

Учреждение образования  
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

**С. В. Ребко**

# **ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДРЕВЕСНЫХ ВИДОВ**

**Курс лекций для студентов специальности 1-75 01 01  
«Лесное хозяйство» специализации 1-75 01 01 06  
«Лесовосстановление и питомническое хозяйство»**

Минск 2014

УДК 602.6:635.054(0.034)  
ББК 43я73  
Р31

Рассмотрен и рекомендован к изданию редакционно-издательским советом Белорусского государственного технологического университета.

**Р е ц е н з е н т ы :**

главный научный сотрудник лаборатории продуктивности и устойчивости растительных сообществ ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси»  
доктор биологических наук *В. В. Сарнацкий*;  
доцент кафедры экологической и молекулярной генетики  
УО «Международный государственный экологический университет им. А. Д. Сахарова» кандидат биологических наук, доцент  
*П. М. Морозик*

**Ребко, С. В.**

Р31 Основы генетической инженерии древесных видов : курс лекций для студентов специальности 1-75 01 01 «Лесное хозяйство» специализации 1-75 01 01 06 «Лесовосстановление и питомническое хозяйство» / С. В. Ребко. – Минск : БГТУ, 2014. – 61 с.

Изучение дисциплины «Основы генетической инженерии древесных видов» ставит своей целью обратить внимание студентов на наиболее важные вопросы конструирования рекомбинантных молекул ДНК методами *in vivo* или *in vitro*, что позволит создавать новые растительные организмы с заданными свойствами, а также ознакомить студентов с теоретическими основами клеточной инженерии и вопросами клонального микроразмножения растений.

УДК 602.6:635.054(0.034)  
ББК 43я73

© УО «Белорусский государственный  
технологический университет», 2014  
© Ребко С. В., 2014

## ВВЕДЕНИЕ

Изучение дисциплины «Основы генетической инженерии древесных видов» ставит своей целью обратить внимание студентов на наиболее важные вопросы конструирования рекомбинантных молекул ДНК методами *in vivo* или *in vitro*, что позволит создавать новые растительные организмы с заданными свойствами. Знание теоретических законов генетической инженерии и овладение ее современными методами обеспечат создание теоретической базы для дальнейшей самостоятельной и плодотворной работы выпускников высших учебных заведений в различных отраслях народного хозяйства, в том числе и лесохозяйственного профиля.

Учебная дисциплина «Основы генетической инженерии древесных видов» занимает достойное место в современной биологии. Использование генетической инженерии в различных областях народного хозяйства, в том числе лесного хозяйства, позволит значительно повысить продуктивность и устойчивость лесов.

Возрастающая роль генетической инженерии в ускорении научно-технического прогресса требует, чтобы ее основами овладели специалисты в разных областях биологии, сельского и лесного хозяйства, медицины и биотехнологии. Поскольку применение селекционно-генетических методов позволяет наиболее эффективно решать вопросы повышения продуктивности и жизнестойкости, в том числе и лесных насаждений, то знание теоретических основ и методов получения рекомбинантных ДНК и получение на их основе новых растительных организмов позволят будущим специалистам применять их на практике для повышения продуктивности и биологической устойчивости искусственно создаваемых насаждений.

# Часть I

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

### Лекция 1

#### ВВЕДЕНИЕ В ДИСЦИПЛИНУ «ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДРЕВЕСНЫХ ВИДОВ»

##### 1.1. Сущность и задачи генетической инженерии

К началу 70-х гг. XX в. стали известны основные фундаментальные генетические процессы, протекающие в клетках. Удалось установить принципы репликации, рекомбинации, трансляции и репарации генетического аппарата клеток. Была сформулирована центральная догма биологии, согласно которой генетическая информация передается от ДНК к РНК и далее к белку, идентифицирована информационная РНК, расшифрован генетический код, а также выявлены ферменты, для которых нуклеиновые кислоты являются субстратом, открыты явления трансдукции, трансформации и конъюгации у бактерий, изучены некоторые вирусы и плазмиды и многое другое.

Все это привело к созданию новой области молекулярной биологии – генетической инженерии. Годом рождения генетической инженерии является 1972, когда были созданы первые рекомбинантные молекулы ДНК *in vitro*. Американский ученый П. Берг в 1980 г. получил за эту работу Нобелевскую премию. Методология рекомбинантных ДНК стала основой генетической инженерии. Но наряду с этим в круг интересов генетической инженерии входят вопросы клонирования, переноса генетического материала в реципиентные клетки (трансгеноз), культивирование клеток *in vitro*, экспрессия трансгенов в реципиенте, изучение новых признаков у трансгенных организмов.

Генетическая инженерия изучает проблемы направленного конструирования живых существ с заданными наследственными признаками и свойствами. Методология генетической инженерии позволяет создавать функционально активные генетические структуры *in vitro* из фрагментов геномов различных организмов, вводить такие рекомбинантные или гибридные молекулы в клетку, создавая условия для экс-

прессии в ней введенных чужеродных генов, получать любые организмы, в том числе растения с новыми признаками и свойствами.

Таким образом, одной из главных задач генетической инженерии растений является создание трансгенных растений, представляющих ценность для селекционной работы, растений, способных очищать почву от техногенных загрязнений, и многих других типов трансгенных растений, представляющих практическое значение.

## 1.2. Основные направления и методология генетической инженерии

Основными составляющими методологии генетической инженерии являются: конструирование и клонирование рекомбинантных ДНК, создание трансгенных организмов и их молекулярно-генетический анализ. Методология генной инженерии или, как ее часто называют, ДНК-технологии, являясь главным инструментарием исследований по геномике, имеет огромное прикладное значение. ДНК-технологии представляют основу новейших биотехнологий. Можно выделить два главных направления прикладного использования ДНК-технологий:

- создание генетически модифицированных, или генно-инженерных, организмов (ГМО, или ГИО);
- молекулярно-генетическое картирование геномов и отдельных генов для целей селекции, изучения и сохранения биологического разнообразия.

В рамках первого направления осуществляется:

- создание ГИО, или ГМО, с целью улучшения свойств и признаков модифицируемого организма для направленного размножения и использования желательных генотипов (например, создание новых сортов растений, обладающих высокой урожайностью, качеством зерна, устойчивых к вредителям и болезням и т. д.);
- создание новых форм организмов в целях получения «биореакторов» – организмов, синтезирующих высокий уровень собственных вторичных метаболитов или не свойственных ему чужеродных продуктов (например, трансгенные растения или животные, синтезирующие белки человека – интерферон, гормон роста, лактоферин и др.).

В основе получения ГИО лежит методология генетической трансформации (трансгеноз) клеток бактерий, растений и животных. Для осуществления генетической трансформации требуются следующие условия:

- наличие нужного гена для переноса в реципиентный организм;
- эффективная система переноса гена в клетки реципиента;

– наличие соответствующего реципиентного организма или его клеток, способных интегрировать чужеродный генетический материал (ген) в свой геном и стабильно его наследовать в поколениях.

Важной проблемой является создание эффективно регенерирующей культуры клеток *in vitro*, поскольку, как оказалось, эффективность культуры часто зависит от генотипа сорта или даже линии того или иного растения. Поэтому в каждом конкретном случае требуется предварительная отработка метода культивирования, подбор соответствующего экспланта. Наряду с этим большое значение имеет также стабильность получаемых трансформантов и эффективность экспрессии трансгена, что зависит от правильного подбора вектора, метода введения и системы отбора трансформантов.

В основе методологии генетической инженерии лежит процесс генетической трансформации. Под генетической трансформацией понимают направленную модификацию генома клетки с помощью ДНК из клеток другого организма, которая интегрируется в геном модифицируемой (реципиентной) клетки. Процесс генетической трансформации довольно сложный. Он включает несколько этапов и требует определенных условий для своего осуществления: наличия трансформирующей ДНК (гена), «компетентных» клеток реципиента, способных регенерировать в целый организм, эффективной системы переноса донорной ДНК и ее способности к интеграции и экспрессии в новом организме.

В общем виде процесс получения трансгенных растений можно описать следующим образом: выделяется интересующий исследователя ген (ДНК), ген встраивается в специально сконструированную молекулу ДНК – так называемый вектор, вектор переносят каким-либо способом в клетки растения, где происходит встройка целевого гена в геном клеток. На специальной селективной среде из трансформированных клеток осуществляют регенерацию трансгенных растений, которые затем подвергаются молекулярно-генетическому анализу с тем, чтобы окончательно убедиться, что получены трансформанты.

Таким образом, методология создания генетически модифицированных растений имеет следующие этапы: поиск, идентификация и клонирование нужных генов; создание специальных векторных молекул для переноса генов; генетическая трансформация, включающая: а) культивирование клеток или тканей и регенерацию растений *in vitro*; б) систему переноса вектора с целевым геном в клетки трансформируемого растения; в) молекулярно-генетический анализ трансгенных растений и их биотестирование.

### 1.3. Достижения генетической инженерии

Открытие и изучение фундаментальных принципов культуры *in vitro* изолированных клеток, тканей и органов растений в 60–80-х гг. XX в. сыграло решающую роль в появлении нового научного направления в биологии – биотехнологии растений. В этой области основными методами являются культуры *in vitro* и генетическая трансформация растений. Успехи в области генетической инженерии активно используются для дальнейшего более глубокого изучения фундаментальных процессов жизни, а также разработки различного рода биотехнологий для лесного хозяйства, экологии, промышленности. К началу XXI в. в мировом генбанке уже имелось более 400 полностью секвенированных геномов организмов, включая 378 вирусов, а также бактерии, дрожжи, плазмиды и органеллы. Закончено определение нуклеотидного состава ДНК генома человека, что позволит резко ускорить идентификацию генов, эффективно лечить и предупреждать многие болезни человека.

Биотехнологии ныне являются одним из научно-практических приоритетов XXI в. Биотехнологические процессы базируются на использовании биотехнологического потенциала клеток, тканей и органов растений на искусственных питательных средах. В настоящее время во многих странах мира развитию биотехнологии придается первостепенное значение в силу ряда преимуществ перед другими видами технологий: биотехнологические процессы обладают низкой энергоемкостью, почти безотходны, экологически чисты. Биотехнологическая продукция на мировом рынке уже в 2004 г. оценивалась в 162 млрд. дол. США, в 2010 г. объем рынка превысил 2 трлн. дол. США, в 2014 г. – 4 трлн. дол. США.

Технологии клонального микроразмножения и генетической трансформации применяют как в селекционной работе, так и при производстве посадочного материала. Фирмы и научно-исследовательские институты многих стран ведут интенсивную работу по созданию, испытанию и коммерческой реализации более 30 видов генетически модифицированных растений с трансгенами, придающими растениям такие новые свойства, как устойчивость к различным болезням, вредителям, гербицидам; переносимость жары, холода, засухи, улучшенное качество продуктов.

Созданы трансгенные растения-продуценты различных веществ для парфюмерии, фармакологии; генетически модифицированные животные, производящие ценные продукты, как, например, коровы, которые дают молоко, содержащее моноклональные антитела или человеческие белки – гемоглобин, лактоферин; трансгенные свиньи, козы, кролики, мыши, продуцирующие лекарственные вещества против инфекционных заболеваний, тромбоза, гемофилии, малярии, диабета.

Фирма Monsanto (США) уже в начале 90-х гг. XX в. выпустила на рынок первые трансгенные сорта картофеля (New Leaf), устойчивого к колорадскому жуку; хлопка (Ball Gard), устойчивого к насекомым и вирусным болезням; кукурузы (Yield Gard), устойчивой к гербициду глифосату и кукурузному мотыльку. Фирма Calgene выпустила на рынок сорт томатов, которые могут долго храниться, а также растения рапса с увеличенным содержанием жирной кислоты лаурата, используемой для производства моющих веществ, шампуней и косметики. Сотрудниками холдинга ArboGen Inc. (США) уже к 2006 г. создали около 2000 генетически улучшенных форм ели и сосны с повышенной продуктивностью (на 50–100% в сравнении с исходными формами), переданных в производство. В Канаде аналогичные работы проводятся фирмой CellFor Inc., которая одна из первых в мире начала применять метод соматического эмбриогенеза для производства искусственного посадочного материала (пихта, сосна, ель, лиственница).

Наиболее передовым достижением методов биотехнологии в лесной отрасли являются технологии ускоренного создания высокопродуктивных форм лесных древесных растений путем генетической трансформации. До стадии коммерческого использования доведены трансгенные древесные породы, в частности тополь с повышенной устойчивостью к вредителям (формы с геном Vt-токсина), специфической устойчивостью к гербицидам (на основе фосфинотрицина и глифосата), модифицированным составом лигнинов, устойчивостью к фитопатогенам, мужской стерильностью. Лидерами в сфере коммерциализации трансгенных лесных пород являются США, Канада, Бразилия, Китай. В Новой Зеландии, Австралии и Бразилии созданы формы эвкалипта, продуктивность которых превышает произрастающие в аналогичных естественных условиях насаждения в 2–2,5 раза. Эти формы используются при закладке лесных плантаций.

Самым большим достижением лесоводства XX в. в Швеции считается использование при лесоразведении канадского интродуцента – сосны скрученной, превосходящую по скорости роста сосну обыкновенную на 60%. За последние 30 лет в Швеции созданы насаждения из сосны скрученной на площади более полумиллиона гектаров.

В Республике Беларусь биотехнологические методы размножения растений используют при создании культур быстрорастущих форм березы и осины для создания топливно-энергетических плантаций. Ежегодные объемы площадей плантаций для обеспечения нужд народного хозяйства должны составлять 1,5 тыс. га. Для массового получения посадочного материала используют методы клонального микроразмножения.

## Лекция 2

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

### 2.1. Строение и свойства ДНК

Основным объектом исследований в генетической инженерии являются молекулы наследственного вещества – нуклеиновые кислоты. Впервые нуклеиновые кислоты открыл в 1869 г. австрийский ученый Ф. Мишер. Он установил, что в ядрах гнойных клеток человека содержится необычное соединение, в которое входит фосфор, и назвал это вещество нуклеином (нуклеос – ядро). Поскольку вещество обладало кислотными свойствами, Ф. Мишер назвал его нуклеиновой кислотой. Однако то, что нуклеиновая кислота хранит в себе наследственную информацию, было твердо доказано лишь почти 100 лет спустя. Все это время велись исследования природы ее химических составляющих и связи между ними. Было установлено, что существует два типа нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и рибонуклеиновая кислота (РНК).

Нуклеиновые кислоты представляют собой макромолекулы, образованные повторяющимися структурами – нуклеотидами. Каждый нуклеотид состоит из циклического азотсодержащего соединения: основания, сахара пентозы и фосфорной кислоты. В нуклеиновой кислоте всегда имеются 4 азотистых основания. В ДНК это тимин, цитозин, аденин и гуанин, а РНК вместо тимина включает урацил.

Пространственная или вторичная конфигурация молекулы ДНК, установленная в 1953 г. Д. Уотсоном и Ф. Криком, состоит из двух цепей и образует правозакрученную спираль, в которой две полинуклеотидные цепи закручены вокруг одной оси и удерживаются друг возле друга неполярным (стэкинг) взаимодействием между параллельно уложенными основаниями. Специфичность спаривания оснований обеспечивается водородными связями. Порядок чередования нуклеотидов взаимообусловлен, т. е. напротив аденина (А) всегда должен стоять тимин (Т), а напротив гуанина (Г) – всегда цитозин (Ц).

