

Глава 5

ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

5.1. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Генетическая инженерия — ветвь молекулярной генетики, исследующая возможности и способы создания лабораторным путем (*in vitro*) генетических структур и наследственно измененных организмов, т. е. создания искусственных генетических программ, с помощью которых направленно конструируются молекулярные генетические системы вне организма с последующим их введением в живой организм. Обычно употребляют два названия данного научного направления — *генетическая инженерия* и *генная инженерия*, являющиеся как бы синонимами. Однако их смысловое содержание неодинаково: генетическую инженерию связывают с генетикой, а генная имеет отношение только к генам. Кроме того, генетическая инженерия точнее раскрывает содержание дисциплины — создание генетических программ, основная задача которых — создание *in vitro* молекул ДНК посредством соединения фрагментов ДНК, которые в естественных условиях чаще не сочетаются благодаря межвидовым барьерам (рекомбинантные ДНК). Молекула *рекомбинантной ДНК* представляет собой соединенные в бесклеточной системе два компонента: вектор, обеспечивающий механизм репликации и экспрессии, и фрагмент *клонированной* («чужеродной») ДНК, содержащий интересующие исследователя генетические элементы. Согласно определению национальных институтов здоровья США, «рекомбинантными ДНК называют молекулы ДНК, полученные вне живой клетки путем соединения природных или синтетических фрагментов ДНК с молекулами, способными реплицироваться в клетке». Генетическая инженерия возникла на стыке многих биологических дисциплин: молекулярной генетики, энзимологии, биохимии нуклеиновых кислот и др. Первая рекомбинантная ДНК получена в 1972 г. (П. Бергом с сотр.) и была составлена из фрагмента ДНК обезьяньего вируса ОВ40 и бактериофага λ *dvgal* с галактозным опероном *E. coli*. Формально 1972 г. следует считать датой рождения генетической инженерии.

Генетическая инженерия имеет яркую историю благодаря тому общественному резонансу, который она вызвала с самых первых своих шагов. Начало этим событиям положило послание участников Гордоновской конференции (1973) президиуму АН США, в котором говорилось о возможной опасности технологий рекомбинантных ДНК для здоровья человека. Возможные блага генетической инженерии признавались с самого начала, но разногласия по данной проблеме не затихли и сейчас. В табл. 5.1 перечислены основные этапы становления и развития генетической инженерии.

Таблица 5.1

Основные этапы развития генетической инженерии

Год	Автор	Содержание открытия
1869	Ф. Мишер	Выделена ДНК из ядер клеток гноя
1953	Д. Уотсон, Ф. Крик	Сконструирована модель двойной спирали ДНК на основании результатов рентгеноструктурного анализа ДНК
1961	А. Мармур и П. Доти	Открыто явление ренатурации ДНК и установлены точность и специфичность реакции гибридизации нуклеиновых кислот
1962	В. Арбер	Впервые получены сведения о ферментах рестрикции ДНК
1968	М. Мезельсон и Е. Юань	Выделена первая рестриктаза
1966	М. Ниренберг, С. Очоа, Г. Корана	Расшифрован генетический код
1967	М. Геллерт	Открыта ДНК-лигаза
1972—1973	Г. Бойер, С. Козн, П. Берг (Стенфордский университет и Калифорнийский университет в Сан-Франциско)	Разработана технология клонирования ДНК
1975—1977	Ф. Сэнгер, Р. Баррел, А. Максам, В. Гилберт	Разработаны методы быстрого определения нуклеотидной последовательности

Окончание табл. 5.1

Год	Автор	Содержание открытия
1979	Г. Корана	Синтезирован ген тирозиновой супрессорной РНК
1981—1982	Р. Пальмитер, Р. Бринстер, А. Спрэдлинг, Г. Рубин	Получена трансгенная мышь. Получены трансгенные экземпляры дрозофилы
1993	Л. К. Эрнст, Г. Брем, И. В. Прокофьев	Получены трансгенные овцы с геном химозина

5.2. БИОТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

Технология рекомбинантных ДНК включает набор как новых методов, так и заимствованных из других дисциплин, в частности из генетики микроорганизмов. Эти методы существенно расширяют возможности генетических исследований. Используя технологию рекомбинантных ДНК, получают даже минорные клеточные белки в больших количествах и проводят тонкие биохимические исследования структуры и функций белков, а также осуществляют детальный химический анализ генетического материала. К наиболее важным методам биотехнологии рекомбинантных ДНК следует отнести следующие:

1. Специфическое расщепление ДНК рестрицирующими нуклеазами, что в значительной степени ускоряет выделение различных генов и манипуляции с ними.

2. Быстрое секвенирование всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК, позволяющее определить точные границы гена и кодируемую им аминокислотную последовательность полипептида.

3. Гибридизация нуклеиновых кислот, позволяющая с большой точностью выявить специфические нуклеотидные последовательности на основе их способности связывать комплементарные основания.

4. Клонирование ДНК, суть которого сводится к введению ДНК-фрагмента в самореплицирующийся генетический аппарат (плазмиду или вирус), который используют для трансформации бактерий. Бактериальная клетка после трансформации способна воспроизводить этот фрагмент во многих миллионах идентичных копий.

5. Генетическая инженерия, позволяющая получать модифицированные версии генов и затем внедрять их в клетки или организмы.

Технология рекомбинантных ДНК оказала существенное воздействие на всю клеточную биологию, позволяя решать такие за-

дачи, как определение строения и функций не только белков, но и индивидуальных доменов, а также расшифровывать механизмы регуляции экспрессии генов, получать многие белки, участвующие в регуляции обменных процессов, клеточной пролиферации и развитии организма.

Расщепление ДНК в специфических участках нуклеотидных последовательностей осуществляется особыми ферментами — рестрицирующими нуклеазами, способными разрушить чужеродную ДНК. Все ферменты условно можно разделить на следующие группы:

- 1) используемые для получения фрагментов ДНК;
- 2) синтезирующие фрагменты ДНК на матрице РНК;
- 3) соединяющие фрагменты ДНК;
- 4) позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК;

5) применяемые для приготовления гибридизационных проб.

Каждый фермент, способный разрушить чужеродную ДНК, опознает в ней специфическую последовательность из 4—6 нуклеотидов. Соответствующие последовательности в геноме бактерий замаскированы метилированием остатков с помощью метилаз.

Согласно номенклатуре, предложенной Х. Смитом и Д. Натансоном, название рестриктазы складывается из трех букв: первая обозначает родовое название, две последующие — первые буквы вида. Например, фермент из *E. coli* обозначают как Eco или из *Haemophilus influenzae* — Hin и т.д. Типовая или штаммовая идентификация следует за родовидовой, например, EcoRI или HindII и т.д. В настоящее время различные фирмы выпускают более 100 разнообразных ферментов, опознающих различные последовательности нуклеотидов. Для каждого конкретного фермента они различаются по длине, первичной структуре и способу разрыва молекулы ДНК. Подавляющее большинство ферментов разрывает только двуни-тевую ДНК с образованием серии фрагментов, называемых рестриционными (или рестрикатами) с тупыми либо липкими концами (рис. 5.1).

Многие рестриктазы вносят разрывы в две цепи ДНК со смещением на

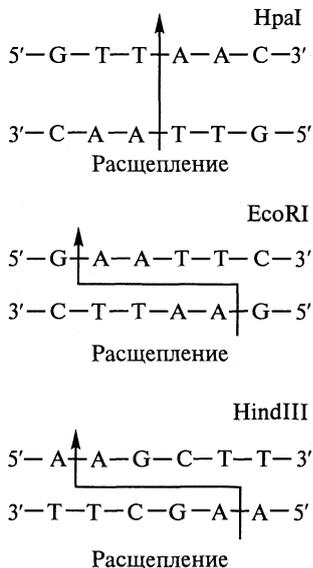
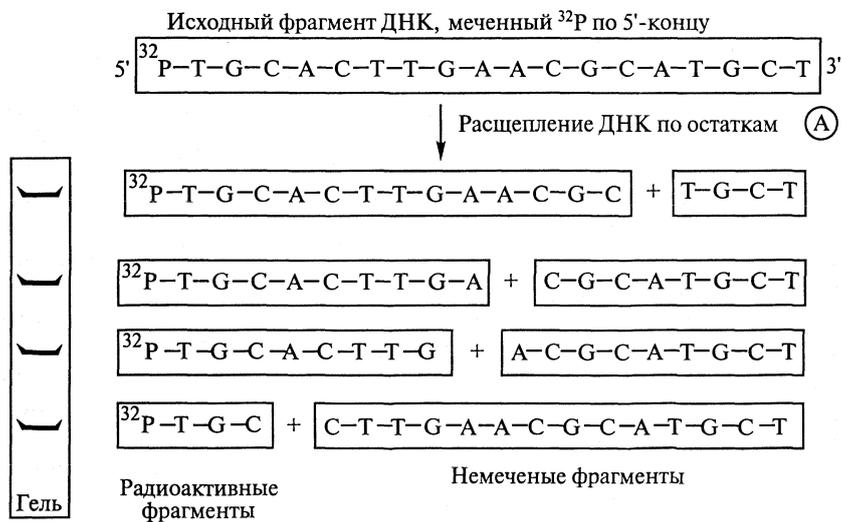


Рис. 5.1. Участки узнавания ДНК тремя рестриктазами из *Haemophilus parainfluenzae* (HpaI); *Escherichia coli* (EcoRI) и *Haemophilus influenzae* (HindIII)

несколько нуклеотидов и образованием на концах фрагментов коротких одноцепочечных участков. Они способны образовывать комплементарные пары оснований с любым другим одноцепочечным участком, полученным с помощью того же фермента (липкие концы). Липкие концы позволяют легко соединить два любых фрагмента ДНК в одно целое. Полученный фрагмент ДНК (любого происхождения) можно встроить в очищенную ДНК плазмиды или бактериального вируса.

Сравнение размеров фрагментов ДНК после обработки соответствующего участка генома набором рестриктаз позволяет построить рестрикционную карту, отражающую расположение определенной последовательности нуклеотидов в данном участке. Сравнением таких карт можно оценить степень гомологии между отдельными генами (участками) без определения их нуклеотидной последовательности. Рестрикционные карты важны для клонирования ДНК, решения эволюционных и филогенетических задач.

Для успешного решения задач генетической инженерии очень важно быстро секвенировать (определить последовательность нуклеотидов) любые очищенные фрагменты ДНК. В настоящее время объем информации о последовательностях ДНК столь велик, что для хранения и анализа данных о фрагментах, целых геномах необходимы новые технологии и компьютерная техника.



Электрофореграмма

Рис. 5.2. Схема получения семейства меченных по 5'-концу фрагментов ДНК в результате расщепления по определённому нуклеотиду (A)

В биотехнологии рекомбинантных ДНК обычно используют два различных метода секвенирования ДНК: химический и ферментативный. Оба метода чрезвычайно надежны, быстры в исполнении и результативны. Результаты секвенирования позволяют также на основе генетического кода определить аминокислотную последовательность белка в соответствии с нуклеотидной последовательностью в соответствующем гене. На рис. 5.2 представлена схема химического метода секвенирования ДНК. Исходный фрагмент ДНК, меченный ^{32}P по 5'-концу, подвергается специфическому расщеплению по определенному нуклеотиду (например, А), в результате чего образуются радиоактивные фрагменты разной длины, которые разделяются по размерам при гель-электрофорезе, а радиоактивные из них выявляются с помощью радиоавтографии.

Обычно химическая процедура расщепления ДНК выполняется одновременно для четырех одинаковых проб ДНК с использованием химических агентов, расщепляющих ДНК по отдельным нуклеотидам (Т, С, G и А). Полученные образцы подвергаются электрофорезу на параллельных дорожках одного геля, и по его результатам можно определить нуклеотидную последовательность ДНК (рис. 5.3).

Энзиматический метод секвенирования основан на энзиматическом введении нуклеотида, терминирующего полинуклеотидную цепь (рис. 5.4). В этом случае обычно используют дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты, в которых дезоксирибоза-3'-ОН, представленная в нормальных нуклеотидах, отсутствует. Такой модифицированный нуклеотид, внедряясь в цепь ДНК с помощью ДНК-полимеразы, блокирует присоединение следующего нуклеотида. Синтез *in vitro* молекулы ДНК в присутствии затравки (прайма) и небольшого количества одного из таких модифицированных нуклеотидов приводит к образованию фрагментов ДНК в виде «лесенки». Если для получения таких фрагментов применять меченую ДНК (обычно проводят четыре реакции синтеза с использованием различных нуклеотидов, терминирующих цепь), а электрофоретический анализ проводить на четырех дорожках геля, то можно определить последовательность нуклеотидов. В настоящее время используют модифицированный метод, сводящийся к флуоресцентному анализу наборов фрагментов ДНК в процессе движения по одной дорожке геля.

Важнейший метод получения рекомбинантных ДНК основан на способности нуклеиновых кислот быстро восстанавливать свою структуру после нагревания до 100°C в сильно щелочной среде (рН 13). При нагревании до 100°C комплементарные пары оснований разрушаются и ДНК диссоциирует на две отдельные цепи. Этот процесс назван денатурацией ДНК («плавлением»). Выдерживание комплементарных цепей при температуре 65°C приводит

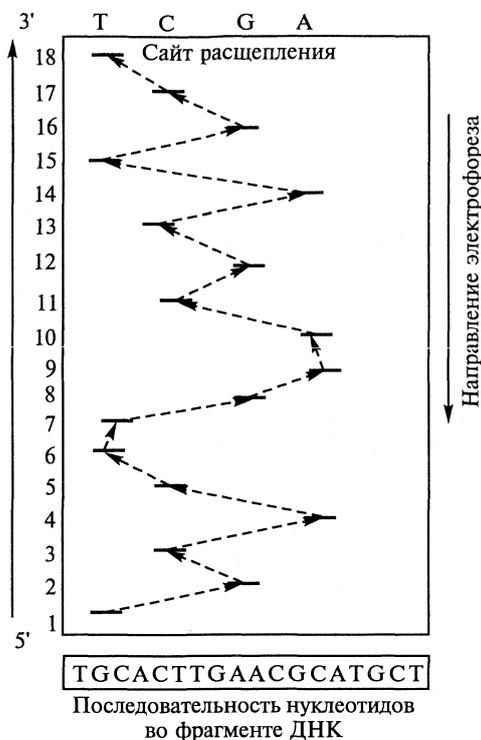


Рис. 5.3. Схема электрофореграммы, полученной с помощью химического метода секвенирования ДНК (первая снизу строка соответствует нуклеотиду на 5'-конце и является нуклеотидом Т на уровне первой дорожки. Для определения полной последовательности (отмечено пунктиром) проводят анализ послойно всех дорожек

к их спариванию и восстановлению структуры двойной спирали (гибридизация, ренатурация, или «отжиг»). Это свойство ДНК широко используют в химической систематике, а также для решения эволюционных и филогенетических проблем.

Скорость восстановления (ренатурации) двойной спирали зависит от вероятности столкновения двух комплементарных нуклеотидных последовательностей и их концентрации в растворе. Скорость реакции гибридации можно использовать для определения концентрации любых последовательностей РНК или ДНК в смеси, содержащей и другие фрагменты нуклеиновых кислот. Для этого необходимо иметь чистый одноцепочечный фрагмент ДНК, комплементарный к тому фрагменту, который надлежит выявить. Обычно фрагмент ДНК, полученный клонированием либо химическим путем, метят по ³²P в целях прослеживания включения фрагмента в состав дуплексов при гибридации. Одноцепочеч-

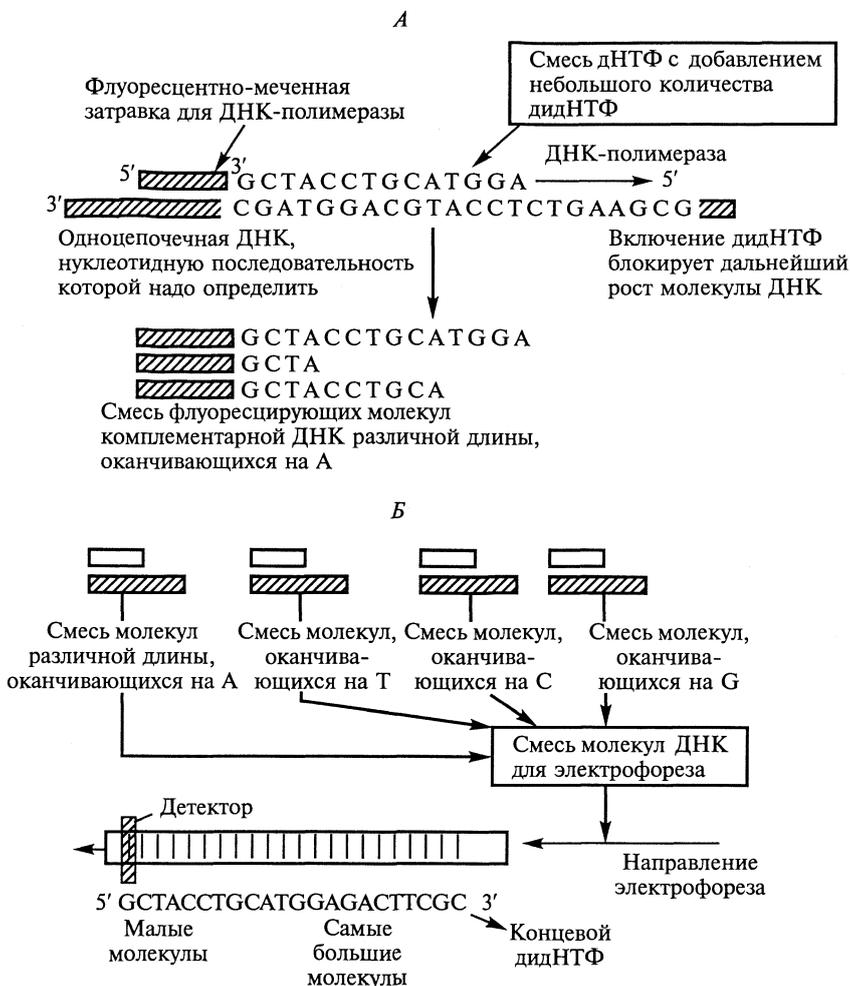


Рис. 5.4. Схема enzymатического метода секвенирования нуклеиновых кислот, основанного на enzymатическом введении нуклеотида, терминирующего цепь:

А — синтез *in vitro* в присутствии затравки с образованием «лесенки» фрагментов; *Б* — инкубация четырех различно окрашенных флуоресцирующих затравок в смеси нуклеотидов с добавлением различных дидНТФ, прекращающих рост цепи (А,Т,С,G)

ную молекулу ДНК, используемую в данном методе в качестве меченого индикатора, называют ДНК-зондом. Размеры его варьируют от нескольких десятков до нескольких сотен и тысяч нуклеотидов. Реакция гибридизации с использованием ДНК-зондов позволяет идентифицировать нуклеотидные последовательности

в очень низкой концентрации и тем самым определять, какое количество копий последовательности ДНК, комплементарной ДНК-зонду, присутствует в геноме клетки.

ДНК-зонды применяют для поиска родственных генов; в реакциях гибридизации с РНК — для выявления экспрессии данного гена в различных клетках. Для выявления молекул нуклеиновых кислот, комплементарных всему зонду (или его участку), ДНК-зонды часто сочетают с методом гель-электрофореза, что позволяет получать информацию о размерах гибридизируемых молекул ДНК. Эффективное использование современных приборов, способных автоматически синтезировать любые нуклеотидные последовательности за короткий промежуток времени, дало возможность перестраивать гены, что представляет собой один из важных аспектов генной инженерии. Обмен генами, а также введение в клетку гена другого вида организма осуществляют посредством *генетической рекомбинации in vitro*. Этот подход был разработан на бактериях, в частности на *E. coli*. Он основан на важном свойстве ДНК — способности к перестройкам, изменяющим комбинацию генов в геноме и их экспрессию. Такая уникальная способность ДНК позволяет приспосабливаться данному виду к изменяющейся среде. Генетическую рекомбинацию подразделяют на два больших класса: общую рекомбинацию и сайт-специфическую рекомбинацию. В процессе общей рекомбинации генетический обмен в ДНК происходит между гомологичными нуклеотидными последовательностями, например между двумя копиями одной и той же хромосомы в процессе мейоза (кроссинговера), или при скрещивании и перегруппировке генов у бактерий.

В процессе сайт-специфической рекомбинации в обмен вступают короткие специфические нуклеотидные последовательности одной и той же или обеих спиралей ДНК, распознаваемые особым сайт-специфическим ферментом, что приводит к трансформации распределения нуклеотидных последовательностей в геноме. Любые комплементарные взаимодействия между двумя гомологичными спиральями ДНК возможны лишь тогда, когда в одной из двух цепей происходит разрыв. К числу факторов, вызывающих такие одноцепочечные разрывы, относят: химические агенты, некоторые виды излучения, специфические белки. Например, у *E. coli* обнаружен белок гес VCD, который вызывает в молекулах ДНК одноцепочечные разрывы. Белок гес VCD представляет собой ДНК-зависимую АТРазу, которая действует как ДНК-хеликаза, перемещающаяся по спирали ДНК и вызывающая ее расплетение. Под влиянием этого белка, обладающего нуклеазной и хеликазной активностью, на двойной спирали ДНК возникает разрыв с образованием одноцепочечного участка «ус» (whisker) (рис. 5.5).

Белок гес VCD присоединяется к двойной спирали ДНК с одного конца (5') и со скоростью около 300 нуклеотидов в секунду

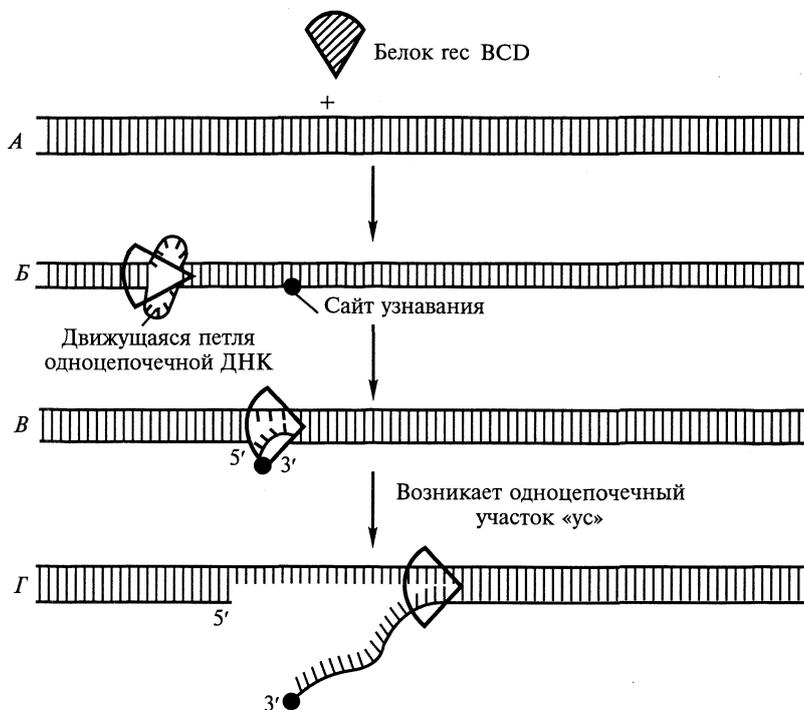


Рис. 5.5. Схема процесса общей рекомбинации с участием белка гес BCD у *E. coli*:

A — двойная спираль ДНК; B — присоединение к двойной спирали белка гес BCD с последующим его перемещением; B — возникновение разрыва в сайте узнавания; Г — образование одноцепочечного участка «ус»

движется вдоль спирали ДНК за счет гидролиза АТФ. Одновременно с белком движется и возникшая петля ДНК. Когда петля на спирали достигает участка, называемого сайтом узнавания (recognition site), одна из цепей разрывается с освобождением небольшого одноцепочечного участка «ус». Возникший «ус» инициирует дальнейшую генетическую рекомбинацию.

В процессе общей генетической рекомбинации центральная роль отводится комплементарным взаимодействиям нуклеотидных последовательностей. Кроме того, этот процесс требует участия особого белка гесА с Mg, равной 38 кДа. Белок гесА прочно связывается в виде крупных кластеров с одиночными цепями ДНК, одновременно удерживая и двойную спираль. За счет двух сайтов данный белок имеет еще один участок — для связывания и гидролиза АТФ, т.е. он представляет собой ДНК-зависимую АТФазу. Благодаря особенностям белка гесА осуществляются од-

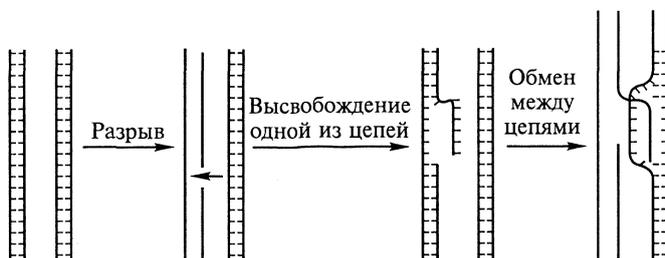


Рис. 5.6. Схема начального одноцепочечного обмена между двумя гомологичными двойными спиралями ДНК в процессе общей рекомбинации

ноцепочечный обмен между двумя двойными спиралями (рис. 5.6) с удалением некоторого количества нуклеотидов и локальный ре-синтез ДНК.

Разрыв в одной из цепей ДНК высвобождает эту цепь, и она внедряется во вторую спираль, образуя короткий спаренный участок. После начального обмена гомологичные нуклеотидные последовательности двух взаимодействующих спиралей устанавливаются в строгом соответствии одна с другой, в связи с чем происходит расширение области спаривания и быстрый обмен между спиралями. Для этого процесса разные организмы используют неодинаковые механизмы, большинство из которых включает в качестве промежуточного этапа обмен с перекрещиванием цепей между двумя спиралями ДНК (рис. 5.7).

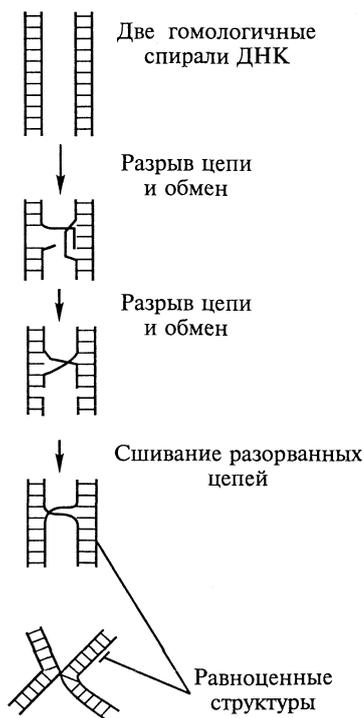


Рис. 5.7. Схема образования структуры с перекрещиванием цепей между двумя спиралями ДНК

Структура, образуемая при обмене с перекрещиванием цепей, содержит две перекрещенные и две неперекрещенные цепи. Она способна существовать в различных изомерных формах. Изомеризация меняет положение двух пар цепей: две ранее перекрещивающиеся цепи становятся неперекрещивающимися и наоборот.

Для того чтобы восстановились две отдельные спирали ДНК и тем самым прекратился процесс спаривания, в каждой из двух перекрещенных цепей должен произойти разрыв (рис. 5.8).

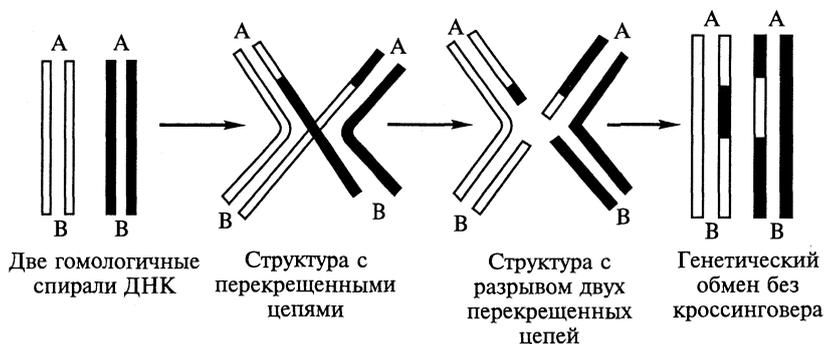


Рис. 5.8. Схема генетического обмена между двумя гомологичными спиралями ДНК без кроссинговера

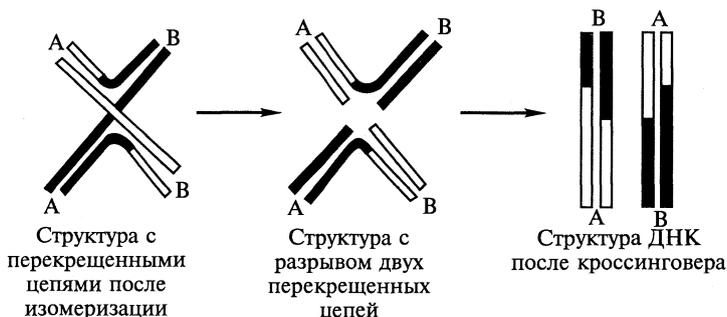


Рис. 5.9. Схема образования молекулы ДНК после изомеризации перекрещенных цепей и кроссинговера

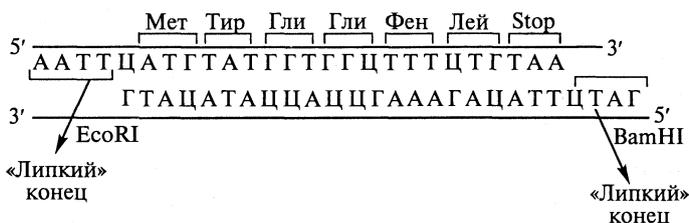
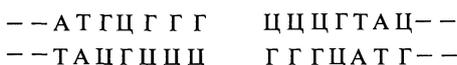
В случае изомеризации одной из цепей (поворота на 180°) разрыв перекрещенных цепей дает две кроссоверные хромосомы (рис. 5.9).

5.3. КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК

Сущность генетической инженерии сводится к целенаправленному конструированию генетических систем вне организма с последующим введением их в живой организм. При этом рекомбинантные ДНК становятся составной частью генетического аппарата реципиентного организма и, кроме того, они привносят в него новые генетические и физиолого-биохимические свойства, полезные для человека. К числу таких свойств можно отнести синтез аминокислот и белков, гормонов, ферментов, витаминов и др.



Сшивание ↓ ДНК-лигаза



Один из важных этапов конструирования молекулы ДНК — лигирование (или сшивание) генов с помощью фермента ДНК-лигазы. Сшивание фрагментов ДНК, содержащих нужные гены, осуществляют двумя основными методами: а) по «липким» концам; б) с помощью искусственно достроенных «липких» концов.