Вводящие в ДНК основания интенсивно поглощают ультрафиолетовый свет в области длин волн 260–290 нм. Это свойство обусловлено наличием в основаниях сопряженных двойных связей. Если ДНК не разрушенная и достаточно чистая, она поглощает ультрафиолетовый свет в области 260 нм. С помощью повышенной температуры или воздействи-

ем других факторов (например, pH) можно вызвать разрыв водородных связей между основаниями и таким образом разделить две цепи ДНК. Это явление называется денатурацией, или плавлением, ДНК. Обычно денатурация ДНК наступает при повышении температуры раствора до 90–100°C или pH выше 9. При понижении температуры (50–60°C) две отдельные комплементарные цепи нуклеиновой кислоты способны воссоединяться с образованием исходной структуры, что исключительно важно для реализации генетической информации генома *in vivo*.

В ДНК сосредоточена вся информация, необходимая живому организму для его жизнедеятельности, роста, развития, размножения. Любой процесс, происходящий в клетках организма, обусловлен или связан с генетической информацией, записанной в ДНК.

Основополагающими процессами, в которых участвует ДНК, являются репликация, транскрипция, трансляция РНК, репарационный, рекомбинационный и мутационный процессы.

## 2.2. Строение, типы и свойства РНК

В отличие от ДНК, в которой закодирована вся генетическая информация, молекулы рибонуклеиновой кислоты (РНК) осуществляют внутриклеточную транспортировку и преобразование этой информации в последовательности аминокислот, составляющих тот или иной белок. Все клеточные РНК – одноцепочечные молекулы. Транспортная РНК выполняет функцию доставки аминокислот к рибосомам и участвует в процессе синтеза белка. Рибосомная РНК накапливается в ядрышках, затем поступает в цитоплазму, где входит в состав рибосом. Информационная (матричная) РНК составляет около 5% всей клеточной РНК. Ее роль заключается в переписывании наследственной информации с участка ДНК (гена) и переносе этой информации на рибосомы.

## 2.3. Механизм репликации ДНК

В настоящее время механизм репликации ДНК изучен достаточно хорошо. Механизм репликации – довольно сложный процесс, состоящий из ряда этапов, осуществление которых обеспечивается несколькими ферментами.

Процесс репликации начинается с разрыва фосфодиэфирной связи в определенной точке ДНК, что обеспечивает расплетание нитей спирали с помощью фермента геликазы. Образуется так называемая

вилка репликации. Начиная с этой точки, репликация идет в одном или обоих направлениях. Репликация хромосом эукариот обычно начинается одновременно во многих точках, расположенных в различных местах хромосомной ДНК, что обеспечивает высокую скорость удвоения эукариотических хромосом.

В расплетании нитей ДНК участвует также белок В, который присоединяется к обеим нитям. Затем с помощью ДНК-полимеразы I и III начинается синтез новых цепей, сначала так называемой запаздывающей, а затем лидирующей цепи. Для того чтобы ДНК-полимераза начала достраивать новую цепь, требуется еще один фермент – праймаза, который к цепи-матрице пристраивает несколько рибонуклеотидов (отрезок РНК), так называемую затравку. Затем от 3'-конца затравки ДНК-полимераза III начинает синтез цепи ДНК в 5'–3'-направлении. Позже РНК-затравка удаляется, и на ее место встраиваются дезоксирибонуклеотиды, комплементарные ДНК-матрице.

Таким образом, в результате репликации ДНК обеспечивается материальная непрерывность наследственного вещества клетки.

## 2.4. Процесс транскрипции ДНК

Реализация наследственной информации, заключенной в нуклеотидной последовательности ДНК, в последовательность аминокислот соответствующей белковой цепи начинается с переписывания ее в РНК. Процесс переписывания нуклеотидов того или иного гена с ДНК в РНК называется транскрипцией. Транскрипция – это один из важнейших механизмов, контролирующих экспрессию генов. Он включает в себя процессы регуляции и модуляции и состоит из ряда высокоспецифичных этапов. Транскрипция осуществляется с помощью фермента ДНК зависимой РНК-полимеразы. Это сложный белок, состоящий из нескольких полипептидов ( $2\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\sigma$ ), выполняющих определенные функции в процессе синтеза иРНК.

У эукариот имеется три типа РНК-полимераз, ответственных за синтез различных классов РНК. Так, РНК-полимераза I транскрибирует гены, кодирующие рибосомные РНК; РНК-полимераза II синтезирует информационную, или матричную, РНК; РНК-полимераза III ответственна за синтез тРНК и других мелких ядерных РНК.

Условно процесс транскрипции можно разделить на три этапа: инициацию, элонгацию и терминацию.

**Инициация.** Инициация транскрипции осуществляется с определенного участка ДНК, который называется промотором. Заканчивается

транскрипция последовательностями нуклеотидов, называемых терминатором.

**Элонгация.** После связывания РНК-полимеразы с промотором участок ДНК перед стартовой точкой расплетается и начинается синтез РНК. Рост цепи иРНК происходит путем присоединения рибонуклеозидмонофосфатов к 3'-концу цепи. Транскрипция у эукариот обычно происходит в пределах участка ДНК, представляющего собой один ген.

**Терминация.** Окончание транскрипции ДНК в РНК связано с наличием в конце каждого гена специфической терминирующей последовательности. Эти последовательности распознаются РНК-полимеразой в присутствии так называемого *p*-фактора (белка с молекулярной массой 50 000 дальтон). В момент, когда РНК-полимераза останавливается стоп-сигналом, *p*-фактор сбрасывает ее с ДНК. Терминатор представляет собой последовательность оснований, которая прочитывается одинаково в обеих цепях ДНК, но в противоположных направлениях. Такие структуры называются палиндромами.

Рассмотрим более подробно, каким же образом происходит перевод с 4-буквенного языка нуклеотидов на 20-буквенный язык аминокислот, образующих первичную структуру белков. Такая информационная связь осуществляется с помощью генетического кода. Установлено, что считывание информации идет триплетами. Единица генетической информации, определяющая, какая из аминокислот будет встраиваться в синтезирующуюся молекулу белка, называется кодоном. В дальнейших исследованиях установлено, какие кодоны (триплеты) соответствуют конкретным аминокислотам и как осуществляется пунктуация кода. В 1966 г. генетический код был полностью расшифрован. Из 64 возможных триплетов 61 кодирует аминокислоты, а три триплета служат стоп-сигналами, обозначающими конец считывания информации (трансляции).

Генетический код является триплетным, он также характеризуется вырожденностью, т. е. одной аминокислоте, как правило, соответствуют два и более кодона (за исключением метионина и триптофана).

## 2.5. Трансляция РНК

Трансляция – это перевод информации, заложенной в нуклеотидной последовательности информационной РНК, в последовательность аминокислотных остатков белка. Процесс трансляции также можно разделить на три последовательные стадии: инициацию, элонгацию и терминацию. На первой стадии иРНК присоединяется к малой субъ-

единице рибосомы при участии специальных белковых факторов инициации и в присутствии ионов  $Mg^{2+}$ . Трансляция начинается с иницирующего стартового кодона АУГ, к которому подсоединяется транспортная РНК своим антикодоном. Первая тРНК обычно несет на своем противоположном конце у бактерий аминокислоту формилметионин, а у высших организмов – метионин.

Во взаимодействии с рибосомой важную роль играет участок иРНК перед стартовым кодоном. У эукариот на 5'-конце иРНК необходимо присутствие так называемого «кэпа» – 7-метилгуанозина. Наличие таких «кэпов» на РНК-предшественнике защищает иРНК от разрушения нуклеазами, а также обеспечивает ее узнавание рибосомами. Рост полипептидной цепи продолжается до тех пор, пока один из трех терминирующих кодонов на иРНК (УАГ, УАА, УГА) не войдет в рибосому (терминация). Обычно на одной молекуле иРНК работает не одна рибосома, а несколько и даже много, образуя так называемые полисомы. Таким образом, одна молекула иРНК, проходя через ряд рибосом, может обеспечить многократный синтез одной и той же молекулы белка.

Образование цепочки аминокислот в процессе трансляции – это только самый первый этап в формировании большинства белков. Цепочки полипептидов затем образуют соответствующие вторичные и третичные структуры, а также могут соединяться с другими полипептидами в олигомерные комплексы с определенными функциональными свойствами.

Могут происходить и иные модификации: карбоксилирование, гидроксिलирование, фосфорилирование, гликозилирование и другие превращения. Образующиеся белки должны быть транспортированы к определенным местам в клетке для выполнения своих функций. У эукариот это различные мембраны, органеллы, митохондрии, хлоропласта, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и др.

Для доставки белков к местам назначения в клетках эукариот имеется сложный транспортный аппарат, который пока недостаточно изучен.

## Лекция 3

# КОНСТРУИРОВАНИЕ И КЛОНИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ МОЛЕКУЛ ДНК

### 3.1. Ферменты, используемые в генетической инженерии

Конструирование и клонирование рекомбинантных молекул ДНК выполняют главную роль в создании трансгенных растений. Чтобы создать гибридную или рекомбинантную молекулу ДНК, т. е. химерную молекулу, содержащую два и более новых фрагмента ДНК и сочетающую в себе новые генетические свойства, требуется каким-то образом сначала получить нужные фрагменты, а затем соединить их. Эти манипуляции с ДНК в лабораторных условиях стали возможным благодаря открытию большого класса ферментных систем, которые широко распространены в природе и эффективно участвуют в осуществлении различных молекулярных процессов в любой клетке.

Рестрикционные эндонуклеазы, или рестриктазы, являются своеобразными молекулярными ножницами, без которых сейчас нельзя обойтись ни в одном генно-инженерном эксперименте. Еще в 1953 г. было обнаружено, что бактерии способны разрушать чужеродную ДНК, проникающую в клетку. Как выяснилось, гидролиз чужеродной ДНК осуществляют специфические ферменты – эндонуклеазы, которые связываются с чужеродной ДНК в определенных участках – сайтах узнавания – и расщепляют ее на фрагменты. Эти ферменты назвали рестриктазами. Прежде чем «разрезать» ДНК, фермент находит определенное сочетание нуклеотидов, специфическое для узнавания только данного фермента.

Первая рестриктаза, обладающая высокой рестрикционной специфичностью, была выделена в 1970 г. из бактерий. Сейчас имеется более 400 различных рестрикционных эндонуклеаз. Для их обозначения предложена определенная система знаков. Название рестриктаза складывается из первой буквы рода бактерий и двух первых букв вида, из которых выделены ферменты. Например, рестриктаза, полученная из сенной палочки *Bacillus subtilis* обозначается как *Bsu*, из кишечной палочки *Escherichia coli* – *Eco*.

Если же из бактериального штамма выделено несколько рестриктазных ферментов, то вводится дополнительно числовое значение. Например, из *Haemophilus aegyptius* выделено три фермента и они

обозначаются как *Hae I*, *Hae II* и *Hae III*. Если фермент кодируется фаговыми или плазмидными генами, то тогда добавляется еще название этих внехромосомных элементов. Например, *Eco RI* и *Eco RV* относятся к рестриктазам, кодируемым соответственно плазмидой R и фагом P1.

Рестриктазы разрезают ДНК в сайтах узнавания, имеющих длину 4, 6 и 20 нуклеотидов, на фрагменты определенной длины со специфическими последовательностями нуклеотидов на концах.

Многие рестриктазы расщепляют нити ДНК в смещенных относительно друг друга местах. В результате возникают фрагменты ДНК с короткими (4–6 нуклеотидов) одноцепочными участками на концах (таблица).

**Рестриктазы и расщепляемые ими последовательности**

Символ	Микроорганизм, из которого выделен фермент	Сайт узнавания на ДНК	Концы фрагментов
<i>Bam I</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	5-Г <sup>↓</sup> ГАТЦЦ-3 3-ЦЦТАГ <sup>↑</sup> Г-5	5-липкие
<i>Eco RI</i>	<i>Escherichia coli RY13</i>	5-Г <sup>↓</sup> ААТТЦ-3 3-ЦТТАА <sup>↑</sup> Г-5	5-липкие
<i>Hind III</i>	<i>Haemophilus influenza Rd.</i>	5-А <sup>↓</sup> АГСТТ-3 3-ТТЦГА <sup>↑</sup> Г-5	5-липкие
<i>Eco RV</i>	<i>Escherichia coli</i>	5-ГАТ <sup>↓</sup> АТЦ-3 3-ЦТА <sup>↑</sup> ТАГ-5	тупые
<i>Pst I</i>	<i>Providencia stuarti 164</i>	5-ЦТГСА <sup>↓</sup> Г-3 3-Г <sup>↑</sup> АЦГТС-5	3-липкие

Некоторые рестриктазы режут обе цепи ДНК в одном месте, образуя фрагменты одинаковой длины без выступов. В первом случае образующиеся хвосты называют липкими концами, а во втором – тупыми. Это важно помнить, поскольку технология создания рекомбинантных ДНК зависит от типа образующихся при рестрикции фрагментов ДНК. В зависимости от размера сайта узнавания рестриктазы подразделяют на мелко- и крупнощепляющие. Чем короче сайт узнавания, тем больше разрывов образуется в молекуле ДНК и наоборот. Это связано с тем, что вероятность встречаемости определенной последовательности, например, из 4 нуклеотидов гораздо выше, чем последовательности из 6 нуклеотидов.

Есть рестриктазы, узнающие на ДНК одинаковые сайты. Их называют изошизомерами. Например, для *Eco RI* известно 2 изошизомера – *Atu I* и *Apu I*, для *Bam HI* известно 8 изошизомеров, для *Hae III* – 19.

### 3.2. Создание рекомбинантных молекул ДНК

Эра генетической инженерии началась с создания П. Бергом в 1972 г. первой рекомбинантной молекулы ДНК. Создание химерных молекул стало возможным благодаря тому, что к этому времени не только были накоплены знания, но и разработан необходимый инструментарий. Рекомбинантная молекула представляет собой сконструированную *in vitro* новую последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК путем соединения двух или более негомологичных выделенных из разных источников фрагментов ДНК. Конструирование рекомбинантной молекулы осуществляется в несколько этапов. Прежде всего потребуется последовательность, которую мы хотим вставить (вставка) и молекула ДНК – вектор, в которую предполагается интегрировать вставку. Затем с помощью фермента лигазы необходимо соединить вставку с векторной молекулой. Рекомбинантную молекулу в дальнейшем амплифицируют путем репликации, клонируют и отбирают на селективной среде.

**Получение вставок ДНК.** Наиболее простой способ получения вставок ДНК заключается в расщеплении суммарной геномной ДНК какого-либо организма с помощью рестриктаз. При этом образуется уникальный набор фрагментов ДНК с липкими или тупыми концами в зависимости от использованной рестриктазы. Для того чтобы из полученного пула фрагментов выбрать необходимый, проводится обогащение смеси нужными фрагментами методом электрофореза или жидкостной хроматографии. Если размер генома небольшой, то образуется небольшое число хорошо разделяющихся фрагментов, которых можно легко выделить. В случае расщепления крупного генома чаще всего получают непрерывный набор фрагментов разных размеров («шмер»). В этом случае проводят идентификацию нужного фрагмента методом гибридизации с меченым зондом. В качестве зонда используется известная гомологичная ДНК, кДНК, мРНК, иРНК и др.

**Лигирование фрагментов ДНК.** После того как получена вставка и вектор, приступают непосредственно к конструированию рекомбинантной молекулы ДНК. Процесс встройки вставки в вектор зависит от того, какие концы, липкие или тупые, имеют объединяемые молекулы. При этом возможно несколько ситуаций: полностью совпадают липкие концы; тупые концы; пара совпадающих липких и пара тупых концов. Если полученный фрагмент ДНК, или вставка, имеет липкие концы, то и вектор, в который предполагается интегрировать

вставку, может быть расщеплен той же рестриктазой. В этом случае у вставки и вектора образуются комплементарные концы, которые будут спариваться при контакте.

Сшивки молекул ДНК с тупыми концами также может осуществляться с помощью ДНК-лигазы. Однако в этом случае требуется высокая концентрация фермента, а эффективность сшивки низкая из-за слабого сродства лигазы к тупым концам.

### 3.3. Клонирование рекомбинантных молекул ДНК

Сконструированные в пробирке уникальные гибридные молекулы ДНК требуется размножить или клонировать. Для осуществления молекулярного клонирования рекомбинантная молекула ДНК должна представлять собой молекулу, способную переноситься и реплицироваться в соответствующих реципиентных клетках. Такие молекулы ДНК называют переносчиками, или векторами. Векторы – это молекулы, способные переносить, размножать и хранить генетическую информацию.

В природе векторами являются небольшие по размерам молекулы ДНК плазмид, вирусов и фагов. Непосредственно в качестве вектора их не используют. Для того чтобы они отвечали указанным требованиям, их соответствующим образом перестраивают.

Наиболее широкое распространение получили векторы на основе плазмид. Плазмиды – это внехромосомные генетические элементы бактерий, состоящие из двунитевых кольцевых молекул ДНК размером от 1 до 200 тыс. пар нуклеотидов (т. п. н.). Это самостоятельные репликоны, т. е. они могут размножаться в клетке бактерии независимо от клеточной хромосомы. Поэтому число копий плазмиды может варьировать в клетке от 1 до 200 шт. Плазмиды придают бактериям новые свойства, например устойчивость к антибиотикам, и позволяют вести селекцию бактерий, в которых содержится та или иная плазида. Широкое распространение получил плазмидный вектор pBR3222, он содержит 2 гена устойчивости к антибиотикам – тетрациклину и ампициллину, а также сайты узнавания для нескольких рестриктаз: *Hind* III, *Sal* I, *Bam* HI, *Eco* RI, *Pst* I. В данной конструкции сайт узнавания для трех рестриктаз (*Hind* III, *Sal* I, *Bam* HI) расположен в ДНК гена устойчивости к антибиотикам тетрациклину, а для рестриктазы *Pst* I – в гене устойчивости к ампициллину. Это позволяет вести отбор клеток бактерий, в которые введена такая рекомбинантная плазида, по устойчивости к антибиотикам. Если фрагмент чужеродной ДНК введен в один из генов

устойчивости (например, тетрациклин), то он инактивируется и у бактерий исчезнет устойчивость к тетрациклину. Поэтому клетки, которые не будут выживать на питательной среде, содержащей антибиотик тетрациклин, будут нести рекомбинантную плазмиду.

Плазмидные векторы вводятся в реципиентные клетки методом генетической трансформации. Широкое распространение для клонирования векторных ДНК получила трансформация клеток кишечной палочки. Для введения ДНК в бактерии используют хлористый кальций. Для этого берут клетки растений в фазе интенсивного роста, помещают в раствор, содержащий хлористый кальций (0,05 М), и выдерживают при  $t = 0^{\circ}\text{C}$  в течение 40 мин.

К клеткам бактерии добавляют ДНК и продолжают инкубировать при такой же температуре еще 30 мин. Затем бактерии переносят в раствор с  $t = 42^{\circ}\text{C}$  и выдерживают 10–20 мин. После этого клетки высевают на селективную среду. Эффективность трансформации клеток при этом довольно высокая. Например, при трансформации клеток кишечной палочки плазмидой рBR322 может образоваться более 100 млн. успешно трансформированных клеток на 1 мкг плазмидной ДНК. Если в плазмиду введена чужеродная вставка, эффективность трансформации снижается в 10–100 раз.

После трансформации образуются популяции самых разных клеток либо популяции вирусов или бактериофагов. Одни клетки в популяции содержат нужные рекомбинантные молекулы, другие несут рекомбинанты, содержащие нежелательные вставки или векторы вообще без вставок, третьи в случае плазмид могут представлять собой неизмененные клетки. Могут встречаться многие другие рекомбинационные варианты. Поэтому после осуществления трансформации требуется провести идентификацию рекомбинантов.

Для успешного клонирования все трансформированные или инфицированные клетки высевают так, чтобы они полностью были изолированы одна от другой и каждая могла дать начало отдельной колонии (клону). В случае плазмидных векторов клетки высевают на агар, содержащий селективный агент. Если же клетки инфицированы фаговыми векторами, то их высевают на газоне чувствительных клеток, на котором в результате инфицирования соседних клеток образуются фаговые бляшки. На селективной среде ведут отбор трансформантов по селективному маркеру, который имеется на векторе. Если вектор содержал ген устойчивости к антибиотику ампициллину, то в среду добавляют этот антибиотик и все выжившие клетки будут содержать данный вектор. Однако в этом случае остается неясным, несет ли ото-

бранная колония клеток вектор с фрагментом чужеродной ДНК или нет. Для того чтобы выяснить, несут ли клетки рекомбинантную ДНК, существует ряд подходов. Например, клон клеток, содержащий векторную плазмиду, можно проверить методом электрофореза. Для этого из клона клеток выделяют плазмиду и путем электрофореза в агарозном геле определяют ее молекулярную массу. Сравнивая местоположение полос в геле, легко можно определить, содержит ли трансформированный клон обычную или рекомбинантную плазмиду.

Если вектор является рекомбинантной молекулой, он будет иметь большую молекулярную массу и в геле будет занимать более высокое положение по сравнению с обычной плазмидой. При этом можно установить даже размер вставки, если электрофорезу подвергнуть специальный метчик, например ДНК фага лямбда, или рестрицированный предварительно на фрагменты участок известной молекулярной массы. Наличие чужеродного фрагмента ДНК в векторной плазмиде можно определить методом фенотипического отбора. Если при создании рекомбинантной плазмиды вставку встраивали в маркерный ген антибиотикоустойчивости (к тетрациклину), то происходило нарушение структуры гена и он не мог нормально экспрессироваться. На селективной среде с тетрациклином такие трансформанты не выживают.

Для того чтобы не потерять рекомбинантные клоны, реципиентные клетки после трансформации вначале выращивают на полной среде без антибиотика, а затем делают реплики на селективную среду. Для обнаружения специфических вставок можно применять метод гибридизации с радиоактивным зондом. Этот метод удобно использовать для скрининга большого числа колоний, содержащих плазмиды, а также фаговые бляшки. При этом бактериальные колонии или бляшки переносят с агара на иммобилизованную подложку, например нитроцеллюлозный фильтр, и подвергают ДНК денатурации. Затем фильтр инкубируют в растворе, содержащем денатурированный  $^{32}\text{P}$  меченый зонд, с целью ренатурации комплементарных цепей. Если колония или бляшка содержит ДНК, комплементарную зонду, то на радиоавтограмме в соответствующем месте будет темное пятно. Главное при использовании данного метода скрининга колоний – наличие нужного зонда. В качестве зондов могут использоваться высокоочищенные иРНК, гомологичные ДНК или кДНК.

## Лекция 4

# ВЕКТОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ПЕРЕНОСА ГЕНОВ

### 4.1. Свойства векторов

Чтобы перенести клонированный ген в геном реципиентной клетки, создаются *in vitro* специальные переносчики – рекомбинантные молекулы ДНК, или векторы (от лат. *vector* – везущий, несущий). Вектор – это молекула ДНК, способная самостоятельно реплицироваться в клетках различных организмов и обеспечивать размножение (клонирование) и работу (экспрессия) встроенного в нее искусственно какого-либо гена. Вектор, кроме целевого гена, должен содержать все необходимые элементы для его репликации и интеграции в геном реципиента, а также иметь регуляторные элементы для экспрессии гена и селективные маркеры, с помощью которых ведется отбор трансформантов. Для эффективного выполнения своей роли вектор должен отвечать определенным требованиям: быть репликоном (обладать способностью автономно размножаться в клетках реципиента), чтобы стабильно существовать в клетке; иметь селективный маркер (легко отделяться от ДНК реципиента); иметь в каждой молекуле минимальное количество сайтов узнавания для конкретной рестриктазы.

Наиболее подходящими кандидатами на роль векторов являются естественные репликоны небольших размеров – ДНК плазмид, вирусов, в том числе и фагов, митохондрий, хлоропластов. Однако эти природные молекулы ДНК редко используются непосредственно в качестве векторов. Их предварительно модифицируют или комбинируют для того, что они отвечали перечисленным выше требованиям.

Конкретные свойства векторов определяются целью клонирования генов. Поэтому большинство векторов носит специализированный характер, т. е. их приспособляют для решения узкого круга задач. Есть, например, векторы для амплификации рекомбинантной ДНК, векторы с регулируемой и нерегулируемой экспрессией генов, интегративные (перенос и интеграция ДНК в хромосому хозяина).

Такие векторы в зависимости от назначения могут иметь: большое число копий ДНК; фенотипические признаки, отличающих их от рекомбинантных ДНК; единичные сайты рестрикции для различных рестриктаз; мощные промоторы, расположенные рядом с сайтами клонирования генов; широкий круг клеток-реципиентов; малый

размер и способность клонирования фрагментов ДНК, длина которых варьирует в широких пределах; возможность легкого вычленения клонируемого гена.

#### 4.2. Векторы на основе агробактериальных плазмид

В 70-х г. XX в. учеными было установлено, что у растений генетическая трансформация может происходить в естественных условиях. Оказалось, что некоторые опухоли двудольных растений, так называемые корончатые галлы, представляют собой результат генетической трансформации растительных клеток, которую вызывает бактерия *Agrobacterium tumefaciens*. Если опухолевые клетки корончатых галлов отделить от растения и посадить на минимальную питательную среду (без фитогормонов), они продолжают хорошо расти, в то время как обычные клетки на такой среде не растут. Это происходит потому, что опухолевые клетки приобрели способность синтезировать в больших количествах нужные для роста гормоны (ауксины и цитокинины). Кроме этого, клетки галлов способны синтезировать специфические аминокислоты – опины (октопин и нопалин).

Генетическая трансформация клеток растений обусловлена плазмидой Ti (*Tumor inducing* – индуцирующая опухоль), расположенной в клетках агробактерий. Плазида Ti – это крупная кольцевая молекула ДНК с молекулярной массой 95–156 млн. дальтон. Характерной ее особенностью является наличие участка T-ДНК (трансформированная ДНК), составляющего 8–15 т. п. н., или 6–10% всего генома плазмиды. Именно T-ДНК переносится в клетки растений, встраивается в растительный геном, и гены, заключенные в ней, заставляют клетку синтезировать не свойственные ей белки.

В плазмиде T-ДНК ограничивается специальными повторяющимися последовательностями (LB и RB) размером по 25 п. н. По этим сайтам и происходит отделение и вставка T-ДНК в ДНК клетки растения. Способность интегрироваться и экспрессироваться в растительных клетках дает возможность использовать плазмиду Ti в качестве вектора для переноса различных генов в растения. Содержащиеся в T-ДНК онкогены можно удалить, не нарушив при этом ее способность к трансформации, а вместо удаленных генов вставить чужеродный целевой ген. Плазида Ti является базовым вектором, который может размножаться как в клетках кишечной палочки, так в клетках агробактерий. Чужеродные гены в него вводят через встроенный фрагмент от плазмиды pBR322. Чтобы ввести нужный ген в такой вектор, конструируют еще

так называемый промежуточный вектор. Для этого в pBR322 встраивают чужеродный ген (ген канамициноустойчивости). Такая химерная плаزمида сначала размножается в *E. coli*, а затем вводится с помощью хелперных плазмид в клетки агробактерий, содержащих плазмиду Ti. Там происходит конъюгация между этими плазмидами по гомологичным последовательностям ДНК. Агробактерии с такими плазмидами отбирают по дополнительному селективному маркеру, имеющемуся на промежуточном векторе. Это может быть ген антибиотикоустойчивости. Клетки бактерий, несущие конъюгатные с чужеродным геном плазмиды, размножают и используют для трансформации растений.

### 4.3. Векторы на основе хлоропластной и митохондриальной ДНК

Наряду с векторами на основе плазмиды Ti ведется поиск иных подходов к конструированию векторов для растений. В этом плане интерес представляют ДНК органелл клетки – хлоропластов и митохондрий. Геномы хлоропластов представлены кольцевыми молекулами ДНК длиной 120–210 т. п. н. У двудольных растений, имеющих инвентированные повторы, хлоропластный геном больше, чем у однодольных. Хлоропластную ДНК можно применять в качестве вектора, поскольку она реплицируется и транскрибируется автономно. Фрагмент ДНК хлоропласта, содержащий сайты начала репликации, инициации и терминации транскрипции, можно использовать в качестве вектора для создания рекомбинантной бактериальной плазмиды. Однако такие гены не способны интегрироваться в геном растения и могут существовать в виде эписом, что приведет к нестабильности генома трансгенного растения. Митохондриальная ДНК высших растений характеризуется очень сильным разнообразием. ДНК митохондрий растений различаются не только по размерам, но и по типам. С точки зрения создания новых векторных систем интерес представляют две плазмидоподобные ДНК – S1 и S2. Это линейные молекулы длиной 6,4 т. п. н. (S1) и 5,4 т. п. н. (S2), которые имеют гомологию в пределах 1500 п. н., а также способность инвентировать концевые повторы – 196 и 168 нуклеотидов.

### 4.4. Векторы на основе вирусов растений

В настоящее время известно свыше 300 видов вирусов растений. Вирусы представляют собой примеры естественной генетической инженерии, поскольку инфекция клетки вирусом приводит к появлению

в ней нового генетического материала, экспрессирующегося в хозяине. Для конструирования векторов используют ДНК-содержащие вирусы, которые составляют 1–2% известных вирусов. К их числу относятся прежде всего каулимовирусы, содержащие двунитевую ДНК.

Наиболее детально изученным представителем этой группы является вирус мозаики цветной капусты CaMV (cauliflower mosaic virus), поражающий в основном семейство крестоцветных. Вирус содержит кольцевую молекулу ДНК размером 8 т. п. н.

Для своей репликации CaMV использует механизм обратной транскрипции. ДНК CaMV имеют уникальные сайты рестрикции *Sal* I и *Xho* I. Эти сайты можно использовать для превращения ДНК в линейную форму с последующим встраиванием в плазмидный вектор pBR322. Таким образом, ДНК CaMV может быть клонирована и амплифицирована в клетках *E. coli*. В геноме CaMV выявлены несущественные для жизнедеятельности области. В эти сайты можно интегрировать чужеродную ДНК, что позволяет использовать CaMV в качестве вектора для трансформации растений.