Сшивание генов (фрагментов) ДНК по «липким» концам, т.е. взаимнокомплементарным участкам, длиной из 4—6 пар нуклеотидов, достаточно легко осуществляется ферментом ДНК-лигазой с образованием ковалентной фосфодиэфирной связи между соседними нуклеотидами:



Сшивание ↓ ДНК-лигаза

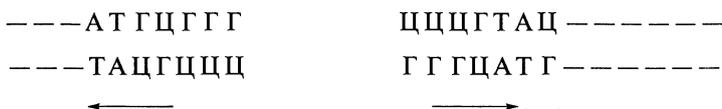


При отсутствии комплементарных «липких» концов у сшиваемых фрагментов их достраивают, т.е. синтезируют искусственно ферментативным путем. Для этой цели применяют так называемые линкеры (или «переходники») — короткие участки ДНК, имеющие разные «липкие» концы:



Линкерные фрагменты не только обеспечивают объединение генов, но и обуславливают их экспрессию, в связи с чем часто в середину линкера помещают какой-либо регуляторный генетический элемент, например промотор, или участок связывания с рибосомой.

Возможно сшивание фрагментов и по тупым концам, когда концы фрагментов двунитевые:



В этом случае реакция лигирования имеет биохимические особенности и ее эффективность ниже, чем при сшивке по «липким» концам.

После того как рекомбинантная ДНК сшита, ее вводят в живые клетки. Но поскольку она не способна к самовоспроизведению, ее разрушают внутриклеточные нуклеазы. Для того чтобы рекомбинантная ДНК стала составной частью генетического аппарата клетки, она должна либо встроиться (интегрироваться) в ее геном и реплицироваться за его счет, либо быть способной к автономной репликации. Принято молекулы ДНК, способные акцептировать чужеродную ДНК и автономно реплицироваться, называть *векторными молекулами*. К числу векторов относят плазмиды, бактериофаги, вирусы животных. Векторы должны обладать следующими особенностями:

1. Иметь субстратные участки для определенных эндонуклеаз рестрикции.
2. Иметь свойства репликона.
3. Содержать один или несколько маркерных генов, которые после проникновения вектора в клетку придадут ей фенотип, свидетельствующий о присутствии вектора.

В частности, для бактериальных векторов в качестве маркерных генов чаще всего используются гены, вызывающие устойчивость клеток к некоторым антибиотикам.

Таким образом, все векторы обеспечивают репликацию встроенных генов, их экспрессию, интеграцию в хромосому клетки и т.д.

Чаще других в генетической инженерии в качестве векторов используют плазмиды. *Плазмидами* называют бактериальные репликоны (внехромосомные элементы наследственности), стабильно наследуемые. Они представляют собой двуцепочечные кольцевые молекулы ДНК с варьируемыми молекулярными массами. По размеру они соответствуют 1—3 % генома бактериальной клетки. Так, молекулярная масса одной из самых мелких плазмид, найденных у *E. coli*, составляет 1,5 МДа, а клетки псевдомонад содержат плазмиды с Мг около 300 МДа, что составляет 15 % от Мг хромосом этих бактерий. Плазмиды разделяют на конъюгативные, способные сами перенестись в реципиентные клетки с помощью конъюгации, и неконъюгативные, не обладающие этим свойством. Они детерминируют разные свойства: резистентность к антибиотикам (R-плазмиды); биodeградацию (D-плазмиды) и др. Например, плазмиды стафилококков несут гены устойчивости к пенициллину, соединениям ртути и др. Гены устойчивости к тяжелым металлам обнаружены также в составе R-плазмид *E. coli*. Плазмиды могут управлять синтезом инсектицида в клетках *Bacillus thuringiensis*. F-плазида *E. coli* или FP-плазида псевдомонад являются половыми факторами. Плазида pS101 с Мг 5,8 МДа несет ген устойчивости к тетрациклину (селективный маркер). У различных микроорганизмов — *E. coli*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Saccharomyces* обнаружены Col-плазмиды, обеспечивающие синтез разных колицинов — высокоспецифических антибиотиков, подавляющих жизнедеятельность других штаммов микроорганизмов того же вида или родственных видов. Количество плазмид в клетке может колебаться от одной до более ста. В целом чем крупнее плазида, тем меньше количество ее копий в клетке.

Первый плазмидный вектор был получен С.Козном (1973). Его источником была плазида *E. coli* R₆₋₅ с Мг 65 кДа. Плазида стала родоначальником серии векторов и других структур. Особое место в генетическом манипулировании занимает плазида, относящаяся к группе колициногенных плазмид *E. coli*. ColE1 реплицируется независимо от хромосомы и присутствует в количестве примерно 24 копий на клетку. Ее широко используют благодаря селективному маркеру в качестве вектора для клонирования фрагментов про- и эукариотической ДНК в *E. coli*.

Плазида ColE1 (Мг 4,2 МДа) применяется для клонирования EcoRI-фрагментов. При этом интеграция чужеродного фрагмента в участок узнавания EcoRI ведет к фенотипическому изменению клетки, прекращению синтеза колицина с сохранением иммунности к нему. Этот признак используют при отборе рекомбинантных трансформантов.

Плазида pBR313 содержит уникальные участки расщеплений нескольких рестриктаз: EcoRI, HindIII, BamHI, SalI, XmaI и HpaI. Конструируя рекомбинантную ДНК, в эти участки можно встра-

ивать фрагменты чужеродной ДНК, полученные с помощью соответствующих рестриктаз. На рис. 5.10 изображена схема расположения генов в плазмиде pBR322. Плазмида pBR322 содержит два гена, программирующих устойчивость к двум различным антибиотикам — тетрациклину (ген *tet*) и ампициллину (ген *bla*). В гене *tet* находятся уникальные участки расщепления рестриктазами *Hind*III, *Bam*HI и *Sal*I, а в гене *bla* — участок расщепления *Pst*I. Если разрезать плазмиду любой из рестриктаз, участок расщепления которой находится в гене *tet*, и соединить ее методом «липких» концов с чужеродным фрагментом ДНК, то в полученной рекомбинантной молекуле останется нетронутым только ген *bla*, а ген *tet* утрачивает свою активность, так как его целостность нарушается вставкой. Напротив, при разрезании плазмиды рестриктазой *Pst*I и внедрении в этот участок фрагмента ДНК инактивируется ген *bla*, тогда как ген *tet* продолжает кодировать белок, обеспечивающий устойчивость *E. coli* к тетрациклину. Плазмидные векторы в настоящее время чрезвычайно разнообразны за счет следующих свойств:

уменьшения размеров плазмиды вследствие изъятия участков, не обязательных для репликации (чем больше плазмида содержит уникальных участков узнавания для рестриктаз, тем она универсальнее);

гибридизации векторов одного рода с другими векторами или природными плазмидами (например, получены гибридные векто-

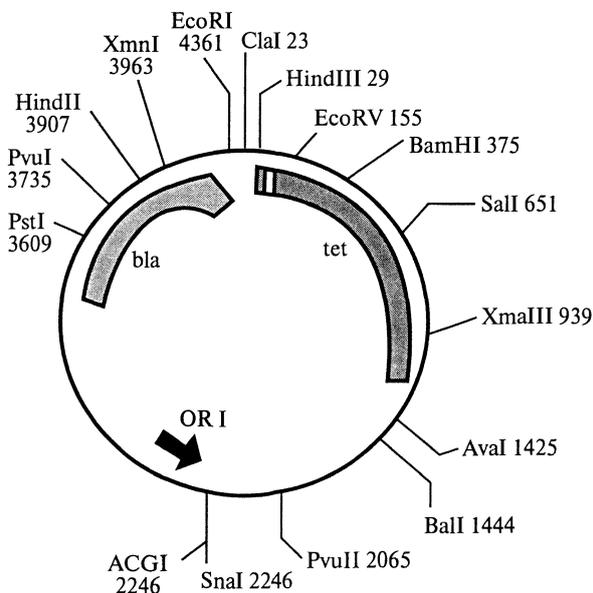


Рис. 5.10. Схема строения плазмиды pBR322

ры комбинацией плазмиды и фага λ (при этом вновь сконструированная рекомбинантная ДНК должна сохранить репликационные свойства исходной плазмиды);

использования новых плазмид;

применения транспозонов;

создания векторов с генетическими маркерами, позволяющими вести отбор рекомбинантных клонов.

Зукариотические вирусы до сих пор нашли более скромное применение в качестве векторов. Практически используются только онкогенный вирус SV 40 и его производные. Все эти векторы — дефектные вирусы, не способные давать полноценные вирусные частицы в клетке хозяина. Анализируемую ДНК можно вводить и в другие репликоны, способные размножаться в клетках, например бактериофаги. Чаще всего из известных фагов в качестве векторов применяют сконструированные производные фага λ и фагов M13 и fd. В векторах на основе бактериофага λ используется его особенность, состоящая в том, что большая часть его ДНК не участвует в размножении фага в клетке. Это позволяет вводить чужеродную ДНК в ДНК фага λ в качестве вектора.

Фаг M13 — это одноцепочечная циклическая ДНК длиной около 6500 нуклеотидов. После инфицирования бактериальной клетки одноцепочечная ДНК фага превращается в двуцепочечную репликативную форму (RF), которая подобна плазмиде. Фаговая ДНК содержит, кроме того, короткий участок из 500 нуклеотидов, названный как МП (межгенная последовательность), не существенный для ее жизнедеятельности. Именно в этот участок МП репликативной формы ДНК после расщепления ее с помощью лигазы вставляют чужеродную ДНК. Введение рекомбинантной двуцепочечной молекулы в клетку *E. coli* приводит к ее репликации, синтезу (+) цепи, упаковке последней в белковый чехол и выделению фага в среду. Инфицированная нитевидным фагом клетка продолжает делиться, выделяя в окружающую среду большое количество фага. Этот фаг содержит в вирионе одноцепочечную циклическую ДНК, в которую встроена одна из цепей чужеродной ДНК.

Векторные плазмиды и векторные вирусы со встроенными чужеродными генами часто называют *гибридными* (или *химерными*) *плазмидами* (или фагами). После конструирования рекомбинантных ДНК их с помощью трансформации вводят в реципиентный организм: бактериальную, грибную, растительную или животную клетку. Трансформация предусматривает предварительную обработку клеток соединениями, обуславливающими проникновение ДНК внутрь клеток с последующим их помещением в среду, в которой способны существовать только клетки, получившие векторную молекулу, например в среду с определенным антибиотиком.

Процесс инфицирования клеток с помощью чужеродных ДНК, приводящий к образованию зрелого фагового потомства, назван трансфекцией.

Практически общий способ трансформации и трансфекции основан на том, что при обработке клеток бактерий CaCl_2 их мембрана становится проницаемой для ДНК. Однако эффективность проникновения экзогенной ДНК в клетку довольно низка. Поэтому среди бактерий, подвергшихся трансформации, только небольшая часть оказывается трансформированной. Отделение ее от общей массы осуществляется в процессе клонирования. Для клонирования бактериальную суспензию определенной концентрации выливают на твердую питательную среду, например на агар с питательными добавками в чашке Петри из расчета 5—10 бактерий на 1 см^2 поверхности. Бактериальная клетка на поверхности агара начинает делиться с образованием в итоге маленькой колонии, похожей на шляпку гриба. Эта колония называется *клоном*, причем из каждой клетки образуется свой клон, все клетки которого имеют свойства бактерии-родоначальника.

Отбор бактерий-трансформантов можно продемонстрировать, используя плазмиду rBR322 (см. рис. 5.10), содержащую два гена устойчивости к тетрациклину и ампициллину. Для отбора этих бактерий в агар добавляют антибиотик — или ампициллин, или тетрациклин в зависимости от того, какой из генов (*bla* или *tet*) остался интактным после введения чужеродной ДНК. На такой среде клоны образуют клетки только с плазмидами. Для отделения рекомбинантных бактерий часть материала каждого клона переносят на другую чашку Петри, содержащую антибиотик, ген устойчивости к которому был разрушен при создании рекомбинантов. На этих чашках Петри дают клоны только те бактерии, которые содержат исходную плазмиду, а рекомбинантные бактерии их не образуют. Такая тщательная селекция клонов по устойчивости к антибиотику позволяет идентифицировать рекомбинантные клоны. При поиске рекомбинантных клонов успешно применяют метод автордиографии.

Рекомбинантные клоны могут быть идентифицированы и по синтезируемому ими продукту. Но чаще приходится идентифицировать непосредственно нуклеотидную вставку с использованием методов гибридизации. С этой целью бактериальные колонии выращивают на нитроцеллюлозных фильтрах, помещенных на чашку Петри с питательной средой. Далее готовят реплики: к фильтру с исходными колониями прижимают свежий нитроцеллюлозный фильтр, который затем переносят на чашку Петри с плотной питательной средой, где образуются колонии, идентичные первым.

Затем фильтр-реплику подвергают щелочной обработке, при этом клетки в колониях лизируют и денатурированная ДНК из

клеток связывается с нитроцеллюлозой в том участке, где была расположена соответствующая колония. При радиоактивной ДНК или РНК (меченной ^{32}P или ^{125}J) выдерживание фильтра в растворе, содержащем радиоактивный полинуклеотид, приводит к гибридизации с комплементарными последовательностями. В итоге те участки фильтра, в которых находились рекомбинантные клоны с требуемой вставкой, оказываются радиоактивными и идентифицируются радиоавтографически.

5.4. ЭКСПРЕССИЯ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ

Эффективность функционирования бактериальных генов неодинакова, что обуславливает вариабельность концентрации отдельных белков в зависимости от их функций. Такие вариации белков, например у *E. coli*, обусловлены системой контроля генной экспрессии, осуществляемой в основном на уровне транскрипции ДНК, и зависят от количества синтезируемой на данном гене мРНК и активности фермента РНК-полимеразы. Порядок в чередовании нуклеотидных последовательностей в промоторном участке структурного гена определяет степень активности РНК-полимеразы и инициацию процесса транскрипции. Бактериальные гены, включенные в геном, как правило, экспрессируются достаточно легко, давая мРНК и белок в силу того, что в сигнальных последовательностях, управляющих процессами транскрипции и трансляции у различных прокариотических организмов, много общих черт. Что касается экспрессии генов эукариот в бактериях, то она происходит крайне редко, если не создавать специальные условия, поскольку регуляторные участки эукариот отличны от таковых у бактерий. Регуляторные (сигнальные) участки не узнаются бактериальными РНК-полимеразами, что приводит к замедлению транскрипции. При клонировании геномной ДНК эукариотической клетки экспрессия генов не происходит из-за отсутствия у бактерий системы сплайсинга. Следовательно, для экспрессии эукариотических генов в клетках прокариот необходимо, чтобы данные гены находились под контролем прокариотических регуляторных элементов. В связи с этим для осуществления экспрессии эукариотического гена соответствующая кДНК (или синтетическая ДНК), содержащая кодирующую последовательность, в составе векторной молекулы (например, плазмиды) присоединяется к регуляторным элементам бактерии-промотора, оператору и рибосом-связывающему участку.

Таким образом, в сконструированных промежуточных рекомбинантных ДНК эукариотический ген будет находиться под контролем бактериальных регуляторных элементов. Целесообразнее встраивать ген в подходящий вектор для экспрессии, который уже

содержит регуляторные элементы, способствующие активной экспрессии встроенного гена после введения рекомбинантной плазмиды в бактериальную клетку. Например, к таким эффективным регуляторным участкам принадлежит промотор гена β -лактамазы (ген устойчивости к ампициллину, входящий в состав плазмиды pBR322). Промотор гена β -лактамазы нерегулируемый, а использование таких промоторов не всегда удобно, так как синтезированные белки в большом количестве могут блокировать рост бактерий. В связи с этим целесообразнее использовать регулируемые сильные промоторы, включить которые для синтеза чужеродного белка можно и в том случае, когда получена большая бактериальная масса. В частности, к числу регулируемых сильных промоторов следует отнести термочувствительный промотор pL, который ответствен за экспрессию нескольких генов бактериофага. Белок-репрессор, блокирующий данный промотор, активен при 31 °С, но неактивен при 38 °С, следовательно, при инкубировании бактерий при 31 °С чужеродный ген не экспрессируется и, наоборот, повышение температуры вызывает инактивацию репрессора и высокий уровень синтеза нужного белка.

Последовательность оснований длиной 6—8 нуклеотидов, расположенная непосредственно перед иницирующим кодоном АУГ у *E. coli*, определяет эффективность процесса трансляции. Эта последовательность представляет собой участок связывания мРНК с рибосомой, и его сдвиг в ту или иную сторону способен уменьшать эффективность трансляции мРНК. По имени исследователей, идентифицировавших этот участок, он был назван *последовательностью Шайн-Дальгарно*. Обычно эту последовательность включают в состав самого вектора вместе с иницирующим кодоном на нужном расстоянии. При экспрессии векторов такого типа образуется гибридный белок, в котором несколько N-концевых аминокислотных остатков происходят от источника регуляторных элементов и иницирующего кодона прокариотического гена. Такие гибридные белки часто более стабильны; обработка их химическим или ферментативным способом приводит к выделению эукариотической части белка.

Суммарная активность экспрессируемого гена возрастает с ростом числа копий рекомбинантной ДНК в расчете на клетку. Используя многокопийные плазмиды, можно получить сверхсинтез нужных белковых продуктов. Получены температурно-чувствительные мутантные плазмиды, способные накопить до 1—2 тыс. копий на клетку без нарушения жизненно важных функций бактерий. Обычно же используемые плазмидные векторы поддерживаются в клетке в количестве 20—50 копий. Получение бактериальных штаммов-сверхпродуцентов плазмидных генов — одна из важнейших задач современной биотехнологии в экономическом, медицинском и социальном аспектах.

5.5. КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНИЗМАХ

В настоящее время разработаны системы клонирования в бактериях, дрожжах, грибах, растениях и млекопитающих. Особый интерес с экономической точки зрения представляют системы клонирования генов в грамположительных бактериях, многие из которых являются сверхпродуцентами важнейших химических соединений. Значительных успехов в биоиндустрии удалось достичь с клетками *Bacillus subtilis*, стрептомицетами и *Saccharomyces cerevisiae*.

Векторы для клонирования в таких системах представляют собой *двойные репликоны*, способные существовать и в *E. coli*, и в той клетке хозяина, для которой они предназначены. С этой целью создают гибридные векторы, содержащие репликон какой-либо из плазмид *E. coli* и требуемый репликон (из бактерий, дрожжей и др.), и первоначально клонируют с последующим отбором требуемых генов в хорошо изученной системе. Затем выделенные рекомбинантные плазмиды вводят в новый организм. Такие векторы должны содержать ген (или гены), придающий клетке-хозяину легко тестируемый признак.

B. subtilis — непатогенный почвенный микроорганизм. Клеточная стенка бактерии имеет простую структуру, позволяющую секретировать многие белки в культуральную жидкость. В частности, 20 различных видов бактерий синтезируют более 40 ферментов с внеклеточной локализацией. В этих бациллах обнаружены плазмиды и фаги, генетика которых хорошо изучена. Клонирование осуществляется с помощью так называемых *челночных векторов*, которые способны реплицироваться в клетках нескольких хозяев: *B. subtilis*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*. Векторы были получены комбинацией *in vitro* фрагментов плазмид *St. aureus*, *E. coli* и хромосомных фрагментов *B. subtilis*. Полученные рекомбинантные штаммы несут признаки устойчивости к антибиотикам.

Стрептомицеты широко применяют в биотехнологии в качестве продуцентов антибиотиков. Конструирование векторов для клонирования в них началось с выделения плазмиды Scp2 из *Streptomyces coelicolor*. На основе этой плазмиды были сконструированы векторы, придающие стрептомицетам устойчивость к антибиотикам, например к метиленомоцину А.

Клонирование в дрожжах. Среди дрожжей наиболее полно изучен вид *S. cerevisiae*. У этого вида в гаплоидных клетках содержится 17 хромосом, в их составе идентифицировано несколько сотен генов. Большинство штаммов дрожжей содержат автономно реплицирующуюся кольцевую ДНК длиной 2 мкм. Плазмида Scp1 *S. cerevisiae* содержит около 6300 пар оснований и имеет 50—100 копий на клетку. Ее гибриды с плазмидами обычно и используют в

качестве векторов. Работа с дрожжами облегчается тем, что подобно бактериям они могут расти в жидкой среде и давать колонии на твердой среде, а такие имеют сравнительно короткое время регенерации (несколько часов) вследствие малого размера генома.

Процедура выделения ДНК в клетки дрожжей довольно проста. Обычно целлюлозную клеточную стенку удаляют обработкой ферментами, получая так называемые сферопласты. Их инкубируют с ДНК в присутствии CaCl_2 и полиэтиленгликоля. Мембрана при этом становится проницаемой для ДНК. Дальнейшая инкубация сферопластов в среде с агаром восстанавливает клеточную стенку. Селекция дрожжевых клонов, трансформированных рекомбинантными плазмидами, основана на применении в качестве клеток-хозяев определенных мутантов, не способных расти на среде, в которой отсутствует тот или иной питательный компонент. Векторная плазида содержит гены, которые при попадании в клетку-хозяина придают ей этот недостающий признак. Трансформанты легко отбираются по их способности давать колонии на обедненной среде. Применяя приемы, аналогичные использовавшимся при клонировании в бактериях, удается достичь синтеза чужеродных белков в дрожжевых клетках. Эти клетки подобно *B. subtilis* секретируют большое количество белка во внеклеточную среду, что используется также для секреции чужеродных белков, например интерферона человека (с. 43).

Клонирование в клетках животных. Проблема введения генов в клетки млекопитающих очень важна для исследования функционирования генов высших эукариот.

Предварительно клонированные гены вводят в клетку животных различными путями. Суть одного из них состоит в трансформации клеток требуемым геном, соединенным с одним из генов, для которых осуществляется селекция. Для идентификации и последующего размножения клеток, содержащих интегрированную ДНК, был разработан метод, получивший название метода маркера. Примером может служить метод получения клеток, дефектных по синтезу фермента тимидинкиназы (ТК⁻-клетки). Такие клетки трансформировались фрагментами ДНК вируса герпеса (HSV), содержащего ген фермента ТК, и после трансформации они приобретали способность к синтезу фермента на селективной среде, т. е. становились ТК⁺-клетками. Клетки ТК⁺ легко отличаются от клеток ТК⁻, поскольку способны расти на средах с аминокпертином (ингибитор, блокирующий определенные стадии биосинтеза нуклеотидов), гипоксантином и тимидином. Следовательно, в данном случае для трансформации клеток животных были использованы гибриды бактериальных плазмид с геном ТК из вируса герпеса. Для этого предварительно проводили клонирование и идентификацию генов в клетках *E. coli* и затем полученная рекомбинантная плазида вводилась в ТК⁻-клетки. Анализ мето-

дом блот-гибридизации подтвердил, что выжившие клетки содержали интегрированный в геном ТК-ген вируса герпеса.

Селективные маркеры дают возможность вводить в клетки млекопитающих любой ген, заранее лигированный с клонированным селективным маркером.

В последние годы сконструировано большое количество так называемых *челночных векторов* и их рекомбинантных производных, способных к репликации в животной и бактериальной клетках, экспрессирующие клонируемый ген в животной клетке. К числу таких векторов можно отнести векторы из плазмиды рBR322 и интактного района транскрипции ДНК SW-40. Геном SW-40 представляет собой циклическую ДНК длиной 5243 п.о. Однако в вирусах животных размеры несущественных областей малы и в них нельзя внедрить большие фрагменты чужеродной ДНК, например ген дигидрофолатредуктазы мыши размером 42 kb. В большинстве случаев чужеродная ДНК замещает существенные гены, в результате чего рекомбинантные вирусы утрачивают способность к репликации. Для ее функционирования используют «вирусы-помощники», синтезирующие продукты недостающих генов, за счет которых и существует рекомбинантный вирус. Обычно опухолевые вирусы (в том числе SV-40) внедряют свою ДНК в хромосому клетки-хозяина и тем самым убивают ее при своем размножении. Обычно вирус бычьей папилломы в трансформированных клетках существует в виде эписомы (≈ 100 копий на клетку) и используется в качестве основы для конструирования эписомных векторов. Одна из важнейших задач генной инженерии — разработка технологий по созданию векторов, подобных плазмидам, не убивающим клетку-хозяина и эффективно экспрессирующим клонируемый ген в животной клетке.

Представляют немаловажный интерес *микроринъекции ДНК* непосредственно в ядро клетки. Так, плазмиды, содержащие фрагмент вируса герпеса с геном тимидинкиназы, и плазмиды рBR322 были инъецированы в ТК-клетки, при этом ТК-ген проник в ядра и нормально в них реплицировался.

Трансформация соматических клеток млекопитающих открывает возможность для изучения механизмов регуляции экспрессии генов и целенаправленно модифицировать генетический аппарат клетки животных, в том числе и человека. Культуры клеток млекопитающих могут быть эффективным источником выделения ряда вирусных антигенов с целью получения вакцин для животных и человека.

В настоящее время разработаны способы введения генов в эмбриональные клетки млекопитающих, мух и некоторых растений с целью изменения свойств организма, таких, как скорость роста, устойчивость к заболеваниям и внешним воздействиям. Подобного рода работы были начаты с довольно крупными яйцами амфибий, а затем продолжены с яйцеклетками и эмбрионами мыши.

Микроинъекцию клонированных генов проводят в один или оба пронуклеуса только что оплодотворенной яйцеклетки мыши. После инъекции яйцеклетку немедленно имплантируют в яйцевод приемной матери или дают возможность развиваться в культуре до стадии бластоцисты, после чего имплантируют в матку. Таким образом были инъецированы гены интерферона и инсулина человека, ген глобина кролика, ген тимидинкиназного вируса герпеса и кДНК вируса лейкемии мышей. Выживает обычно от 10 до 30 % яйцеклеток, а доля мышей, родившихся из трансформированных яйцеклеток, составляет от нескольких до 40 %.

Выяснено, что уровень экспрессии чужеродного гена зависит от места интеграции ДНК с хромосомами, от дифференцировки тканей.

Несмотря на определенные успехи в области интеграции чужеродных генов в эмбриональные клетки животных, до сих пор не удалось встроить чужеродную ДНК в заданный участок хромосомы, вытеснить ген и заменить его новой нуклеотидной последовательностью, подчинить новый ген системе регуляции организма. Преодоление этих трудностей позволит успешно осуществлять генотерапию человека — лечение нескольких десятков генетических заболеваний, обусловленных отсутствием или дефектами генов.

5.6. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

Применение методов генетической инженерии в животноводстве открывает перспективу изменения ряда свойств организма: повышение продуктивности, резистентности к заболеваниям, увеличение скорости роста, улучшение качества продукции и др. Животных, несущих в своем геноме рекомбинантный (чужеродный) ген, принято называть *трансгенными*, а ген, интегрированный в геном реципиента, — *трансгеном*. Продукт этого гена (белок) является трансгенным. Благодаря переносу генов у трансгенных животных возникают новые качества, а дальнейшая селекция позволяет закрепить их в потомстве и создавать трансгенные линии.

Получение трансгенных животных предусматривает ряд этапов: приготовление раствора ДНК для микроинъекции; извлечение эмбрионов из донорных организмов; микроинъекция ДНК и пересадка инъецированных эмбрионов в яйцеводы или после культивирования в матку синхронизированных реципиентов. У родившихся потомков исследуют экспрессию трансгена на уровне транскрипции и трансляции. Трансгенное потомство получают путем использования традиционных методов разведения животных. Следует отметить, что от приготовления инъекционного раствора ДНК

(его чистоты, концентрации) во многом зависит эффективность получения трансгенных животных. Обычно гены транспортируют на ранних стадиях развития животного (в большинстве случаев на стадии зиготы и двухклеточных эмбрионов). Для трансформации генов в геном животного используют следующие приемы: микроинъекцию ДНК в пронуклеус зигот или в каждый бластомер у двухклеточного эмбриона; введение ДНК с помощью ретровирусных векторов; получение трансгенных химер из генетически трансформированных клеток и эмбрионов. В настоящее время наиболее распространенный метод — микроинъекция ДНК. Ее осуществляют с помощью специальной пипетки (внутренний диаметр ее около 1 мкм), а количество инъецированного раствора ДНК составляет 1—2 пкл. После инъекции ДНК эмбрионы культивируют до момента пересадки реципиентам. Следует отметить, что микроинъекция эмбрионов сельскохозяйственных животных значительно сложнее, чем микроинъекция эмбрионов мышей и кроликов.

После небольшого культивирования *in vitro* проинъецированные эмбрионы переносят в яйцеводы (хирургическим путем) реципиентов. Каждому реципиенту мыши, кролика и свиньи обычно пересаживают 20—30 инъецированных зигот, причем у свиней все эмбрионы трансплантируют в один яйцевод; у мышей и кроликов — раздельно по яйцеводам, а у овец, коз и крупного рогатого скота — по 2—4 эмбриона каждому реципиенту. Используя методы блот-анализа, дот-блот-анализа и ПЦР, можно получить вполне надежные доказательства интеграции и экспрессии ДНК у трансгенных животных. С этой целью используют ядродержащие клетки тканей или внутренних жидкостей реципиента, из которых выделяют ДНК.

Для исследования у трансгенных животных выделяют РНК из тех тканей, в которых предполагается наиболее высокий уровень экспрессии. Качественный и количественный анализы экзогенных белков позволяют судить об уровне трансляции инъецированного генного материала.

Генетический анализ родившихся трансгенных животных и полученного от них потомства показал, что, несмотря на инъекцию ДНК на ранних стадиях, в трансгенных линиях могут появляться так называемые *мозаики*. К мозаикам относят животных, происходящих из одной зиготы, но имеющих разные генотипы. Помимо клеточных линий, содержащих трансген, они имеют еще и нетрансгенные клеточные линии. Подсчитано, что около 30 % первичных трансгенных животных, полученных методом микроинъекции ДНК, — мозаики, что затрудняет создание чистых *трансгенных линий* животных. Этим объясняется тот факт, что трансген не передается потомству с ожидаемой в соответствии с законами Менделя частотой 50 %. Часть мозаиков вообще не может дать на-

чало трансгенным линиям, так как у них отсутствует передача трансгена по наследству.

Одна из важнейших задач сельскохозяйственной биотехнологии — выведение трансгенных животных с улучшенной продуктивностью и более высоким качеством продукции, резистентностью к болезням, а также создание так называемых *животных-био-реакторов* — продуцентов ценных биологически активных веществ. Каковы же успехи биотехнологии в этом направлении? С генетической точки зрения особый интерес представляют гены, кодирующие белки каскада гормона роста: непосредственно гормон роста (ГР), рилизинг-фактор гормона роста (РФ) и инсулиноподобный фактор ГР (ИФГР).