Среди РНК-вирусов потенциальным вектором для трансформации может быть вирус мозаики табака (TMV), представляющий собой однонитевую РНК размером 6400 нуклеотидов и кодирующий 5 белковых продуктов. На его основе сконструирован вектор, в который в место гена, кодирующего белок оболочки, вставляется чужеродный целевой ген.

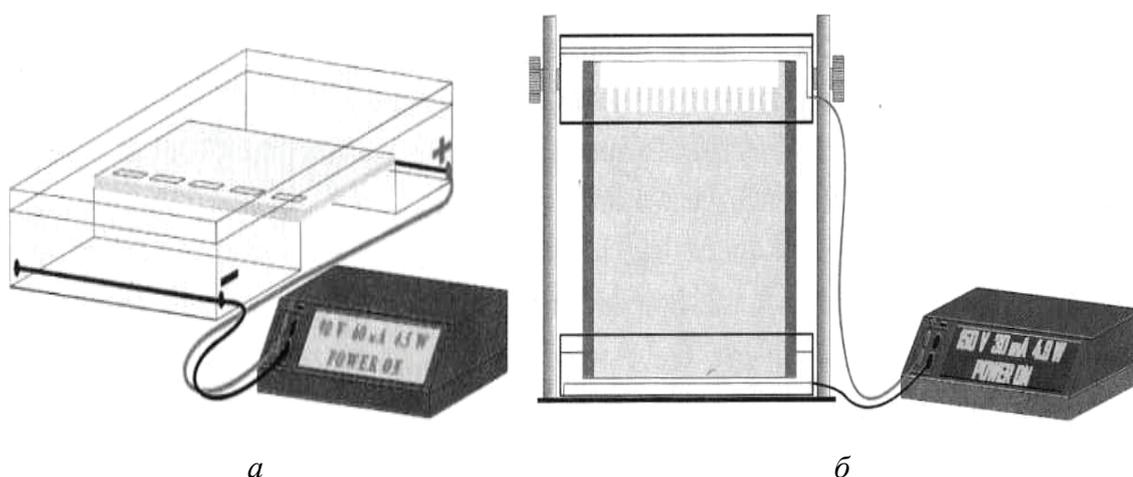
Как потенциальные векторы вирусы имеют ряд положительных характеристик: малый размер генома, позволяющий легко манипулировать вирусной ДНК; высокая копияность в клетках растений (до 50 тыс. на клетку); наличие сильных промоторов, позволяющих обеспечить высокую эффективность экспрессии чужеродных генов.

## Лекция 5

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

### 5.1. Метод электрофоретического анализа ДНК

В ходе манипуляций с различными фрагментами ДНК часто необходимо определить размер или выделить конкретный участок ДНК из смеси. Оказалось, что фрагменты ДНК легче всего разделять с помощью метода электрофореза в агарозном геле. ДНК, обработанную одной или несколькими рестриктазами, помещают в лунку застывшего агарозного геля, который помещается в специальную камеру для электрофореза (рисунок).



*а*

*б*

Электрофоретические камеры:  
*а* – горизонтальная; *б* – вертикальная

Разделение нуклеиновых кислот основано на том, что смесь ДНК под действием электрического поля начинает перемещаться в пористом, похожем на мармелад геле. Скорость продвижения фрагментов ДНК в геле зависит от их длины. Короткие фрагменты движутся быстрее, чем длинные, что позволяет цепочкам ДНК разной длины отделиться друг от друга. При этом фрагменты ДНК не повреждаются и их можно выделить из геля без потери биологических свойств.

Электрофоретическое разделение проводят в вертикальных или горизонтальных электрофоретических камерах. Для агарозных гелей чаще применяется горизонтальные камеры, а для полиакриламидных гелей – как горизонтальные, так и вертикальные типы камер.

Для приготовления агарозного геля агарозу растворяют в электрофоретическом буфере (обычно трис-ЭДТА-боратном или трис-ЭДТА-ацетатном) путем нагревания смеси. Затем горячий раствор заливают в специальную кювету. После полимеризации гель помещают в камеру. С помощью пластмассового шаблона, напоминающего расческу, в геле выдавливают лунки. Далее отсеки камеры наполняют электрофоретическим буфером, чтобы слой буфера над гелем составил 5–7 мм. В лунки геля с помощью пипетки вводят образцы, смешанные с буфером для загрузки, камеру плотно закрывают, подсоединяют электроды и подключают к универсальному источнику питания. Напряжение, сила тока и время подбирают эмпирически.

Для получения полиакриламидных гелей готовят смесь следующего состава: акриламид, N,N-метилен-бис-акриламид, персульфат аммония, TEMED. Реагенты растворяют в гелевом буфере и заливают в специальные формы для дальнейшей полимеризации. После полимеризации в лунки геля с помощью пипетки вводят образцы, смешанные с буфером для загрузки, а сам гель помещается в камеру для проведения электрофореза. Важно знать, что разные рестриктазы дают неодинаковую картину расщепления одной и той же ДНК. Электрофорез в агарозном геле позволяет разделить, а затем легко извлечь любые рестрикционные фрагменты ДНК для последующего использования.

Заключительным этапом электрофоретического анализа является описание выявляемых спектров – определение количества зон и их обозначение. Для типировки каждой фракции используется числовая величина размера (в парах нуклеотидов) фрагментов ДНК, находящихся в данной электрофоретической фракции. Вычисление размера молекул ДНК каждой зоны спектра производится на основании сравнения электрофоретической подвижности данной зоны относительно молекул ДНК с известным размером, т. н. электрофоретическим маркером. Маркер может представлять собой смесь однотипных или различающихся по размерам молекул ДНК.

Следует подчеркнуть, что для каждой фракции маркера известен размер молекул ДНК, которые их составляют. В качестве маркера могут быть использованы рестрикционные фрагменты бактериофагов, искусственно синтезированные цепочки ДНК, ПЦР-продукты с известным размером и др. Анализ и расчет размера фрагментов проводят с помощью специального программного обеспечения. При отсутствии таких программ для маркера в конкретном геле можно самостоятельно составить калибровочную кривую и вычислить размер фракций для других образцов.

## 5.2. Амплификация фрагментов ДНК

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – процесс амплификации (размножения) *in vitro*, при котором фрагмент ДНК длиной до 15 т. п. н. может быть размножен до  $10^8$  раз, т. е. ПЦР способна увеличить количество копий исходной пробы ДНК в миллионы раз в течение нескольких часов. В ходе каждого цикла реакции из исходной молекулы образуются две копии. Каждая из синтезированных копий ДНК может служить матрицей для синтеза новых копий ДНК в следующем цикле. Многократное повторение циклов приводит к возрастанию количества копий в геометрической прогрессии. Подсчитано, что даже при наличии 30 циклов число копий исходной молекулы ДНК составит более 1 млрд. Даже если учесть, что в ходе каждого цикла дублируются не все ампликоны, то общее количество копий несмотря на это составляет достаточно большую цифру.

Каждый цикл ПЦР состоит из следующих этапов:

1. Денатурация – повышение температуры вызывает раскручивание и расщепление двухцепочной молекулы ДНК на две одноцепочные. Температурные параметры денатурации находятся в области 90–95°C, но в случае образца ДНК с большим содержанием гуанина и цитозина температура должна быть увеличена до 98°C.

2. Отжиг – снижение температуры позволяет праймерам присоединиться к комплементарным участкам молекулы ДНК. Температура отжига ( $T_a$ ) является одним из важнейших параметров полимеразной цепной реакции и для каждого конкретного праймера подбирается индивидуально. Она зависит от длины и нуклеотидного состава праймера. Обычно она ниже на 2–4°C значения температуры плавления праймера ( $T_m$ ).

3. Элонгация – фермент ДНК-полимераза производит достраивание комплементарной цепи. Обычно каждый вид термостабильной ДНК-полимеразы имеет индивидуальный температурный оптимум активности.

Общий вид программы ПЦР следующий:

1 этап – первичная длительная денатурация препарата ДНК – 1 цикл;

2 этап – быстрая денатурация препарата ДНК; отжиг праймеров; элонгация – 30–45 циклов;

3 этап – длительная элонгация; охлаждение реакционной смеси – 1 цикл.

Для амплификации избранного фрагмента используют два олигонуклеотидных праймера (затравки), фланкирующих определенный

участок ДНК. Праймеры ориентированы 3'-концами навстречу друг другу и в сторону той последовательности, которую необходимо амплифицировать. ДНК-полимераза осуществляет достройку взаимно комплементарных цепей ДНК, начиная с праймеров. При синтезе ДНК праймеры физически встраиваются в цепь новосинтезирующихся молекул ДНК. Каждая цепь молекулы ДНК, образуемая с помощью одного из праймеров, может служить матрицей для синтеза комплементарной цепи ДНК с помощью другого праймера.

Полимеразную цепную реакцию проводят в специальных тонкостенных полипропиленовых пробирках, совместимых по размеру с используемым термоциклером-амплификатором – прибором, который контролирует температурные и временные характеристики этапов ПЦР. Технология полимеразной цепной реакции (ПЦР) была разработана в 1983 г. К. Мюллисом, за которую ему была присуждена в 1993 г. Нобелевская премия.

### 5.3. Секвенирование фрагментов ДНК

Развитие молекулярно-генетических методов невозможно без разработки эффективных методов определения нуклеотидной последовательности ДНК – секвенирования.

Широкое распространение в генно-инженерных исследованиях получили два метода:

- 1) метод терминации цепи по Сэнгеру (1975 г.);
- 2) метод химического расщепления по Максаму – Гилберту (1977 г.).

Метод терминации цепи по Сэнгеру основан на применении флюоресцентных дидезоксинуклеотидтрифосфатов. Принцип метода Сэнгера основывается на синтезе меченой комплементарной цепи ДНК с использованием в качестве матрицы нативной ДНК. Синтез осуществляется с помощью фермента ДНК-полимеразы I. В первоначальном варианте в реакционной смеси присутствуют 4 немеченых дезоксирибонуклеотидтрифосфата, из которых строится комплементарная цепь ДНК. Однако помимо них в системе находится модифицированная форма одного из оснований (2'3'-дидезокси аналог), при включении которой рост цепи прекращается. В результате синтезируются цепочки ДНК всевозможной длины.

Используются четыре реакционные смеси (по количеству типов нуклеотидов в молекуле ДНК), в каждую из которых добавляют помимо четырех мономеров аналог одного из оснований в качестве терми-

натора роста цепи. Затем цепи в каждой смеси разделяют с помощью гель-электрофореза и проводят радиоавтографию. С полученной фото- пленки непосредственно считывают последовательность оснований.

Метод химического расщепления по Максаму и Гилберту заключается в том, что один из концов фрагмента ДНК, последовательность которого нужно прочесть (секвенировать), метят с помощью  $^{32}\text{P}$ . Препарат меченой ДНК делят на 4 порции и каждую из них обрабатывают реагентом, специфически разрушающим одно из четырех оснований ДНК. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы на каждую молекулу ДНК приходилось лишь несколько повреждений. Когда эти поврежденные молекулы обрабатывают пиперидином, в ДНК образуется разрыв в том месте, где находилось разрушенное основание.

В результате получается набор меченных фрагментов, длины которых определяются расстоянием от разрушенного основания до конца молекулы. Например, если остатки Г находятся на расстоянии 2, 6, 11 и 16 нуклеотидов от меченого конца, то обработка данной цепи реагентами, разрушающими Г, приведет к образованию меченых фрагментов длиной 2, 6, 11 и 16 нуклеотидов. Также еще образуются фрагменты длиной 3 и 4 нуклеотида, но эти фрагменты, расположенные между остатками Г, будут не мечеными.

Наборы меченых фрагментов, образующиеся при каждой из 4 реакций, подвергают электрофорезу в соседних дорожках полиакриламидного геля, при этом происходит разделение фрагментов ДНК в соответствии с их размерами. Затем производят радиоавтографию геля. Набор полос, регистрируемых на рентгеновской пленке, «читают», определяя нуклеотидную последовательность ДНК. Последовательность цепочки ДНК от меченого конца будет следующая: АЦГЦЦЦГААТАГЦЦЦАГАТТ.

В последнее время вместо радиоактивных меток при анализе последовательностей ДНК используется флюорисцентное окрашивание. Флюорисцентные красители разного цвета применяются для каждого из 4 нуклеотидов, и 4 смеси электрофорезируются вместе. Флюорисцентный анализ позволяет определять последовательность ДНК автоматически, что дает возможность прочитывать более 1000 нуклеотидных пар за одну операцию.

## Лекция 6

# СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ

### 6.1. Понятие о трансгенных организмах

Трансгенный организм (генетически модифицированный организм) – организм, в геном которого с использованием методов генетической инженерии перенесена чужеродная информация, экспрессирующаяся в нем. Процесс осуществления генетической трансформации и получения трансгенных растений включает подготовку растительного материала для трансформации, перенос вектора в клетки растения и затем селекцию трансформантов.

Трансген – ген, взятый из одного организма и перенесенный в другой организм или клетку. Обязательным условием для осуществления трансформации является способность трансформируемого растения регенерировать из отдельной клетки или ткани целое растение.

Тотипотентность – способность растения функционально восстанавливаться из части, органа или отдельной клетки. Методология выращивания растений в культуре ткани *in vitro* разработана довольно хорошо. Практически для любого вида растений имеются методики культивирования тканей, в том числе из протопластов многих растений. Объектами для введения векторов могут быть протопласты, отдельные клетки, сегменты стебля, диски листьев, зародыши, пыльца и др.

В настоящее время благодаря хорошо разработанной методологии создания трансгенных растений может быть успешно трансформированы практически любой вид растения.

В различных лабораториях мира созданы, проходят испытания и внедряются в производство трансгенные растения в основном по трем направлениям:

- 1) улучшение признаков, связанных с устойчивостью растений к насекомым, вирусам и грибным болезням, гербицидам;
- 2) улучшение признаков, связанных с урожайностью и качеством продукции (содержание питательных веществ);
- 3) повышение устойчивости к засолению, тяжелым металлам, засухо- и холодоустойчивости, улучшение морфологических признаков растения, развития плодов, цветения, высоты растений.

## 6.2. Методы переноса генов в растения

Существует несколько методов генетической трансформации растений: 1) трансформация инфекцией *A. tumefaciens*; 2) кокультивация клеток и тканей с ДНК (свободного поглощения); 3) инъекция ДНК в клетки и целые растения; 4) электропорация растительных клеток; 5) метод бомбардировки. Генетическая трансформация с помощью агробактерий применяется пока только для двудольных растений и может осуществляться 4 способами: 1) инфекция целых растений; 2) инокуляция эксплантатов *in vitro*; 3) кокультивация клеток с бактериями; 4) трансформация с помощью листовых дисков.

**Трансформация с помощью агробактерий:** инфекция растений соответствующим штаммом *A. tumefaciens* обязательно включает предварительное поранение ткани – обычно листа или стебля. Часто делают декапитацию стебля (срезают верхушку). Для инфекции используют двухсуточную культуру бактерий, суспензию которой ( $10^8$  кл/мл) наносят на раневую поверхность. При таком методе индукцию трансформации можно выявить только по образующимся наростам (корончатым галлам). Поэтому в данных случаях обязательно должны использоваться онкогенные штаммы.

**Инокуляция тканевых эксплантатов *in vitro*** кусочков стебля имеет ряд преимуществ для получения целых трансформированных растений. В этом случае эксплантаты в стерильных условиях культивируются с суспензией агробактерий. Затем экспланты переносят на среду, содержащую антибиотики, для удаления бактерий (карбенициллин или клафоран). Этот метод позволяет вести селекцию трансформантов при использовании уже векторных плазмид, несущих ген антибиотикоустойчивости.

**Метод кокультивации** растущих из протопластов клеток с клетками агробактерий позволяет вести эффективную селекцию по антибиотикоустойчивости трансформированных растительных клеток. Впервые успешная трансформация протопластов в культуре была получена в 1979 г. Частота трансформации может достигать до  $10^{-1}$ . Процедура кокультивации следующая: в среду, содержащую 2–3-дневные протопласты, образующие клеточную оболочку и начавшие делиться ( $10^4$ – $10^5$  кл/мл), вносят суспензию клеток *A. tumefaciens* ( $10^7$ – $10^8$  кл/мл) и культивируют от 36 до 48 ч. В это время бактериальные клетки связываются с растительными клетками и происходит процесс переноса и интеграции одной или нескольких копий Т-ДНК в геном растения. Последующим отмыванием и обработкой протопластов ан-

антибиотиком карбеницилином или клафораном растительные клетки освобождаются от бактерий. Клетки выращивают до образования микроколоний, которые затем переносят на селективную среду, содержащую антибиотик, устойчивость к которому хотят получить (канамицин). Из полученных антибиотикоустойчивых каллусов можно затем вырастить целые растения. Недостаток данного метода – ограниченность применения из-за отсутствия регенерации целых растений из протопластов.

**Метод трансформации листовых дисков** является очень удобным для тех растений, которые на питательной среде способны образовывать каллус (дедифференцироваться) и регенерировать целые растения. Агробактерии, содержащие неонкогенные рТi-плазмиды (или векторы на ее основе), могут эффективно переносить генетический материал в клетки листовых эксплантов, не нарушая способности этих листьев регенерировать растения. Метод заключается в том, что из стерилизованных листьев вырезаются диски, которые инокулируют агробактериями, содержащими векторную плазмиду с геном канамицинустойчивости. Для этого диски помещают специальным образом на чашки, содержащие среду, которая стимулирует регенерацию побегов из клеток листьев. Через два дня культивирования экспланты переносят на ту же среду, содержащую карбеницилин (500 мкг/мл), чтобы освободиться от бактерий, и канамицин (100–300 мкг/мл), чтобы отобрать трансформированные клетки. Через 2–3 недели можно наблюдать образование побегов по краю листовых дисков. Побеги отделяют, сажают на среду для окоренения, а затем в почву. Метод трансформации листовыми дисками успешно применяется для таких растений, как табак, петуния, арабидопсис, томаты, картофель.

**Метод свободного поглощения или кокультивации растительных клеток** достаточно прост в использовании и заключается в том, что к протопластам определенной концентрации ( $2 \cdot 10^6$  кл/мл) добавляют трансформирующую ДНК, полиэтиленгликоль (ПЭГ 40%-ный раствор, молярная масса 1500) и тимусную ДНК в качестве носителя. Считается, что полиэтиленгликоль способствует связыванию ДНК с протопластами, которые затем пиноцитозом поглощают ДНК внутрь клетки. В этой среде протопласты инкубируют в течение 30 мин при 26°C, а затем постепенно отмывают от ПЭГ и культивируют на питательной среде сначала в течение 3 дней в темноте при 25°C, а затем на свету. Через неделю микроколонии клеток высаживают на селективную среду и начинают вести отбор трансформированных каллусов, а затем и растений.

**Инъекция ДНК в клетки и растения** позволяет вводить чужеродный генетический материал непосредственно в клетки без помощи агробактерий или каких-либо веществ. Этот метод впервые был применен для введения изолированной ДНК (суммарный препарат) в стебель растений на предмейотической стадии развития. Недавно этот метод был успешно применен для получения трансформантов с помощью векторной плазмиды pLGV neo 1103, содержащей ген канамицинустойчивости. Были получены трансгенные растения, в клетках которых происходит синтез фермента аминогликозилфосфаттрансферазы, обеспечивающей устойчивость растениям к антибиотику канамицину. Метод инъекций в целые растения заключается в том, что на определенной стадии развития организма шприцом в ткань вводится чужеродный генетический материал, образующиеся затем семена анализируют по селективируемому признаку.

**Метод электропорации (электрошока) клеток** дает возможность прямого введения чужеродных генов в клетки, в отличие от методов с использованием агробактерий. Этот метод впервые был разработан для клеток животных, но сейчас в модифицированном виде с успехом стал применяться для протопластов растений. Сущность его в том, что через смесь протопластов и векторной плазмидной ДНК пропускают короткие импульсы тока высокого напряжения. В период прохождения тока в мембране протопластов образуются отверстия или поры, через которые молекулы ДНК успевают проникать внутрь клеток. Метод пока также имеет ограниченное применение, поскольку эффективно работает только на протопластах, хотя эффективность его достаточно высокая.

**Метод обстрела (бомбардировки) тканей микрочастицами** является самым эффективным методом трансформации, который может использоваться для любых тканей и различных растений, способных к регенерации. Данный метод впервые применил Д. П. Сэнфорд в 1987 г. С тех пор было создано несколько вариантов прибора, различающихся в основном используемым источником энергии для ускорения микрочастиц: электричество, газ, пороховой заряд. Существует несколько типов конструкции прибора.

Наибольшее распространение получила система для переноса частиц (пушка) PDS-1000/He, выпускаемая фирмой Bio-Rad. Для ускорения частиц в ней используется газ гелий. Этой же фирмой налажено производство прибора в форме пистолета, который можно применять также и в полевых экспериментах. Однако мощность его гораздо ниже.

### 6.3. Получение трансгенных растений, устойчивых к гербицидам, биотическим и абиотическим факторам

В современном производстве практически невозможно обойтись без гербицидов. Сейчас разработано 3 генно-инженерных подхода к созданию гербицидоустойчивых растений:

- модификация растительного фермента мишени, в результате которой он теряет чувствительность к гербициду;
- индуцирование повышенного синтеза фермента без нарушения его нормального метаболизма;
- введение в геном растения фермента, способного деградировать и детоксицировать гербицид в растении.

Известно и уже изолировано много различных генов, кодирующих инсектицидные белки, которые очень специфичны для различных видов насекомых. Важно подчеркнуть, что эти белки совершенно не токсичны для млекопитающих, рыб, беспозвоночных и полезных насекомых. Естественные гены, перенесенные в растения, плохо экспрессируются. Поэтому генно-инженерными методами их модифицируют, добиваясь более высокой экспрессии в клетках растений.

Реакции растений на фитопатогены можно разделить на 3 группы:

- растение имеет полный иммунитет против данного патогена;
- в ответ на повреждение происходит быстрая программируемая гибель клеток в точке внедрения патогена (так называемая реакция сверхчувствительности), при этом патоген не успевает распространиться и погибает вместе с клетками растения;

– патоген преодолевает ответные защитные реакции организма и вызывает различной степени повреждения вплоть до гибели растения.

Разработано несколько методов создания растений, устойчивых к *вирусам* растений. Один из них заключается в контроле различных антисмысловых конструкций, где кДНК-содержащая копия вирусной РНК помещается под промотор таким образом, чтобы в результате транскрипции образовалась последовательность РНК, комплементарная вирусной РНК. При заражении вирусом растительной клетки с такой конструкцией образуются дуплексы между вирусной и конститутивно синтезируемой антисмысловой РНК. Эти дуплексы разрушаются специфическими РНКазам, в результате чего вирусы не образуются и соответственно болезнь не развивается. Примером могут быть трансгенные растения табака, несущие антисмысловые конструкции для вируса мозаики огурца и вируса табачной мозаики.

Еще одним методом борьбы с вирусной инфекцией является клонирование и встраивание в геном растений гена синтеза белка оболочки вируса. Активный синтез такого белка, имеющего сродство с РНК вируса, ингибирует репликацию РНК вируса, что приводит к довольно высокой устойчивости растения. В этом случае наблюдается высокая специфичность реакции, т. е. защита достигается только против того вируса, ген белка которого был встроен в геном растения. Этот метод успешно использован для большого числа вирусов различных таксономических групп.

В последнее время появились работы, в которых приводятся данные о создании трансформантов против виридов. Создаются также трансгенные растения, устойчивые к бактериальным болезням.

В последние годы большое значение приобретают работы по созданию растений, устойчивых к таким факторам среды, как холод, засуха, засоление почвы, повышенное содержание озона, тяжелые металлы и др. При всех абиотических стрессах растения претерпевают окислительный стресс, связанный с усиленным образованием активированных форм кислорода (окислительных радикалов). Эти формы кислорода образуются в различных субклеточных компартментах и реагируют с ДНК, липидами и белками, вызывая при длительном действии стресса поражение клеток.

Для получения засухоустойчивых растений используют конструкции векторов с геном левансахарозы, генами суперсинтеза пролина, геном пиролидинкарбоксилатсинтетазы, геном изопентенилтрансферазы и др.

Большой интерес представляют генно-инженерные подходы по созданию трансгенных растений, устойчивых к повышенной концентрации солей за счет увеличения внутриклеточного осмотического давления путем синтеза и накопления маннитола или бетаина в цитоплазме растительной клетки.

## Часть II

# КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

### Лекция 7

## КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

### 7.1. Понятие о клеточной инженерии растений

В первой части «Генетическая инженерия» электронного курса лекций нами рассмотрены вопросы конструирования и клонирования рекомбинантных молекул ДНК и основы технологии создания трансгенных растений. Однако следует особо подчеркнуть, что технологии создания трансгенных растений включают также основные этапы культивирования клеток и тканей растений *in vitro*, поэтому вторая часть лекций «Клеточная инженерия» нами рассматривается в неразрывной связи с первой частью, что в итоге позволит выпускникам лесохозяйственного факультета более полно усвоить теоретический материал.

Следует отметить, что клеточная инженерия является одним из основных разделов молекулярной биотехнологии. Под клеточной инженерией в широком смысле понимают культивирование в асептических условиях среды вне организма (*in vitro*) изолированных клеток и тканей растений, животных и микроорганизмов, а также различные манипуляции с ними (слияние, размножение и др.).

Клеточная инженерия основана на 3 принципах: необходимость изолирования экспланта (клетка, кусочек ткани, орган) от материнского растения; культивирование экспланта в регулируемых условиях, определяемых химическим составом питательной среды, а также физическими условиями (интенсивность освещения, длина дня и спектральный состав света, температурный режим, влажность воздуха, газовый состав культуральных сосудов); выполнение всех работ по культивированию клеток и тканей в стерильных условиях (стерилизация экспланта, питательной среды, культуральных сосудов).

Главные вехи истории развития клеточной инженерии растений представлены в табл. 7.1.

Таблица 7.1

## Этапы развития клеточной инженерии растений (по Р. Пиерик)

Год	Содержание этапа	Авторы
1902	Первые попытки культивирования тканей растений	Г. И. Ф. Хаберландт
1922	Культивирование кончиков корней <i>in vitro</i>	Ф. Ч. Роббинс
1925	Эмбриокультура межвидовых гибридов льна	Ф. Лайбах
1934	Длительное культивирование растительных тканей в условиях <i>in vitro</i>	Р. Готрэ
1934	Успешное культивирование корней томата	Ф. Уайт
1944	Получение адвентивных побегов в культуре <i>in vitro</i> табака	Ф. Скуг
1948	Образование адвентивных побегов и корней табака в зависимости от соотношения ауксина и аденина	Ф. Скуг, Т. Цай
1954	Получение первого растения из одиночной клетки	Т. Муйр
1955	Открытие кинетина	С. Миллер
1957	Открытие регуляции образования органов (корней и побегов) путем изменения отношения цитокинин/ауксин	Ф. Скуг, С. Миллер
1958	Регенерация соматических зародышей <i>in vitro</i> из нуцеллуса	П. Магешвари, Ш. Рангасвами
1960	Первое успешное оплодотворение растения <i>in vitro</i>	К. Канга
1960	Ферментативное разрушение клеточной оболочки для получения большого количества протопластов	Э. Кокинг
1962	Разработка широкого применения среды Мурасиге, Скуга	Т. Мурасиге, Ф. Скуг
1964	Получение первого гаплоида из пыльцевых зерен	С. Гуха, П. Магешвари
1965	Индукция цветения табака <i>in vitro</i>	Г. Агион-Прат
1970	Селекция биохимических мутантов <i>in vitro</i>	П. Карлсон
1970	Впервые достигнуто слияние протопластов	Д. Пауэр
1971	Первое растение, регенерированное из протопластов	И. Такебе
1974	Открытие Ti-плазмид	А. Заенен, В. Ларебеке
1975	Клеточная селекция кукурузы, устойчивой к гелминтоспориозу	Б. Г. Генгенбах, К. Е. Грин
1976	Инициация побегов из криосохраненных апексов растений	Д. Сейберт
1977	Успешная интеграция Ti-плазмидной ДНК из <i>Agrobacterium tumefaciens</i> в растения	Г. Мельхерс
1978	Соматическая гибридизация томата и картофеля	М.-Д. Чилтон
1981	Введение термина «соматическая изменчивость»	М. Ларкин, С. Скоукрофт
1982	Электрослияние протопластов	У. Зиммерманн

В области селекции стало возможным вести клеточную и гаметную селекцию на устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, преодолевать барьеры нескрещиваемости и создавать принципиально новые формы, несущие различные наборы ядерных и цитоплазматических генов в результате соматической гибридизации, изменять уровень пloidности и ускорять селекционный процесс путем использования гаплоидов, сохранять генофонд в виде культуры клеток криосохранением в жидком азоте.

В области семеноводства создана индустрия производства оздоровленного от вирусов и других патогенов посадочного материала размножаемых культур (плодовые, ягодные, декоративные растения).

В области защиты растений на основе достижений генной и клеточной инженерии получены растения, устойчивые к насекомым, вирусам, болезням и другим патогенам; созданы новые средства защиты растений путем культивирования бактерий и грибов, биологически активных веществ, полученных при культивировании организмов.

Путем клеточной инженерии созданы новые штаммы микроорганизмов, повышающие усвоение азота и фосфора, подавляющие развитие вредной микрофлоры, что позволяет конструировать микробоценоз, достигая повышения плодородия почвы и продуктивности растения. Культивирование новых растений-суперпродуцентов биологически активных веществ позволит более эффективно решать проблему создания и производства новых лекарств и препаратов для медицины и ветеринарии. Важным направлением практического применения клеточной инженерии является микробиологический синтез белка и незаменимых аминокислот.

Область применения достижений клеточной инженерии постоянно расширяется по мере пополнения методов культивирования клеток и тканей и различных манипуляций с ними и разработки этих подходов для новых видов растений, животных и микроорганизмов.