В конце 70-х годов XX в. на основе технологии рекомбинантной ДНК получили гормон роста микробного происхождения. Было показано, то ГР оказывает такое же стимулирующее действие на лактацию и рост животного, как и гипофизарный ГР. Гормон роста, полученный с помощью методов генетической инженерии, при крупномасштабном применении вызывал увеличение удоев на 23—31 % при дозе 13 мг в день. Разработаны формы препарата пролонгированного действия, позволяющие использовать его один раз в две недели и даже в месяц. При ежедневной инъекции ГР молодняку крупного рогатого скота, свиней и овец удалось увеличить суточные привесы на 20—30 % при значительном сокращении расхода кормов на единицу прироста. У молодняка свиней с ускорением роста увеличивалось содержание белка и уменьшалось содержание жира в тканях, что повышало качество мясопродуктов.

Первые трансгенные мыши с геном ГР были получены в 1982 г. У них отмечалось повышение скорости роста и увеличение конечной живой массы. Однако у трансгенных свиней с геном ГР (1989) увеличение роста не наблюдалось.

По данным Л. К. Эрнста (1996), у трансгенных свиней с геном рилизинг-фактора гормона роста (РФ ГР) конечная живая масса была на 15,7 % выше по сравнению с контрольными животными. У потомства трансгенных свиней, получавших модифицированный кормовой рацион с повышенным содержанием белка (18 % сырого протеина) и с дополнительным количеством лизина, отмечались более высокие среднесуточные привесы (на 16,5 %).

У трансгенных овец с генами ГР и РФ ГР, несмотря на повышенный уровень ГР, скорость роста не увеличивалась. Вместе с тем, по данным большинства исследователей, у трансгенных свиней наряду с повышением содержания белка наблюдалось двукратное уменьшение толщины шпика (7—8 мм у трансгенных против 18—20 мм у контрольных животных); аналогичные показатели отмечены у трансгенных овец (25—30 % жира у контрольных животных против 5—7% у трансгенных овец).

Рассматривается возможность уменьшения лактозы в молоке путем создания животных, у которых присутствует специфический для молочной железы промотор, соединенный с геном фермента β -галактозидазы, катализирующей распад лактозы. Молоко таких животных, не содержащее лактозы, могут использовать люди, у которых не синтезируется β -галактозидаза. Ведутся работы по введению генных конструкций в организм трансгенных животных, вырабатывающих антитела, предотвращающие маститы.

Другая важная задача — выведение трансгенных животных, *устойчивых к заболеваниям*. Потери в животноводстве, вызванные различными болезнями, достаточно велики, поэтому все более важное значение приобретает селекция животных по резистентности к болезням, вызываемых микроорганизмами, вирусами, паразитами и токсинами. Пока результаты селекции на устойчивость животных к различным заболеваниям невелики, но обнадеживающи. В частности, созданы популяции крупного рогатого скота с примесью крови зебу, устойчивые к некоторым кровепаразитарным заболеваниям. Установлено, что защитные механизмы от инфекционных заболеваний обусловлены либо препятствием вторжению возбудителя, либо изменением рецепторов. Вторжению возбудителей, равно как и их размножению, препятствуют в основном иммунная система организма и экспрессия генов главного комплекса гистосовместимости. Одним из примеров гена резистентности у мышей служит ген Mx. Этот ген, обнаруженный в модифицированной форме у всех видов млекопитающих, вырабатывает у Mx⁺-мышей иммунитет к вирусу гриппа А. Ген Mx⁺ был выделен, клонирован и использован для получения трансгенных свиней, экспрессирующих ген Mx на уровне РНК. Однако данные о трансляции Mx-протеина, обуславливающего устойчивость трансгенных свиней к вирусу гриппа А, пока не получены. Ведутся исследования в целях получения трансгенных животных, резистентных к маститу за счет повышения содержания белка лактоферина в тканях молочной железы. На культуре клеток из почек трансгенных кроликов было показано, что клеточные линии, содержащие трансгенную антисмысловую РНК, имели резистентность против аденовируса H5 (Ad₅) более высокую на 90—98 % по сравнению с контрольными линиями клеток. Л. К. Эрнст продемонстрировал также устойчивость трансгенных животных с геном антисмысловой РНК к лейкозу крупного рогатого скота, к заражению вирусом лейкоза.

Показана возможность конструирования системы внутриклеточной иммунизации против инфекционных вирусов с участием мутационных форм эндогенных вирусных белков, защищающих от соответствующих вирусов. Так, получены трансгенные куры, устойчивые к лейкозу, у которых в клетках присутствовал белок вирусной оболочки.

Одна из важнейших задач стратегии использования трансгенных животных в медицине — получение *биологически активных соединений* за счет включения в клетки организма генов, вызывающих у них синтез новых белков.

Трансгенные животные как продуценты ценных биологически активных белков и гормонов имеют ряд преимуществ перед микроорганизмами и клеточными системами. Важно, что новые белки, получаемые в линиях клеток трансгенных животных, могут быть модифицированы, их активность сравнима с активностью протеинов. Для молочного производства представляет большой интерес получение целенаправленной трансгенной экспрессии в эпителиальные клетки молочной железы с целью выхода белков с молоком. Один из основных этапов получения трансгенных животных, продуцирующих гетерогенный белок с молоком, — идентификация промотора, направляющего экспрессию структурных генов в секреторный эпителий молочной железы.

В настоящее время выделены гены и промоторы α S1-казеина, β -казеина, α -лактоальбумина, β -лактоглобулина и сывороточного кислого протеина (WAP). Молочная железа — великолепный продуцент чужеродных белков, которые можно получать из молока и использовать в фармацевтической промышленности. Из молока трансгенных животных извлекают следующие рекомбинантные белки: человеческий белок С, антигемофильный фактор IX, α -1-антитрипсин, тканевой плазменный активатор, лактоферин, сывороточный альбумин, интерлейкин-2, урокиназу и химозин. В большинстве проектов, за исключением α -1-антитрипсина и химозина, эти исследования пока еще на стадии разработки и ведутся в основном на трансгенных мышах, поэтому оценивать их с точки зрения коммерческого интереса еще рано.

Вышесказанное можно проиллюстрировать следующими примерами. В США осуществлен метод микроинъекции ДНК, отвечающий за экспрессию β -лактоглобулина, который способен продуцироваться только в молочных железах животных. В Эдинбурге в 1992 г. были выведены трансгенные овцы с геном α -1-антитрипсина человека и β -глобулиновым промотором. Содержание этого белка у разных трансгенных овец составляло от 1 до 35 г/л, что соответствует половине всех белков в молоке. При таком уровне продукции белка может быть получено около 10 кг трансгенного белка от одного животного в год, что достаточно для 50 пациентов при лечении эмфиземы легких. Обычно выход рекомбинантных белков в системах с использованием культуры клеток составляет около 200 мг/л, а у трансгенных животных он может повышаться до 1 л. Следует заметить, что создание клеточных культур и их выращивание в промышленных реакторах, а также выведение трансгенных животных и их обслуживание — дорогие и сложные процедуры. Однако трансгенные животные легко размножа-

ются, содержание их сравнительно дешево, что делает этих животных хорошими продуцентами разнообразных белков с низкой стоимостью. В России группой ученых под руководством Л. К. Эрнста получены трансгенные овцы с геном химозина, в 1 л молока которых содержится 200—300 мг химозина — основного компонента для производства сыра. Стоимость его будет в несколько раз ниже продукта, получаемого традиционным способом из сычугов молочных телят и ягнят. Приведены данные, свидетельствующие о высокой эффективности производства сыра с использованием химозина молока трансгенных овец. Так, из 3 л молока трансгенной овцы можно получить достаточное количество химозина для производства 1 т сыра из коровьего молока.

5.7. ПОЛУЧЕНИЕ ИНСУЛИНА НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Инсулин — гормон поджелудочной железы, регулирующий углеводный обмен и поддерживающий нормальный уровень сахара в крови. Недостаток этого гормона в организме приводит к одному из тяжелейших заболеваний — сахарному диабету, который как причина смерти стоит на третьем месте после сердечно-сосудистых заболеваний и рака. Инсулин — небольшой глобулярный белок, содержащий 51 аминокислотный остаток и состоящий из двух полипептидных цепей, связанных между собой двумя дисульфидными мостиками. Синтезируется он в виде одноцепочечного предшественника — препроинсулина, содержащего концевой сигнальный пептид (23 аминокислотных остатка) и 35-звенный соединительный пептид (С-пептид). При удалении сигнального пептида в клетке образуется проинсулин из 86 аминокислотных остатков, в котором А и В-цепи инсулина соединены С-пептидом, обеспечивающим им необходимую ориентацию при замыкании дисульфидных связей. После протеолитического отщепления С-пептида образуется инсулин.

Известно несколько форм сахарного диабета. Самая тяжелая форма, для лечения которой больному необходим инсулин (инсулинзависимая форма заболевания), вызвана избирательной гибелью клеток, синтезирующих этот гормон (клетки островков Лангерганса в поджелудочной железе). Форма сахарного диабета, для лечения которой инсулин не требуется, распространена чаще, с ней удается справляться с помощью соответствующих диет и режима. Обычно поджелудочная железа крупного рогатого скота и свиней не используется в мясной и консервной промышленности и поставляется в вагонах-рефрижераторах на фармацевтические предприятия, где проводят экстракцию гормона. Для получения 100 г кристаллического инсулина необходимо 800—1000 кг исходного сырья.

Синтез обеих цепей и соединение их дисульфидными связями для получения инсулина были проведены в 1963 и 1965 гг. тремя коллективами исследователей в США, Китае и ФРГ. В 1980 г. датская компания «Ново индастри» разработала метод превращения инсулина свиньи в инсулин человека путем замещения 30-го остатка аланина в цепи В на остаток треонина. Оба инсулина не различались по активности и времени действия.

Работы по генно-инженерному получению инсулина начались около 20 лет назад. В 1978 г. появилось сообщение о получении штамма кишечной палочки, продуцирующего крысиный проинсулин (США). В этом же году были синтезированы отдельные цепи человеческого инсулина посредством экспрессии их синтетических генов в клетках *E. coli* (рис. 5.11). Каждый из полученных синтетических генов подстраивался к 3'-концу гена фермента β-галактозидазы и вводился в векторную плазмиду (pBR322). Клетки *E. coli*, трансформированные такими рекомбинантными плазмидами, производили гибридные (химерные) белки, состоящие из фрагмента β-галактозидазы и А или В пептида инсулина, присоединенного к ней через остаток метионина. При обработке химерного белка бромцианом пептид освобождается. Однако замыкание дисульфидных мостиков между образованными цепями инсулина происходило с трудом.

В 1981 г. синтезирован ген-аналог проинсулина — мини-С-проинсулин, в котором 35-звенный С-пептид был заменен на сегмент из шести аминокислот: арг-арг-гли-сер-лиз-арг и показана его экспрессия в *E. coli*.

В 1980 г. У.Гилберт с сотрудниками выделили мРНК инсулина из опухоли β-клеток поджелудочной железы крысы и с помощью обратной транскриптазы получили с нее кДНК. Полученную кДНК встроили в плазмиду pBR322 *E. coli*, в среднюю часть гена пенициллиназы. Рекомбинантная плазида содержала информацию о структуре проинсулина. В результате трансляции мРНК в клетках синтезировался гибридный белок, содержащий последовательности пенициллиназы и проинсулина, который выщепляли из такого белка трипсином.

В 1978 г. сотрудниками Института биоорганической химии под руководством акад. Ю.А. Овчинникова был осуществлен синтез двух структурных генов, кодирующих синтез нейропептидов: *лейцин-энкефалина* и *брадикинина*. Синтезированный ген лейцин-энкефалина имел два «липких» конца:



Полученный синтетический ген был встроен вместе с фрагментом природной ДНК, содержащим промотор и проксимальную часть гена белка β-галактозидазы кишечной палочки *E. coli*, в плазмиду-

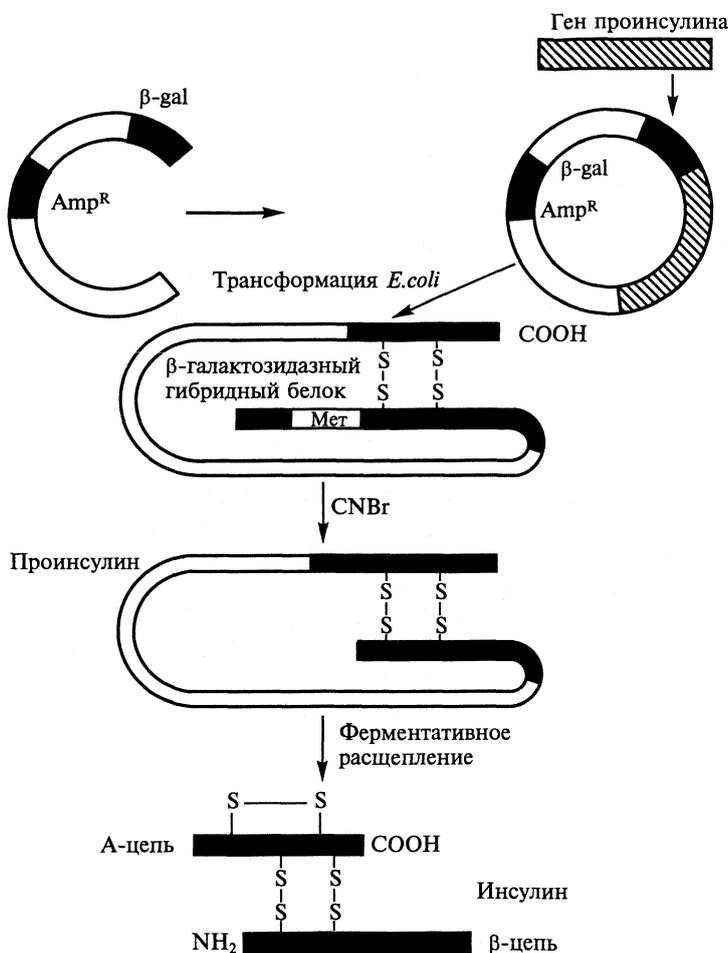


Рис. 5.11. Схема синтеза инсулина

вектор pBR322 и обработан смесью рестриктаз — EcoRI и BamHI. Полученная рекомбинантная плазмида *pEκ* была трансформирована в клетки *E. coli*. В результате экспрессии встроенного гена бактерия начала продуцировать гибридный (химерный) белок, содержащий на N-конце участок β -галактозидазы, а на C-конце — последовательность нейропептида. С помощью бромциана химерный белок расщепляли *in vitro* и получали активный *лейцин-энкефалин*. На рис. 5.12 представлены схема клонирования синтетического гена лейцин-энкефалина и его экспрессия в клетках кишечной палочки.

Аналогичным путем был синтезирован *соматостатин* — гормон гипоталамуса (рис. 5.13). Молекула соматостатина состоит из 14 аминокислотных остатков. Соматостатин подавляет выделение инсулина и гормона роста человека. В Национальном медицинском центре «Хоуп» (Калифорния) был осуществлен химико-ферментативный синтез гена длиной в 42 нуклеотида, способного кодировать соматостатин. Участок ДНК, кодирующий гормон соматостатин, получен путем соединения тринуклеотидов. Из 52 н. п. синтетического гена 42 пары составляли структурный ген гормона, а остальные служили для присоединения синтетического гена к плазмиде pBR322,

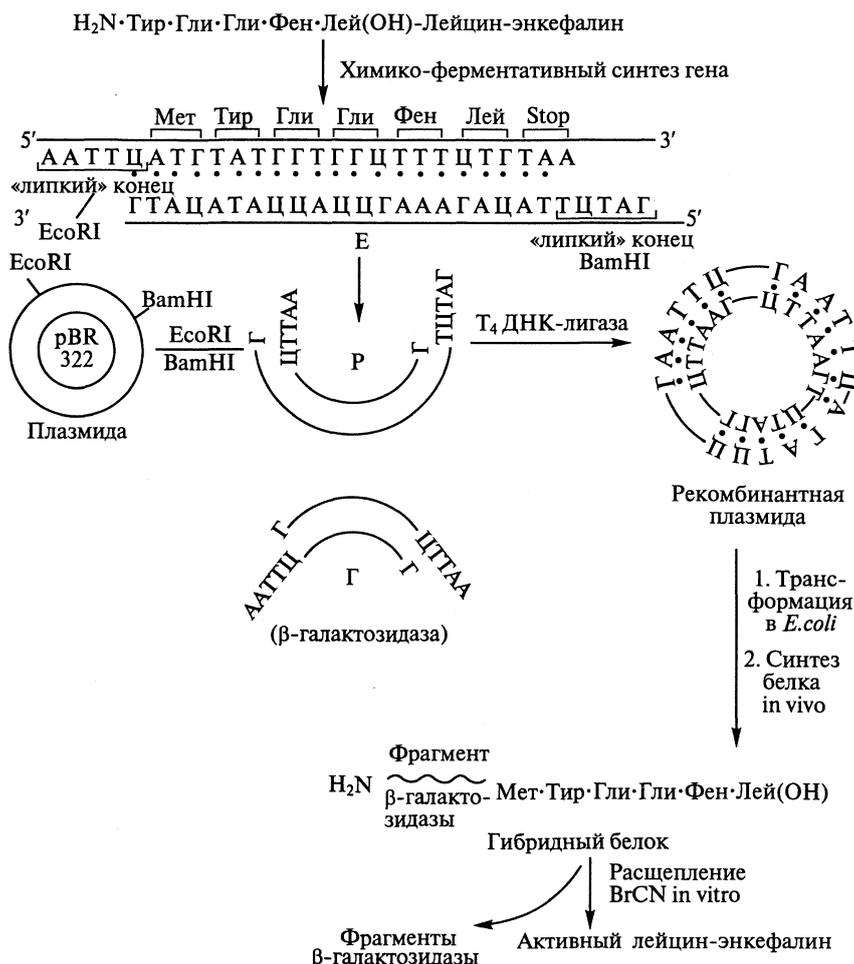


Рис. 5.12. Схема синтеза гибридного и активного лейцин-энкефалина

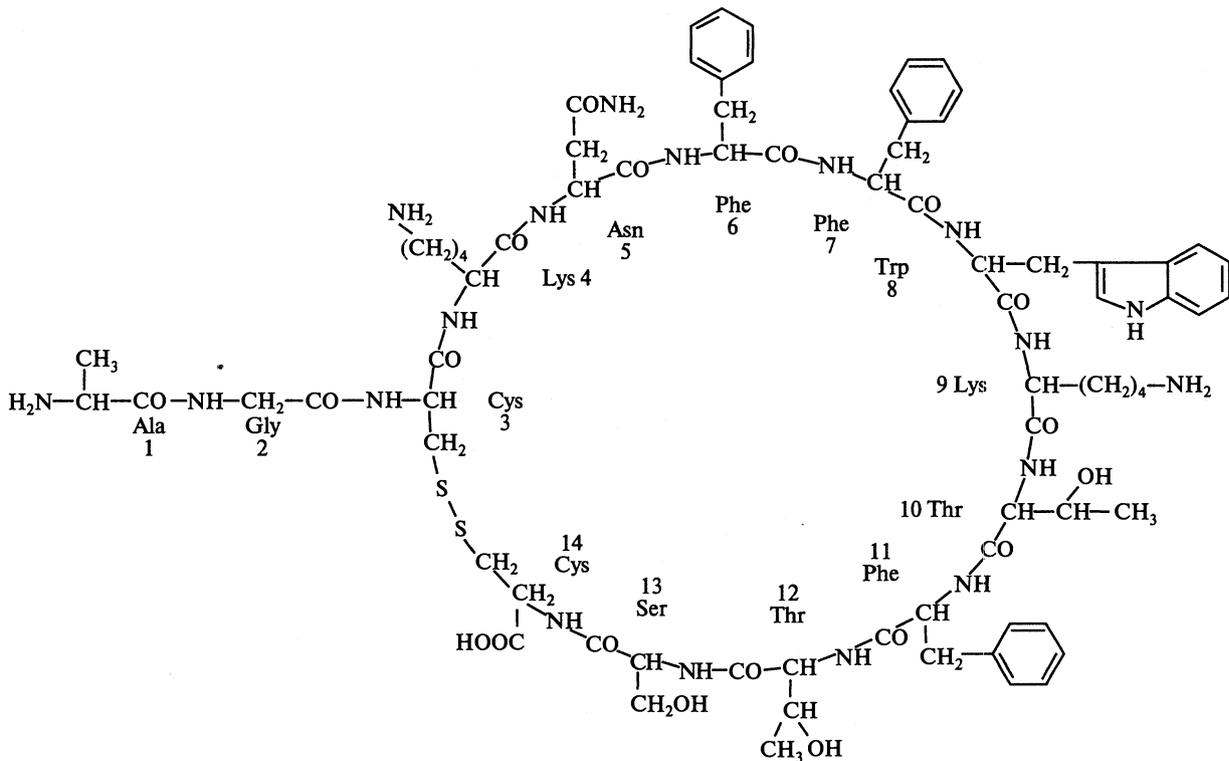


Рис. 5.13. Первичная структура молекулы соматостатина

а также к сегменту лактозного оперона (*lac*) из генома *E. coli* или к β -галактозидазному гену. Такую синтетическую чужеродную ДНК встраивали непосредственно за бактериальным геномом (или внутри его) после расщепления ДНК рестрикционными эндонуклеазами с образованием в результате трансляции гибридного белка.

Основные этапы генно-инженерного синтеза соматостатина показаны на рис. 5.14. Синтетический ген соматостатина был встроен в плазмиду pBR322 *E. coli* вблизи конца гена, кодирующего фермент β -галактозидазу. Между двумя генами был помещен кодон метионина. После выделения рекомбинантной плазмиды в бактериальную клетку кишечная палочка стала синтезировать гибрид-

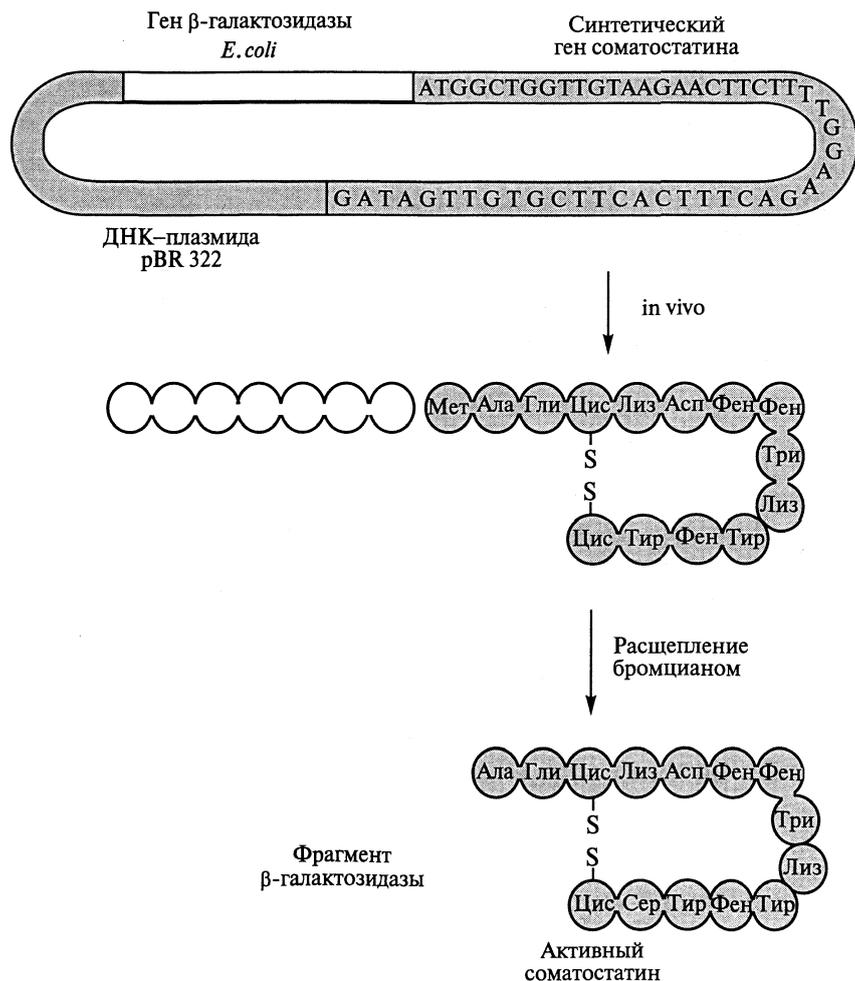


Рис. 5.14. Схема синтеза соматостатина в бактериальной системе

ный белок. Часть его (соматостатин) затем отщепляли от β -галактозидазы BtCN. Такой сложный способ получения гормона был необходим, так как соматостатин, синтезированный в виде свободных молекул, быстро деградирует под действием бактериальных протеаз. Первый синтез соматостатина генно-инженерным способом был осуществлен в 1977 г. Бойером. Выход гормона составил 10 000 молекул на одну клетку. Из 100 г биомассы *E. coli*, выращенной в ферментере объемом 8 л, удалось выделить 5 мг соматостатина, т.е. столько, сколько можно его выделить из 100 г овечьих мозгов.

5.8. СИНТЕЗ СОМАТОТРОПИНА

Соматотропин (или гормон роста человека ГРЧ) секретируется передней долей гипофиза. Впервые он был выделен и очищен в 1963 г. из гипофиза. Его недостаток приводит к заболеванию — гипофизарной карликовости (1 случай на 5000 человек). Гормон обладает видовой специфичностью. Обычно его получают из гипофиза трупов, но в недостаточном количестве. Гормона хватает лишь для лечения 1/3 случаев гипофизарной карликовости в развитых странах. Основные производители — Швеция, Италия, Швейцария и США. Молекула ГРЧ состоит из 191 аминокислотного остатка.

Препарат из трупного материала представляет собой смесь из нескольких форм, из которых пять имеют 22 кДа, другие являются димерами, а остальные — фрагментами, образующимися при протеолизе. Это приводило к тому, что у 30 % больных, получавших препарат, против гормона вырабатывались антитела, сводившие на нет его биологическую активность.

Принимая во внимание это обстоятельство, в настоящее время ГРЧ синтезируют методами генетической инженерии в специально сконструированных клетках бактерий. Будучи синтезированным в клетках *E. coli*, ГРЧ содержит дополнительный остаток метионина на H_2N -конце молекулы. Биосинтез ГРЧ из 191 аминокислотного остатка был осуществлен в 1979 г. Д. Гедделем с сотрудниками. Сначала клонировали двунитевую кДНК; далее путем расщепления получали последовательность, кодирующую аминокислотный порядок гормона, за исключением первых 23 аминокислот, — с фен ($-NH_2$) до лей (23), и синтетический полинуклеотид, соответствующий аминокислотам от первой до двадцать третьей со стартовым АТГ-кодоном в начале. Затем два фрагмента объединяли и подстраивали к паре *lac*-промоторов и участку связывания рибосом. Конечный выход гормона составил 2,4 мкг на 1 мл культуры, что составляет 100 000 молекул гормона на клетку. Полученный гормон на конце полипептидной цепи содержал дополнительный остаток метионина и обладал значительной био-

логической активностью. С 1984 г. после серьезных клинических испытаний на токсичность компанией «Генетек» (Сан-Франциско) было начато широкомасштабное производство бактериального соматотропина.

ГРЧ в клетках *E. coli* и в культуре клеток животных был получен в 1982 г. одновременно в Институте Пастера (Париж) и в Институте молекулярной биологии (Москва). Оказалось, что в бактериальных клетках возможен синтез аналогов ГРЧ, с помощью которых изучались участки молекулы, важные для стимулирования роста и процесса неоглюкогенеза на молекулярном уровне.

Огромный интерес представляют выделение и синтез полипептида, обладающего полной биологической активностью *гипоталамического рилизинг-фактора соматотропина* (СТГ-РФ). Введение этого фактора способно компенсировать недостаток соматотропина. Таким образом, наличие СТГ-РФ и самого гормона, полученных в генетически сконструированных бактериальных клетках, очень важно для успешного лечения заболеваний, обусловленных недостатком этого гормона, и ряда патологических заболеваний, таких, как некоторые формы диабета, регенерация тканей после ожогов и др. Предполагаем, что СТГ-РФ можно использовать и для увеличения массы и роста домашних животных, так как он, не обладая видовой специфичностью, способен стимулировать освобождение гормона роста у ряда животных.

β -Эндорфин — опиат мозга, состоящий из 31 аминокислотного остатка, был синтезирован в генетически сконструированных клетках в 1980 г. группой ученых из Австралии и США. β -Эндорфин получен в клетках *E. coli* в виде гибридного белка с β -галактозидазой. Процедура синтеза β -эндорфина включала: получение путем обратной транскрипции мРНК — кДНК, кодирующей белок-предшественник, содержащий помимо последовательности β -эндорфина последовательность АКТГ и β -липотропина (β -ЛТГ), в дальнейшем удаляемые. β -Эндорфин, полученный из гибридного белка и тщательно очищенный, обладал значительной биологической активностью. Он специфически взаимодействовал с антителом против β -эндорфина. От β -эндорфина человека генно-инженерный β -эндорфин отличался по двум аминокислотам, и эти отличия можно было легко устранить на нуклеотидном уровне путем замены двух кодонов в ДНК бактериальной плазмиды.

5.9. ПОЛУЧЕНИЕ ИНТЕРФЕРОНОВ

Интерфероны были открыты в 1957 г. в Национальном институте медицинских исследований в Лондоне как факторы устойчивости к вирусной инфекции. Было установлено, что клетки животных, подвергнутые воздействию вируса, выделяют в среду фак-

тор, способный придавать свежим клеткам устойчивость к вирусной инфекции: он как бы препятствовал (интерферировал) размножению вирусов в клетке и в силу этой способности был назван *интерфероном*.

Известны три группы интерферонов: α -интерфероны (α -И), образующиеся при воздействии вирусов на лейкоциты; β -интерфероны (β -И), появляющиеся при воздействии вирусов на фибробласты; γ -интерфероны, продуцируемые Т-лимфоцитами в ответ на воздействие бактериальными и вирусными антигенами или антитысыворотками против поверхностных детерминант лимфоцитов.

Все интерфероны (кроме α -И) гликопротеины; они представляют собой типичные глобулярные белки, причем на долю α -спиральных структур приходится от 40 до 75 %. В α -И обнаружены две дисульфидные связи. Интерфероны — низкомолекулярные белки из 146 — 166 аминокислотных остатков; видоспецифичны.