## 7.2. Источники получения эксплантов

Эксплантом для введения в культуру *in vitro* может быть практически любая часть растения (часть стебля, листа, корня, цветка, запасающих органов, семена, пыльца). Для введения в культуру *in vitro* экспланта главными являются две задачи: добиться инициации роста и развития клеток и тканей экспланта и обеспечить стерильность в сосудах для культивации.

Успех введения в культуру определяется генетическими и физиологическими особенностями материнского растения и степенью его инфицированности микроорганизмами. Растения, выращенные в фитотроне, имеют значительно меньшую степень инфицированности микроорганизмами в сравнении с растениями из теплиц и тем более полевых условий.

Конкретный выбор экспланта определяется спецификой культуры, а также целью культивирования. Экспериментальный материал, вводимый в культуру *in vitro*, во многом определяет эффективность культивирования. Основными аспектами этого вопроса являются:

1. Генотип (регенерационная способность растения зависит в первую очередь от генетических особенностей (семейство, вид, сорт)). Так, например, двудольные растения легче образуют каллус и регенерируют, чем однодольные.

2. Возраст растения (эмбриональные ткани имеют более высокую регенерационную способность). С возрастом способность растений к регенерации уменьшается, поэтому молодые растения как источник эксплантов предпочтительнее старых.

3. Физиологическое состояние (стадия развития и физиологическое состояние материнского растения определяют способность экспланта к активной пролиферации *in vitro*). Растения, вступившие в генеративную фазу, обычно снижают регенерационный потенциал в сравнении с находящимися в вегетативной фазе.

Почки, взятые с растения, находящегося в состоянии покоя (поздняя осень или ранняя зима), труднее регенерируют в сравнении с почками, взятыми весной. Выведение органа, из которого вычленяется эксплант, из состояния покоя изменяет соотношение эндогенных регуляторов, повышая концентрацию стимуляторов (ауксины, цитокинины, гиббереллины) и уменьшая концентрацию ингибиторов (этилен, абсцизовая кислота).

На рост *in vitro* влияет также «состояние здоровья» растения. Угнетенные растения со слабыми ростовыми процессами менее эффективны. Условия при культивировании материнского растения изменяют его физиологическое состояние, способствуя накоплению запасных веществ и регуляторов роста и влияя на рост *in vitro*. Так, растения из теплиц (более вытянутые и этиолированные) обычно регенерируют лучше растений этого вида из открытого грунта.

4. Расположение экспланта на растении (у растений имеется так называемый градиент регенерации). Каждое растение отличается различной эффективностью регенерационных процессов из разных орга-

нов. Так, для лилии лучшими эксплантами являются луковичные чешуи. Листья и стебли не дают положительного результата).

5. Размер экспланта и метод инокуляции (большие по размеру экспланты снабжены большим запасом питательных веществ, что положительно влияет на эффективность регенерации. Однако большие размеры экспланта могут повышать и вероятность инфицирования в культуре *in vitro*).

### 7.3. Принципы составления и компоненты питательных сред

**Вода.** Питательная среда – водный раствор различной концентрации (табл. 7.2), поэтому качество воды играет большую роль. Для практических целей используют дистиллированную воду, для работы с протопластами и меристемами применяют двойной дистиллят.

**Агар-агар.** Твердая консистенция питательной среды определяется наличием в ней агар-агара – полисахарида, получаемого из морских водорослей. Оптимальная концентрация агара – 0,6–0,8%. Возможно культивирование клеток и тканей на жидкой питательной среде или на заменителях агара (синтетические полимеры, минеральная вата, мостики из фильтрованной бумаги). Используется также двухфазная среда. В этом случае на твердую питательную среду высаживается эксплант, а затем добавляется жидкая среда.

**Углеводы.** Растительные клетки и ткани в культуре *in vitro* питаются преимущественно гетеротрофно, поскольку процесс фотосинтеза в этих условиях затруднен или невозможен (если культивирование происходит в темноте). Источником углеводов является сахароза в концентрации 1–5%, также глюкоза и фруктоза.

**Макро- и микроэлементы.** Обязательными компонентами среды для роста и развития растения *in vitro* являются макроэлементы (азот, фосфор, калий, кальций, магний, сера, железо) и микроэлементы (медь, цинк, марганец, бор, молибден, кобальт). Для улучшения поступления железа в клетки в состав питательной среды добавляется этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) или ее натриевая соль. Наиболее распространена и часто применяется среда Мурасиге, Скуга, которая хорошо сбалансирована по основным элементам питания.

**Кислотность среды.** Оптимальная pH среды для большинства культур колеблется в пределах 5,0–6,5. Чаще всего используют pH = 5,5–5,6. При низкой (меньше 4,5) и высокой (больше 7,0) pH рост и развитие *in vitro* останавливается.

Таблица 7.2

**Состав различных питательных сред, применяемых  
при культивировании тканей растений**

Компонент среды	Концентрация веществ (мг/л) в различных питательных средах						
	WPM	АСМ	Гамборга	Уайта	Нича	Михайлюка	N <sub>6</sub>
KNO <sub>3</sub>	–	–	3000	80	950	1900	2830
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400	400	–	–	720	600	–
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	–	–	–	2085	–	–	–
CaNO <sub>3</sub> · 4H <sub>2</sub> O	556	556	–	–	–	–	–
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990	990	–	–	–	–	–
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	–	–	134	–	–	–	463
CaCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	–	–	–	–	166	–	166
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	96	96	150	–	–	–	–
KCl	–	–	–	65	–	300	–
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	370	250	360	185	300	185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	–	12	68	170	400
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	–	–	–	200	–	–	–
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	–	–	169,6	18,7	–	–	–
Na <sub>2</sub> ·ЭДТА · 2H <sub>2</sub> O	37,3	–	37,3	–	37,3	37,3	37,3
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27,8	–	27,8	–	27,8	27,8	27,8
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	–	–	10	–	–	10	–
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22,3	22,3	13,2	7	25	–	4,4
ZnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	–	–	–	–	–	2	–
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	2	3	10	–	1,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	3	1,5	10	3,6	1,5
KJ	–	0,83	0,75	0,75	–	0,75	0,8
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	0,0025	0,25	0,25	–
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,25	0,025	0,025	0,001	0,025	0,025	–
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	–	0,025	0,025	–	–	0,25	–
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	–	–	–	2,5	–	2,46	–
Sodium Ferric EDTA	–	30,0	–	–	–	–	–
Тиамин HCl	0,1	0,1	10	0,1	3	0,005	3
Пиридоксин HCl	0,5	0,5	1	0,5	1	0,005	1
Глицин	0,5	–	–	3	–	–	–
Лизин	–	100	–	–	–	–	–
Мезоинозит	100	100	100	–	200	100	200
Аскорбиновая кислота	–	–	–	–	3	–	3
Никотиновая кислота	0,5	0,5	1	0,5	–	–	–
Сахароза	30 000	30 000	20 000	20 000	60 000	125	60 000

Концентрация водородных ионов в культуре *in vitro* влияет на устойчивость индолилуксусной кислоты, гиббереллина, витамина В, пантотеновой кислоты, желатинизацию агара, поступление в растение фосфатов, аммония, железа.

**Витамины.** В состав питательных сред могут входить следующие витамины: мезоинозит, витамин В1 (тиамин), пантотеновая кислота, фолиевая кислота (витамин М), рибофлавин (витамин В2), аскорбиновая кислота (витамин С), никотиновая кислота (витамин РР), пиридоксин (витамин В6), биотин (витамин Н), парааминобензойная кислота, токоферол (витамин Е).

**Регуляторы роста.** Для роста культуры клеток и тканей растений *in vitro* необходимо наличие в составе питательной среды природных или синтетических гормонов.

Их концентрация и взаимодействие обуславливают направление и скорость процессов морфогенеза (образование каллуса, корней, побегов и др.). К наиболее часто употребляемым регуляторам относятся ауксины и цитокинины. Могут использоваться гиббереллины, этилен и абсцизовая кислота, а также недавно открытые brassinosteroids.

**Ауксины.** К ауксинам относятся индолил-3-уксусная кислота (ИУК), нафтилуксусная кислота (НУК), индолилмасляная кислота (ИМК), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д). Степень активности ауксинов возрастает от ИУК к 2,4-Д. Используют их в концентрации от 0,01 до 10,00 мг/л. Ауксины вызывают дедифференцировку клеток, растяжение клеточной оболочки, деление клеток и образование каллуса, образование корней, ингибируют образование боковых побегов. При низких концентрациях ауксины образуют корни, при высоких преобладает образование каллуса. 2,4-Д как самый активный ауксин (в 30 раз активнее ИУК) вызывает образование каллуса, но может индуцировать мутации.

**Цитокинины.** Среди цитокининов используются аденин, кинетин, 6-бензиламинопурин (6-БАП), зеатин, 6-γ,γ-диметилаллиаминопурин (2иП). Они применяются в концентрациях от 1 до 10 мг/л и индуцируют процесс деления клеток, образования боковых побегов, подавляя при этом развитие корней. Цитокинины задерживают старение тканей *in vitro*.

**Гиббереллины.** Гиббереллины не являются обязательными компонентами питательных сред. Наиболее часто применяют гибберелловую кислоту (ГК). Гиббереллины способствуют удлинению междоузлий, а также росту меристем и почек *in vitro*. Кроме того, они выводят из состояния покоя изолированные зародыши и семена. Гиббереллины могут ингибировать образование придаточных побегов и корней.

**Другие регуляторы.** Использование других регуляторов достаточно редко и обычно связано со специальными или исследовательскими целями. Абсцизовая кислота может способствовать образованию микроклубней картофеля *in vitro*.

Гормон газообразной природы этилен может накапливаться в культуральных сосудах в результате выделения тканями растений. При этом возможно ингибирование ростовых процессов *in vitro*. Этилен влияет на процесс органогенеза, например, он усиливает образование луковичек у лилий *in vitro*. Есть сведения и о положительном действии этилена на индукцию клеточного деления. Брассиностероиды способствуют образованию каллуса.

**Другие компоненты среды.** В отдельных случаях в состав питательной среды добавляют кокосовое молоко, солодовый и дрожжевой экстракт, томатный и апельсиновый сок, гидролизат казеина, пептон. В питательную среду можно добавлять также активированный уголь, который обладает способностью адсорбировать токсические темноокрашенные пигменты и другие метаболиты, угнетающие рост растения *in vitro*. Добавление активированного угля в среду способствует развитию и органогенезу древесных растений.

Приготовление и хранение питательных сред. Растворы макро- и микроэлементов готовят более концентрированными (макросоли в 10–20 раз, микросоли в 100–1000 и витамины в 1000 раз). Маточные растворы хранят в холодильнике, причем витамины – при отрицательной температуре. Регуляторы роста также используют в виде маточных растворов. Приготовленные среды желательно хранить в холодильнике при температуре 5°C. На свету может происходить потеря активности некоторых фитогормонов (ИУК, кинетин).

#### 7.4. Условия стерилизации эксплантов, питательных сред, оборудования и рабочих материалов

Стерильность является одним из основополагающих принципов культивирования клеток и тканей растений *in vitro*, поскольку питательная среда – отличный субстрат для развития микроорганизмов. Все манипуляции с культурой *in vitro* выполняются в ламинар-боксе, который подвергается стерилизации ультрафиолетом в течение 30 мин с последующим протиранием рабочих поверхностей 70%-ным спиртом. Посуду, завернутую в фольгу или оберточную бумагу, стерилизуют сухим паром в сушильном шкафу при температуре 160°C в течение двух часов или влажным жаром в автоклаве при 2 атмосферах в

течение 25–30 мин. Стерилизацию экспланта проводят следующими агентами: 0,1%-ный раствор сулемы, 0,1%-ный раствор диацида, 1%-ный раствор брома, 3–6%-ный раствор хлорамина, 5–10%-ный раствор гипохлорита (кальция, натрия), 10–12%-ный раствор перекиси водорода. Концентрация и длительность экспозиции зависят от вида растения, экспланта и стерилизующего агента (табл. 7.3).

Таблица 7.3

**Стерилизация исходного растительного материала**

Объекты	Время стерилизации, мин			
	Диацид (0,1%)	Сулема (0,1%)	Гипохлорит натрия или кальция (5–9%)	Перекись водорода (10–12%)
Семена сухие	15–20	10–15	15–20	12–15
Семена набухшие	6–10	6–8	10–15	6–8
Ткани корня, клубня	20–30	15–25	15–20	–
Ткани стебля	20–40	20–25	20–25	–
Листья	1–3	0,5–3	3–6	3–5
Апексы	1–10	0,5–7	3–15	2–7

Органы, используемые для получения экспланта, моют щеткой с мылом, затем промывают дистиллированной водой и опускают на несколько секунд в 70%-ный раствор этанола (семена на 1–2 мин).

После обработки основным стерилизующим агентом органы тщательно промывают стерильной водой для удаления антисептика.

Для стерилизации питательных сред применяют автоклавирование при температуре 120°C и давлении 1 атм в течение 20 мин. Термолабильные компоненты, разрушающиеся при автоклавировании, подвергают холодной стерилизации. Для этой цели используются бактериальные фильтры. Профильтрованные растворы смешивают в ламинар-боксах с автоклавированной средой, охлажденной до температуры 40°C.

## Лекция 8

# КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ

### 8.1. Понятие о клональном микроразмножении растений

Открытие методов культивирования *in vitro* различных видов растений создало предпосылки для применения принципиально новых подходов к их размножению. В настоящее время для ряда культур разработаны технологии клонального микроразмножения, т. е. вегетативного размножения растений на основе культуры *in vitro*. Такие технологии особенно актуальны для культур, размножаемых в производстве преимущественно вегетативно (плодовые, ягодные, декоративные, лесные растения). При длительном вегетативном размножении традиционными способами (черенками, луковичками, усами) дочерние растения накапливают вирусную, бактериальную и грибную инфекцию, что снижает качество посадочного материала. Возникает необходимость в оздоровлении посадочного материала от инфекции. Перед клональным микроразмножением стоят следующие цели: а) ускоренное размножение уникальных генотипов в селекции растений; б) промышленное размножение посадочного материала высоких репродукций в семеноводстве растений; в) оздоровление посадочного материала от вирусной, бактериальной и грибной инфекции в процессе размножения; г) поддержание неконстантного материала, расщепляющегося в процессе семенного размножения (гибриды плодовых, ягодных, декоративных и других культур); д) размножение культур с длительным жизненным циклом (древесные растения); е) размножение растений, которые невозможно или трудно размножить *in vivo* (стерильные формы для гетерозисной селекции).

Преимущества клонального микроразмножения в сравнении с традиционными методами заключаются в следующем:

1. Метод обеспечивает высокий коэффициент размножения, что дает возможность быстро внедрить в производство новые сорта растений.

2. Метод не имеет альтернативы для видов, не размножаемых или трудноразмножаемых *in vivo*.

3. В процессе размножения обеспечивается оздоровление посадочного материала путем применения методов апикальных меристем, термотерапии или химиотерапии.

4. Требуется небольшое количество стартового материала, существует возможность его сохранения в генбанках, в том числе *in vitro*.

5. Выполнение работ осуществляется в лабораторных условиях и не зависит от факторов внешней среды.

6. Метод обеспечивает экономию площадей и возможность регуляции средовых факторов;

7. Возможны автоматизация выращивания *in vitro* и применение промышленных технологий получения посадочного материала.

К недостаткам метода клонального микроразмножения следует отнести сложность и высокую цену оборудования, возможность повышения частоты мутаций в культуре *in vitro*, удорожание посадочного материала. В связи с этим клональное микроразмножение целесообразно использовать для получения высоких репродукций в семеноводстве с последующим применением традиционных методов вегетативного размножения оздоровленного посадочного материала.

## 8.2. Классификация методов клонального микроразмножения

В основе клонального микроразмножения лежит явление тотипотентности, т. е. способности растения структурно и функционально восстанавливаться из части, органа или отдельной клетки.

В зависимости от типа меристематической ткани, используемой для регенерации, а также особенностей протекания процесса регенерации существуют три основных подхода к методам клонального микроразмножения:

1) активация развития уже существующих в растениях меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля);

2) индукция образования новых стеблевых почек или эмбриоидов непосредственно на тканях экспланта;

3) возникновение почек или эмбриоидов из первичного и пересадочного каллуса, суспензионной культуры клеток или протопластов.

Принципиальное отличие второго и третьего подходов от первого заключается в образовании новых меристематических зон среди специализированных клеток в результате процесса дедифференциации. Первый подход является наиболее естественным и предпочтительным, поскольку в нем участвуют уже сформировавшиеся меристемы, особенностью которых является генетическая стабильность. При использовании в качестве эксплантов дифференцированных тканей растений, образующих адвентивные почки или эмбриоиды, вероятность

появления мутантных форм возрастает. Особенностью третьего подхода является образование почек или эмбриоидов через стадию каллуса, суспензионной культуры или протопластов, что еще более повышает возможность возникновения мутаций.

Активация развития уже существующих в растениях меристем является основным методом клонального микроразмножения. Метод основан на снятии эффекта апикального доминирования. При удалении верхушечной точки роста в пазушных почках возрастает концентрация цитокининов, снижается концентрация ауксинов, индуцируется клеточное деление и рост пазушных почек. Снять эффект апикального доминирования также можно путем добавления в питательную среду цитокининов (6-БАП, кинетин, 2-*ip*, зеатин). Под воздействием цитокининов происходит реювенилизация, т. е. омоложение тканей. Такие ткани обладают большей способностью к активному росту и регенерации побегов и корней.

Первый метод не требует применения цитокининов, второй основан на добавлении в состав среды цитокининов и применяется для размножения декоративных (гербера, гвоздика, розы), плодовых (яблоня, груша, вишня, слива), ягодных (земляника, смородина, малина, ежевика), лесных (береза, тополь, туя, можжевельник) растений.

Второй метод клонального микроразмножения – индукция образования новых стеблевых почек или эмбриоидов непосредственно на тканях экспланта. Он включает ряд процессов: дедифференциацию специализированных клеток, клеточное деление и образование новых меристем, образование и развитие органов.

Третий метод клонального микроразмножения – возникновение почек или эмбриоидов из первичного и пересадочного каллуса, суспензионной культуры клеток или протопластов. Главная его особенность в том, что меристематические ткани возникают в результате непрямого органогенеза или соматического эмбриогенеза. Этому предшествует дедифференциация специализированных соматических тканей экспланта, в качестве которого могут быть использованы практически любые органы растения (корни, стебли, листья, цветки). Главная проблема, возникающая при клональном микроразмножении таким образом – возможные мутации (изменение уровня ploидности, хромосомные aberrации, генные мутации) в культуре тканей.

### 8.3. Этапы клонального микроразмножения

Т. Мурасиге в 1974 г. впервые предложил подразделить микроразмножение на 3 этапа:

- 1) введение экспланта в культуру *in vitro*;
- 2) собственно микроразмножение;
- 3) укоренение и адаптация в нестерильных условиях.

В последующем были разработаны схемы клонального микроразмножения, более соответствующие выполняемым задачам на каждом этапе. П. Деберг и А. Мэйн в 1981 г. предложили выделить 5 этапов (стадий) клонального микроразмножения:

*Этап 0.* Подготовительная стадия. На этой стадии растительный материал подготавливается к культуре *in vitro*. Цель этапа состоит в получении стерильного стартового материала, находящегося в оптимальном для введения в культуру физиологическом состоянии.

*Этап 1.* Введение в культуру *in vitro*. Цель – обеспечить успешную пролиферацию экспланта в культуре *in vitro*. Размножение на этом этапе не является важным.

*Этап 2.* Собственно размножение. Единственная функция этой стадии – увеличить число побегов. Для этого индуцируются меристематические центры, которые развиваются в почки и/или побеги.

*Этап 3.* Удлинение побегов и укоренение. На этом этапе удлиняются побеги, индуцируются и развиваются корни.

*Этап 4.* Перенос в тепличные условия. Большинство видов требуют адаптации в условиях *ex vitro*.

Рассмотрим особенности клонального микроразмножения на каждом из его этапов.

**Этап 0. Подготовительная стадия.** Исходным материалом для введения в культуру обычно служат элитные растения, типичные для данного сорта, без признаков инфекции. Для подготовки таких растений к введению в культуру *in vitro* желательно уменьшить их инфицированность путем выращивания в условиях теплиц, а также изменить физиологический статус. В теплицах поддерживается высокая температура (25°C) и сравнительно низкая влажность (70%). Для уменьшения влажности инфицированное растение поливают непосредственно под корень, исключая полив листьев. Минимальная длительность такого режима зависит от вида растений. Например, для фикуса и драцены достаточно 3 месяцев. На этом этапе проводится термотерапия для борьбы с вирусами. Для некоторых растений необходима холодовая обработка при температуре 4–5°C с целью выведения из состояния покоя (древесные растения).

**Этап 1. Введение в культуру *in vitro*.** Целью этапа является инициация роста тканей экспланта *in vitro*. Эксплантом для микроразмножения обычно служат апикальные или боковые почки. Для неко-

торых растений (фикус, антуриум, глоксиния) используют кусочки листа, для герберы и фрезии – части цветка. Для получения свободных от вирусов растений используют апикальные меристемы. В качестве питательной среды чаще всего используют среду Мурасиге, Скуга или ее модификации. Для древесных растений применяют среду WPM (woody plant medium).

Важной на этом этапе, в особенности для древесных растений, является проблема полифенолов. При механической изоляции экспланта возникает стрессовая ситуация, в которой синтез полифенолов усиливается. В культуре *in vitro* полифенолы окисляются полифенолоксидазами. Продукты окисления ингибируют активность ферментов, вызывают потемнение ткани и среды, что может привести к гибели экспланта. Для борьбы с этим явлением можно использовать антиоксиданты путем добавления в состав питательной среды или обработки экспланта перед помещением на среду.

**Этап 2. Собственно размножение.** Цель этапа – получение максимального количества побегов за один пассаж. Главным условием образования побегов является высокое соотношение цитокининов к ауксинов. Потребность в экзогенных гормонах зависит от концентрации цитокининов в экспланте. Среди цитокининов часто используется 6-БАП, в отдельных случаях – кинетин и 2-*ip*. Обычно 1–2 мг/л цитокинина достаточно для пролиферации побегов. Более высокие концентрации усиливают образование адвентивных почек, что не всегда желательно в связи с повышением вероятности образования мутаций. Возможно использование ауксинов для повышения активности роста побегов. Чаще используют нафтилуксусную и индолилмасляную кислоты в концентрации 0,1–1,0 мл/л, реже – индолилуксусную кислоту (из-за ее нестабильности в среде). Ауксин 2,4-Д не применяется, поскольку может вызывать мутации.

**Этап 3. Удлинение побегов, индукция и развитие корней.** Побег, полученные на этапе 2 при высокой концентрации цитокининов, имеют небольшой размер, что затрудняет манипуляции с ними. Удлинения побегов можно достигнуть при их пересадке на среду, не содержащую цитокинины. Пазушные или адвентивные побеги, полученные при наличии цитокининов, обычно не имеют корней. В связи с этим главная задача этапа 3 – индукция ризогенеза. Ризогенез имеет три фазы: индукция, инициация и элонгация. Первые две фазы трудно различимы. Образование корней происходит при низком содержании или отсутствии цитокининов и высоком содержании в среде ауксинов. Обычно остаточного количества цитокининов в побегах после этапа 2

достаточно и их добавления в среду не требуется. На этапе 3 чаще всего применяют нафтилуксусную, индолилмасляную, индолилуксусную кислоты в концентрации 0,1–1,0 мг/л.

**Этап 4. Перенос в тепличные условия.** Микрорастения, выращенные в культуре *in vitro*, имеют ряд анатомических и физиологических особенностей. Для них характерны более мелкие и тонкие листья, слабо развитая кутикула, нарушение работы устьиц, ксилемные ткани в регенерантах могут образовать закрытую систему, поскольку побеги появляются до образования корней. Кроме того, тип питания микрорастений миксо- или гетеротрофный, но не автотрофный.

В теплице над пересаженными растениями устанавливаются укрытия из полиэтиленовой пленки для получения высокой влажности. Оптимальная влажность поддерживается с помощью туманообразующей установки, поскольку важен размер капель воды (чем меньше, тем лучше). Такие условия удерживают в течение 2–3 недель. Для предотвращения инфицированности микрорастений используют фунгициды и стерилизацию субстрата. В качестве субстрата применяют верховой торф, а также его смеси с песком и/или перлитом. Хорошие результаты при укоренении микрорастений показал субстрат на основе ионообменных смол «Биона», разработанный в Институте физико-органической химии НАН Беларуси. Субстрат содержит необходимые элементы по прописи Мурасиге, Скуга. Важным его достоинством является возможность многократного использования.

Микрорастения высаживают непосредственно в грунт или стеллажи теплицы, в ящики, горшки или пластиковые кассеты. Кассеты удобны в транспортировке и обеспечивают растения при пересадке стартовым запасом субстрата, сохраняя при этом корневую систему.

Поскольку микрорастения *in vitro* не вступают в контакт с микроорганизмами, целесообразно создавать такие микробоценозы в ризосфере на этапе адаптации, для чего особенно эффективны пластиковые кассеты. Источниками микроорганизмов могут быть специально культивируемые штаммы, а также природные ассоциации. В БГСХА в течение ряда лет изучалась возможность использования микроорганизмов в клональном размножении.

#### **8.4. Перспективы клонального микроразмножения древесных пород**

Клональное микроразмножение декоративных пород широко распространено в Западной Европе и США. Микроразмножение расте-

ний, начавшее распространяться в середине XX в., оформилось как мощное промышленное производство, быстро реагирующее на запросы рынка. К примеру, только за период с 1985 по 1990 гг. число растений, размножаемых *in vitro*, возросло с 130 млн. до 513 млн. Мировыми лидерами в этой области являются Нидерланды, США, Индия, Израиль, Италия, Польша. В США микроразмножением занимаются около 100 лабораторий, 5 из которых имеют производительность 15–20 млн. растений в год, 8–10 лабораторий – от 2–10 млн., остальные – менее 1 млн. растений. Из 248 коммерческих лабораторий Западной Европы с общей годовой производительностью 212 млн. растений только 37 производят более 1 млн. растений.

Лидером микроразмножения растений в Западной Европе являются Нидерланды (около 70 лабораторий). Это связано с традиционной ориентацией на производство декоративных культур, в котором Нидерланды доминируют на мировом рынке (около 50% мирового экспорта цветов на срезку и декоративных растений экспортируется из этой страны). Наиболее важными группами растений, размножаемых *in vitro* в Нидерландах, являются такие декоративные культуры, как горшечные растения на срезку, орхидеи и луковичные.

Во Франции 94% всей продукции цветочных культур получают методом *in vitro*. Италия специализируется на микроразмножении подвоев яблони, сливы и персика. Широкое производство растений методом *in vitro* развернуто в Индии, где 75 лабораторий производят около 190 млн. растений. Главное направление работы индийских лабораторий – производство декоративных растений. Кроме того, развито производство плодовых, лесных, овощных и ароматических растений. Использование микроразмножения дает возможность быстро перейти на высокопродуктивные сорта. Так, например, компания АВТ распространяет *in vitro* сорта кардамона с урожайностью 250 кг/га при урожае обычных сортов 70 кг/га. Правительство создало систему мер для поддержки и развития клонального микроразмножения и облегчения экспорта продукции за рубеж.

В Беларуси около 30 лабораторий занимаются клональным микроразмножением растений (крупнейшая – в БГСХА). Главная культура, размножаемая *in vitro* в республике, – картофель, что связано с традиционным производством этой культуры в личном и общественном секторе. Налаживается производство оздоровленного посадочного материала земляники, голубики высокой, декоративных растений (розы, фикус и др.). Научные исследования по клональному микроразмножению растений проводятся в Республиканском селекционно-

семеноводческом центре, БГТУ, БГСХА, НИИ картофелеводства, НИИ плодководства, Институте леса НАН Беларуси, Институте генетики и цитологии НАН Беларуси, Центральном ботаническом саду НАН Беларуси.

В Беларуси посадочный материал подразделяется на 3 класса:

- класс А – (virus free – свободный от вирусов);
- класс Б – (virus test – тестированный на вирусы);
- класс В – (visual healthy – визуально здоровый).

Для получения посадочного материала класса А необходимы тщательный отбор, оздоровление и тестирование исходных растений на наличие вирусных и микоплазменных заболеваний. Растения класса А являются основным, а в перспективе – единственным видом посадочного материала. Высокий уровень распространения вирусов снижает продуктивность растений и для получения качественного посадочного материала класса А необходимы термотерапия и культура *in vitro*.

Микроразмножение является весьма эффективным приемом быстрого распространения и оздоровления от инфекции новых сортов и гибридов картофеля, плодовых, ягодных, декоративных и лесных растений. Методы микроразмножения широко используются селекционерами для ускоренной репродукции ценного материала. Размножение растений *in vitro* может стать важным инструментом поддержания существующего биоразнообразия редких и исчезающих видов, занесенных в Красную книгу Беларуси.

## Лекция 9

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ, КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ И СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ

### 9.1. Получение и культивирование протопластов растений

Изолированные протопласты представляют собой клетки, лишенные оболочки. Отсутствие клеточной оболочки облегчает проникновение в протопласт из окружающего раствора макромолекул (белки, нуклеиновые кислоты) и частиц (клеточные органеллы, микроорганизмы). Получение протопластов, таким образом, позволяет переходить с организменного уровня на клеточный и обратно, манипулировать содержанием растительной клетки, изменяя ее генетический аппарат.

Исходным материалом для выделения протопластов могут быть различные части растений – листья, корни, семядоли, гипокотили, пыльцевые зерна, каллусные и суспензионные культуры. Оптимальные условия для выделения протопластов индивидуальны для различных растений и типов тканей. Главными факторами являются состав ферментов, pH среды, выбор осмотического раствора, физиологическое состояние, возраст и условия выращивания исходного растения. Вероятность получения жизнеспособных протопластов увеличивается, если растения находятся в состоянии активного роста.