К числу наиболее хорошо исследованных интерферонов человека следует отнести α -интерфероны; число генов, их кодирующих, примерно 20. γ -Интерферон в отличие от гетерогенного класса α -интерферонов представлен всего одним индивидуальным белком, который кодируется одним геном. Менее ясна ситуация в отношении β -интерферонов. Выделен только один белок, соответствующий β -интерферону человека, — интерферон β_1 ; ему соответствует практически вся противовирусная активность, обнаруживаемая после индукции фибробластов. Не исключено, что в геноме существует ряд генов, кодирующих различные β -интерфероны. Интерфероны — это как бы первая линия обороны против инфекции.

Интерфероны широко используются для лечения различных тяжелых заболеваний — острого вирусного гепатита, рассеянного склероза, остеосаркомы, миеломы и некоторых видов лимфом. Их применяют и для лечения меланом, ряда опухолей гортани, легких и мозга.

С учетом видоспецифичности интерферонов, предназначенных для лечения, необходимы такие препараты, которые получены из клеток человека. Традиционно их извлекают из крови человека (из 1 л крови можно выделить всего 1 мкг интерферона, т.е. примерно одну дозу для инъекции). Долгое время большая часть мирового производства интерферонов осуществлялась в Финляндии (Хельсинки), а позже — во Франции. С 1980 г. одна из японских компаний наладила производство лимфобластоидного интерферона из лимфобластоидных клеток. С этой целью культура данных клеток индуцировалась вирусом сендай, после чего интерферон выделяли с помощью хроматографических колонок, заполненных моноклональными антителами против получаемого интерферона. В Швеции лимфобласты выращивали в ферментерах объемом 2000 л; полученные интерфероны очищали с помощью моноклональных антител.

Из всех видов интерферонов для мирового производства наиболее пригоден β -И. Фибробласты, получаемые из тканей плода, можно поддерживать в культуре клеток, что дает возможность массового производства. Метод получения β -интерферона был разработан в Англии.

В целом вышеперечисленные методы получения интерферонов характеризуются низким выходом, высокой стоимостью и недостаточной чистотой препарата. На современном этапе наиболее перспективный метод — биосинтез интерферонов с помощью генетически сконструированных микроорганизмов. Однако использование генно-инженерных технологий для получения интерферонов человека сопряжено с рядом трудностей. Во-первых, в смеси мРНК, кодирующих различные белки, содержание кодирующих интерферон чрезвычайно мало — всего около 0,1%. Тем не менее кДНК, полученные обратным транскрибированием, были клонированы в *E. coli*, что явилось революционным событием в теоретических и прикладных исследованиях интерферонов. Ген интерферона был встроен в векторную ДНК, и к нему были присоединены бактериальные регуляторные элементы, программирующие его транскрипцию и трансляцию в бактериальной клетке (рис. 5.15).

Установлено, что интерфероны синтезируются в клетке сначала в виде предшественников, содержащих на N-конце полипептидной цепи сигнальный пептид, который затем отщепляется, и в результате образуется зрелый интерферон, обладающий полной биологической активностью. Бактерии не содержат ферментов,

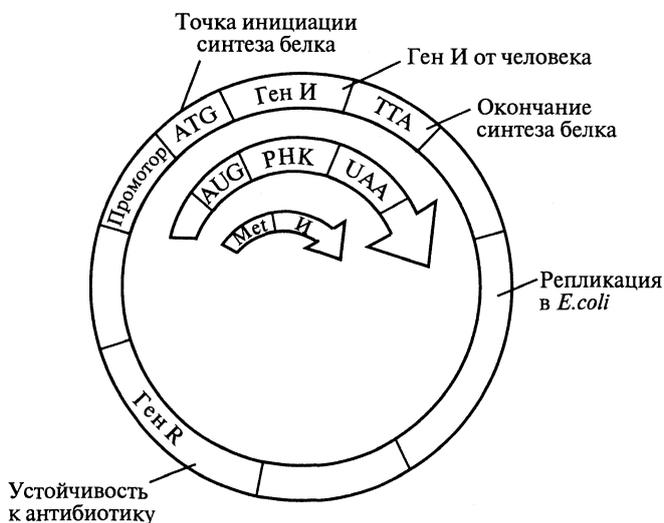


Рис. 5.15. Схема рекомбинантной плазмиды, обуславливающей синтез интерферона человека в *E. coli*

способных отщепить сигнальный пептид с образованием зрелого белка. Поэтому для того чтобы бактерии синтезировали зрелый интерферон, следует ввести в плазмиду только ту часть гена, которая его кодирует, и удалить часть гена, кодирующую сигнальный пептид. Данная процедура осуществлялась следующим образом. Ген интерферона содержит три участка расщепления рестриктазой *Sau* 3A1, из которых один находится рядом с сигнальной частью. Неполное расщепление гена этим ферментом позволяет выделить фрагмент гена, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый интерферон, но без первого цистеина. Триплет АТG, кодирующий цистеин, отщепляется ферментом вместе с сигнальной частью. Для восстановления полинуклеотидной последовательности полного гена химически был синтезирован небольшой фрагмент ДНК, содержащий данный триплет, а также примыкающий к нему триплет АТG — точка инициации синтеза белка. Этот фрагмент присоединили к изолированной части зрелого гена, и в результате был восстановлен полный ген зрелого интерферона. Реконструированный ген ввели в плазмиду таким образом, что с ним оказался рядом участок ДНК-промотор; обеспечивающий начало синтеза мРНК. Экстракты из *E. coli*, содержащие такую плазмиду, обладали противовирусной активностью.

Синтезированный генно-инженерным способом интерферон был выделен, очищен, и его физико-химические свойства оказались близкими свойствам интерферона, полученного из крови доноров. Удалось получить бактерии, способные синтезировать до 5 мг интерферона на 1 л бактериальной суспензии, содержащей примерно 10^{11} бактериальных клеток, что в 5000 раз превосходит то количество интерферона, которое можно извлечь из 1 л крови доноров. При использовании генно-инженерных технологий в разных лабораториях были получены штаммы бактерий, продуцирующих различные интерфероны: α -, β - и γ -типов. Недостаток использования *E. coli* для получения β - и γ -интерферонов — отсутствие в бактерии аппарата гликозилирования эукариотических белков, что приводит к синтезу негликозилированных молекул. И хотя роль гликозилирования неясна и негликозилированные β - и γ -интерфероны практически полностью сохраняют противовирусную активность, эта особенность диктует осторожный подход к использованию генно-инженерных препаратов в медицинской практике.

В настоящее время гены интерферонов клонированы в дрожжи и клетки высших эукариот, способных осуществлять гликозилирование.

В 1981 г. в США впервые для синтеза лейкоцитарного интерферона человека были употреблены генетически сконструированные клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Полученная эффективная экспрессия гена LeIF и замена бактерий клетками дрожжей позволили увеличить производство интерферона в 10 раз.

Большое количество исследований было посвящено химическому синтезу гена, кодирующего ЛИЧ из 166 аминокислот. Соответственно, данный ген из 514 н.п. оказался самым крупным геном, синтезированным в 1982 г. группой английских ученых. В России в 1984 г. был осуществлен полный синтез гена α -И размером

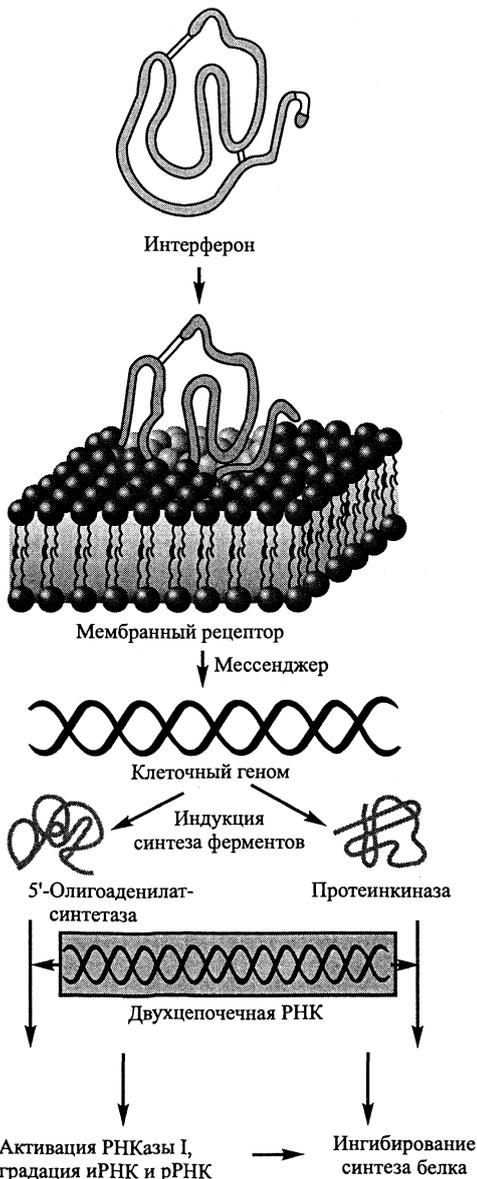


Рис. 5.16. Механизм действия интерферона

примерно 600 н.п. (Институт биоорганической химии под руководством М. Н. Колосова).

Несмотря на успехи, достигнутые в области получения интерферонов с помощью генно-инженерных технологий и их применения для лечения различных вирусных заболеваний, в том числе онкологических, предстоит еще решить многие вопросы. На современном этапе не все гены интерферонов идентифицированы: обнаружены новые гены α_1 ; мало известно о генах фибробластного интерферона (кроме гена β_1); до конца не расшифрованы механизмы их биосинтеза и взаимодействия с другими веществами. Выяснение многих явлений, связанных с интерферонами, приведет к созданию новых средств для лечения ряда тяжелых заболеваний.

Схема биологического действия интерферона представлена на рис. 5.16.

Механизм действия интерферона можно свести к следующим основным этапам. Связываясь с клеточными рецепторами, интерфероны инициируют синтез двух ферментов: 2',5'-олигоденилатсинтетазы и протеинкиназы за счет инициации транскрипции соответствующих генов. Оба фермента проявляют свою активность в присутствии двухцепочечных ДНК, являющихся продуктами репликации многих вирусов или содержащихся в их вирионах. Фермент 2',5'-олигоденилатсинтетаза катализирует синтез 2',5'-олигоденилатов (из АТР), которые активируют клеточную рибонуклеазу I; протеинкиназа фосфорилирует (и тем самым активирует) фактор инициации трансляции IF₂. В результате этих событий ингибируются биосинтез белка и размножение вируса (деградация иРНК и рРНК) в инфицированной клетке, что вызывает ее лизис. Вероятны и другие механизмы действия интерферонов, например, инактивация тРНК, нарушение процессов метилирования и др.

5.10. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

Генно-инженерные методы, в частности технология рекомбинантных ДНК, позволяют создавать новые генотипы и, следовательно, новые формы растений гораздо быстрее, чем классические методы селекции. Кроме того, появляется возможность целенаправленного изменения генотипа — трансформации — благодаря введению определенных генов.

Проблемы выращивания сельскохозяйственных растений связаны с перспективой ввода в них генов устойчивости к стрессовым факторам, фитопатогенам, гербицидам и пестицидам, генов скороспелости, а также с расширением круга культурных растений, способных к симбиотической фиксации азота и т.д.

Генетическая трансформация заключается главным образом в переносе чужеродных или модифицированных генов в эукариоти-

ческие клетки. Можно вводить гены в клетки прокариот, но этот перенос осуществляется не для трансформации, а в целях увеличения экспрессии чужеродных генов, их клонирования. В клетках растений также возможна экспрессия генов, перенесенных не только от других растений, но и от микроорганизмов и даже от животных.

Получение растений с новыми свойствами из трансформированных клеток (регенерация) возможно благодаря их свойству тотипотентности, т.е. способности развиваться в целое растение.

Однако возможности генной инженерии растений ограничиваются рядом причин. Во-первых, геном растений изучен хуже, чем геном млекопитающих. Это значит, что определение и выделение искомым генов — задача очень трудная. Во-вторых, не для всех растений удастся подобрать условия регенерации. Стабильно получают растения-регенеранты из протопластов картофеля, люцерны, томатов, моркови, табака, капусты и др. Регенерацию злаков из их клеток пока не всегда удается воспроизвести. Наконец, одна из главных лимитирующих причин — размер гетерологичной ДНК (не более 35 кб для агробактериальной и немного больше для баллистической трансформации), которую можно было бы эффективно вводить в геном растения. Не так давно была сделана удачная попытка использовать при трансформации пыльцу в качестве супервектора, что позволяет исключить появление химерных растений (В.А. Аветисов, Ю.В. Давыдова и др., 1999). Имеются сообщения об использовании искусственной бактериальной хромосомы в качестве вектора для трансформации, которая позволяет переносить значительные фрагменты ДНК, вводить кассеты генов, кодирующие множественные ступени биохимических процессов. Это открывает такие огромные перспективы, что первостепенными становятся вопросы экологической безопасности.

Биотехнология и, в частности, генная инженерия подошли к той ступени развития, когда прежде всего приходится думать о возможных последствиях эксперимента, об использовании полученных знаний.

5.10.1. Получение трансгенных растений

Перенос генов в растительные клетки, так же как в клетки животных, и их встраивание в геном растений (трансформация) осуществляются главным образом благодаря специфическим структурам — векторам.

Векторы на основе Ti-плазмид. Некоторые виды агробактерий (*Agrobacteria*) могут заражать двудольные растения, вызывая образование опухолей — корончатых галлов. Одним из самых сильных индукторов опухолей служит почвенная бактерия *A. tumefaciens*. Способность этой бактерии к образованию опухоли связана с большой внехромосомной плазмидой, получившей название Ti-плаз-

мида (от англ. tumor inducing— индуцирующие опухоль). Ti-плазмиды — это естественные векторы для генов, обладающие всеми функциями, необходимыми для переноса, стабильного включения и экспрессии генетической информации в растениях. Они имеют широкий круг хозяев. В бактериальных клетках Ti-плазмиды реплицируются автономно. Эти плазмиды различаются по типу кодируемых опинов — белков, которые используются бактериями в качестве источников азота и углерода. Обычно встречаются плазмиды, кодирующие два типа опинов: либо октопин (октопиновая плазида), либо нопалин (нопалиновая плазида).

После заражения часть Ti-плазмиды встречается в хромосомах клеток растения-хозяина. Следовательно, *A. tumefaciens* встраивает часть своего генома в ДНК растительной клетки и заставляет ее таким способом изменять метаболизм, синтезируя вещества, необходимые для бактерий. Именно это свойство *A. tumefaciens* и послужило поводом для создания на основе Ti-плазмиды вектора, доставляющего необходимые гены в клетку.

Участок Ti-плазмиды, встречающийся в хромосомах растительных клеток, называется T-областью в бактерии и T-ДНК в клетках растений. T-область включает примерно 10 % Ti-плазмиды и содержит гены, отвечающие за индукцию опухоли, синтез опинов и подавление дифференцировки (гормоннезависимый рост клеток). Важно отметить, что все гены, ответственные за перенос и интеграцию генов T-области, находятся не в ней самой, а рядом — в области вирулентности — vir-области (рис. 5.17).

T-области ограничены прямыми повторяющимися последовательностями, и любая ДНК, вставленная между этими повторами, будет принята за T-область и перенесена в растительную клетку.

Недостаток этих плазмид состоит в том, что некоторые гены, находящиеся в T-ДНК, заставляют расти клетки растений независимо от гормонов, вносимых в питательную среду, на которой куль-

тивируются данные клетки. В связи с этим очень трудно регенерировать нормальное растение из клеток, содержащих полную последовательность T-ДНК. Другой недостаток — большие размеры Ti-плазмиды, из-за которых затруднены какие-либо манипуляции с ней, поэтому вставить ген в плазмиду традиционными методами невозможно.

В настоящее время конструируются производные Ti-плазмиды, в которых оставляют регуляторный участок T-области,

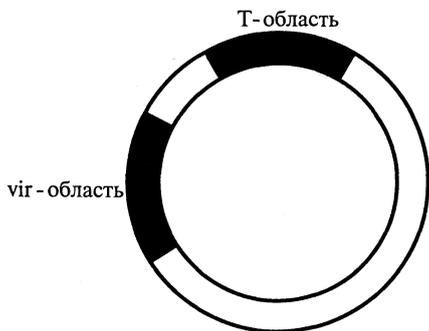


Рис. 5.17. Взаимное расположение T- и vir-областей в Ti-плазмиде

а вместо ее структурных генов вшивают структурную часть гена, который надо ввести в растение. Такие гены с позиции их регенерации безвредны для растений.

Существуют и другие бактерии (*A. rhizogenes*), вызывающие усиленное образование корешков при заражении растений. За этот процесс ответственны содержащиеся в них так называемые Ri-плазмиды (от англ. root inducing — индуцирующий корни). Ri-плазмиды выгодно отличаются от Ti-плазмид тем, что они служат естественными безвредными векторами, так как трансформированные с их помощью растительные клетки сохраняют способность к морфогенезу и к регенерации здоровых растений. В связи с этим Ri-плазмиды в данный момент рассматриваются как более перспективные векторы.

Промежуточный и бинарный векторы. Эти векторы конструируются на основе Ti-плазмид. Промежуточный вектор получают путем ряда сложных операций. Сначала T-область с помощью рестриктаз вырезают из плазмиды, вставляют в вектор для клонирования в клетке *E. coli* и размножают. Затем внутрь T-области встраивают чужеродный ген и вновь размножают. Полученную рекомбинантную плазмиду вводят в клетки *A. tumefaciens*, несущие полную Ti-плазмиду. В результате двойного кроссинговера между гомологичными участками T-область рекомбинантной плазмиды, содержащая чужеродный ген, включается в Ti-плазмиду клетки хозяина, заместив в ней нормальную T-область. Наконец, бактериями, имеющими Ti-плазмиду со встроенными генами, заражают растения, где эти гены встраиваются в геном растительной клетки.

Бинарные векторы представляют собой бактерии, содержащие две разные Ti-плазмиды. Одна из них несет vir-область и обеспечивает интеграцию в геном растительной клетки T-области, содержащей любые гены другой плазмиды. В этом случае двойной кроссинговер не требуется.

Однако полученные в результате заражения бактериями растительные клетки не способны к регенерации, так как у них подавлена дифференцировка. Трансформированные растительные клетки смогут дифференцироваться, если в гены, блокирующие дифференцировку, ввести мутации или вырезать их из T-ДНК.

Векторы на основе ДНК-содержащих вирусов растений. Вирусы можно рассматривать как разновидности чужеродной нуклеиновой кислоты, которые реплицируются и экспрессируются в клетках растений. Подавляющее большинство фитовирусов в качестве носителя генетической информации содержат РНК. Только 1 — 2 % вирусов, инфицирующих растения, относятся к ДНК-содержащим. Именно эти вирусы удобны для использования в технологии рекомбинантных ДНК, а также в качестве векторов.

ДНК-содержащие вирусы могут включать одноцепочечную или двухцепочечную ДНК. В качестве представителей первой

группы можно назвать вирус золотистой мозаики фасоли (ВЗМФ) или вирус полосатости кукурузы. Наиболее изученный представитель группы вирусов с двухцепочечной ДНК — вирус мозаики цветной капусты (ВМЦК), поражающий в основном растения семейства крестоцветные.

Обычно фитовирусы реплицируются с образованием большого числа копий молекул нуклеиновых кислот — 10^6 и более молекул на зараженную клетку. Например, при репликации вируса табачной мозаики образуется 10^7 молекул нуклеиновых кислот (РНК) на клетку. Поэтому фитовирусы представляют собой очень эффективные средства для получения хорошей экспрессии чужеродного гена. Кроме высокой копийности вирусной нуклеиновой кислоты вирусные векторные системы имеют еще ряд преимуществ: малый размер генома (возможность легкой манипуляции вирусной ДНК) и сильные промоторы, обеспечивающие эффективную экспрессию чужеродных генов.

Однако вирусы в качестве векторов обладают и существенными недостатками: имеют небольшую емкость, патогенны и неспособны встраиваться в хромосомы хозяина. Небольшую емкость можно увеличить, если инфицировать вирусом (например, ВМЦК) растительные протопласты, а не клетки. В этом случае инфекция не передается от клетки к клетке, нет необходимости в упаковке ДНК в вирусные частицы.

Следовательно, часть вирусного генома, ответственная за упаковку в вирусные частицы, может быть удалена и замещена дополнительной чужеродной ДНК. Другой недостаток — отсутствие способности встраиваться в геном растительной клетки — удается обойти (по крайней мере для ВМЦК) благодаря специальному методическому приему — агроинфекции. Для этого геном ВМЦК встраивают в Т-область T_i -плазмиды и в ее составе интегрируют в ядерный геном различных растений.

Методы прямого переноса генов в растение. Эти методы возникли благодаря появлению специфического объекта — изолированных протопластов, т. е. клеток, лишенных целлюлозной стенки.

Методы прямого переноса генов довольно многочисленны:

1. Трансформация растительных протопластов. Осуществляется благодаря комбинации методик кальциевой преципитации ДНК и слияния протопластов. Для трансформации может быть использован практически любой ДНК-вектор. Донорная ДНК может не содержать специальных биологических сигналов (vir-областей, пограничных областей Т-ДНК).

2. Культуру протопластов на начальной стадии ее роста заражают агробактериями, которые используют в качестве векторов.

3. Микроинъекции ДНК. Аналогичен методу микроинъекций животных клеток. Этот метод можно рассматривать как наиболее универсальный. Эффективность трансформации растительных кле-

ток — 10—20 % независимо от типа вектора. Трансформация не видоспецифична, возможен перенос генов в любое растение.

4. Электропорация. Метод основан на повышении проницаемости биомембран за счет действия импульсов высокого напряжения. В результате молекулы ДНК проникают в клетки через поры в клеточной мембране.

5. Упаковка в липосомы. Это один из методов, позволяющих защитить экзогенный генетический материал от разрушения нуклеазами растительной клетки. Липосомы — сферические тельца, оболочка которых образована фосфолипидами.

Метод биологической баллистики. Это один из самых эффективных методов трансформации однодольных растений. Исходный материал для трансформации — суспензионная культура, каллусная ткань или 4—5-дневные культивируемые незрелые зародыши однодольных.

Метод основан на напылении ДНК-вектора на мельчайшие частички вольфрама, которыми затем бомбардируют клетки. Бомбардировка осуществляется с помощью биолиственной пушки за счет перепада давления. Часть клеток гибнет, а выжившие клетки трансформируются, затем их культивируют и используют для регенерации растений.

5.10.2. Применение методов генетической инженерии для улучшения аминокислотного состава запасных белков растений

Решение проблемы создания новых форм растений подразумевает в первую очередь повышение качества синтезируемых растением продуктов, которые определяют его питательную и техническую ценность. В основном это касается запасных белков.

В большинстве случаев запасные белки растений имеют несбалансированный для питания человека и животных аминокислотный состав. Так, запасные белки злаков — проламины — бедны лизином, триптофаном и треонином, что снижает их питательную и кормовую ценность. Улучшение аминокислотного состава белка путем традиционной селекции не дает желательных результатов, поскольку необходимые гены часто сцеплены с нежелательными признаками и наследуются вместе. Например, у мутантов кукурузы и ячменя повышение содержания лизина коррелировало с уменьшением синтеза основных запасных белков — зеина и гордеина, а также с уменьшением урожайности.

Генно-инженерные методы более перспективны для создания улучшенных сортов, так как позволяют избирательно вводить в геном растения-реципиента гены искомого признака. Операции по получению трансгенных растений с улучшенным аминокислотным составом белка разделены на ряд этапов: 1) клонирование генов запасных белков; 2) изучение механизмов тканеспецифичной и временной экспрессии белков и выявление последовательностей

ДНК, определяющих данный механизм; 3) целенаправленное изменение последовательностей генов запасных белков для улучшения аминокислотного состава; 4) создание векторов, содержащих измененный ген; 5) введение модифицированных генов в растения.

В настоящее время клонированы 10 генов гордеинов ячменя, гены α - и β -глиадинов и глютеина пшеницы, зеинов кукурузы, легумина бобовых, пататина картофеля и ряд других. Имеются практические результаты трансформации растений. Так, введение в геном пшеницы модифицированного гена проламина привело к активному синтезу модифицированного белка, а также повлияло на состав и уровень соответствующих запасных белков. В итоге улучшилось хлебопекарное качество пшеничной муки.

5.10.3. Повышение эффективности процесса фотосинтеза

Один из возможных способов увеличения фотосинтеза и, следовательно, продуктивности растений состоит в клонировании хлоропластных генов в клетках бактерий и их переносе в растения. Известно, что хлоропласты и прокариотические клетки сходны по ряду признаков. На основании этого возникла симбиотическая гипотеза происхождения хлоропластов, впервые выдвинутая А. С. Фаминциным (1886). Согласно этой гипотезе, клетки прокариот и хлоропласты сходны. В них присутствуют кольцевые ДНК, 70S-рибосомы; синтез белков начинается с одной и той же аминокислоты — N-формилметионина, а синтез белка подавляется хлорамфениколом, а не циклогексимидом, как у эукариот. Позже было показано, что ДНК-зависимая РНК-полимераза *E. coli* связывается с определенными участками ДНК хлоропластов шпината.

В клетках *E. coli* инициация белкового синтеза частично регулируется доступностью участка связывания рибосом (УСР). Его структура до конца еще не выяснена, но расшифрован участок, известный под названием «последовательность Шайн-Дальгарно» (ШД). Она комплементарна 3'-концу 16S-рибосомальной РНК, и инициация белкового синтеза начинается с образования комплементарной пары между этой последовательностью и 3'-концом 16S-рибосомальной РНК. Анализ последовательности ДНК хлоропластного гена большой субъединицы основного фермента фотосинтеза — рибулозодифосфаткарбоксилазы (РДФкарбоксилазы) кукурузы — выявил значительные гомологии с известными промоторами и последовательностями ШД клеток *E. coli*. Все это привело к попытке клонирования генов хлоропластов в клетках *E. coli*, наиболее часто используемой в генно-инженерных исследованиях.

Транскрипционные конструкции могут создаваться двумя путями: во-первых, это установка промотора рядом с УСР, который узнается полимеразой *E. coli*, во-вторых, это формирование гибридного УСР, состоящего из прокариотической последователь-

ности ШД и эукариотического или синтетического иницирующего кодона. Первый путь широко применяется для увеличения экспрессии генов *E. coli* и хлоропластных генов в клетках *E. coli*.

В настоящее время уже клонировано несколько хлоропластных генов: гены синтеза субъединиц РДФкарбоксилазы, белка хлорофилл-белкового комплекса, АТФсинтетазы, цитохрома и др.

5.10.4. Генно-инженерные подходы к решению проблемы усвоения азота

Азот — один из самых необходимых элементов для растений. Его недостаток в почве или питательном субстрате часто приводит растение к гибели, поэтому в первую очередь необходимо внесение в почву азотных удобрений. Однако их производство требует очень больших энергетических затрат, поэтому оно дорогостояще. Стоимость азотных удобрений в 6 раз выше стоимости фосфорных удобрений и в 16 раз выше стоимости калийных удобрений. При этом растения используют только от 30 до 70 % внесенных в почву доступных форм азота, остальное просто вымывается из почвы, загрязняя окружающую среду. Гораздо более естественно и доступно снабжение растений азотом путем его биологической фиксации.

Фиксация атмосферного азота (дiazотрофность) — свойство прокариотических организмов. Азотфиксирующие организмы делятся на симбиотические (90 %) и свободноживущие (10 %). Фиксация атмосферного азота связана преимущественно с симбиотическими микроорганизмами. В настоящее время известны четыре основные системы симбиоза, имеющие большое значение не только для естественных сообществ, но и для сельского хозяйства, лесоводства. Это *Rhizobia* — бобовые растения, *Azolla-Anabaena* — рис, *Actinomyces* — деревья, *Spirillum* — травы. Атмосферный азот фиксируется благодаря уникальному ферменту — нитрогеназе.

В 1960 г. американские исследователи показали, что нитрогеназа сохраняет свою активность в бесклеточных экстрактах *Clostridium pasteurianum*. Это послужило толчком для начала активных исследований биохимии азотфиксации, структуры и механизма действия нитрогеназы. К 1981 г. нитрогеназа была выделена из 36 видов микроорганизмов. Она считается одним из наиболее сложных ферментов, использующих простые субстраты. Кроме азота нитрогеназа может восстанавливать ацетилен, цианистый водород, закись азота и некоторые другие соединения. Восстановление ацетилена в этилен позволило разработать надежный тест для обнаружения азотфиксирующей активности. Непременное условие работы нитрогеназы — ее защита от кислорода, который ингибирует не только активность нитрогеназы, но и ее биосинтез.

Начиная с 1970 г. стали появляться серьезные работы по изучению генов азотфиксации и их переносу в клетки *Klebsiella pneumoniae*

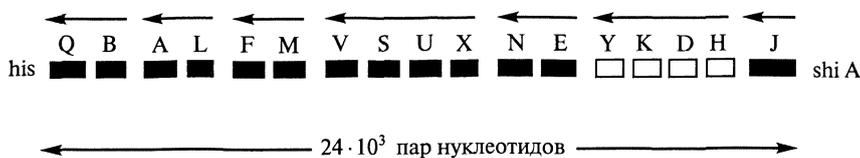


Рис. 5.18. Генетическая карта области *nif*-генов хромосомы *Klebsiella pneumoniae* (по А. Сассон, 1987). Оперон HDKY кодирует белки нитрогеназы; стрелки обозначают направление транскрипции

и *E. coli*. С помощью техники рекомбинантных ДНК были составлены генетические карты генов азотфиксации (*nif*-генов), которые показали сходную организацию генов у большей части азотфиксирующих организмов. Было установлено, что *nif*-гены расположены между генами, кодирующими биосинтез гистидина (*his*) и генами, ответственными за усвоение шикимовой кислоты (*shiA*). Гены, кодирующие синтез белковых субъединиц компонентов нитрогеназы, образуют единый оперон (рис. 5.18). В клетках симбиотических бактерий *Rhizobium leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii* плазмиды, кроме структурных генов нитрогеназы, содержат гены, отвечающие за развитие корневых клубеньков у определенных видов бобовых.

Конструирование плазмид, несущих *nif*-гены, позволяет передавать способность к фиксации азота организмам, не обладающим этим свойством. Среди бактерий, кроме *E. coli*, такой перенос осуществлен для бактерий *Salmonella typhimurium*, *Erwinia herbicola* и других. Однако подобные манипуляции могут приводить к нежелательным эффектам. Так, перенос генов в штамм *Erwinia* (бактерии, вызывающие гниение растений) может усилить его патогенное действие. Кроме того, существует вероятность случайного переноса вместе с *nif*-генами каких-то нежелательных генов.

В настоящее время внимание ученых привлекают проблемы введения генов азотфиксации в клетки растений; создания ризоценозов между небобовыми растениями (особенно злаками) и азотфиксирующими организмами; повышения мощности корневой системы бобовых растений для увеличения на ней количества клубеньков. Кроме того, предполагается создание новых азотфиксирующих систем путем введения азотфиксирующих микроорганизмов в каллусные ткани растений с последующим образованием из них растений-регенерантов, а также повышение эффективности фиксации азота путем воздействия на гены, контролирующиеся этот процесс.

Наиболее интересная первая проблема — введение *nif*-генов в клетки растений. Однако ее решение сопряжено с рядом трудностей. Основная — разрушение нитрогеназы под воздействием кислорода. У азотфиксирующих микроорганизмов существует ряд приспособлений, защищающих бактерии от свободного кислорода.

Среди них присутствие в клетках клубеньков леглобина — гем-содержащего белка, который встраивается в мембрану бактериоида (увеличенная в размере бактериальная клетка, характеризующаяся наибольшей способностью к фиксации азота) и регулирует поступление кислорода. Леглобин кодируется в геноме растительной клетки-хозяина, но его синтез начинается только после проникновения бактерий в эту клетку. У цианобактерий механизм защиты нитрогеназы от кислорода иной. Азотфиксация идет в гетероцистах, а фотосинтез — в обычных клетках. Поэтому кислород, выделяющийся в процессе фотосинтеза, не ингибирует фиксацию азота. Таким образом, введение только *nif*-генов в какую-то растительную клетку не решает проблемы. Если нитрогеназа будет синтезироваться в этой клетке, в частности в клетках злаков, то она разрушится под действием кислорода, присутствующего в клетке. Кроме того, сама клетка, в которую переносят гены азотфиксации, может быть не приспособлена к синтезу и расходованию большого количества энергии, которое требуется для фиксации азота.

Таким образом, более перспективно повышение эффективности фиксации азота в уже существующих природных системах за счет воздействия на гены, контролирующие этот процесс, а также увеличение мощности корневой системы бобовых растений и создание новых азотфиксирующих систем с помощью методов клеточной инженерии.

5.10.5. Устойчивость растений к фитопатогенам

Наибольший урон растениям наносят грибные, бактериальные и вирусные патогены. В растениях существуют защитные механизмы, которые в большей или меньшей степени (в зависимости от устойчивости растений) начинают действовать в ответ на проникновение фитопатогенов в клетку. Во-первых, начинается синтез соединений, вызывающих гибель патогенов. Примером могут служить специфические белки PRP (pathogen related proteins). Из них наиболее изучены ферменты хитиназы и β -1,3-глюконазы, которые угнетают рост грибов и некоторых видов бактерий, разрушая их клеточные стенки. Во-вторых, могут создаваться структурные барьеры, препятствующие распространению инфекции. Это достигается благодаря лигнификации клеточных стенок. Той же цели — защите клеток — служит присутствие в клеточных стенках белков-экстенсинов и олигосахаридов.

Применение методов генетической инженерии, использующих естественные защитные механизмы, позволяет получать трансгенные растения, устойчивые к грибной, бактериальной и вирусной инфекции. Так, гены хитиназы и глюконазы кодируются одиночными генами. Благодаря этому были получены трансгенные растения табака и турнепса, в состав генома которых ввели ген хити-

назы. Лабораторные и полевые испытания выявили большую устойчивость трансгенных растений. В растения томатов был введен ген защитных пептидов редьки (дефензинов) *gs*, отвечающих за устойчивость к фитопатогенным грибам. Наконец, перспективны клонирование и перенос генов, кодирующих специфические белки (*small antibiotic-like proteins*), содержащиеся в семенах многих растений. Эти белки защищают семена в период покоя и во время прорастания от грибных и бактериальных инфекций.

Другой подход к получению трансгенных растений, устойчивых к вирусной инфекции, состоит во введении в геном исходных растений гена оболочки вируса. Это приводит к ингибированию размножения вируса и снижению инфицированности. Благодаря такому подходу был получен стойкий антивирусный эффект у растений табака, трансформированных геном оболочки вируса табачной мозаики (ВТМ).

Еще одна группа методов получения трансгенных растений, устойчивых к действию фитовирусов, включает введение и экспрессию генов антивирусных антител, вирусных сателлитных РНК. Интересный эффект дало введение в геном растений гена человеческого интерферона JFN — одного из ключевых белков индукции иммунитета у млекопитающих. С помощью вируса мозаики цветной капусты геном интерферона были трансформированы растения турнепса, табака, картофеля, что повысило устойчивость этих растений к вирусным заболеваниям. Однако в настоящее время более перспективными считаются методы, основанные на использовании растительных генов, обуславливающих высокую устойчивость трансформации растений и низкую устойчивость к фитопатогенам.

5.10.6. Устойчивость растений к гербицидам

В настоящее время в сельском хозяйстве широко используют гербициды — химические соединения, применяемые для уничтожения сорной растительности. Гербициды широкого спектра действия могут не только уничтожать сорняки, но и угнетать рост культурных растений. В связи с этим возникает необходимость в создании растений, устойчивых к этим веществам. Существует два подхода к решению этой проблемы: прямая селекция устойчивых к гербицидам мутантных форм растений, или мутантных клеточных штаммов (клеточная селекция), и генно-инженерный метод, который состоит во введении в растения генов гербицид-резистентности растительного или бактериального происхождения.

Изучение механизмов устойчивости служит основой для создания трансгенных растений. Оно включает четыре основных этапа: выявление мишеней действия гербицидов в клетке растений; отбор растений, устойчивых к данному гербициду в качестве источ-

ника генов резистентности; идентификация и клонирование этих генов; изучение их экспрессии для использования в трансгенных конструкциях.

Благодаря использованию методов генетической инженерии были созданы новые, устойчивые к различным гербицидам сельскохозяйственные культуры. В геном этих культур вводились мутантные гены, кодирующие синтез ферментов, на которые гербициды (атразин, бромоксилин, имидазол) не оказывают негативного действия. Например, растения лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus*) были трансформированы с помощью штамма A281/рСВЕ21. Эта бактерия содержит плазмиду со встроенным геном *bar*, кодирующим фермент, придающий устойчивость к гербициду биалофосу. Трансгенные растения содержали ген *bar* и были невосприимчивы к гербициду (А. М. Стефанович, Г. Н. Ралдугина, 1999). Однако в тканях таких растений наблюдается накопление гербицидов, и использовать эти растения можно только в технических целях. Вместе с тем было показано, что введение генов, кодирующих другие ферменты, позволяет проводить детоксикацию гербицидов, создавая, таким образом, растения, пригодные в пищу. Так, детоксикация действующего вещества гербицида 2,4-D осуществляется при переносе в растение гена монооксигеназы, глифосата — при введении гена фосфонатазы, бромоксилина — гена нитриказы.

5.10.7. Устойчивость растений к насекомым

Создание трансгенных растений, устойчивых к насекомым, с помощью методов генной инженерии стало возможным после того, как было обнаружено, что бактерии *Bacillus thuringiensis* синтезируют специфический белок — прототоксин, высокотоксичный для насекомых. Попадая в кишечник насекомого, этот белок расщепляется, образуя активную форму токсина. В результате насекомое погибает. Ген, ответственный за экспрессию прототоксина, удалось обнаружить, выделить из генома *B. thuringiensis* и с помощью бинарного вектора ввести в геном растений табака. Аналогичным образом растения томата были трансформированы генами другого инсектицидного белка — эндотоксина. В итоге были получены первые трансгенные растения, которые не повреждали насекомых.

5.10.8. Устойчивость растений к абиотическим стрессам

Адаптация растений в природе и, следовательно, их способность к выживанию при неблагоприятных условиях среды обеспечиваются тремя способами. Во-первых, с помощью физиологических механизмов, позволяющих растениям избежать неблагоприятных воздействий (например, период покоя). Во-вторых, адаптация осуществляется благодаря морфологическим приспособле-

ниям: толстому слою кутикулы на листьях, уменьшению листовой поверхности, ее опушению, которые предотвращают излишнюю потерю влаги растениями. В-третьих, негативное влияние внешней среды может быть преодолено с помощью изменений метаболизма. Именно этот последний адаптационный механизм наиболее доступен для генно-инженерных исследований. Например, известно, что при водном стрессе у высших растений основным защитным механизмом, связанным с изменением метаболизма, является накопление в клетках пролина, глицинбетаина и других осмопротекторов.

Экспериментально было показано, что стрессовый ответ у бактерий и высших растений выражается сходно. И у растений, и у бактерий начинается усиленный синтез молекул осмопротекторов, механизм действия которых состоит в установлении осмотического баланса между цитоплазмой и окружающей средой, а также стабилизации белковых молекул. В бактериях биосинтез пролина хорошо изучен, известны гены, кодирующие ферменты этого процесса. Избирательная экспрессия генов осмопротекторов может привести к увеличению адаптационных качеств растения и, следовательно, к увеличению его продуктивности. Поэтому следующим шагом на пути создания устойчивых к стрессам растений было клонирование бактериальных генов, получение векторных конструкций на основе Ti -плазмиды и введение их в растения. Полученные трансгены синтезировали и накапливали пролин в 4—6 раз интенсивнее, чем обычные растения. Трансгенные побеги могли укореняться и расти при концентрации соли в среде 20 г/л (350 мМ).

У растений адаптация к низким температурам сопряжена с многочисленными физиологическими изменениями. При этом накапливаются растворимые вещества, понижающие осмотический потенциал клеток и уменьшающие вероятность образования крупных кристаллов льда. Кроме того, синтезируется большое количество белков с повышенным содержанием сульфгидрильных групп (-SH), которые обладают особо высокой способностью к гидратации, а гидратационная вода, как известно, практически не замерзает. Однако повышение устойчивости растений к замерзанию с помощью методов генной инженерии началось с изменения генома не растений, а бактерий. Исследователи Колорадского университета (США) выяснили, что повреждению растений при замерзании способствуют бактерии эпифитной (поверхностной) микрофлоры *Pseudomonas syringae* и *Erwinia herbicola*, белки которых служат центрами кристаллизации. Если обезвредить бактерии стрептомицином, то растения не замерзают при температуре -8°C . Но стрептомицин дорог и вреден, поэтому выгоднее было изменить генетику данного штамма бактерий, вырезав из генома определенный ген. Растения, инфицированные мутантным штаммом *P. syringae*,

росли при отрицательной температуре. Однако оказалось, что бактерии мутантного штамма более живучи и способны вытеснить природный штамм, который, попадая в верхние слои атмосферы, способствует кристаллизации атмосферной влаги. Вероятно, уничтожение природного штамма могло бы привести к экологической катастрофе.

Следует отметить, что работы по генной инженерии, возможности манипулирования генами растений представляют огромный интерес для фундаментальных исследований. Эти работы позволяют изучать основы молекулярной и клеточной биологии растительной клетки, глубинные механизмы процессов, происходящих в ней. Вместе с тем нельзя не задуматься о своевременности прикладного применения результатов генно-инженерных исследований.

Глава 6

ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ

6.1. КУЛЬТУРА КЛЕТОК И ТКАНЕЙ, КРАТКАЯ ИСТОРИЯ ПРЕДМЕТА

Клеточная инженерия — одно из наиболее важных направлений в биотехнологии. Она основана на использовании принципиально нового объекта — изолированной культуры клеток или тканей эукариотических организмов, а также на тотипотентности — уникальном свойстве растительных клеток. Применение этого объекта раскрыло большие возможности в решении глобальных теоретических и практических задач. В области фундаментальных наук стало осуществимым исследование таких сложных проблем, как взаимодействие клеток в тканях, клеточная дифференцировка, морфогенез, реализация тотипотентности клеток, механизмы появления раковых клеток и др. При решении практических задач основное внимание уделяется вопросам селекции, получения значительных количеств биологически ценных метаболитов растительного происхождения, в частности более дешевых лекарств, а также выращивания оздоровленных безвирусных растений, их клонального размножения и др.

Бурное развитие клеточной инженерии приходится на 50-е годы прошлого века, хотя первые попытки выращивания изолированных кусочков ткани были сделаны гораздо раньше. В конце XIX — начале XX в. немецкие ученые Х. Фехтинг (1892), С. Рехингер (1893), Дж. Хабберландт (1902) сделали первую неудачную попытку стимуляции роста растительных тканей и органов, помещенных на фильтровальную бумагу, пропитанную сахарозой. Несмотря на отсутствие положительного результата, их работы представляют большой интерес. В них были высказаны идеи, которые намного опередили развитие науки того времени и которые нашли свое подтверждение несколько десятилетий спустя. Так, Фехтинг предположил, что полярность присуща не только организму или органу растения, но и самой клетке. Рехингер определил минимальный размер сегмента, образующего каллус. Согласно его исследованиям, в кусочках ткани тоньше 1,5—2,0 мм клетки не делились. Хабберландт впер-

вые четко сформулировал идеи о возможности культивирования *in vitro* изолированных клеток растений и о тотипотентности клеток, т. е. способности любой соматической клетки полностью реализовывать свой потенциал развития. Иначе говоря, о способности каждой растительной клетки давать начало целому организму.

Первые успехи были получены в 1922 г. американским ученым В. Роббинсом и немецким ученым В. Котте. Независимо друг от друга они показали возможность выращивания меристем кончиков корней томатов и кукурузы на синтетической питательной среде. Считается, что их работы легли в основу метода культуры изолированных корней растения.

Настоящее развитие метода культуры тканей и клеток высших растений началось в 1932 г. с работ французского ученого Р. Готре и американского исследователя Ф. Уайта. Они показали, что при периодической пересадке на свежую питательную среду кончики корней могут расти неограниченно долго. Кроме того, ими были разработаны методы культивирования новых объектов: тканей древесных растений камбиального происхождения, каллусных тканей запасающей паренхимы (Р. Готре), а также тканей растительных опухолей (Ф. Уайт). С этого момента начинаются массовые исследования по разработке новых питательных сред, включающих даже такие неконтролируемые компоненты, как березовый сок или эндосперм кокоса, и по введению в культуру новых объектов. К 1959 г. насчитывалось уже 142 вида высших растений, выращиваемых в стерильной культуре.

В 1955 г. после открытия Ф. Скугом и С. Миллером нового класса фитогормонов — цитокининов — оказалось, что при совместном их действии с другим классом фитогормонов — ауксинами — появилась возможность стимулировать деление клеток, поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез в контролируемых условиях.

В 1959 г. был предложен метод выращивания больших масс клеточных суспензий. Важным событием стала разработка Е. Коккингом (Ноттингемский университет, Великобритания) в 1960 г. метода получения изолированных протопластов. Это послужило толчком к получению соматических гибридов, введению в протопласты вирусных РНК, клеточных органелл, клеток прокариот. В это же время Дж. Морелом и Р. Г. Бутенко был предложен метод клонального микроразмножения, который сразу же нашел широкое практическое применение. Весьма важным достижением в развитии технологий культивирования изолированных тканей и клеток стало культивирование одиночной клетки с помощью ткани-«няньки». Этот метод был разработан в России в 1969 г. в Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН под руководством Р. Г. Бутенко. В последние десятилетия продолжается быстрый прогресс технологий клеточной инженерии, позволяющих значительно

облегчить селекционную работу. Большие успехи достигнуты в развитии методов получения трансгенных растений, технологий использования изолированных тканей и клеток травянистых растений, начато культивирование тканей древесных растений.

6.2. МЕТОДЫ И УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ТКАНЕЙ И КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

Выращивание изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях (*in vitro*) получили название метода культуры изолированных тканей.

В связи с тем что в жизни человека наибольшее значение имеют семенные растения, методы и условия для их культивирования разработаны лучше, чем для голосеменных растений или водорослей, выращивание которых в стерильных условиях вызывает определенные затруднения. Однако независимо от принадлежности растений к той или иной таксономической группе существуют общие требования к выращиванию объектов в культуре *in vitro*.

Асептика. Прежде всего культивирование фрагментов ткани или органа растения — эксплантов, а тем более отдельных клеток требует соблюдения полной асептики. Микроорганизмы, которые могут попасть в питательную среду, выделяют токсины, ингибирующие рост клеток и приводящие культуру к гибели. Поэтому при всех манипуляциях с клетками и тканями при культивировании *in vitro* соблюдают определенные правила асептики в ламинар-боксе или в асептических комнатах. В первом случае асептика достигается подачей профильтрованного стерильного воздуха, направленного из ламинкар-бокса наружу, на работающего. Асептические комнаты стерилизуют с помощью ультрафиолетовых ламп, а работают в таких помещениях в стерильной одежде. Рабочую поверхность столов в асептических комнатах и инструменты перед работой дополнительно стерилизуют спиртом.

Чистую посуду, предварительно завернутую в бумагу или в фольгу, инструменты, бумагу, вату стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу при температуре 160 °С в течение 1,5—2 ч. Питательные среды стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С и повышенном давлении в течение 15—20 мин. Если в состав питательных сред входят вещества, разрушающиеся при автоклавировании, их следует стерилизовать путем фильтрации через бактериальный фильтр. Затем стерильные профильтрованные компоненты добавляют в проавтоклавированную среду, охлажденную до температуры 40 °С.

Растительные ткани сами по себе могут служить серьезным источником заражения, так как на их поверхности всегда находится эпифитная микрофлора. Поэтому необходима поверхностная стерилизация, которую проводят следующим образом. Предварительно часть

растения, из которой будет извлечен эксплант, промывают водой с мылом и споласкивают чистой водой. Затем растительный материал стерилизуют в растворах дезинфицирующих веществ. Некоторые из этих веществ, а также время стерилизации представлены в табл. 6.1.

Таблица 6.1

Стерилизация исходного растительного материала
(по Р.Г. Бутенко, 1999)

Объект	Время стерилизации, мин		
	диацид 0,1 %-й	сулема 0,1 %-я	перекись водорода, 10–12 %-я
Семена сухие	15–20	10–15	12–15
Семена набухшие	6–10	6–8	6–8
Ткани стебля	20–40	20–25	—
Листья	1–3	0,5–3	3–5
Апексы	1–10	0,5–7	2–7

После выдерживания эксплантов в дезинфицирующем растворе их несколько раз промывают в дистиллированной воде и скальпелем удаляют наружный слой клеток на срезах эксплантов, так как он может быть поврежден при стерилизации.

Микроорганизмы могут находиться и внутри растительной ткани. Наиболее часто внутреннее инфицирование встречается у тропических и субтропических растений. Поэтому кроме поверхностной стерилизации иногда приходится применять антибиотики, которые и убивают микробную флору внутри ткани. Следует, однако, заметить, что подобная обработка не всегда приводит к стерилизации внутренних тканей, так как трудно выбрать направленное действующий антибиотик.

Питательные среды. Изолированные клетки и ткани культивируют на многокомпонентных питательных средах. Они могут существенно различаться по своему составу, однако, в состав всех сред обязательно входят необходимые растениям макро- и микроэлементы, углеводы, витамины, фитогормоны и их синтетические аналоги. Углеводы (обычно это сахароза или глюкоза) входят в состав любой питательной смеси в концентрации 2–3%. Они необходимы в качестве питательного компонента, так как большинство каллусных тканей лишено хлорофилла и не способно к автотрофному питанию. Поэтому их выращивают в условиях рассеянного освещения или в темноте. Исключение составляет каллусная ткань мандрагоры, амаранта и некоторых других растений.

Обязательными компонентами питательных сред должны быть ауксины, вызывающие дедифференцировку клеток экспланта, и цитокинины, индуцирующие клеточные деления. При изменении соотношения между этими фитогормонами или при добавлении других фитогормонов могут быть вызваны разные типы морфогенеза.

Высокое содержание нитратов, ионов аммония, калия, фосфата способствует быстрому росту клеток. Истощение среды значительно снижает рост и процессы вторичного метаболизма. Однако изначально низкое содержание фосфатов в питательной среде способно стимулировать синтез вторичных метаболитов. Установлено, что культивирование каллусов солодки голой на среде с половинной концентрацией азота и фосфора в темноте увеличивает содержание фенольных соединений в 1,6 раза по сравнению с каллусами, растущими на полной среде. В среду могут быть добавлены эндоспермы незрелых зародышей (кокосовый орех, конский каштан и др.), пасока некоторых деревьев, различные экстракты (солодовый, дрожжевой, томатный сок). Введение их в среду дает интересные результаты, но такие эксперименты трудно воспроизводимы, так как действующий компонент, как правило, точно неизвестен. Например, добавление в питательную среду отдельных фракций кокосового молока не давало никаких результатов, в то время как нефракционированный эндосперм вызывал деление клеток.

При приготовлении твердых питательных сред для поверхностного выращивания каллусных тканей используют очищенный агар-агар — полисахарид, получаемый из морских водорослей. В качестве примеров в табл. 6.2 приведены составы наиболее распространенных питательных сред.

Среда Мурасиге и Скуга — самая универсальная. Она пригодна для образования каллусов, поддержания неорганизованного каллусного роста, индукции морфогенеза у большинства двудольных растений. Так, изменение соотношения ауксина и кинетина приводит к образованию либо корней (преобладание ауксина), либо стеблевых культур (преобладание кинетина).

Среда Гамборга и Эвелеге хорошо подходит для культивирования клеток и тканей бобовых растений и злаков, среда Уайта обеспечивает укоренение побегов и нормальный рост стебля после регенерации, а среда Нича и Нич пригодна для индукции андрогенеза в культуре пыльников.

Физические факторы. На рост и развитие растительных тканей *in vitro* большое влияние оказывают физические факторы — свет, температура, аэрация, влажность.

Свет. Большинство каллусных тканей могут расти в условиях слабого освещения или в темноте, так как они не способны фотосинтезировать. Вместе с тем свет может выступать как фактор, обеспечивающий морфогенез и активирующий процессы вторично-

Таблица 6.2

**Состав питательных сред, применяемых при культивировании клеток
и тканей (по Р.Г. Бутенко, 1999)**

Компонент сред	Концентрация питательных сред, мг/л			
	Мурасиге и Скуга, 1962	Гамборга и Эвелега, 1968	Уайта, 1939	Нича и Нич, 1974—1975
KNO_3	1900	3000	81	950
NH_4NO_3	1650	—	—	720
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	—	—	142	—
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	—	—	—	—
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	134	—	—
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	500	74	185
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	—	—	—	166
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	—	—
KCl	—	—	65	—
KH_2PO_4	170	—	12	68
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	—	150	—	—
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	—	10	—	—
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	—	—	25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,6	—	—	—
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	—	2	—	10
H_3BO_4	6,2	3	—	10
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,075	—	0,025
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	—	0,25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	—	—	—
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	—	—	27,8
Na EDTA $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	—	—	37,3
Секвестрен 330-Fe	—	28	—	—
Мезоинозит	100	—	—	200
Аскорбиновая кислота	—	—	—	3
Тиамин-HCl	0,5	—	—	3
Пиридоксин-HCl	0,5	—	—	1
Никотиновая кислота	0,5	—	—	—
Сахароза	30 000	20 000	2000	60 000
Агар «Дифко», гель- рит, агароза	—	—	—	7000

го синтеза. В качестве источника света используют люминесцентные лампы. Для большинства травянистых растений оптимум освещенности составляет примерно 1000 люкс. Слишком низкая (300 люкс) или высокая (3000—10 000 люкс) освещенность подавляет рост. Освещение может влиять на метаболизм каллусных клеток. Так, в культурах чайного растения под действием света увеличивался биосинтез полифенолов. Напротив, в культуре клеток *Scopolia parvi-*

flora свет подавлял образование алкалоидов. Кроме интенсивности освещенности на культуру ткани и ее физиологические особенности влияет качество света. Так, более 20 флавонов и флавоноловых гликозидов образуется в культурах клеток петрушки после освещения ее непрерывным люминесцентным светом «холодный белый». Вместе с тем синтез флавоновых гликозидов активируется при последовательном облучении ультрафиолетовым светом, а затем светом, лежащим в области «красный — длинноволновый красный».

Температура. Для большинства калусных культур оптимальна температура 26 °С. В то же время калусы и культуры клеток диоскореи дельтовидной хорошо растут даже при температуре 32 °С. В отличие от роста культур клеток и тканей индукция их морфогенеза требует более низких температур (18—20 °С). Влияние температуры на метаболизм клеток *in vitro* изучено слабо. Есть данные, что в калусных культурах максимальное образование алкалоидов наблюдалось при температуре 25 °С, а при повышении температуры резко снижалось. В суспензионных культурах клеток *Ipomoea* содержание жирных кислот значительно увеличивалось, если их выращивали при субоптимальных температурах роста (15 °С). Поэтому при выращивании культуры *in vitro* необходимо тщательно изучать влияние всех абиотических факторов, в том числе температурного, на рост и метаболизм клеток.

Аэрация. Для выращивания суспензионных культур большое значение имеет аэрация. Особенно важно снабжение воздухом культивируемых клеток в больших объемах ферментеров.

При сравнении разных типов ферментеров было показано, что синтез вторичных метаболитов в суспензионной культуре был наибольшим при подаче воздуха снизу. При выращивании клеток в малых объемах (в колбах) нормальная аэрация достигается при постоянном перемешивании суспензии.

Влажность. Оптимальная влажность в помещении, где растут культуры, должна составлять 60—70%.

Таким образом, культивирование клеток и тканей зависит от многих факторов внешней среды, и действие их не всегда хорошо известно. Поэтому при введении в культуру нового вида растений необходимо прежде всего тщательно изучить влияние физических факторов на рост и физиологические характеристики этой культуры.

6.3. ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКА КАК ОСНОВА КАЛЛУСОГЕНЕЗА

Культура изолированных тканей обычно представлена калусными и гораздо реже опухолевыми тканями. Калусная ткань образуется в результате повреждения на целых растениях, а также в стерильной культуре на эксплантах — фрагментах ткани или орга-

на, используемых для получения первичного каллуса. Возникновение каллуса связано с неорганизованным делением (пролиферацией) дедифференцированных клеток. Дедифференцировка — основа создания каллусной ткани. В процессе дифференцировки клетки теряют способность делиться. Дедифференцировка — это возвращение клеток в меристематическое состояние, при котором они сохраняют способность к делению. У интактных растений дедифференцировка и индукция каллусогенеза возникают вследствие образования раневых гормонов (травматиновая кислота) при механическом повреждении. Обязательное условие дедифференцировки тканей экспланта и превращения их в каллусные клетки, помимо повреждения, — присутствие ауксинов и цитокининов. Среди ауксинов чаще всего используют 2,4-D (2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту), ИУК (индолил-3-уксусную кислоту), НУК (α -нафтилуксусную кислоту), причем наибольшую активность проявляет 2,4-D. Из цитокининов в искусственные питательные среды обычно вносят кинетин, 6-БАП (6-бензиламинопурин), зеатин. Наиболее активны 6-БАП и зеатин. Функции этих двух групп гормонов в каллусогенезе разные, но они тесно связаны между собой. Ауксины вызывают процессы дедифференцировки клетки, подготавливают ее к делению. Затем цитокинины инициируют деление клеток. Последние исследования свидетельствуют, что ауксины индуцируют синтез главной протеинкиназы клеточного деления P_{34}^{cdc2} , а цитокинины — циклинов. Таким образом, действие этих гормонов проявляется только при последовательном или одновременном внесении их в среду. Кроме того, оно будет зависеть от физиологического состояния клеток экспланта, от их компетентности к действию тех или иных внешних факторов. Результаты исследований показали, что полисахариды и какие-то неизвестные индукторы тоже могут вызывать деление клеток, приводящее к образованию каллуса.

Во время процесса дедифференциации, который у всех клеток сходен, клетки должны утратить характерные черты исходной ткани. В первую очередь они теряют запасные вещества — крахмал, белки, липиды. В них разрушаются специализированные клеточные органеллы, в частности хлоропласты, но возрастает число амилопластов. Кроме того, разрушается аппарат Гольджи, перестраиваются эндоплазматический ретикулум и элементы цитоскелета.

Через несколько часов после перенесения экспланта в условия *in vitro* начинается новый синтез белка. Он связан, вероятно, с механическим повреждением и действием гормонов, сохранившихся в экспланте с момента его изоляции из растения. Когда данные гормоны израсходуются, синтез белка прекращается. Если в это время клетки будут культивироваться на питательной среде, содержащей ауксины и цитокинины, то начнется каллусогенез, т.е. в результате дедифференцировки и деления клеток будет

образовываться первичный каллус. Таким образом, специализированная клетка растительной ткани становится каллусной в результате дедифференцировки, т.е. восстановления у нее способности к делению.

6.4. ТИПЫ КУЛЬТУР КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

В зависимости от способа, условий культивирования и происхождения можно выделить несколько типов культур клеток и тканей. Если культивирование происходит поверхностно на агаризованной питательной среде, то образуется каллусная ткань. Она не имеет четко выраженной структуры, но может различаться по плотности. Происхождение и условия выращивания определяют, будет ли каллусная ткань рыхлой, средней плотности или плотной. Рыхлая каллусная ткань имеет сильно обводненные клетки, легко распадается на небольшие группы клеток и кластеры и поэтому может быть использована для получения суспензионной культуры. Ткань средней плотности характеризуется хорошо выраженными меристематическими очагами. В ней легко иницируются процессы органогенеза. Наконец, у плотных каллусных тканей различают зоны редуцированного камбия и трахеидоподобных элементов:



Существует также суспензионная культура клеток, которую выращивают в жидкой питательной среде, так называемое глубинное культивирование. Клеточные суспензии образуются как из каллусных тканей, так и непосредственно из экспланта. Для получения суспензионных культур предпочтительнее брать каллусы рыхлого типа. Если для этой цели необходимо использовать плотный каллус, то его можно разрыхлить, исключив из питательной среды соли Ca^{2+} . С этой же целью можно культивировать ткань на среде, содержащей ауксин 2,4-D или ферменты — пектиназу (0,2 мг/л) и

целлюлазу (0,01 мг/л). Наилучший эффект достигается при добавлении ферментов. Суспензионные культуры клеток можно получить и непосредственно из экспланта по методу Ф. Стюарда. Для этого эксплант помещают в жидкую среду при постоянном автоматическом перемешивании. Дедифференцированные клетки отрываются от экспланта, образуя суспензию в питательной среде. Постоянное встряхивание — необходимое условие культивирования клеточных суспензий. Суспензионные клетки делятся в присутствии тех же двух групп гормонов (ауксинов и цитокининов), которые индуцируют деление клеток в каллусных тканях. Следовательно, можно сказать, что суспензионные культуры представлены разными агрегатами каллусных клеток.

Клеточные суспензии играют значительную роль в биотехнологии. Они могут быть использованы для получения изолированных протопластов, которые применяют для клеточной селекции, при введении чужеродных ДНК и других процессах. Клеточные суспензии культивируют в больших количествах для получения вторичных метаболитов, выявления новых веществ, для выращивания клеточной биомассы. Однако увеличение клеточной биомассы в результате деления клеток и синтез вторичных метаболитов разобщены во времени. Поэтому необходимо хорошо знать физиологию, свойства клеток в суспензионных культурах, чтобы получить максимальный выход продукта. Состояние клеточных суспензий характеризуется плотностью клеточной популяции. За 14—16 дней (средняя длительность пассажа) плотность обычно повышается от $5 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^6$ кл/мл. Качество суспензии определяется степенью агрегированности. Агрегаты должны содержать не более 10—12 клеток.

Большой интерес представляет культура одиночных клеток. Ее применяют в клеточной селекции для отбора гибридных клеток и их клонирования, а также для генетических и физиологических исследований. Например, вопрос о причинах генетической неоднородности легче решать, используя клон-потомство одной клетки, а не гетерогенную ткань исходного экспланта.

Однако культивирование одной или нескольких клеток связано с определенными трудностями, состоящими в том, что одиночная клетка живет, но не делится в тех условиях, которые разработаны для нормального роста и размножения клеток каллусной ткани. Поэтому при культивировании одиночных клеток потребовалась выработка специальных методов. Все они основаны на использовании так называемого «кондиционирующего фактора» — метаболитов, выделяемых в среду делящимися клетками. Когда на питательную среду высаживается одна клетка или небольшое их количество, они не делятся, так как выделяемого кондиционирующего фактора не хватает для индукции деления. Следовательно, необходимо повысить концентрацию фактора в питательной среде. Этой цели служат следующие методы:

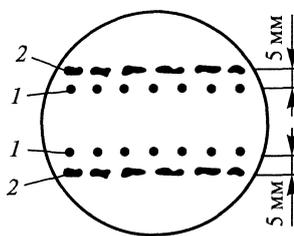


Рис. 6.1. Выращивание отдельных клеток с помощью ткани-«няньки» (по Р. Г. Бутенко, 1999):

1 — одиночные клетки; 2 — каллусная культура-«нянька»

1. Метод ткани-«няньки» — кондиционирующий фактор выделяется находящимися рядом с одиночной клеткой кусочками ткани-«няньки» (рис. 6.1).

2. Метод «кормящего слоя» — кондиционирующий фактор выделяют активно делящиеся клетки суспензионной культуры того же вида растений, что и одиночная клетка (рис. 6.2).

3. Кондиционирование среды — осуществляется путем добавления в нее питательной среды, отфильтрованной от интенсивно делящихся клеток.

4. Метод культивирования одиночных клеток — осуществляется в микрокапле, т.е. в очень малом объеме (≈ 20 мкл) богатой питательной среды (Ю. Ю. Глеба).

Точно сказать, что представляет собой кондиционирующий фактор, пока невозможно. Согласно исследованиям А. И. Павловой и Р. Г. Бутенко (1969), этот фактор водорастворим, термостабилен, не заменяется фитогормонами, включает низкомолекулярные вещества. Химическая природа кондиционирующего фактора доказывается с помощью довольно простого эксперимента. Если

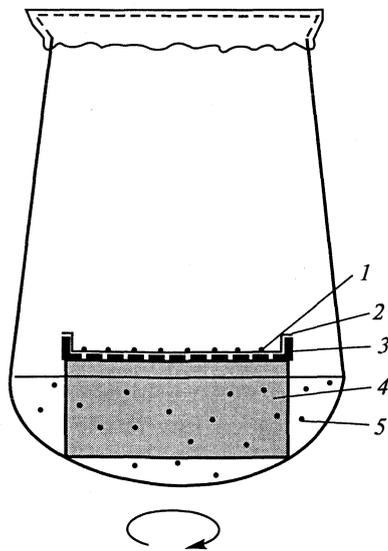


Рис. 6.2. Использование культуры суспензионных клеток в качестве «кормящего слоя» для выращивания изолированных протопластов и одиночных клеток кукурузы (Ву Дык Куанг, З. Б. Шамина, 1985):

1 — колонии клеток; 2 — фильтровальная бумага; 3 — алюминиевая сетка; 4 — пенополиуретан; 5 — суспензия клеток

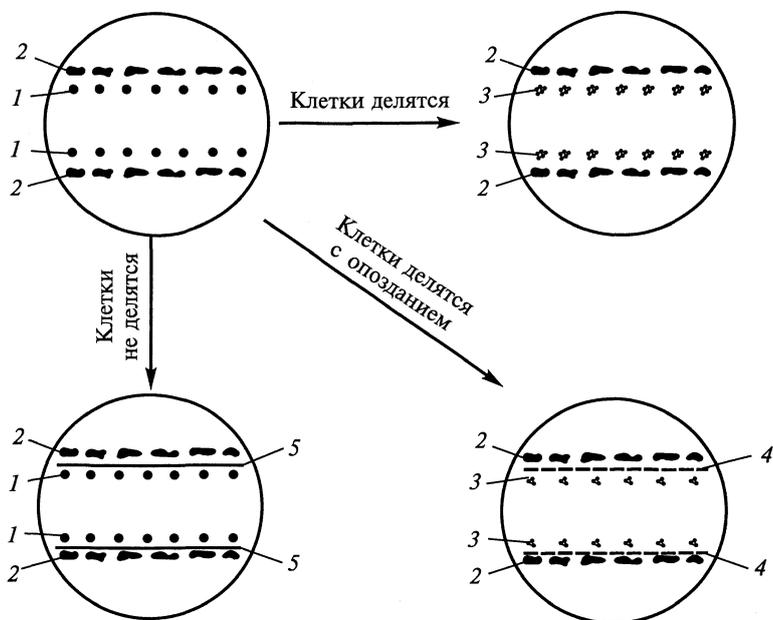


Рис. 6.3. Доказательство химической природы фактора кондиционирования:

1 — одиночные клетки; 2 — ткань-«нянька»; 3 — делящиеся клетки; 4 — целлофан; 5 — стеклянные пластинки

разделить одиночные клетки и ткань-«няньку» стеклянной пластиной, то деления клеток не наступает. Если вместо пластины поместить целлофан, то хотя и с задержкой начинается деление одиночных клеток (рис. 6.3).

6.5. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛЛУСНЫХ КЛЕТОК

Каллусная клетка имеет свой цикл развития, аналогичный циклу всех других клеток: деление, растяжение, дифференцировку, старение и отмирание. Дифференцировку каллусных клеток принято называть вторичной. Однако ее не следует путать с вторичной дифференцировкой, на которой основан морфогенез. Рост каллусных тканей подчиняется общим закономерностям. Кривая роста каллусных тканей также имеет характер S-образной кривой (ростовая кривая Сакса) и включает пять фаз, длительность которых неодинакова у разных видов растений (рис. 6.4).

Первая фаза — латентная, или лаг-фаза, заключается в подготовке клеток к делениям. Вторая — фаза экспоненциального роста (логарифмическая). В это время митотическая активность наибольшая,

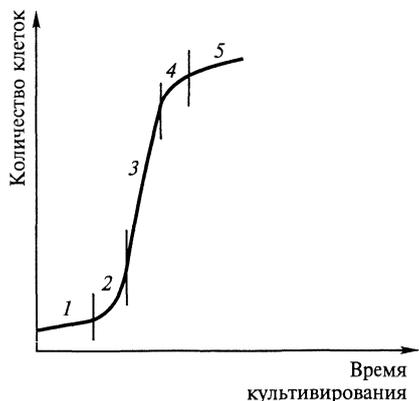


Рис. 6.4. Ростовая кривая при периодическом выращивании каллусных тканей:

Фазы роста: 1 — латентная; 2 — логарифмическая; 3 — линейная; 4 — замедленного роста; 5 — стационарного роста

такие свойства, как морозостойкость, устойчивость к абиотическим факторам (температура, засоление, фотопериодическая реакция), а главное, хотя и в разной степени, способность к синтезу вторичных метаболитов. Наряду с общими у каллусных клеток появляются свои, характерные только для них особенности. Например, длительно культивируемые *in vitro* клетки высших растений, как каллусные, так и суспензионные, образуют специфическую популяцию, относящуюся к типу неполовых, — популяцию соматических клеток. Наиболее характерные свойства этой популяции — физиологическая асинхронность и генетическая гетерогенность.

Физиологическая асинхронность — наиболее важное свойство неполовой популяции. Оно заключается в том, что в каждый данный момент времени клетки находятся в разных фазах роста: одни делятся, другие растут, а третьи уже стареют. Поэтому общее физиологическое состояние такой популяции принято оценивать по состоянию большинства клеток.

Причины возникающей асинхронности весьма разнообразны:

1. Особенности вида, сорта, генотипа индивидуального растения, а также особенности экспланта.
2. Стрессы культивирования, например неоптимальная для данного вида клеток среда.
3. Изменение баланса эндогенных гормонов и концентрации в среде экзогенных гормонов в течение выращивания.
4. Генетическая гетерогенность клеток и клонов.
5. Аномалия митотического цикла клеток *in vitro*.
6. Физические факторы (температура, свет, аэрация).

рост идет с ускорением, масса каллуса увеличивается. Третья фаза — линейная, характеризуется постоянной скоростью роста каллусной массы. Четвертая — фаза замедленного роста, во время которой интенсивность деления клеток резко снижается. Во время пятой фазы — стационарной — масса каллуса не увеличивается, так как начавшееся отмирание клеток еще компенсируется за счет их деления. Далее следует отмирание каллуса.

Культивируемые каллусные клетки и ткани сохраняют многие физиологические особенности, свойственные клеткам растения, из которого они были получены. Сохраняются, например,

Асинхронность — устойчивое свойство популяции каллусных клеток. Если с помощью специфических воздействий синхронизировать пролиферацию клеток популяции, то уже через 3—4 деления она вновь становится асинхронной.

Генетическая гетерогенность — свойство клеток соматической популяции (нестабильность генома и их генетическая гетерогенность). Генетически стабильными считаются только клетки меристематических тканей. В клетках остальных тканей при культивировании могут возникать полиплоидия, анеуплоидия, хромосомные aberrации, генные мутации. Однако генетическую гетерогенность нельзя рассматривать как недостаток, так как она является необходимым условием существования популяции клеток и служит основой для их адаптации.

В качестве причин появления генетической гетерогенности можно назвать следующие:

1. Генетическая гетерогенность исходного материала. В растениях клетки характеризуются различной плоидностью, диплоидны только активно делящиеся меристематические клетки.

2. Нарушение коррелятивных связей при выделении первичного экспланта из растения.

3. Действие компонентов среды. Экзогенные гормоны и стимуляторы могут оказывать мутагенное действие. Ауксины, особенно 2,4-D, входящие в состав питательных сред, — мутагены; цитокинины способствуют полиплоидизации клеток.

4. Длительное субкультивирование, при котором накапливаются генетически измененные каллусные клетки.

После 5—6 пересадок новый кариотип клеточной популяции, как правило, стабилизируется, если условия культивирования остаются постоянными. В противном случае изменение физических или трофических факторов приведет к новым генетическим изменениям.

Генетическая нестабильность каллусных клеток имеет большое значение для селекционной работы, так как позволяет отбирать штаммы клеток с измененным генотипом. Эти клетки могут обладать уникальными свойствами: повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам, повышенной продуктивностью и т. д. Однако генетическая гетерогенность популяций каллусных клеток в культуре не влияет на сохранение в их геноме основных качеств вида и растения-донора.

Гормоннезависимость. Хотя гормоны и вызывают мутации, каллусные ткани от большинства растений образуются только в присутствии в питательной среде и ауксинов, и цитокининов. Исключение составляют, например, незрелые зародыши пшеницы и семядоли подсолнечника. Первые образуют каллусную ткань на питательной среде с 2,4-D, но без цитокининов. Вторые, напротив, — на среде, содержащей цитокинины, но без ауксинов.

Вероятно, такая специфика связана с эндогенным содержанием фитогормонов и с компетентностью клеток. Однако при длительном культивировании практически у всех тканей может возникать специфическое свойство гормоннезависимости, т.е. автономности по отношению к ауксинам и цитокининам. Эти ткани могут расти на среде без гормонов, что делает их похожими на опухолевые клетки и резко отличает от нормальных каллусных тканей. Внешне же такие гормоннезависимые ткани ничем не отличаются от каллусных.

Клетки, которые в процессе культивирования приобрели свойство автономности от присутствия в среде гормонов, называются «привыкшими». Ткани, образованные такими «привыкшими» клетками, называют «химическими опухолями» в отличие от растительных или генетических опухолей. Генетические опухоли возникают на межвидовых гибридах растений. Растительные опухоли имеют бактериальное или вирусное происхождение. Чаще всего растительные опухоли возникают при попадании в растения агробактерий. Так, *Agrobacterium tumefaciens* вызывает образование корончатых галлов, *A. rhizogenes* — бородатого корня, *A. rubi* — стеблевого галла. Превращение растительных клеток в опухолевые связано с проникновением в них ДНК бактериальной клетки, так называемой Т1-плазмиды, которая значительно изменяет свойства клетки, в том числе экспрессирует гены, контролирующие синтез ауксинов и цитокининов. Гормоннезависимость «привыкших» клеток связана с изменением активности собственных генов, ответственных за синтез белков-ферментов, участвующих в синтезе гормонов. Таким образом, «привыкшим» тканям и растительным опухолям в равной степени свойственна гормоннезависимость, но у растительных опухолей она носит генетический характер. У «привыкших» клеток это свойство достигается главным образом за счет эпигеномных изменений. Существует еще одна особенность, позволяющая отличить «привыкшие» и опухолевые клетки от обычных каллусных. Обычно ни опухолевые, ни «привыкшие» ткани не способны к нормальной регенерации. Они могут образовывать уродливые органоподобные структуры, так называемые тератомы. В отдельных случаях у длительно культивируемых тканей удается отодвинуть порог «привыкания» благодаря изменению состава питательных сред и добиться регенерации нормального растения.

6.6. МОРФОГЕНЕЗ В КАЛЛУСНЫХ ТКАНЯХ КАК ПРОЯВЛЕНИЕ ТОТИПОТЕНТНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Дифференцировка каллусных тканей. Одна из наиболее интересных, но сложных проблем в биологии — развитие многоклеточных организмов. Изучение данного вопроса возможно несколь-

кими путями. Так, большое распространение получило моделирование процессов онтогенеза на более простых системах. При этом используют изолированные ткани, клетки, протопласты, культивируемые в стерильных условиях. Преимущество этого процесса состоит в том, что нет необходимости постоянно учитывать результаты взаимодействия органов в целостной системе растительного организма. Кроме того, экспериментатор сам имеет возможность выбирать, изменять и повторять условия опыта в соответствии с поставленной задачей. После завершения дедифференцировки дальнейшее развитие каллусной клетки может идти в нескольких направлениях. Во-первых, это вторичная дифференцировка разной степени сложности. Во-вторых, в клетке может сформироваться состояние стойкой дедифференцировки («привыкание»), а следовательно, способность расти на безгормональной среде. В-третьих, каллусная клетка проходит свой цикл развития, завершающийся ее старением и отмиранием.

Наибольший интерес вызывает первый путь, фактически представляющий морфогенные процессы. В культуре каллусных тканей морфогенезом называют возникновение организованных структур из неорганизованной массы клеток.

Вторичная дифференцировка каллусной клетки может завершиться образованием в каллусной ткани отдельных дифференцированных клеток. Они имеют определенное строение и выполняют специфические функции. Примером служит образование эпибластов — клеток, в которых запасаются вторичные метаболиты. Это наиболее простой тип дифференцировки каллусной клетки. Более сложная гистологическая дифференцировка завершается образованием в каллусе различных тканей: млечников, волокон, трихом, элементов ксилемы (трахеи и трахеиды) и флоэмы (ситовидные трубки и клетки-спутницы). К самым сложным видам вторичной дифференцировки относятся органогенез — образование органов и соматический эмбриогенез — образование из соматических клеток эмбриоидов, биполярных зародышеподобных структур. Все эти типы дифференцировки возможны только благодаря тотипотентности: любая растительная клетка содержит полный набор генов, характерный для того организма, из которого она была выделена. Потенциальные возможности всех клеток этого растения одинаковы; каждая из них в определенных условиях может дать начало целому организму. Однако выяснено, что реально детерминируется только одна из 400—1000 клеток, что, вероятно, связано с физиологическим состоянием клетки, с ее компетентностью. Так, у эксплантов стеблевого происхождения компетентны к действию экзогенных фитогормонов и, следовательно, способны к морфогенезу только клетки эпидермальных и субэпидермальных тканей (Тран Тан Ван, 1981). Однако компетентность клеток может приобретаться ими в процессе культивирования

калусной ткани, в условиях, индуцирующих морфогенез. Время, в течение которого в калусных клетках возникает это свойство, изменяется в широких пределах. Кроме того, существенную роль в дифференциации играют генотип растения-донора, условия и физические факторы культивирования.

Все калусные клетки, готовые ко вторичной дифференцировке, т. е. детерминированные, характеризуются общими чертами. Эти клетки — «клетки-инициали» — образуют утолщенную клеточную стенку, обособляясь от остальных калусных клеток. Для них характерно более крупное ядро, большее количество запасных веществ, меньшие размеры вакуолей. В «клетках-инициалах» начинается синтез определенных белков, интенсифицируется пентозофосфатный путь расщепления гексоз. Очень важно, что между этими клетками, формирующими меристематические очаги, восстанавливаются плазмодесмы, которые практически отсутствуют в массе калусных клеток.

Интересное предположение было высказано Л. Саксом и С. Тойвоном (1963). Оно сводится к тому, что существует минимальная масса калусных клеток, которая определяет способность уже детерминированных клеток к дальнейшему морфогенезу. Это подтвердилось в опытах с культурой семейства эли: детерминация адвентивных побегов происходила в клеточных комплексах из 5—6 клеток (Б.С. Флинн и др., 1988). В исследованиях С. Номура и А. Комаине (1989) было показано, что развитие соматических зародышей детерминируется в 6—10-клеточном агрегате.

Гистогенез. Главную роль в преобразовании калусных клеток в сосудистые элементы играют фитогормоны, в основном ауксины. Опыты по влиянию апикальной меристемы побега (место синтеза ауксинов) на гистогенез в калусной ткани показали, что ниже места прививки апекса в калусной ткани начинали образовываться сосудистые элементы. Тот же эффект наблюдался при нанесении на каллус ауксина с сахарозой. Интересно, что повышение концентрации сахарозы способствовало образованию элементов флоэмы, а понижение — образованию ксилемных элементов. Причем такое действие оказывала совместно с ауксином только сахароза, что позволяет говорить о ее регуляторной роли. Добавление к гормону других сахаров гистогенеза не вызывало. В некоторых случаях стимуляторами гистогенеза помимо ауксинов могут быть и остальные фитогормоны. Так, было отмечено, что в калусных тканях сои этот процесс начинается под действием гибберелловой кислоты и этилена.

Органогенез. Первые работы Ф. Скуга и С. Миллера по влиянию ауксинов и открытого ими кинетина на органогенез в каллусах растений показали прямую зависимость этого процесса от соотношения фитогормонов. Преобладание концентрации ауксина над цитокинином вызывает дифференцировку клеток, приводя-

шую к образованию корневой системы. В этом случае регенерации целого растения не происходит. При увеличении концентрации цитокинина и уменьшении ауксина начинаются стеблевой органогенез и образование побега. Если его пересадить на свежую питательную среду с преобладанием ауксина, то наблюдается образование корней и регенерация целого растения. В настоящее время доказано, что для прохождения органогенеза очень большое значение имеют принадлежность растения-донора к классу двудольных или однодольных, его генотип, а также тип экспланта. Кроме того, морфогенез можно получить только при условии подбора оптимальной питательной среды, определенных физических факторов, балансе фитогормонов, присутствии сигнальных белков и белков-акцепторов в клетках.

Среди компонентов, входящих в состав питательных сред, важную роль играют ионы NH_4^+ и NO_3^- . Присутствие аммонийного азота важно для начала морфогенеза, а добавление нитратного азота способствует росту и развитию образовавшихся структур. Фитогормоны, используемые для стимуляции органогенеза, не ограничиваются теперь только ауксинами и цитокининами. С этой целью в питательную среду вводят другие классы фитогормонов: абсцизины, гиббереллины, этилен.

Влияние типа экспланта на морфогенез было четко показано в работах Н. П. Аксеновой, Т. В. Бавриной, Т. Н. Константиновой. Они установили, что только экспланты, выделенные из верхних междоузлий, могут образовывать каллус, способный к флоральному морфогенезу. Каллусы, полученные на эксплантах из нижних междоузлий, давали начало только вегетативным органам.

Вопрос о механизме запуска вторичной дифференцировки у каллусных клеток остается открытым. В настоящее время самое раннее событие, связанное с морфогенезом, — это появление тканеспецифичных белков. Установлено, что все морфогенетические изменения активируются и (или) контролируются специальными генами.

Соматический эмбриогенез. При соматическом эмбриогенезе клетка-инициаль дает начало зиготе. Регенерант, образующийся из соматического зародыша, полностью сформирован, что устраняет лишние затраты по укоренению полученных при органогенезе побегов. Кроме того, соматические эмбриониды точнее воспроизводят генотип исходного растения по сравнению с растениями-регенерантами, полученными в результате органогенеза. Соматические зародыши представляют и чисто практический интерес, так как могут быть использованы для получения искусственных семян.

Соматический эмбриогенез очень важен для фундаментальных наук. Он позволяет изучать механизмы эмбриогенеза, так как почти все его фазы, за исключением первой, в растении и в культуре тканей совпадают. Наиболее ранняя из изученных фаз детерминации клетки по эмбриональному пути развития состоит в при-

обретении ею свойств полярности. Так, при определении плотности биоэлектрического потенциала для четырех морфогенных клеток оказалось, что максимальная плотность электрического тока была на полярных полюсах этой группы клеток. Переход клеток в следующую фазу эмбриогенеза сопровождался значительным повышением плотности тока. Предполагается, что морфогенные клетки могут поддерживать полярность за счет активного базипетального транспорта эндогенного ауксина, градиента биоэлектрических потенциалов, градиента ионов кальция.

В связи с этим особый интерес представляют работы Ю. Б. Долгих (1994), в которых было установлено, что слабый постоянный электрический ток (2 мкА) может быть индуктором эмбриогенеза. Соматический эмбриогенез фактически не зависит от экзогенных фитогормонов, только развитие сформировавшихся соматических зародышей начинается в отсутствие ауксинов в среде. Однако содержание эндогенных фитогормонов имеет решающее значение для индукции эмбриогенеза.

На регуляцию морфогенеза существенно влияет качество света. Показано (Л. Коппель, 1992), что морфогенный каллус образуется чаще на синем свете, чем на белом или красном. Изменения на уровне индивидуальных белков во время реализации морфогенетической программы в культуре тканей позволили говорить о существовании белков развития. Однако отсутствие специфических тестов на эти белки не позволяет их выявить. Вместе с тем при использовании гибридов, продуцирующих моноклональные антитела на мембранные белки соматических зародышей, удалось выявить полипептид с молекулярной массой 45 кДа, который встречается в ядре нескольких видов растений и возможно участвует в регуляции клеточного деления (Г. Смит и др., 1988). В настоящее время большое внимание уделяется генетическому аспекту морфогенеза, изучению соматического эмбриогенеза как генетически наследуемого признака. Роль основного двигателя процесса развития отводится дифференциальной активности генов. Предполагается, что гены, контролирующие соматический эмбриогенез, начинают экспрессироваться в критические периоды развития эмбриоидов (Н.А. Моисеева, 1991).

6.7. ИЗОЛИРОВАННЫЕ ПРОТОПЛАСТЫ, ИХ ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ

Впервые термин «изолированные протопласты» был предложен Д. Ханстейном в 1880 г. Протопласт в целой клетке можно наблюдать во время плазмолиза. Изолированный протопласт — это содержимое растительной клетки, окруженное плазмалеммой. Целлюлозная стенка у данного образования отсутствует. Изолированные

протопласты — одни из наиболее ценных объектов в биотехнологии. Они позволяют исследовать различные свойства мембран, а также транспорт веществ через плазмалемму. Главное их преимущество состоит в том, что в изолированные протопласты достаточно легко вводить генетическую информацию из органелл и клеток других растений, прокариотических организмов и из клеток животных. Е. Коккинг установил, что изолированный протопласт благодаря механизму пиноцитоза способен поглощать из окружающей среды не только низкомолекулярные вещества, но и крупные молекулы, частицы (вирусы) и даже изолированные органеллы.

Большое значение в создании новых форм растений для изучения взаимодействия ядерного генома и геномов органелл имеет способность изолированных протопластов сливаться, образуя гибридные клетки. Таким способом можно добиться получения гибридов от растений с разной степенью таксономической удаленности, но обладающих ценными хозяйственными качествами.

Первые протопласты были выделены Дж. Клернером в 1892 г. при изучении плазмолиза в клетках листа телореза (*Stratiotes aloides*) во время механического повреждения ткани. Поэтому этот метод назван механическим. Он позволяет выделить лишь небольшое количество протопластов (выделение возможно не из всех видов тканей); сам метод длительный и трудоемкий. Современный метод выделения протопластов заключается в удалении клеточной стенки с помощью поэтапного использования ферментов для ее разрушения: целлюлазы, гемицеллюлазы, пектиназы. Этот метод получил название ферментативного.

Первое успешное выделение протопластов из клеток высших растений данным методом сделано Е. Коккингом в 1960 г. По сравнению с механическим ферментативный метод имеет ряд преимуществ. Он позволяет сравнительно легко и быстро выделять большое количество протопластов, причем они не испытывают сильного осмотического шока. После действия ферментов смесь протопластов пропускают через фильтр и центрифугируют для удаления неразрушенных клеток и их осколков.

Выделить протопласты можно из клеток растительных тканей, культуры каллусов и суспензионной культуры. Оптимальные условия для изоляции протопластов для разных объектов индивидуальны, что требует кропотливой предварительной работы по подбору концентраций ферментов, их соотношения, времени обработки. Очень важным фактором, позволяющим выделять целые жизнеспособные протопласты, является подбор осмотического стабилизатора. В качестве стабилизаторов обычно используют различные сахара, иногда ионные осмотики (растворы солей CaCl_2 , Na_2HPO_4 , KCl). Концентрация осмотиков должна быть немного гипертонична, чтобы протопласты находились в состоянии слабого плазмолиза. В этом случае тормозятся метаболизм и регенерация клеточной стенки.

Изолированные протопласты можно культивировать. Обычно для этого используют те же среды, на которых растут изолированные клетки и ткани. Сразу же после удаления ферментов у протопластов в культуре начинается образование клеточной стенки. Протопласт, регенерировавший стенку, ведет себя как изолированная клетка, способен делиться и формировать клон клеток. Регенерация целых растений из изолированных протопластов сопряжена с рядом трудностей. Получить регенерацию через эмбриогенез удалось пока только у растений моркови. Стимуляцией последовательного образования корней и побегов (органогенез) добились регенерации растений табака, петунии и некоторых других растений. Следует отметить, что протопласты, изолированные из генетически стабильной клеточной культуры, чаще регенерируют растения и с большим успехом используются при исследованиях генетической модификации протопластов.

6.8. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА КУЛЬТУРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ В СОЗДАНИИ СОВРЕМЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Помимо фундаментальных исследований метод культуры изолированных тканей широко используется в сельском хозяйстве и промышленном производстве (рис. 6.5). Примером может служить массовое клональное микроразмножение плодовоовощных и декоративных растений, а также их оздоровление от вирусных и других инфекций. С помощью культуры *in vitro* можно расширить возможности селекционной работы: получать клоны клеток, а затем и растения с запрограммированными свойствами. Благодаря способности клеток синтезировать в культуре вторичные метаболиты возникла отрасль промышленности, осуществляющая биологический синтез веществ, необходимых человеку.

6.8.1. Синтез вторичных метаболитов

В настоящее время известно примерно $2 \cdot 10^4$ синтезируемых растениями веществ, которые используются человеком, и их количество постоянно увеличивается. Растения всегда служили источником пищи, эфирных масел, красителей и, конечно же, лекарственных соединений. Так, мак снотворный (*Papaver somniferum*) является источником болеутоляющего вещества — кодеина; из наперстянки (*Digitalis lanata*) получают дигоксин, тонизирующий сердечную деятельность; из хинного дерева (*Cinchona ledgeriana*) — антималярийное средство «хинин». Особое место занимают наркотики и стимулирующие вещества. В небольших, строго контролируемых количествах их используют в медицине. Однако при си-

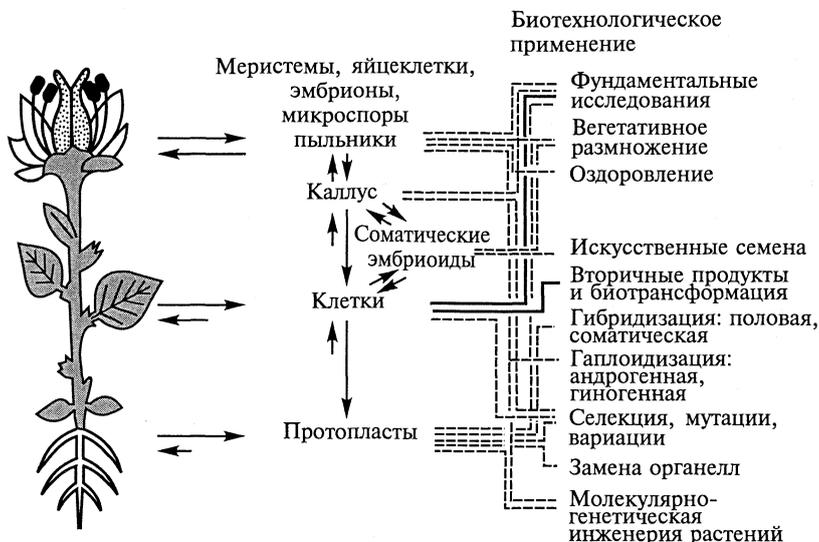


Рис. 6.5. Использование культуры клеток и тканей растений в биотехнологии (по Х. Борнман, 1991)

стематическом употреблении низких концентраций наркотиков возникают наркозависимость и стремление к увеличению употребляемой дозы. Применение высоких концентраций наркотика убивает человека. Наиболее известны опиум и героин из *Papaver somniferum*, кокаин из *Erythroxylon*, никотин из различных сортов табака. Наиболее известный стимулятор — кофеин, содержащийся в растениях чая и кофе. Стимуляторы не токсичны в концентрациях, рекомендуемых к применению. Однако высокие их концентрации негативно влияют на сердечно-сосудистую и нервную систему человека.

Большой интерес вызвало открытие пиретринов, выделенных из цветков *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Эти вещества — мощные инсектициды. Особая их ценность заключается в том, что пиретрины не вызывают привыкания у насекомых, а также не проявляют кумулятивного токсического эффекта.

Способность интактных растений синтезировать различные соединения привела к предположению, что тем же свойством будут обладать клетки и ткани этих растений, выращиваемые в стерильных условиях. Для некоторых культур это оказалось справедливым. Но в отдельных случаях клетки либо не проявляли способности к синтезу необходимых веществ, либо синтезировали их в минимальных количествах. Понадобились долгие эксперименты по подбору питательных сред, условий культивирования, исследованию новых штаммов, полученных благодаря генетической гетероген-

ности каллусных клеток или применению мутагенных факторов, чтобы добиться серьезных успехов в этой области.

В настоящее время промышленный синтез вторичных метаболитов — очень перспективное направление. Синтез вторичных метаболитов происходит главным образом в суспензионной культуре клеток, в регулируемых условиях, поэтому он не зависит от климатических факторов, от повреждения насекомыми. Культуры выращивают на малых площадях в отличие от больших массивов плантаций с необходимыми растениями. Культуры клеток растений могут синтезировать практически все классы соединений вторичного обмена, причем довольно часто в количествах, в несколько раз превышающих их синтез в целых растениях. Например, выход аймалицина и серпентина в культуре клеток *Catharanthus roseus* составляет 1,3 % сухой массы, а в целом растении — 0,26 %. В культуре клеток *Dioscorea deltoidea* диосгенин синтезируется в количестве 26 мг на 1 г сухой массы, а в клубнях растений его содержание составляет 20 мг на 1 г сухой массы. Кроме того, в культурах клеток может начаться синтез веществ, не характерных для исходного растения, либо расширяется набор синтезируемых соединений. В ряде случаев в клеточной культуре образуются вещества, которые синтезировались интактным растением на ювенильной фазе развития, либо вещества, содержавшиеся в клетках филогенетически более ранних групп растений. Так, в культуре клеток *Papaver bracteatum* содержится сангвирин, характерный для ювенильных растений, и отсутствует тебаин, синтезируемый взрослыми растениями. А в культуре клеток живокости (*Delphinium*) синтезируются Δ^7 -стерины, присутствующие у архаичных групп растений.

Синтез вторичных соединений может коррелировать с процессом дифференцировки в культуре клеток. Например, в суспензионной культуре *Papaver somniferum* максимальный синтез алкалоидов начинается после того, как в ней дифференцируется достаточно большое количество специализированных клеток млечников, предназначенных для депонирования метаболитов. С другой стороны, культуры клеток табака и моркови синтезируют большое количество никотина и антоцианина соответственно, хотя их клетки слабо дифференцированы. Не существует также однозначного ответа на вопрос, как связан синтез вторичных метаболитов с ростовыми процессами. У большого числа культур вторичные метаболиты синтезируются и накапливаются в значительных количествах либо во время экспоненциальной фазы, когда ростовые процессы особенно активны, либо в период стационарной фазы роста культуры клеток, когда прирост клеточной массы прекращается. Однако есть культуры, например культура клеток *Catharanthus roseus*, у которых синтез вторичных метаболитов сопровождает весь период роста.

Важная особенность культивируемой популяции клеток — ее стабильность в отношении синтеза и накопления продуктов вто-

ричного синтеза. Так, в отделе биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН под руководством Р.Г. Бутенко были получены разные штаммы клеток *Dioscorea deltoidea*, в том числе штамм-сверхпродукцент ИФР ДМ-0,5. Все эти штаммы сохраняли стабильность в отношении синтеза фураностаноловых гликозидов около 26 лет. Интересная особенность большинства клеток в культуре состоит в том, что обычно эти клетки не транспортируют синтезируемые метаболиты в питательную среду или другие клетки, хотя некоторые культуры составляют исключение, в частности культура клеток мака, которые депонируют алкалоиды в млечники. Синтез вторичных метаболитов в культивируемых клетках связан с внутриклеточными органеллами, в основном с пластидами и эндоплазматическим ретикулумом. В клетках, не способных к транспорту метаболитов, продукты вторичного синтеза обычно накапливаются в вакуолях и свободном пространстве (СП) клеток (табл. 6.3).

На синтез вторичных метаболитов влияет целый ряд факторов. Прежде всего выход продукта зависит от генотипа растения-донора. Показано, что культуры клеток, полученных от высокопродуктивных растений, продуцировали большее число метаболитов. Другой важный фактор — состав питательной среды и концентрация ее компонентов, которые должны обеспечивать, с одной стороны, увеличение количества клеток-продукентов, с другой —

Таблица 6.3

Внутриклеточная локализация синтеза и накопления вторичных метаболитов (по Р.Г.Бутенко, 1999)

Внутриклеточные метаболиты	Синтез	Накопление
Алкалоиды	Пластиды, цитоплазма	Вакуоль, хлоропласты, СП
<i>Терпеноиды</i> Монотерпены Тритерпены	Лейкопласты Хлоропласты, лейкопласты	СП Вакуоль, СП, цитоплазма
<i>Фенолы</i> Флавоноиды Танины Кумарины Оксикоричные кислоты	Хлоропласты Вакуоль, пластиды Вакуоль, хлоропласты, ЭПР ЭПР, хлоропласты, митохондрии	Вакуоль, хлоропласты, СП Вакуоль, СП, ЭПР Вакуоль Вакуоль, СП, хлоропласты
Цианогенные гликозиды	ЭПР	Вакуоль
Глюкозинолаты	ЭПР	Вакуоль
Бетаины	Предположительно цитоплазма	Вакуоль

усиливать сам процесс синтеза. На рост, т.е. на увеличение биомассы, существенно влияет природа и количество углеводов, соединений азота и фосфора, на синтез метаболитов — природа и концентрация фитогормонов. Так, при замене одного ауксина на другой, например нафтилуксусной кислоты на 2,4-D, трехкратно увеличился синтез антрахинона суспензионной культурой *Morinda citrifolia*.

Очень большое влияние на рост суспензионной среды оказывает ее непрерывное перемешивание, которое обеспечивает хорошую аэрацию и предотвращает осаждение клеток. В лабораторных условиях перемешивание достигается благодаря использованию качалок или роллерных установок. При промышленном выращивании суспензионных культур применяют специальные системы, в которых идут увеличение биомассы и синтез вторичных соединений, — биореакторы. Эти системы обладают важными преимуществами: возможностью управлять процессом культивирования на основе показаний датчиков; кроме того, большой объем культивируемого материала позволяет забирать значительные пробы, при этом стрессовые реакции у культуры клеток не возникают. В зависимости от способа перемешивания культуральной жидкости биореакторы делят на две группы.

Первая группа включает биореакторы, в которых суспензионная культура перемешивается только за счет подачи воздуха; во второй группе биореакторов культура перемешивается механическим способом (рис. 6.6).

Выращивание культур растительных клеток в биореакторах проводят в двух режимах. Первый режим — периодическое культивиро-

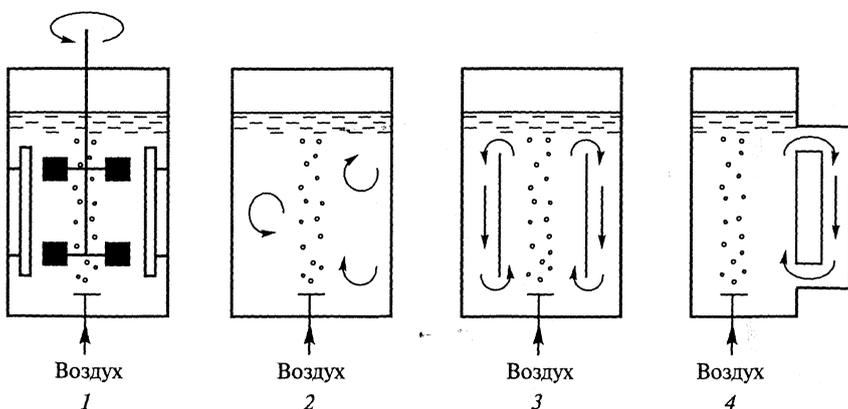


Рис. 6.6. Схема работы основных типов биореакторов:

1 — биореактор с механическим перемешивающим устройством; 2 — барботажный биореактор; 3 — аэролитный биореактор; 4 — биореактор с вынесенной циркуляционной петлей

вание — заключается в том, что по окончании процесса откачивают и используют всю суспензию клеток. При втором режиме — проточное культивирование — в биореактор постоянно добавляют свежую питательную среду и одновременно отбирают тот же объем либо суспензии (открытое проточное культивирование), либо одной отработанной питательной среды, оставляя клетки в реакторе (закрытое проточное культивирование).

Существуют две разновидности открытого культивирования. Первая — турбидостат — подразумевает измерение и автоматическое поддержание концентрации клеточной биомассы в реакторе на одном уровне путем изменения скорости протока. Вторая разновидность — хемостат — заключается в подаче в биореактор с постоянной скоростью питательного раствора при одновременном откачивании с той же скоростью клеточной суспензии.

Существует еще одна современная технология получения вторичных метаболитов с помощью иммобилизованных клеток культуры, т.е. помещение их в определенный носитель или адсорбция в нем. Носитель с клетками помещают в питательную среду. Клетки остаются живыми. Они прекращают рост, но продолжают синтез метаболитов, выделяя их в среду.

Довольно часто синтез вторичных метаболитов в суспензионной культуре останавливается на промежуточных этапах, не доходя до необходимого продукта. Получение продукта возможно благодаря процессу биотрансформации. Сущность его состоит в изменении промежуточных метаболитов с помощью культур других растений или клеток бактерий. Биотрансформация очень эффективна в бактериальных клетках, поэтому растительные клетки используют, когда процесс не осуществляется в клетках микроорганизмов. Вводимые в эти культуры вещества могут подвергаться гидроксигированию, эпоксидированию, глюкозилрованию, этерификации, а также присоединяться к аминокислотам. Например, культура клеток женьшеня корневого происхождения способна трансформировать (гликозиллировать) фенольные соединения — продукты деятельности суспензионной культуры клеток корня *Panax ginseng*. Культуры клеток лебеды и картофеля могут биотрансформировать индолил-3-уксусную кислоту в индолил-3-ацетил-L-аспарагиновую кислоту (Н. И. Рекославская и др., 1991).

Еще один пример — биотрансформация карденолидов, гликозиды которых используют в медицине для лечения болезней сердца. Растения наперстянки (*Digitalis lanata*) в большом количестве синтезируют дигитоксин вместо необходимого дигоксина. Для соответствующей биотрансформации с успехом используют недифференцированную суспензионную культуру наперстянки. Иммобилизованные клетки этой культуры способны долгое время с постоянной скоростью трансформировать β -метилдигитоксин в β -метилдигоксин (А. В. Альферманн и др., 1987).

Таким образом, использование суспензионных культур для синтеза вторичных метаболитов в промышленных масштабах имеет большие перспективы, и не только с точки зрения экономической выгоды получения более дешевой продукции в запланированных количествах. Важно, что использование культуры клеток спасет от уничтожения тысячи дикорастущих растений, ставших уже редкими, которые синтезируют необходимые человеку вещества. Увеличение выхода продукта может быть достигнуто благодаря дальнейшей исследовательской работе по селекции специализированных популяций клеток и оптимизации условий культивирования. Большой интерес представляет также дальнейшее развитие методов биотрансформации метаболитов и иммобилизации культивируемых клеток.

6.8.2. Биотехнологии в сельском хозяйстве

Ускорение и облегчение селекционного процесса, а также создание растений с новыми качествами — это направления, которые достаточно успешно развиваются с помощью технологий клеточной инженерии, культуры клеток и тканей.

Две группы методов, благодаря которым развиваются данные направления, представлены в табл. 6.4.

Некоторые из указанных технологий стали традиционными, другие находятся на начальных этапах разработки. Наконец, есть такие методы, которые явно вышли из ранга вспомогательных, ускоряющих селекцию технологий. К ним можно отнести криосохранение генофонда — технологию, в настоящий момент приобретающую экологическую направленность; или клональное микроразмножение растений, тесно связанное с проблемой их оздоровления от вирусных и других инфекций. Поэтому обзор этих технологий вынесен за рамки данного раздела.

Технологии, облегчающие селекционный процесс. Одна из наиболее важных технологий этой группы — *оплодотворение in vitro*, помогающее предотвратить прогамную несовместимость, которая может быть вызвана следующими причинами:

1) генетически детерминированное (определенное) несоответствие секрета рыльца материнского растения и пыльцы отцовского, которое тормозит рост пыльцевых трубок на рыльце пестика;

2) несоответствие длины столбика пестика и пыльцевой трубки, в результате чего пыльцевая трубка не достигает семязпочки (гетеростилия);

3) тканевая несовместимость партнеров, приводящая к остановке роста пыльцевой трубки в любой момент ее прорастания от рыльца пестика до микропиле семязпочки (гаметофитный тип несовместимости).

Таблица 6.4

Клеточные технологии в селекции растений (по Р.Г. Бутенко, 1999)

Облегчение и ускорение селекционного процесса	Создание генетического разнообразия и скрининга генотипов с важными признаками
Оплодотворение <i>in vitro</i>	Использование соматональных вариаций и получение индуцированных мутантов на клеточном уровне
Культура незрелых гибридных семян и зародышей (эмбриокультура)	Клеточная селекция
Регенерация растений из тканей летальных гибридов	Гибридизация соматических клеток
Экспериментальная гаплоидия	Перенос чужеродных цитоплазматических генов
Клональное микроразмножение новых сортов, гибридов, линий (включая создание искусственных семян)	Перенос чужеродной генетической информации различного происхождения
Криосохранение генофонда	Адресный перенос ядерных генов

Преодоление прогамной несовместимости возможно благодаря выращиванию в стерильных условиях изолированной завязи с нанесенной на нее пыльцой или изолированных кусочков плаценты с семечками, рядом с которыми или непосредственно на ткани которых культивируется пыльца.

Значительным препятствием для селекции служит также постгамная несовместимость, вызванная одновременным развитием зародыша и эндосперма при отдаленной гибридизации. В результате образуются невсхожие щуплые семена. Получить растение из таких семян можно только при использовании *метода эмбриокультуры*, т.е. выращивания изолированного зародыша на искусственной питательной среде *in vitro*. Метод эмбриокультуры широко применяется при межвидовой гибридизации овощных растений, для микроразмножения ценных гибридов, для клеточной селекции.

Большое значение имеет *создание гаплоидов*, позволяющее ускорить процесс селекции в 2—3 раза. Использование гаплоидных клеток и гаплоидных растений способствует обнаружению экспрессии введенного в клетку генома, редких рекомбинаций, рецессивных мутаций, которые в диплоидных растениях, как пра-

вило, маскируются доминантными генами. Из гаплоидных клеток можно выделить протопласты; сливаясь, они образуют гибридные клетки и растения с диплоидным числом хромосом. Обработка гаплоидные клетки колхицином, можно добиться удвоения числа хромосом и получить диплоидные гомозиготные растения. Все это значительно облегчает выявление и стабилизацию необходимых признаков. Кроме селекции гаплоиды применяются также в генно-инженерных исследованиях. Впервые возможность получения спонтанных гаплоидов при аномальном развитии пыльников, пыльцы и других объектов была показана в 1964 г. С. Гуха и С. Магешвари. В настоящее время в культуре гаплоидные растения получают из изолированных пыльников (андрогенез), изолированных семяпочек (гиногенез); из гибридного зародыша, у которого в результате несовместимости потеряны отцовские хромосомы (партеногенез). Новые сорта ячменя — Исток и Одесский-15 — были выведены благодаря комбинации партеногенетического метода с культурой изолированных зародышей за 4 года вместо 10—12 лет, необходимых для обычной селекции.

Создание генетического разнообразия исходных форм растений и скрининга генотипов. Сомаклональная изменчивость — прекрасный источник генетического разнообразия (сомаклональных вариаций), которое может быть реализовано в создании генетически измененных растений-регенерантов с новыми свойствами (*сомаклональные варианты*, или *сомаклоны*). Помимо повышения генетического разнообразия, использование сомаклональных вариантов в 2 раза может ускорить процесс выведения нового сорта даже для размножаемых семенами растений. Первые сомаклональные варианты табака были получены в Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева (Н. А. Загорина, З. П. Шамина, 1970).

Сомаклональные вариации нельзя рассматривать как случайные спонтанно возникающие мутации. Генетические изменения, характерные для сомаклональных вариаций, сложны и носят комплексный характер. Частота таких генетических изменений на три порядка превышает частоту спонтанных мутаций. Кроме того, сомаклональные варианты отличаются от исходного растения не только качественными моногенными признаками, но и количественными — полигенными (интенсивность роста, продуктивность, устойчивость к неблагоприятным факторам внешней среды).

Отмечены случаи появления сомаклональных вариантов, сочетающих признаки, которые невозможно или трудно соединить в одном генотипе традиционным селекционным путем. Так, Л. А. Кучеренко (1986) выделила из сомаклональных вариантов, возникших в каллусной культуре риса, растения, сочетающие скороспелость и длиннозерность. На их основе за короткий срок был создан новый сорт риса.

По-разному сказываются на генетических изменениях и, следовательно, на появлении соматклональных вариаций различные типы морфогенеза. Экспериментально установлено, что при соматическом эмбриогенезе цикл «клетка — растение» совершается значительно быстрее, чем при органогенезе. Поэтому степень различия между полученным и исходным родительским генотипом в случае органогенеза может быть значительно выше, чем при эмбриогенезе.

Источником генетического разнообразия растительного материала могут быть не только соматклональные вариации, но и мутагенез, в несколько раз повышающий образование стабильно устойчивых по искомым признакам клонов клеток.

После получения различных соматклональных вариаций от исходного растения наступает следующий этап — отбор необходимых сочетаний признаков. Данный вопрос решается с помощью *клеточной селекции*, которую проводят практически на любом объекте, введенном в культуру *in vitro*. Однако удобнее использовать суспензионную культуру или изолированные протопласты. Преимущество этих объектов состоит в быстром росте культуры и равномерном действии селективного фактора на все клетки. Для отбора соматклональных вариаций соответствующие селективные факторы (соли в высоких концентрациях, гербициды и др.) добавляют в питательную среду для выращивания культуры клеток либо растущие культуры помещают в селективные условия (низкая или высокая температура, освещенность и т.д.). Существует несколько методов клеточной селекции:

1. Прямая (позитивная) селекция, при которой выживает только заданный тип мутантных клеток.

2. Непрямая (негативная) селекция, которая ведет к гибели делящихся клеток дикого типа и выживанию метаболически неактивных клеток. Этот прием требует дополнительной идентификации мутационных изменений у выживших клеток.

3. Тотальная селекция, при которой индивидуально тестируются все клеточные клоны.

4. Визуальная селекция и неселективный отбор, когда необходимая вариантная линия выбирается среди прочих визуально или с помощью биохимических методов.

Для отбора клеток, устойчивых к неблагоприятным или стрессовым факторам, наиболее часто применяют прямую селекцию. После выбора нужной популяции необходимо проверить стабильность устойчивости к неблагоприятному фактору. Это длительный процесс, включающий многочисленные циклы выращивания и пересадки клеток на среды, содержащие селективный фактор или без него. Из стабильных клонов необходимо попытаться регенерировать растения. Получение растений-регенерантов, а также гибридологический анализ подтверждают генетическую природу при-

знака, а не адаптационный его характер. Следует, однако, отметить, что кропотливая работа по клеточной селекции не всегда приводит к нужному результату. Это связано с различием механизмов клеточной устойчивости и устойчивости растений. Либо клеточная устойчивость может быть только частью общего механизма, работающего в целом растении, как это наблюдается при создании устойчивости к засолению. Вместе с тем механизмы устойчивости к низким температурам, гербицидам, высоким концентрациям алюминия имеют, по-видимому, сходный характер у клеток и у целых растений. В последнем случае есть возможность получить из устойчивых клеточных популяций растение-регенерант, устойчивое к тому же фактору. Затем из большого числа соматклонов отбирают и проверяют в полевых условиях на стабильность те, которые имеют хозяйственно важные признаки, восполняющие отдельные недостатки исходного сорта. Так, после трехлетних полевых испытаний соматклонов сорта Любимец удалось выделить линии, превосходящие сорт по урожайности, устойчивости к фитофторе и степени зараженности вирусами.

Метод негативной селекции используется главным образом для выявления мутантов, ауксотрофных в отношении аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, витаминов и других важных метаболитов (Ю. Б. Долгих, З. П. Шамина, 1982). Ауксотрофные мутанты очень ценны для фундаментальных исследований механизмов генной регуляции синтеза этих веществ в клетке и в растении.

Гибридизация соматических клеток осуществляется благодаря слиянию протопластов, изолированных из соматических клеток растений, и служит для создания новых генотипов, новых форм растений. Использование изолированных протопластов позволяет решать множество теоретических и практических задач. С их помощью можно вести селекцию на клеточном уровне, работать в малом объеме с большим числом индивидуальных клеток, осуществлять прямой перенос генов, изучать мембраны, выделять пластыды. Протопласты непременно участвуют в соматической гибридизации. Термин «соматическая гибридизация», означающий процесс слияния протопластов соматических клеток, был введен Дж. Мельхерсом в 1974 г.

Соматическая гибридизация имеет важные особенности. Во-первых, этому процессу доступны практически любые скрещивания, перенос генов на далекие таксономические расстояния. Во-вторых, слияние протопластов способствует объединению цитоплазматических генов родительских клеток, чего не бывает при скрещивании половых клеток.

Самопроизвольное слияние протопластов происходит достаточно редко. Механизм этого процесса до конца не выяснен. Однако известно, что протопласты имеют отрицательный поверхностный

заряд, который вызывает их взаимное отталкивание. Для слияния это отталкивание необходимо преодолеть специальными приемами, способствующими снятию или перераспределению поверхностного заряда мембран. Впервые искусственное слияние протопластов с помощью индуктора слияния (фьюзогена) было осуществлено в 1970 г. Коккингем и его сотрудниками. В настоящее время в качестве эффективных фьюзогенов используют полиэтиленгликоль (ПЭГ) и растворы с рН 9—11 и высокой концентрацией ионов кальция. Согласно одной из гипотез, объясняющих слияние протопластов при использовании ПЭГ, высокая концентрация этого вещества (20—30 %) способствует поглощению всей свободной воды между протопластами, вызывая их слипание в результате дегидратации. Кроме того, поглощение свободной воды индуцирует образование пор в мембране, через которые перетекает внутриклеточное содержимое. Если повреждения мембран обратимы, слипшиеся протопласты регенерируют клеточную стенку (рис. 6.7).

Кроме того, существует физический фактор — импульсы электрического тока, который также заставляет протопласты сливаться. Обработка электрическими импульсами, как и обработка ПЭГ, приводит к обратимому повреждению мембран. Применение переменного тока вызывает диэлектрофорез, и протопласты, находящиеся между электродами, выстраиваются в ряд, примыкая друг к другу своими полярными поверхностями. Импульс постоянного

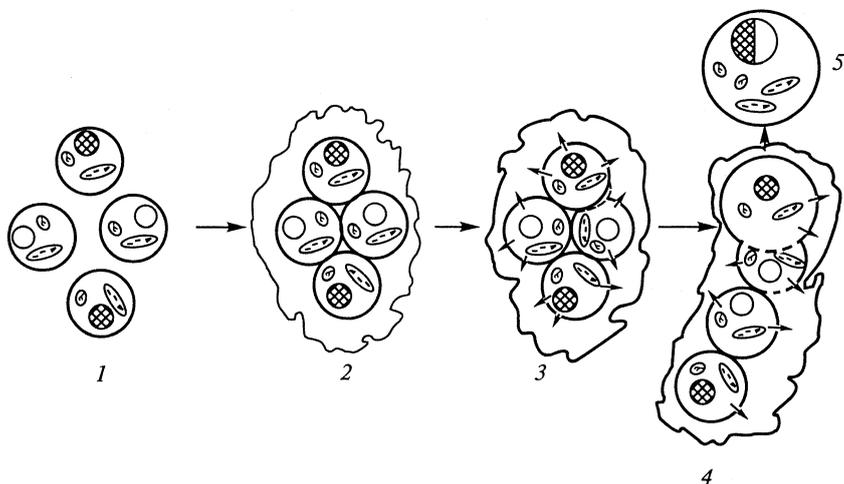


Рис. 6.7. Схема слияния протопластов под действием полиэтиленгликоля (по Х. Борнман, 1991):

1 — изолированные протопласты; 2 — слипание протопластов в результате дегидратации; 3 — образование пор в мембране протопласта; 4 — перетекание через поры внутриклеточного материала; 5 — гибридный протопласт

тока приводит к образованию пор, через которые происходит слияние (рис. 6.8).

При соматической гибридизации развиваются клетки двух типов: гибриды и цибриды. При образовании гибридов объединяется ядерный геном обеих клеток. Цибридная клетка содержит цитоплазму обоих партнеров, а ядро — одного. Такой результат достигается при деградации одного из ядер после слияния или в том случае, если один из протопластов был лишен ядра.

Первый неполювой гибрид высших растений был получен в 1972 г. при слиянии изолированных протопластов двух видов табака: *Nicotiana glauca* и *Nicotiana langsdorfii*. В настоящее время получено много межвидовых, межсемейственных и межтрибных гибридов, значительную часть которых нельзя считать нормальными растениями, а некоторые гибриды (гибрид арабидопсиса и турнепса) представляют собой растения-монстры. Возникающие аномалии — результат хромосомной несбалансированности. Описаны случаи возникновения гибридов между протопластами эритроцитов крысы и дрожжевых клеток, моркови и человека и др. Любые исследования, любые манипуляции в области создания новых генотипов должны быть тщательно и всесторонне продуманы, а ученые должны помнить об ответственности и научной этике. Профессор Колумбийского университета Э. Чаргафф предупреждал о том, что «в тысяче опытов, вероятно, ничего не случится,

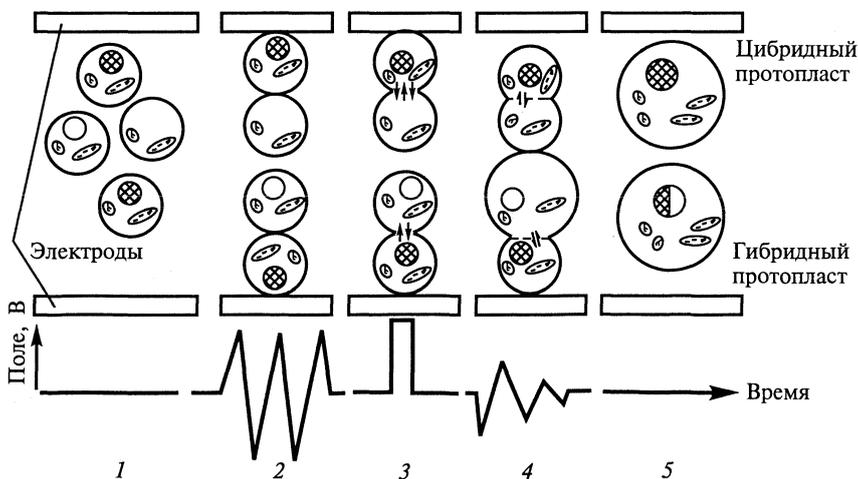


Рис. 6.8. Схема слияния протопластов под действием электрического поля (по Х. Борнман, 1991):

1 — изолированные протопласты; 2 — слияние протопластов полярными поверхностями; 3 — образование пор в мембранах под действием сильного импульса постоянного тока; 4 — смешивание цитоплазмы; 5 — образование гибридных (гибридных) протопластов

но затем в одном каком-то случае произойдет нечто очень неприятное». Он был «убежден, что именно попытка преобразовать или перехитрить природу почвы привела к ее гибели».

Введение в протопласты макромолекул, клеточных органелл и бактериальных клеток. Чужеродный генетический материал можно переносить в клетку не только при соматической гибридизации, но и при непосредственном введении ДНК или органелл, содержащих ДНК, в изолированные протопласты. Работы в этом направлении начаты не так давно, но уже получены интересные результаты. Так, поглощение экзогенных макромолекул ДНК показано у протопластов петунии, сои, моркови. Проведена трансплантация органелл (ядер, митохондрий, хлоропластов) в протопласты растений. Наибольшую важность представляют опыты по трансплантации хлоропластов одних растений в клетки других. П. Карлсон провел опыты по введению хлоропластов нормально-зеленого растения *Nicotiana suaveolens* в протопласты пестролистного мутанта *N. tabacum*. В результате культивирования протопластов были получены зеленые каллусы, из которых регенерировали растение, оказавшееся пестролистным. Для того чтобы понять, содержит растение-регенерант элементы геномов двух видов табаков или только одного, проанализировали белковую фракцию I, в которую входит ключевой фермент цикла Кальвина — рибулозодифосфаткарбоксилаза (РДФ-карбоксилаза). Этот фермент состоит из двух больших субъединиц и двух малых. Большие субъединицы кодируются геномом хлоропластов, малые — ядерными генами. Анализ состава белковой фракции I растения-регенеранта показал присутствие полипептидов, характерных и для пластид *N. tabacum*, и для пластид *N. suaveolens*. Перспективность работ по трансплантации хлоропластов заключается в том, что введение высокоэффективных хлоропластов может способствовать активации фотосинтеза и повышению продуктивности других растений.

Среди бактериальных клеток к созданию искусственных ассоциаций с растительными клетками наиболее способны цианобактерии. Это может быть связано с тем, что они часто вступают в симбиотические отношения с другими организмами; что древние цианобактерии, вероятно, участвовали в формировании растительных клеток в процессе эволюции; что цианобактерии способны выделять в среду разнообразные вещества: углеводы, аминокислоты, вещества гормональной природы и другие, которые могут быть использованы культивируемыми клетками растений. Растительные клетки способны потреблять кислород, образующийся в процессе фотосинтеза цианобактерий, а цианобактерии потребляют диоксид углерода, выделяемый растительными клетками при дыхании. Кроме того, азотфиксирующие цианобактерии могут накапливать азот в почве и обеспечивать до 15 % потребностей

растений в нем. Например, симбиоз папоротника *Azolla* с *Anabaena azollae* применяют в сельском хозяйстве в качестве источника связанного азота на рисовых полях.

Большой интерес вызывает тот факт, что цианобактерии могут выступать в качестве фототрофного компонента ассоциаций с растительными клетками. Использование питательных сред, в которых не хватает источника углерода, показало, что прирост растительных клеток может быть обеспечен за счет усвоения ими продуктов фотосинтеза цианобактерий или их лизиса. Однако не все сочетания растений и цианобактерий оказывают взаимное благотворное влияние. Выявлена видовая специфичность взаимодействия партнеров. Так, клетки культуры мака и *Anabaena variabilis* взаимно подавляли рост друг друга. В то же время на рост культивируемых клеток табака, женьшеня, диоскореи цианобактерии оказывали стимулирующее влияние. В большинстве случаев существенное влияние одного партнера на ростовые процессы другого не выявлялось.

Совместное выращивание растительных клеток и цианобактерий имеет еще одну важную особенность. На дефицитной среде оно может приводить к увеличению синтеза вторичных метаболитов по сравнению с их накоплением в монокультуре на полной среде.

Введение азотфиксирующих цианобактерий в культуру растительных клеток могло бы наряду с применением методов генной инженерии решить проблему азотфиксации. Показано, что в смешанных культурах каллуса табака и цианобактерий на среде Мурасиге и Скуга формировались побеги регенерантов табака с участками сине-зеленого цвета, где локализовались цианобактерии. Вероятно, большие межклетники в каллусах табака способствуют проникновению цианобактерий сначала в межклетники каллусной ткани и в область меристематических делений, а затем — в формирующиеся побеги. Цианобактерии сохранялись на поверхности и в тканях стебля и листьев при многочисленных пересадках, образовании вторичных каллусов и последующей регенерации из них побегов, т. е. образовывалась устойчивая ассоциация растительной и бактериальной клетки. Азотфиксирующие цианобактерии обеспечивали рост растительных клеток в суспензионных и каллусных смешанных культурах на питательных средах, дефицитных по азоту, а в ассоциациях с растениями — и в песчаной культуре, не содержащей связанного азота. Это действие обеспечивается, по-видимому, за счет продуктов азотфиксации, выделяющихся в среду. В свою очередь, цианобактерии могут получать от растений углеводы. Причем цианобактерии, предварительно культивируемые с растительными клетками, получают от побегов в 2,5 раза больше меченых соединений углерода по сравнению с цианобактериями, взятыми из чистой культуры. В результате такого потребления растение-хозяин может значительно снизить интенсивность собственных ростовых процессов. Поэтому прежде чем приступить к прак-

тическому использованию искусственных ассоциаций, необходимо решить проблему обеспечения азотфиксирующего симбионта органическими веществами без нанесения существенного ущерба растению.

6.8.3. Клональное микроразмножение и оздоровление растений

Клональным микроразмножением называют неполовое размножение растений с помощью метода культуры тканей, позволяющее получать растения идентичные исходному. В основе получения таких растений лежит способность соматических клеток растений полностью реализовывать свой потенциал развития, т.е. свойство тотипотентности. Метод клонального микроразмножения получает все более широкое распространение во всем мире. В большинстве стран эта технология приобрела коммерческий характер.

В России первые работы по клональному микроразмножению были проведены в 60-х годах XX в. в лаборатории Р.Г. Бутенко (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева). В настоящее время созданы и развиваются лаборатории клонального микроразмножения, связанные с нуждами селекции, размножением декоративных, лекарственных и других растений. Кроме того, технология используется для размножения лучших экземпляров взрослых лесных деревьев, особенно хвойных, для сохранения редких и исчезающих видов растений.

Свое название эта технология размножения получила от термина «клон» (от греч. *clon* — отпрыск), который предложил Веббер в 1903 г. Клональное микроразмножение имеет существенные преимущества перед традиционными способами размножения:

1. Высокий коэффициент размножения. Одно растение герберы за год при микроклональном размножении дает до 1 млн новых растений, тогда как при обычных способах размножения — только 50—100 растений. Большинство культивируемых в настоящее время сортов лилий размножается только вегетативно. Луковички возникают на материнских луковицах или на побегах в небольших количествах. Технология микроклонального размножения позволяет получить из одной чешуи луковицы за 6 месяцев 10^5 новых растений (сорт Red Carpet).

2. Получение генетически однородного посадочного материала.

3. Возможность оздоровления растений, освобождения их от вирусов благодаря клонированию меристематических тканей.

4. Возможность размножения растений, которые в естественных условиях репродуцируются с большим трудом.

5. Воспроизведение посадочного материала круглый год, что значительно экономит площади, занимаемые маточными и размножаемыми растениями.

6. Сокращение продолжительности селекционного периода, укоренение перехода растений от ювенильной фазы развития к репродуктивной.

Технология микроклонального размножения. Обязательное условие клонального микроразмножения — использование объектов, полностью сохраняющих генетическую стабильность на всех этапах процесса, от экспланта до растений в поле. Такому требованию удовлетворяют апексы и пазушные почки органов стеблевого происхождения, т.е. меристематические ткани. Их устойчивость к генетическим изменениям, вероятно, связана с высокой активностью систем репарации ДНК, а также с негативной селекцией измененных клеток.

Процесс клонального микроразмножения можно подразделить на 3 этапа:

1. Получение хорошо растущей стерильной культуры. На этом этапе необходимо правильно выбрать растение-донор, получить свободную от инфекции культуру, добиться ее выживания и быстрого роста на питательной среде.

2. Собственно размножение, осуществляемое несколькими способами:

активизация пазушных меристем;

индукция образования адвентивных почек тканями листа, стебля, чешуйками и донцем луковиц, корневищем и зачатками соцветий без первоначального образования каллусной ткани;

микрочеренкование побега, сохраняющего апикальное доминирование;

стимуляция образования микроклубней и микролуковичек;

индукция соматического эмбриогенеза.

3. Подготовка к высадке в поле или к реализации. Это очень важный этап, во время которого в теплице укорененные растения, полученные *in vitro*, адаптируют к новым условиям внешней среды: проводят закаливание растений, повышают их устойчивость к патогенным микроорганизмам и различным неблагоприятным факторам внешней среды. Существует много различных способов адаптирования растений к пересадке *in vivo*. Это подбор почвенного субстрата, создание определенной влажности, обработка химическими веществами (глицерин, парафин) для предотвращения обезвоживания листьев. Некоторые древесные растения лучше приживаются, если их заразить *in vitro* микоризообразующими грибами (Е.А. Калашникова, 1993). Упрощенный способ адаптации пробирочных растений винограда был разработан в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Адаптацию проводят прямо в пробирках, снимая с них пробки, когда растения винограда дорастают до верха пробирки. Через 1,5—2 недели, когда верхушки побега с двумя развитыми листьями появляются над пробиркой, растение готово к пересадке в почву.

Для предотвращения механических повреждений корневой системы растение пересаживают в почву вместе с агаром, заглубляя его так, что над поверхностью почвы остаются только 2 развитых листа, которые выросли из пробирки и уже адаптировались к внешним условиям. Такая методика позволяет значительно упростить, ускорить и удешевить этап акклиматизации растений.

Клональное микроразмножение растений проводят разными способами. Первый и основной способ — активизация пазушных меристем. Он состоит в снятии апикального доминирования и активизации развития меристем, существующих в растении. Этот способ основной и в обычном вегетативном размножении. И на интактном растении, и в случае клонирования снятие апикального доминирования достигается или удалением апикальной меристемы побега, или благодаря действию цитокинина. При клонировании цитокинины (6-бензиламинопурин, 6-фурфуриламинопурин, зеатин) добавляют в питательную среду, что приводит к развитию многочисленных пазушных побегов. Эти побеги отделяют от первичного экспланта и культивируют на свежей питательной среде. Активизацию пазушных меристем широко используют в промышленном размножении овощных сельскохозяйственных культур (картофель, томаты, огурцы, сахарная свекла, топинамбур и др.), цветов (гвоздика, роза, гербера), плодовых и ягодных культур (яблоня, вишня, малина, крыжовник и др.), древесных растений (туя, можжевельник и др.). Однако бесконечно размножать таким способом растения нельзя, поскольку длительное воздействие цитокининов, входящих в состав питательных сред, вызывает аномалии в морфологии стебля, потерю способности побегов к укоренению, иногда — гибель растений. В опытах с размножением земляники было показано, что при клонировании необходимо чередовать 2 — 3 цикла получения побегов с их укоренением.

Второй способ — индукция развития адвентивных почек, т. е. почек, возникающих из растительных клеток и тканей, которые их обычно не образуют. Этот метод в значительной мере обусловлен тотипотентностью клеток. Почти любой орган или ткань растения, свободные от инфекции, могут быть использованы в качестве экспланта и в определенных условиях образуют адвентивные почки. Данный процесс вызывают внесением в питательную среду определенных концентраций цитокининов и ауксинов, причем цитокинина должно быть гораздо больше, чем ауксина. Это наиболее распространенный способ микроразмножения высших растений. Развивая адвентивные почки на апикальных и пазушных меристемах, размножают растения томата, лука, чеснока; на сегментах листовых пластинок — салат, глоксину, фиалки; на тканях донца луковиц — лук, чеснок, гладиолусы, тюльпаны и другие луковичные растения.

Третий способ — микрочеренкование побега, сохраняющего апикальное доминирование. Растения-регенеранты, полученные любым другим способом, можно черенковать в стерильных условиях, высаживать на свежую питательную среду, укоренять и адаптировать к полевым условиям либо снова подвергать микрочеренкованию для того, чтобы увеличить количество посадочного материала.

Четвертый способ — размножение в биореакторах микроклубнями. Это один из способов ускоренного размножения оздоровленного материала. О. Мелик-Саркисов сконструировал гидропонную установку, позволяющую получать около 7000 микроклубней с 1 м² при массе одного клубня 5 г. Предусмотрена последующая механизированная посадка их в грунт. В отделе биологии клетки и биотехнологии Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН создана эффективная полупромышленная замкнутая система пневмоимпульсного биореактора для получения микроклубней картофеля, в которой предусмотрена возможность воздействия на направление и скорость процессов клубнеобразования. Технологии клонального микроразмножения в биореакторах разработаны не только для сельскохозяйственных, но и для декоративных растений (лилии, гладиолусы, гиацинты, филодендроны и т.д.). Однако созданные установки пока носят лабораторный, модельный характер.

Пятый способ размножения — образование соматических зародышей — основан на морфогенных изменениях — соматическом эмбриогенезе. Впервые это явление было отмечено в середине 50-х годов XX в. в культуре клеток моркови. Формирование эмбриоидов в культуре осуществляется в два этапа. На первом соматические клетки дифференцируются в эмбриональные в присутствии в питательной среде ауксинов, обычно это 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D). На следующей стадии развиваются эмбриоиды. Этот процесс идет только при значительном снижении концентрации ауксина или полном отсутствии его в питательной среде. Соматический эмбриогенез может происходить в тканях первичного экспланта, в каллусной и суспензионной культурах.

Поскольку соматические зародыши представляют собой полностью сформированные растения, данный метод позволяет сократить затраты, связанные с подбором условий укоренения и адаптации растений-регенерантов. Кроме того, преимущество получения соматических эмбриоидов состоит в том, что при использовании соответствующей техники капсулирования из них можно получать искусственные семена.

Соматический эмбриогенез в настоящее время применяют для размножения пшеницы, ячменя, моркови, редиса, винограда, некоторых древесных растений (дуб, ель, эвкалипт).

Факторы, влияющие на клональное микроразмножение. *Питательная среда.* Состав питательной среды — один из наиболее важных факторов при микроразмножении. Обычно используют стандартные среды: Мурасиге–Скуга, Нича и др., но с добавлением на каждом этапе различных веществ. На первом этапе в питательную среду часто вносят антиоксиданты, чтобы предотвратить гибель клеток из-за активизации гидролитических ферментов. Особое значение имеют концентрация и соотношение фитогормонов в среде. Например, на втором этапе для усиления морфогенеза обычно добавляют цитокинины. Напротив, на третьем этапе при укоренении в питательной среде должно быть только небольшое количество ауксинов (либо используется безгормональная среда). Иногда в среду добавляют гиббереллин (ГК), который стимулирует рост сформировавшихся почек. Важным регуляторным фактором служит сахароза. Обычная концентрация ее в среде составляет 3 %. На растениях каперса было показано, что более высокая концентрация сахарозы в среде приводила к образованию пурпурных, содержащих антоциан, почек возобновления. При концентрациях сахарозы менее 3 % наблюдалось формирование зеленых почек, способных к размножению.

Кроме того, существенное значение имеет состояние среды. Например, культивирование меристем земляники, вишни, черной смородины лучше происходит в жидкой питательной среде, чем в агаризованной.

Состояние экспланта. Морфогенез в значительной мере определяется возрастом и размером экспланта. Так, у эхеверии экспланты из молодых листьев образуют корни, из старых листьев — побеги. И только у листьев среднего возраста возникают и побеги, и корни, т.е. появляется возможность регенерации целого растения. Размер экспланта прямо пропорционально связан с регенерационной способностью: чем крупнее эксплант, тем выше эта способность. Большие экспланты могут самопроизвольно независимо от соотношения в питательной среде ауксинов и цитокининов образовывать почки. Но увеличение размера может привести к негативным последствиям, так как появляется вероятность присутствия в экспланте клеток, содержащих вирусную, грибковую и другие виды инфекции. Оптимальная величина экспланта должна обеспечивать как активный морфогенез, так и полную стерильность.

На регенерационную способность экспланта влияют также физиологическое состояние и таксономическая принадлежность растения-донора. Например, экспланты, выделенные из растений в фазу покоя, обладают более низкой способностью к укоренению и развитию побегов по сравнению с эксплантами, изолированными в фазу активного роста. Двудольные травянистые растения характеризуются большей регенерационной способностью, чем однодольные.

Физические факторы. Большое значение для успешного клонального размножения имеют физические факторы — температура, условия освещения, качество света, влажность.

Для улучшения клонального микроразмножения физические факторы необходимо подбирать с учетом естественного ареала произрастания культивируемого растения. Так, для тропических растений оптимальная температура культивирования будет приближаться к 27 °С, для растений альпийских лугов — к 18—20 °С, для большинства растений — к 25 °С. Жизнеспособность эксплантов увеличивается, если в начале выращивания поддерживать более низкие температуры. Оптимальная интенсивность освещения для большинства растений составляет 1000—3000 лк в течение 14—16 ч в сутки.

Существенное значение для регуляции морфогенеза имеет качество света. У микрочеренков березы красный свет способствовал 100 %-му укоренению, а синий — увеличивал содержание ЦК в тканях растений и таким образом стимулировал образование побегов.

Относительная влажность в камерах, где растут пробирочные растения, поддерживается на уровне 65—75 %. При пересадке в почву эти растения нуждаются в повышенной влажности, что при выращивании в камерах достигается созданием атмосферы «тумана».

Оздоровление посадочного материала начинается с момента стерилизации экспланта в асептических условиях бокса, с обработки ткани антибиотиками. Однако таким образом удается освободиться главным образом от бактерий, грибных инфекций, нематод. Вирусы, виоиды, микоплазмы остаются в тканях инфицированных растений. Именно из-за вирусных болезней погибает от 10 до 50 % урожая сельскохозяйственных культур, размножающихся вегетативно. Некоторые бобовые растения (соя) могут передавать вирусы даже при семенном размножении.

В 1949 г. было выяснено, что клетки меристематических тканей растений обычно не содержат вирусов. В 1952 г. Дж. Морель и Г. Мартин предложили, используя культивирование меристем, получать здоровые, избавленные от вирусной инфекции растения. Они обнаружили, что при выращивании верхушки побега, состоящей из конуса нарастания и 2—3 листовых зачатков, на ней образуются сферические образования — протокормы. Протокормы можно делить, и каждую часть культивировать до образования корней и листовых примордиев, получая в большом количестве генетически однородные безвирусные растения. В настоящий момент культивирование меристем побега — наиболее эффективный способ оздоровления растительного материала от вирусов, виоидов и микоплазм. Однако при этом способе требуется соблюдать определенные правила. Как уже говорилось, чем меньше размер меристематического экспланта, тем труднее вызвать в нем морфогенез.

Чем больше размер экспланта, тем легче идет морфогенез, в результате которого получается целое растение, но тем больше вероятность присутствия вирусов в экспланте. У многих видов и сортов растений зона, свободная от вирусных частиц, различна. Так, при клонировании апикальной меристемы картофеля размером 0,2 мм (конус нарастания с одним листовым зачатком) 70 % полученных растений были свободны от Y-вируса картофеля, но только 10 % — от X-вируса. В некоторых случаях не удается найти оптимальное соотношение между размером меристематического экспланта и морфогенезом в нем, и при этом избавиться от вирусной инфекции. Приходится дополнять метод культуры меристем термо- или(и) хемитерапией. Так, предварительная термотерапия исходных растений позволяет получать свободные от вирусов растения-регенеранты из меристемных эксплантов размером от 0,3 мм до 0,8 мм. Вместе с тем этот прием может вызвать отставание растений в росте, деформацию органов, увеличение латентных (скрытых) инфекций.

Хорошие результаты дает совместное применение метода культуры тканей и хемитерапии. При внесении в питательную среду препарата «Вирозол» (1-рибофуранозил-1,2,4-триазолкарбоксамид) количество безвирусных растений увеличивается до 80—100 %.

В настоящее время для диагностики вирусных растений используют иммуноферментную технику, моноклональные антитела, метод молекулярной гибридизации меченых фрагментов РНК- и ДНК-виридов и вирусов с вирусами тестируемого объекта. Эти методы очень чувствительны, но трудоемки и дорогостоящи.

После оздоровления с помощью вышеперечисленных технологий нормальные растения-регенеранты размножают обычными методами клонального микроразмножения. Для некоторых растений, например цитрусовых, получить морфогенез из меристем малого размера не удастся, поэтому требуется разработка оригинальных методов. Лимоны и апельсины оздоравливают и размножают, используя прививки меристем размером 0,14—0,18 мм на пробирочные подвои, полученные из семян. Достоинство такого подхода состоит и в том, что развивающиеся из меристем побеги не имеют ювенильных признаков, при этом цветение и плодоношение ускоряются.

6.8.4. Криосохранение

Сохранение разнообразия форм жизни — важнейшая проблема, с которой столкнулось современное человечество. Еще Г. Ф. Гаузе доказал, что устойчивость сообщества тем выше, чем больше число составляющих его видов. Следовательно, сохранение биоразнообразия — единственный механизм стабильности жизни на Земле.

Кроме того, для обеспечения питанием растущего населения нашей планеты необходимо выведение новых, более продуктивных сортов сельскохозяйственных растений, а для успешной селекции важен постоянный приток генов из новых источников. Традиционным источником генетического материала служат дикие виды растений. Однако в связи с расширением городов, сельскохозяйственных угодий, вырубкой лесов, ухудшением экологии эти виды постепенно вытесняются, а многие из них находятся на грани вымирания, поэтому их необходимо сохранить.

Существует несколько способов сохранения генофонда высших растений: заповедники, национальные парки, банки семян. В последнее время большое внимание уделяется созданию и развитию новых способов: пересадочных коллекций каллусных клеток, депонированию культур клеток и, наконец, криосохранению, т. е. хранению объектов при очень низкой температуре, обычно это температура жидкого азота (-196°C). Криосохранение имеет существенные преимущества по сравнению с остальными методами. При сохранении в глубоко замороженном состоянии полностью прекращается обмен веществ, отсутствуют значительные физико-химические молекулярные изменения не только в клетке, но и в окружающей водной среде. Сохраняется генофонд, а следовательно, все свойства замороженного объекта. Единственный негативный фактор, которого не удастся избежать, — это фоновая ионизирующая радиация. Однако, по мнению М. Ашвуд-Смита, потребуется примерно 32 000 лет для накопления 10 % летальных хромосомных повреждений. Следовательно, криогенный метод дает возможность неограниченно долго хранить растительный материал без существенных изменений: сохраняются жизнеспособность клеток, их свойства, а также способность к морфогенезу и регенерации целых растений.

Сушность метода криосохранения сводится к замораживанию специально подготовленных растительных клеток при использовании криопротекторов — веществ, ослабляющих повреждения клеток при замораживании и оттаивании. В настоящее время известны два метода криосохранения: программное (медленное) и сверхбыстрое замораживание. Программное замораживание изучалось уже давно, поэтому оно довольно широко применяется для сохранения животных и растительных клеток. Разработка сверхбыстрого замораживания началась сравнительно недавно, однако считается, что именно этот метод со временем станет наиболее перспективным.

Трудности криосохранения растений связаны со спецификой растительных клеток. Клетки растений имеют большие размеры (в культуре тканей они изменяются от 15 до 1000 мкм), прочную целлюлозную стенку и вакуоли. Причем именно степень вакуолизации играет основную роль в устойчивости клеток к действию низких температур. В зрелой клетке центральная вакуоль занимает

до 90 % общего объема клетки, т. е. клетка представляет собой как бы резервуар с водой, которая необходима для ее нормальной жизнедеятельности. Поэтому основные факторы, способные привести клетку к гибели при замораживании, — это образование льда и дегидратация. Обычно кристаллы льда сначала образуются во внешнем растворе вокруг клеток. Максимальная скорость их роста в зависимости от состава раствора находится в пределах температур от -20 до -60 °С. При температуре -140 °С рост кристаллов льда совершенно прекращается. Следовательно, и при замораживании, и при оттаивании клеткам очень важно с оптимальной скоростью «проскочить» температуру образования льда. Кристаллы внеклеточного льда могут механически разрушать клетки. Кроме того, они играют водоотнимающую роль, что приводит к значительной дегидратации клетки и возможной ее гибели от осмотического стресса. При очень быстром замораживании лед может образовываться и внутри клеток, что ведет к разрушению в ней многочисленных мембран.

Избежать кристаллизации льда помогла бы витрификация воды, т. е. затвердение ее в аморфном состоянии. Получить витрификацию чистой воды практически невозможно. Но в коллоидных растворах скорость образования центров кристаллизации и роста кристаллов льда снижается и повышается температура, при которой их рост прекращается. Все это облегчает витрификацию. Добавление криопротекторов также затрудняет кристаллизацию льда и способствует витрификации.

Наиболее известны такие криопротекторы, как диметилсульфоксид (ДМСО), различные сахара, глицерин, этиленгликоль и их производные. Действие криопротекторов состоит в снижении количества свободной воды, повышении вязкости раствора. Все криопротекторы делят на две группы: проникающие и непроникающие. Это разделение достаточно условно. Так, глицерин — первое вещество, определенное как криопротектор, может проникать в клетку, если его добавлять при комнатной температуре, или выступать как непроникающее соединение, если его добавлять при температуре 0 °С. Принято считать, что непроникающие криопротекторы специфически влияют на мембрану, повышая ее проницаемость. Применение сильных, проникающих в клетку криопротекторов ограничено их токсичностью. Поэтому обычно используют смеси криопротекторов, так как в них токсичность одного из веществ снижается за счет присутствия другого.

Жизнеспособность клеток после замораживания зависит не только от предупреждения образования льда, но и от их состояния. Крупные вакуолизованные клетки погибают гораздо чаще, чем мелкие меристематические. Поэтому на этапе подготовки культуры к замораживанию ее культивируют в условиях, способствующих образованию мелких клеток и синхронизации их деления.

Кроме того, концентрирование клеток в культуре, т.е. увеличение ее плотности, способствует повышению выживаемости клеток после замораживания.

Таким образом, криосохранение достаточно надежно обеспечивает сохранение генофонда. Перспективность этого метода подтверждается возобновлением после хранения в жидком азоте суспензионных культур моркови, явора, кукурузы, риса, сахарного тростника; каллусных — тополя, маршанции, сахарного тростника; андрогенных эмбриоидов — беладонны, табака и др. Из восстановленных после замораживания культур моркови и табака удалось регенерировать целые растения. После быстрого замораживания сохранили жизнеспособность меристемы земляники, малины, гвоздики, томатов, картофеля и ряда других растений. Однако для криосохранения требуется сложная работа по подбору условий, обеспечивающих выживание клеток и, следовательно, возможность последующей регенерации из них целых растений. Необходимо учитывать генетические и морфофизиологические особенности клеток, способность к закаливанию, уровень проницаемости клеточных мембран, подбор криопротекторов, скорость снижения температуры при замораживании, условия оттаивания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Круг вопросов, к решению которых привлекают биотехнологические методы и достижения, достаточно широк. Большинство из них прямо или косвенно связано с глобальными проблемами, стоящими перед современной цивилизацией, такими, как загрязнение окружающей среды, угроза экологического кризиса, истощение запасов полезных ископаемых, опасность мирового энергетического кризиса, нехватка продовольствия, борьба с болезнями.

Благодаря достижениям фундаментальных исследований в молекулярной биологии, биохимии, генетической инженерии и новейшим технологиям в биоиндустрии получают новые продукты заданного состава и качества, очищенные от экотоксикантов и обладающие не только питательной ценностью, но и профилактическими свойствами. Таким путем получена серия продуктов на основе сои, созданы бесхолестериновые и малохолестериновые спрэды («намазки») типа хальварина и «легкого» сливочного масла, а также безжирового мороженого.

Переработка растительной и микробной биомассы позволяет получать высококачественные белки, масла, пектиновые вещества, пищевые волокна, а также белок, сбалансированный по аминокислотному составу, и компоненты нуклеиновых кислот, необходимые для медицинской, пищевой, косметической и других отраслей промышленности.

Возникла новая научная дисциплина — *экологическая биотехнология*, осуществляющая новейший подход к охране и сохранению окружающей среды. Разработаны технологии рекультивации почвы, биологической очистки воды и воздуха и биосинтеза препаратов, компенсирующих вредное влияние измененной окружающей среды на людей и животных. Одна из важнейших задач биотехнологии — ограничение масштабов загрязнения нашей планеты промышленными, сельскохозяйственными и бытовыми отходами, токсичными компонентами автомобильных выхлопов. Современные научные исследования нацелены на создание безотходных технологий, на получение легкоразрушаемых полимеров, в том числе биогенного происхождения, а также на поиск новых активных микроорганизмов — разрушителей полимеров (полиэтилена, полипропилена, полихлорвинила). Усилия биотехнологии направлены на борьбу с пестицидными загрязнениями — следствием неумеренного и нерационального применения ядохимикатов. Ведутся разработки технологий по утилизации вредных выб-

росов (химикалии, нефть), загрязняющих воду и почву, и сельскохозяйственных отходов типа молочной сыворотки для получения пищевых и кормовых белковых продуктов, в том числе специальных препаратов, обогащенных, например, селеном дрожжей.

Повышение цен на традиционные источники энергии (природный газ, нефть, уголь) и угроза их исчерпания побудили ученых обратиться к альтернативным путям получения энергии. Роль биотехнологии в создании экономичных возобновляемых энергетических источников (спиртов, биогенных углеводов, водорода) чрезвычайно велика. Эти экологически чистые виды топлива можно получать путем биоконверсии отходов промышленного и сельскохозяйственного производства. Перспективно продолжение исследований по усовершенствованию и внедрению процессов производства метана, этанола, созданию на основе микроорганизмов (и ферментов) элементов, эффективно производящих электричество, а также по организации искусственного фотосинтеза, в частности биофотоллиза воды, при котором можно получать богатые энергией водород и кислород.

Развитие сельскохозяйственной биотехнологии на современном этапе направлено на решение таких глобальных проблем, как повышение плодородия почв, урожайности и качества сельскохозяйственной продукции; рекультивация сельскохозяйственных угодий; улучшение экологической обстановки, способствующей восстановлению биоценоза почв; повышение качества кормов и др. В области медицины весьма перспективной является разработка новых технологий использования молекулярных антител в области диагностики и лечения заболеваний, направленного транспорта лекарственных средств, трансплантологии органов, тканей, клеток, формирования нового класса медицинской техники — индивидуальных биотехнологических систем для контроля состояния организма.

Особый интерес представляют принципиально новые направления, развитие которых предполагается осуществить в XXI в: электрохемитерапия, молекулярное моделирование, отдельные области клеточной инженерии (клеточная инкапсуляция, энергетические межклеточные взаимодействия).

ЛИТЕРАТУРА

Основная

- Биология культивируемых клеток и биотехнология растений / Под ред. Р. Г. Бутенко. — М., 1991.
- Биотехнология / Под ред. А. А. Баева. — М., 1988.
- Биотехнология растений: культура клеток / Под ред. Р. Г. Бутенко. — М., 1989.
- Бейли Дж. Э., Оллис Д. Ф.* Основы биохимической инженерии. — М., 1989. — Ч. II.
- Бутенко Р. Г.* Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. — М., 1999.
- Бутенко Р. Г.* и др. Клеточная инженерия. — М., 1987.
- Елинов Н. П.* Основы биотехнологии. — СПб., 1995.
- Мишустин Е. Н.* Биотехнология. — М., 1989.
- Муромцев Г. С.* и др. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. — М., 1990.
- Промышленная микробиология и успехи генетической инженерии. — М., 1984.
- Рыбальский Н. Г., Скуратовская О. Д.* Белковая инженерия. — М., 1990.
- Сассон А.* Биотехнология: свершения и надежды. — М., 1987.
- Сельскохозяйственная биотехнология / Под ред. В. С. Шевелухи. — М., 1998.
- Сидоров В. А.* Биотехнология растений. — Киев, 1990.
- Фогарти М.* и др. Микробные ферменты и биотехнология. — М., 1986.
- Шабарова З. А., Богданов А. А., Золотухин А. С.* Химические основы генетической инженерии. — М., 1994.

Дополнительная

- Безбородов А. М.* Основы биотехнологии микробных синтезов. — Ростов, 1989.
- Березин И. В., Клесов А. А.* Инженерная энзимология. — М., 1987.
- Биосенсоры // Итоги науки и техники. Сер. «Биотехнология». — М.: ВИНТИ, 1990. — Т. 26.
- Биотехнология, охрана среды. — М., 1990.
- Биотехнология: Принципы и применение. — М., 1988.
- Буков В. А.* Производство белковых веществ. — М., 1987.
- Волиханова Г., Рахимбаев И.* Культура клеток и биотехнология растений. — Алма-Ата, 1989.
- Катаева Н. В., Бутенко Р. Г.* Клональное микроразмножение растений. — М., 1983.
- Кефели В. И., Дмитриева Г. А.* Биотехнология. — Пушкино, 1989.

Кучек Н. В. Генетическая инженерия высших растений. — Киев, 1997.
Новые направления биотехнологии: Материалы международной VIII конференции. — М., 1998.

Скрябин Г., Головлева Л. Биотехнология защиты окружающей среды от ксенобиотиков // Изв. АН СССР. Сер. «Биология». — М., 1986. — № 6. — С. 805—813.

Спирин А. С. Биосинтез белка и перспективы бесклеточной биотехнологии // Вестник АН СССР. — М., 1989. — № 11. — С. 30—38.

Терешин И. М. Молекулярно-биологические основы биотехнологии. — Л., 1981.

Ферментные электроды // Итоги науки и техники. Сер. «Биотехнология». — М.: ВИНТИ, 1988. — Т. 18.

Экологическая биотехнология. — Л., 1990.