Эксплант растения подвергается стерилизации. Ферментные растворы лучше готовить непосредственно перед опытом или за сутки до опыта. Стерилизацию ферментов раствора производят через бактериальные фильтры. Важным фактором для выделения жизнеспособных протопластов является подбор осмотического стабилизатора, в качестве которого обычно используют сахара (глюкоза, сахароза, ксилоза, сорбит, маннит); а также ионные осмотики – растворы солей  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KCl}$ . Среда должна быть гипертоничной, чтобы протопласты находились в слегка плазмолизированном состоянии. Для получения протопластов из листьев их нарезают узкими полосами, после чего помещают на поверхность ферментного раствора в чашки Петри (1 г листовой ткани в 10 мл ферментного раствора). Ферментацию листьев табака или картофеля проводят при 28–30°C в течение 15–18 ч. Ферментные смеси для мезофилла табака содержат 0,5% целлюлазы, 0,5% мацеразы, 0,2% дриселазы. Для мезофилла листа картофеля

используют смесь 1% целлулизина, 0,5% мацеразы и 0,2% дриселазы. Ферментные смеси растворяют в растворе, содержащем 0,5 М сахарозы и 50 мМ CaCl<sub>2</sub> при pH = 5,5–5,6. Чтобы получить протопласты из суспензионной культуры, ее предварительно осаждают центрифугированием или фильтрованием, затем переносят в ферментный раствор. Каллусные ткани, растущие на агаре, переносят в чашку с ферментным раствором с помощью скальпеля. В случае использования для получения протопластов каллуса и суспензионной культуры отпадает необходимость в стерилизации исходного материала. При использовании каллуса и суспензионной культуры лучшей является поздняя стадия логарифмического роста (клеточные стенки легче разрушаются ферментами, протопласты наиболее жизнеспособны).

После обработки ферментным раствором и изоляции протопласты должны быть очищены от остатков ткани и отмыты от ферментов. Для этого содержимое чашки после инкубации в ферментном растворе фильтруют через воронку с нейлоновым фильтром в пустую колбочку. Затем полученную суспензию изолированных протопластов переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют. Подбирая растворы различной плотности, добиваются осаждения протопластов на дно пробирки или всплывания на поверхность раствора. Протопласты отбирают пипеткой и переносят в среду, содержащую осмотик, в которой их центрифугируют второй раз, отмывая от ферментного раствора. Отмывку обычно осуществляют дважды.

Культивирование протопластов осуществляют обычно методом платирования в агаре или методом жидких капель. Перед пересадкой протопласты промывают, суспендируют в определенном объеме среды для культивирования и подсчитывают количество клеток в образце с использованием камеры Фукса-Розенталя. Жизнеспособность протопластов определяют путем их окрашивания флуоресцеиндиацетатом (ФДА), после чего жизнеспособные протопласты узнают по зеленому свечению в ультрафиолетовом свете.

## **9.2. Специфика, получение и культивирование каллусных тканей**

Каллус – неорганизованная масса ткани, состоящая из дедифференцированных (утративших специализацию) клеток. Каллусная ткань обычно возникает в местах поранения тканей и является «запасной программой» растения, обеспечивающей защиту раны, накопление необходимых питательных веществ для регенерации утраченного

органа. Каллус может быть получен из эксплантов различного типа (корней, побегов, листьев, пыльцы, эндосперма).

Эффективность каллусогенеза зависит от особенностей вида, физиологического состояния растения, типа экспланта и условий его культивирования. Явление каллусогенеза свойственно не только покрытосеменным, но и голосеменным растениям, папоротникам, мхам, печеночникам. Двудольные растения образуют каллус более интенсивно в сравнении с однодольными.

Главным условием успешного каллусогенеза являются концентрация и баланс эндогенных и экзогенных ауксинов и цитокининов.

Образующаяся каллусная ткань не имеет анатомической структуры и может быть разной консистенции: 1) рыхлой, состоящей из сильно оводненных клеток; 2) средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами; 3) плотной, в которой дифференцируются элементы камбия и проводящей системы.

Рыхлый каллус быстрее растет и используется для получения суспензионной культуры, плотный каллус можно применять для морфогенеза. Цвет каллусной ткани может быть белым, желтоватым, зеленым, красноватым, бурым, пигментированным полностью или зонально присутствием хлорофилла и антоцианов. Клетки каллуса, как и другие клетки, проходят три фазы роста (деление, растяжение, дифференцировка), после чего деградируют. Популяция культивируемых клеток каллуса проходит пять фаз развития.

Каллусная ткань может пассироваться в течение длительного времени. Так, культура каллусной ткани моркови, полученная Р. Готре более 60 лет назад, поддерживается до сих пор. Поскольку первичный каллус может образоваться из клеток, различных по своей специализации, в процессе длительного пассирования (субкультивирования) образуются штаммы каллусных клеток, имеющие индивидуальные генетические и физиологические особенности.

### 9.3. Получение и культивирование суспензионных культур

Суспензии растительных клеток представляют собой одиночные клетки и их агрегаты, которые растут в жидкой аэрируемой питательной среде во взвешенном состоянии.

Обычно суспензионную культуру получают путем переноса кусочков рыхлого каллуса в перемешиваемую жидкую питательную среду того же состава, что и среда, на которой выращивался каллус,

но без агара. Для инициации суспензионной культуры необходимо 2–3 г каллусной ткани на 60–100 мл питательной среды. Первичную суспензию получают на круговой качалке при скорости вращения 100–120 об./мин. Успех получения суспензионной культуры из каллуса обеспечивается использованием рыхлых каллусов, полученных с применением 2,4-Д; исключением из среды ионов  $Ca^{2+}$ ; обработкой ферментом пектиназой транспланта, предназначенного для выращивания в суспензионной культуре.

Возможно также получение суспензионной культуры из мезофильных клеток листьев путем обработки специальной средой для мацерации клеток, содержащей фермент мацеразу.

Клетки суспензионной культуры так же, как и клетки каллуса, находятся в дедифференцированном состоянии и для их деления необходимо наличие в составе питательной среды ауксинов и цитокининов. Суспензионная культура имеет ряд преимуществ перед выращиванием каллусных тканей поверхностным способом на твердых средах. Здесь легче влиять на клеточный метаболизм, в связи с чем суспензионные культуры часто используются в качестве модельных систем для изучения путей вторичного метаболизма, индукции ферментов и экспрессии генов. Важным их преимуществом при выделении ферментов или продуктов вторичного метаболизма является отсутствие у большинства суспензионных культур хлорофилла и каротиноидных пигментов.

Суспензионные культуры клеток обычно требуют регулярного и более частого субкультивирования, чем каллусные культуры, из которых они получены. Первичную суспензию в конце экспоненциальной фазы фильтруют через 1–2 слоя марли, нейлоновые или металлические сита, чтобы избавиться от крупных агрегатов или остатков экспланта. Определенный объем суспензионной культуры переносят с помощью пипеток или шприцев на свежую питательную среду. Рост суспензионной культуры можно оценивать по следующим параметрам: объем осажденных клеток, число клеток, сырая и сухая масса, содержание белка и ДНК, жизнеспособность клеток.

Суспензионные культуры, как и каллусные клетки, образуют линии, отличающиеся между собой генетически и физиологически. Культивирование в суспензионной культуре может приводить к увеличению соматональной изменчивости. Суспензионная культура используется для сохранения генетического материала при пониженных температурах, в клеточной селекции для получения протопластов, микроразмножения растений и получения искусственных семян, а также вторичных метаболитов.

#### 9.4. Морфогенез в культуре *in vitro*

Реализация генетической программы клетки в культуре *in vitro* происходит в результате морфогенеза – заложения, роста и развития органов, тканей и клеток у растений. Соматическая клетка обладает тотипотентностью, т. е. способностью полностью реализовать свою программу развития и дать начало целому растению. В процессе дифференциации клеток и тканей растения между ними возникают физиологические и структурные различия, связанные со специализацией. В организме эти процессы происходят в онтогенезе от образования зиготы до естественной смерти.

В культуре *in vitro* морфогенез имеет свою специфику, которая связана в первую очередь с вычленением экспланта и выходом его из-под контроля всего организма. Включается программа развития, приводящая к регенерации из группы клеток и тканей целого растения. Возможны и другие пути морфогенеза *in vitro* (образование корней – ризогенез, цветочных почек – флорогенез, каллуса – каллусогенез).

Процесс регенерации в культуре *in vitro* имеет 2 направления:

– соматический, или неполовой, эмбриогенез – образование биполярных зародышеподобных структур из соматических клеток. Такие зародыши в дальнейшем развиваются в регенеранты через стадии аналогично зиготе;

– органогенез – образование монополярной структуры, т. е. отдельных органов из меристем (корней, стеблей, реже цветков или листьев).

Эмбриогенез или органогенез может происходить непосредственно в ткани экспланта (прямой) или через стадию каллуса (непрямой).

Оба этих процесса зависят от ряда факторов, главными среди которых являются генетические особенности вида, физиологическое состояние растения и тип экспланта, химические и физические условия культивирования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Глик, Б. Молекулярная биотехнология: принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 585 с.
2. Калашникова, Е. А. Клеточная инженерия растений: учеб. пособие / Е. А. Калашникова. – М.: РГАУ-МСХА, 2012. – 318 с.
3. Жимулев, И. Ф. Общая и молекулярная генетика / И. Ф. Жимулев. – М.: Сиб. ун. изд-во, 1998. – 448 с.
4. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник / В. С. Шевелуха [и др.]. – 3-е изд., пер. и доп. – М.: Высшая школа, 2008. – 710 с.
5. Гончаренко, Г. Г. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов / Г. Г. Гончаренко, В. Е. Падутов, В. В. Потенко. – Гомель: Урожай, 1989. – 219 с.
6. Калашникова, Е. А. Получение посадочного материала древесных, цветочных и травянистых растений с использованием методов клеточной и генной инженерии: учеб. пособие / Е. А. Калашникова, А. Р. Родин. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: МГУЛ, 2001. – 73 с.
7. Картель, Н. А. Биотехнология в растениеводстве / Н. А. Картель, А. В. Кильчевский. – Минск: Технология, 2005. – 310 с.
8. Гончаренко, Г. Г. Основы генетической инженерии / Г. Г. Гончаренко. – Минск: Вышэйшая школа, 2005. – 183 с.
9. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.
10. Основы генетической инженерии и биотехнологии: учеб. пособие для студ. высших учеб. заведений по спец. «Зоотехния» / Ю. А. Горбунов [и др.]; под ред. Ю. А. Горбунова. – Минск: ИВЦ Минфина, 2010. – 288 с.
11. Шестибратов, К. А. Мировой опыт и достижения технологий клонального микроразмножения и генетической трансформации / К. А. Шестибратов // Лесохозяйственная информация. – 2008. – № 1–2. – С. 22–23.
12. Падутов, В. Е. Генетические и биотехнологические основы рационального использования лесных генетических ресурсов Республики Беларусь / В. Е. Падутов // Лесохозяйственная информация. – 2008. – № 1–2. – С. 23–24.

13. Политов, Д. В. Применением молекулярных маркеров в лесном хозяйстве для идентификации, инвентаризации и оценки генетического разнообразия лесных ресурсов / Д. В. Политов // Лесохозяйственная информация. – 2008. – № 1–2. – С. 24–27.

14. Применение методов биотехнологии для повышения продуктивности лесных культур / В. Г. Лебедев [и др.]. // Лесохозяйственная информация. – 2008. – № 1–2. – С. 28–29.

15. Газизуллин, А. Х. Современное состояние лесной биотехнологии в мире и России / А. Х. Газизуллин // Вестник Казахского ГАУ. – 2012. – № 4 (26). – С. 94–97.

16. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, No. 4. – P. 473–497.

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>3</b>
<b>Часть I. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ</b> .....	<b>4</b>
<b>Лекция 1. Введение в дисциплину «Основы генетической инженерии древесных видов»</b> .....	<b>4</b>
1.1. Сущность и задачи генетической инженерии .....	4
1.2. Основные направления и методология генетической инженерии .....	5
1.3. Достижения генетической инженерии.....	7
<b>Лекция 2. Молекулярные механизмы генетических процессов</b>	<b>9</b>
2.1. Строение и свойства ДНК .....	9
2.2. Строение, типы и свойства РНК .....	10
2.3. Механизм репликации ДНК.....	10
2.4. Процесс транскрипции ДНК .....	11
2.5. Трансляция РНК .....	12
<b>Лекция 3. Конструирование и клонирование рекомбинантных молекул ДНК</b> .....	<b>14</b>
3.1. Ферменты, используемые в генетической инженерии.....	14
3.2. Создание рекомбинантных молекул ДНК.....	16
3.3. Клонирование рекомбинантных молекул ДНК .....	17
<b>Лекция 4. Векторные системы для переноса генов</b> .....	<b>20</b>
4.1. Свойства векторов.....	20
4.2. Векторы на основе агробактериальных плазмид.....	21
4.3. Векторы на основе хлоропластной и митохондриальной ДНК ...	22
4.4. Векторы на основе вирусов растений .....	22
<b>Лекция 5. Молекулярные методы исследования нуклеиновых кислот</b> .....	<b>24</b>
5.1. Метод электрофоретического анализа ДНК .....	24
5.2. Амплификация фрагментов ДНК .....	26
5.3. Секвенирование фрагментов ДНК .....	27
<b>Лекция 6. Создание генетически модифицированных растений</b> .....	<b>29</b>
6.1. Понятие о трансгенных организмах.....	29
6.2. Методы переноса генов в растения .....	30
6.3. Получение трансгенных растений, устойчивых к гербицидам, биотическим и абиотическим факторам.....	33

<b>Часть II. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ.....</b>	<b>35</b>
<b>Лекция 7. Клеточная инженерия растений .....</b>	<b>35</b>
7.1. Понятие о клеточной инженерии растений.....	35
7.2. Источники получения эксплантов.....	37
7.3. Принципы составления и компоненты питательных сред.....	39
7.4. Условия стерилизации эксплантов, питательных сред, оборудования и рабочих материалов .....	42
<b>Лекция 8. Клональное микроразмножение растений.....</b>	<b>44</b>
8.1. Понятие о клональном микроразмножении растений.....	44
8.2. Классификация методов клонального микроразмножения .....	45
8.3. Этапы клонального микроразмножения .....	46
8.4. Перспективы клонального микроразмножения древесных пород.....	49
<b>Лекция 9. Использование протопластов, каллусных тканей и суспензионных культур для получения растений .....</b>	<b>52</b>
9.1. Получение и культивирование протопластов растений .....	52
9.2. Специфика, получение и культивирование каллусных тканей....	53
9.3. Получение и культивирование суспензионных культур .....	54
9.4. Морфогенез в культуре <i>in vitro</i> .....	56
<b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>57</b>

Учебное издание

**Рибко** Сергей Владимирович

**ОСНОВЫ  
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ  
ДРЕВЕСНЫХ ВИДОВ**

Курс лекций

Редактор *О. П. Приходько*  
Компьютерная верстка *О. П. Приходько*  
Корректор *О. П. Приходько*

Издатель:

УО «Белорусский государственный технологический университет».

Свидетельство о государственной регистрации издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий

№ 1/227 от 20.03.2014.

Ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск.