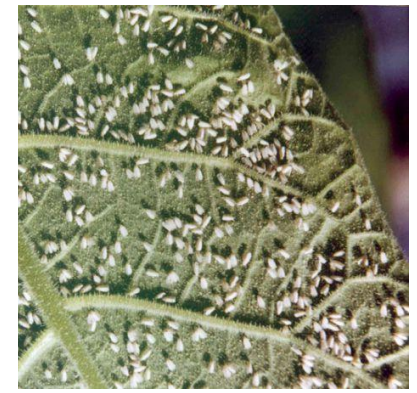


Генно-Модифицированные Организмы. Растения.

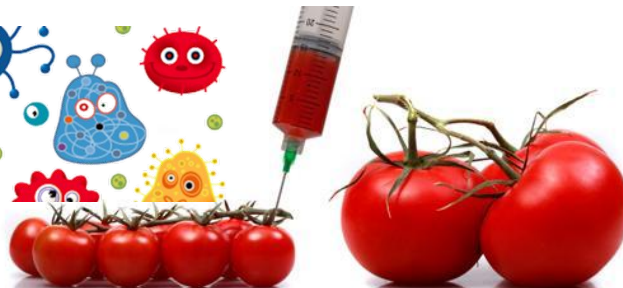
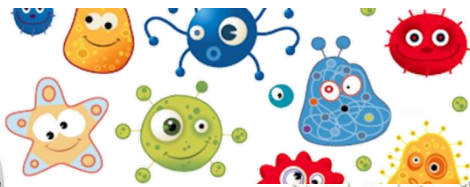
подготовила
Дейч Ксения Олеговна

Проблемы современного сельского хозяйства:

1. Сорняки;
2. Вредители и болезни;
3. Заморозки;
4. Низкая плодородность почв;
5. Увеличение продуктивности;
6. Сохранение урожая на длительный срок и пр.
 - **Метод традиционной селекции – слишком долго ждать!**
 - Один из способов решения проблем – генетическое программирование растений к неблагоприятным условиям и повышению урожайности с помощью ГМО.

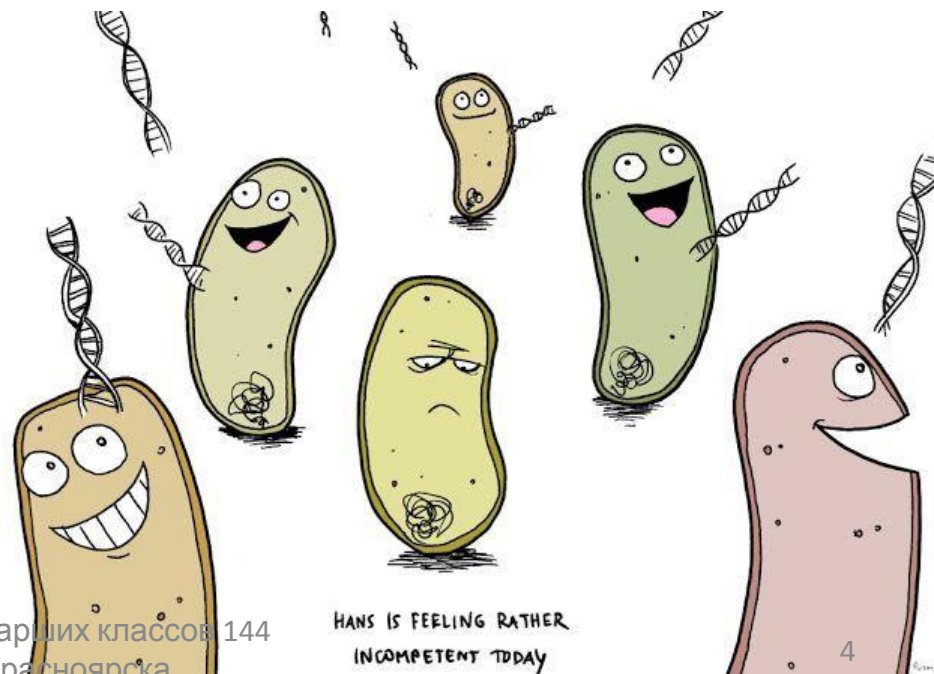


- Для начала необходимо выявить проблемы и детально изучить характеристики того организма (томат) который мы хотим улучшить.
- Затем найти и изучить необходимое полезное свойство у другого организма (микроб).
- Далее попытаться «научить томат делать как микроб» 😊



Для учащихся старших классов 144
школы г. Красноярск

В природе существует процесс, подобный генетической модификации – горизонтальный перенос генов – в ходе которого генетический материал передаётся от одного организма другому, не являющегося его потомком.

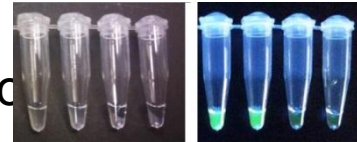


Вставка

Чужеродный ген, вносимый в клетку – **вставка**.

Получить её можно несколькими способами:

1. выделить его из того генома, к которому он принадлежит. [Получение гена с помощью ПЦР возможно, только если мы знаем его нуклеотидную последовательность или хотя бы последовательность его начала и окончания (для того, чтобы можно было синтезировать праймеры). Если же всё это нам неизвестно, то придется **сначала анализировать весь геном**].
2. вполне возможно, что нужный нам ген уже был выделен из генома и присутствует в библиотеке генов как в форме подробного описания так и в форме молекул в пробирке.



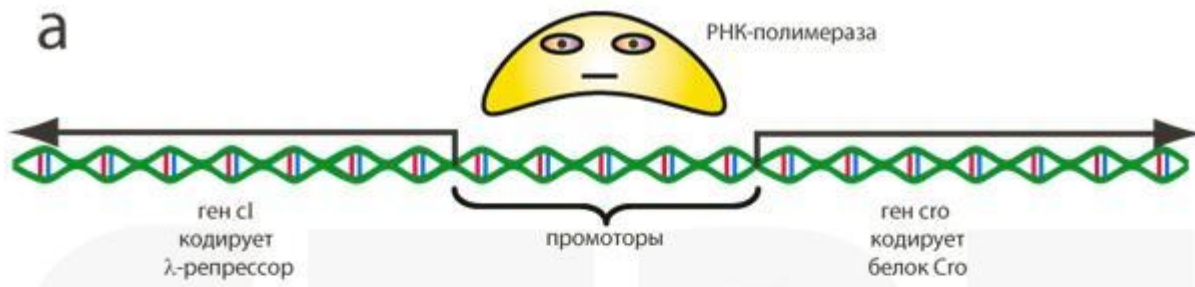
- Полученный тем или иным способом ген содержит информацию о структуре белка, но сам не может ее реализовать. Поэтому нужны **дополнительные механизмы** для управления действием гена — **структурные элементы**: промоторы, расположенные перед началом гена, и узнаваемые ферментом РНК-полимеразой как стартовая площадка для начала транскрипции, а также терминаторы и энхансеры.
- Терминатор** — это последовательность нуклеотидов, ответственная за прекращение транскрипции. **Энхансеры** — последовательности ДНК, усиливающие транскрипцию при взаимодействии со специфическими белками. Они могут находиться в любой части генома, а их взаимодействие с работающим геном происходит за счет четвертичной структуры ДНК.



Промотор + целевой ген (трансген) + терминатор

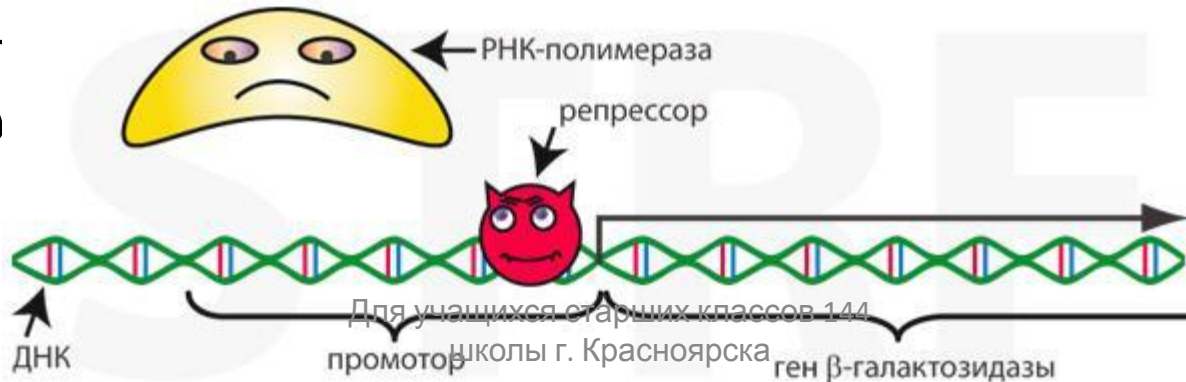
- Существует общая закономерность: **прокариотические промоторы** могут обеспечить активность любого гена, в том числе и эукариотического, **только в прокариотическом организме**. В **эукариотическом** организме может функционировать только ген, имеющий **эукариотический промотор**.
- Поэтому при переносе генов от одного вида растений (животных) к другому можно использовать **гены с их собственными промоторами**.
- Но, если в растительную (животную) клетку переносится бактериальный ген, то его прокариотический промотор должен быть заменен на соответствующий эукариотический.
- Для растений часто используют промоторы от растительных вирусов, которые эволюционно приспособлены к функционированию в растительной клетке.





- Перед каждым рабочим геном находится короткий участок ДНК под названием **промотор**. Именно сюда прикрепляется фермент РНК полимераза, который синтезирует РНК на матрице ДНК, что является первым и **абсолютно необходимым этапом в экспрессии гена**.
- Если у гена нет промотора, или рядом есть репрессор и его экспрессию запустить невозможно, он **так и остается молчащим**, и хотя и присутствует в клетке, но никак себя не проявляет.
- Промоторы **различаются по своей силе**. Некоторые вызывают бурную транскрипцию подконтрольного гена, другие — совсем вялую.

- **Т-ДНК** вс-
интегриру



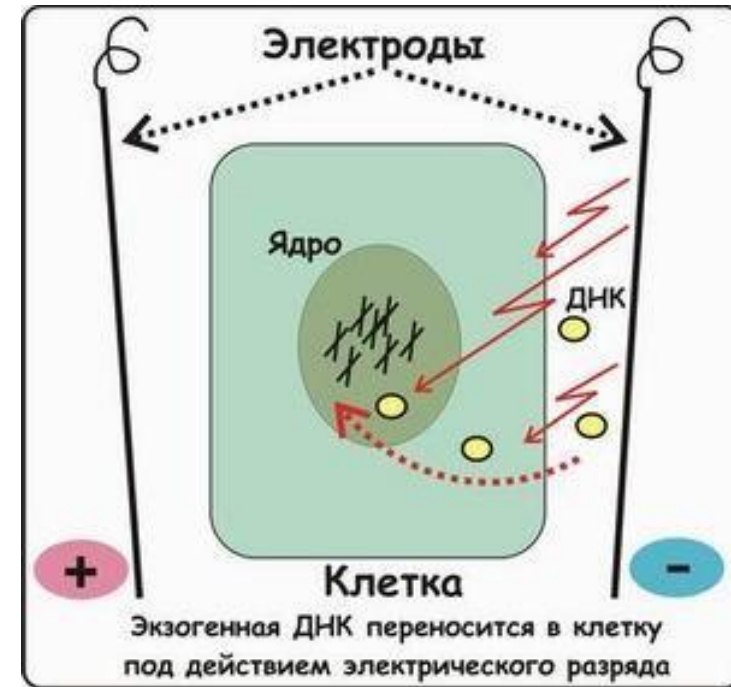
когда не

- Главное, что после получения трансформированной клетки из неё можно получить полноценный организм. При этом подходы к формированию организма зависят от того, **какая клетка** — бактериальная, растительная или животная — **служила мишенью** для трансформации.
- В случае бактериальной клетки либо клетки другого одноклеточного организма (например, дрожжей), получение трансгенного организма ограничивается непосредственным переносом гена в клетку-мишень. **Клетка одноклеточных сама по себе — самостоятельный полноценный организм.** Деление такой клетки приводит к появлению идентичных организмов с теми же свойствами, что были приобретены исходной трансгенной - материнской клеткой.
- Для получения трансгенного животного в качестве клетки-мишени используют половую клетку — **яйцеклетку**. После трансформации в ходе естественных процессов развития яйцеклетка превращается в полноценный автономный организм. Передача новых признаков в поколениях невозможна, если процесс трансформации не затронул половые клетки.
- Растения имеют важное преимущество перед животными, а именно — возможна их регенерация *in vitro* из недифференцированных соматических тканей с получением нормальных, фертильных растений. Это свойство (тотипотентность) дает возможность получать генетически модифицированные (трансгенные) растения и изучать функционирование введенных в растения генов.

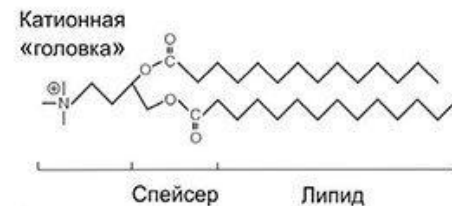
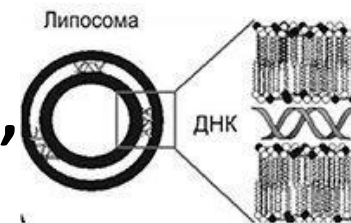
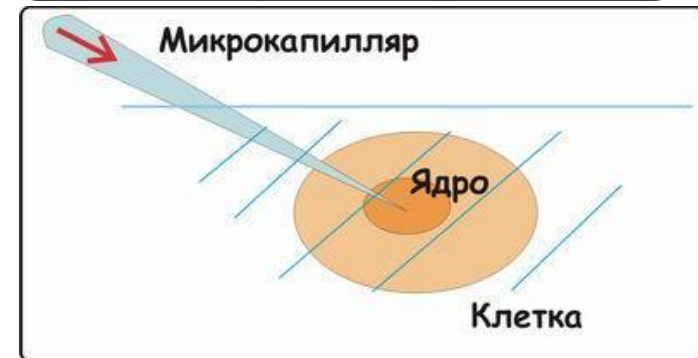
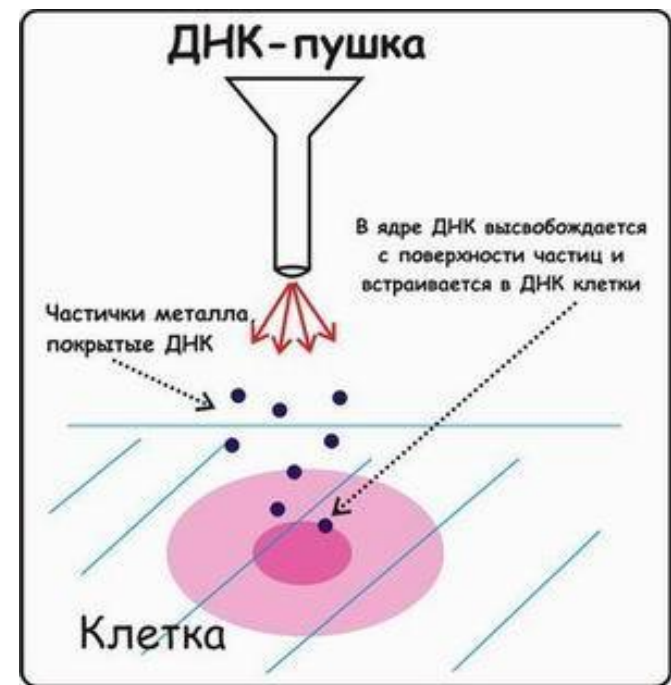
Методы переноса ДНК в клетку:

А) физико-химические

- 1) **Электропорация** - клеточные мембраны, становиться проницаемой для экзогенных молекул ДНК под действием импульсов высокого напряжения, за счет формирования временных пор, через которые способны проходить экзогенные молекулы.

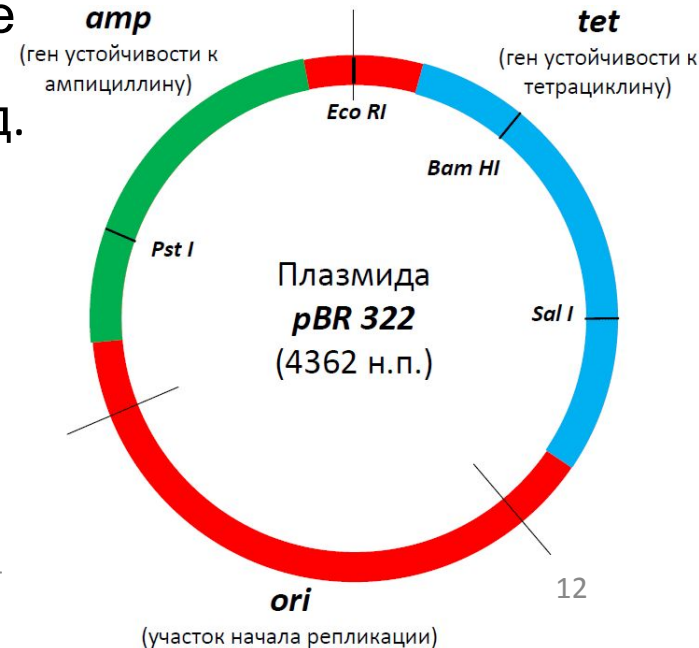
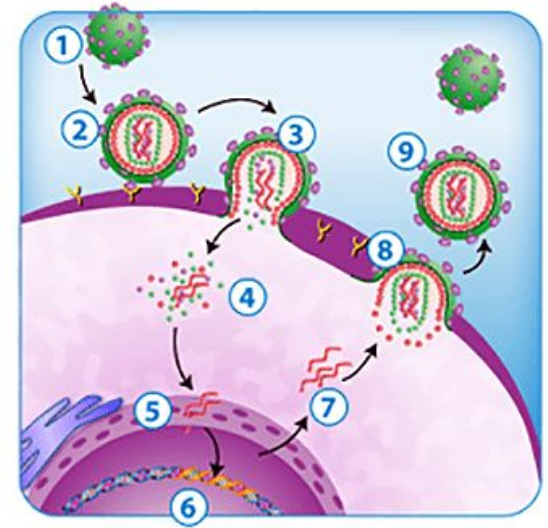


- 2) **Бомбардировка** - на нее частицы вольфрама, платины или золота, диаметром от 0,1 до 3,5 мкм, напыляется векторная ДНК, содержащая трансген. «Заряды» из пушки, пробивая мембраны, входят в цитоплазму и ядра клеток.
 - 3) **Микроинъекции** - генетическую конструкцию инъецируют в клетку.
 - И другие методы:
- воздействие полиэтиленгликоля (ПЭГ), ионов Ca^{2+} , при помощи слияния липосом и высокие значения pH**



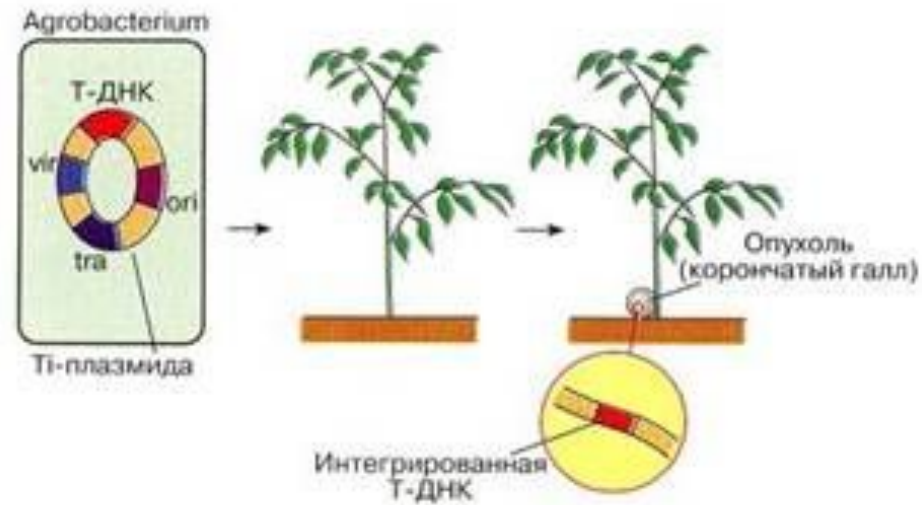
Биологические: Плазмиды и Вирусы

- **Плазмиды** — это кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, способные размножаться в клетке независимо от цикла размножения клетки. «Дикие» плазмиды очень широко распространены **в природных бактериальных популяциях** и способны передаваться от одной бактериальной клетки к другой в процессе «конъюгации» — аналога полового размножения.
- Многие плазмиды содержат гены, которые придают содержащим их бактериям полезные фенотипические признаки: устойчивость к антибиотикам, солям тяжелых металлов и т. д. Наличие в плаزمиде таких генов делает их присутствие в бактериальных клетках выгодным и способствует их размножению.
- Если основная бактериальная ДНК имеет длину более 100 тысяч пар оснований, то **размеры плазмид** составляют всего **несколько тысяч пар оснований**. Они легко выделяются и очищаются.

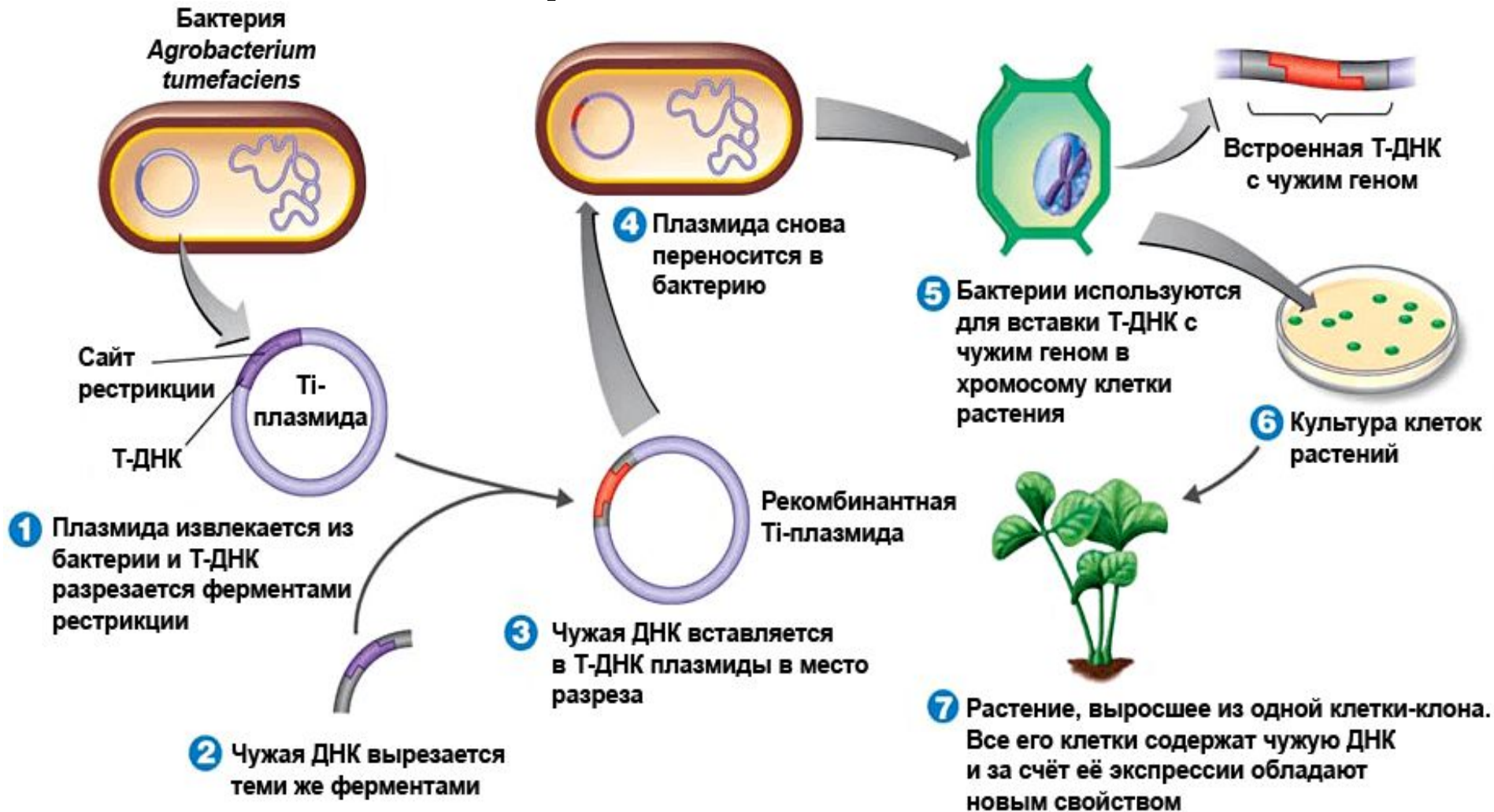


Векторы для переноса кассеты экспрессии

- Удобный способ доставки чужих генов был подсказан самой природой — трансформация растений с помощью почвенных фитопатогенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes*. Как и у большинства других бактерий, часть их генома находится не в основной хромосоме, а в плазмидах.
- Ti-плазмиды** (tumor-inducing, опухолеобразующие в наземной части растения), найденные в *Agrobacterium tumefaciens* или
- Ri-плазмиды** (root-inducing, образующие опухоли в корнях) в *Agrobacterium rhizogenes*, оказались лучшим инструментом для генной инженерии.

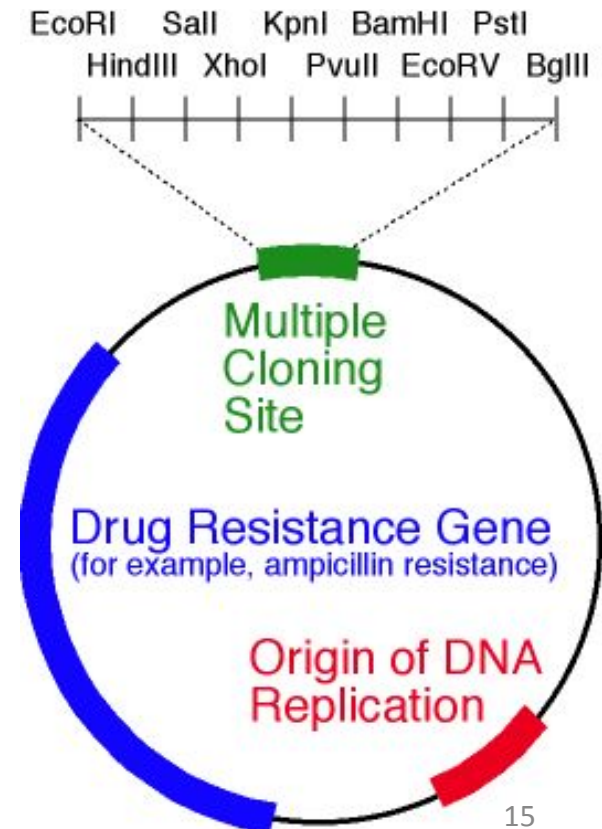
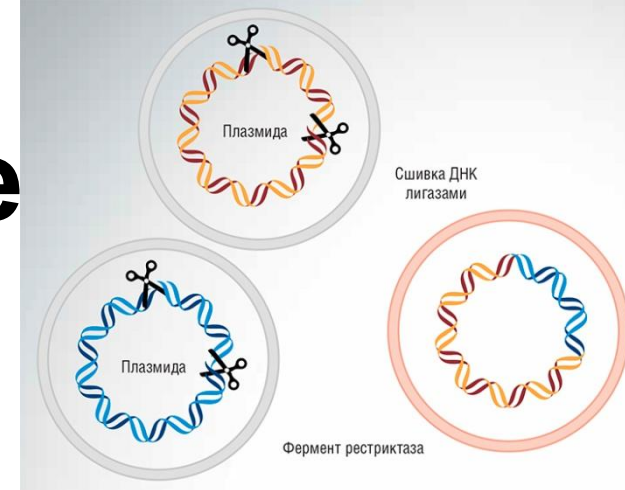


Общая схема получения трансгена



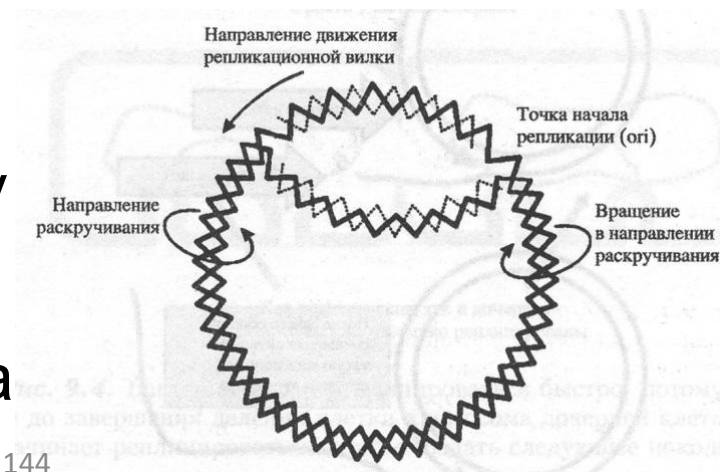
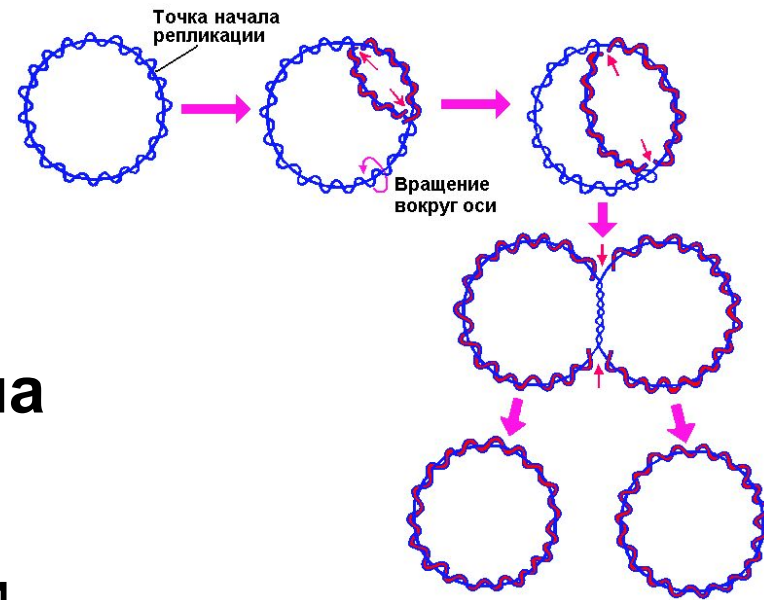
Разрезание

- В ДНК плазмиды должны быть участки, в которых ее можно будет разрезать, чтобы вшить туда вставку. В качестве «ножниц» используются особые ферменты под названием **рестриктазы**.
- Рестриктазы режут ДНК в строго определенных местах, которые называются **сайтами рестрикции** (каждая рестриктаза распознает только свой сайт и только в нём — или возле него — разрезает ДНК).
- Обычно в плазмиду ставят множество разных сайтов рестрикции, расположенных в разных точках, — благодаря этому ее можно будет разрезать в нужном месте нужной рестриктазой.
- Участок ДНК, на котором собрано несколько сайтов рестрикции, называется **полилинкером**.



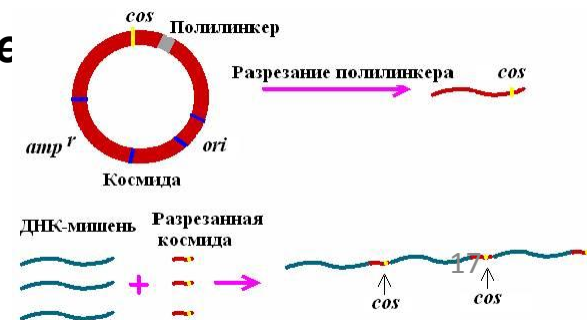
Размножение

- Плазмида обязана в клетке размножаться, реплицироваться, иначе она быстро подвергнется деградации, а вместе с ней исчезнет и ген-вставка. Для этого в ней должна быть специальная последовательность - **точка начала репликации (ori)**, с которой и начинается удвоение ДНК.
- У разных видов живых существ эти точки имеют разную последовательность.
- Если нужно создать плазмиду, которая бы реплицировалась сразу в двух видах клеток (например, и в дрожжевых, и в бактериальных), то нужно вставить две точки начала репликации.

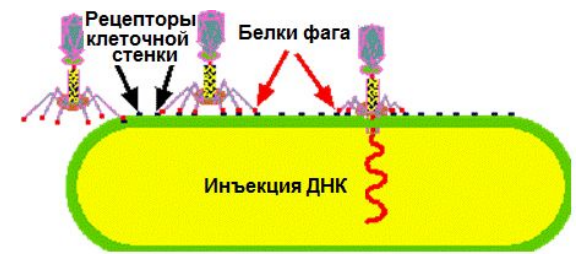


Другие векторы

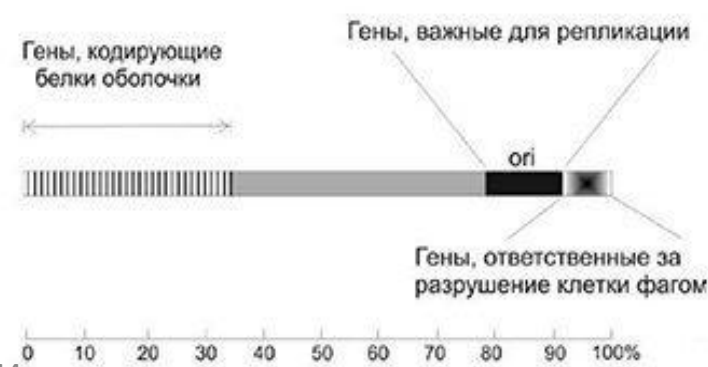
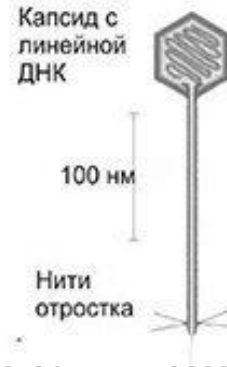
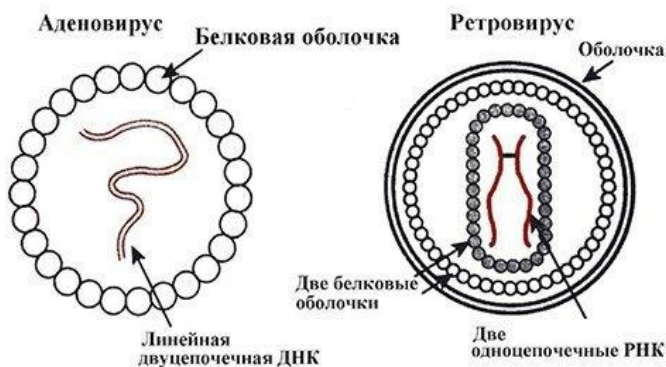
- Если ген-вставка слишком велик, то **плазмида** утрачивает стабильность, потому что ее участки начинают «перетасовываться» друг с другом и теряться при репликации, из-за чего она постепенно укорачивается. Поэтому в качестве вектора для длинных вставок используются более устойчивые конструкции. Например:
- **Космида** — гибрид плазмиды и фага (вируса, который заражает бактерии). По сути дела, это просто плазмида, в которую добавлены сайты для связывания с белками оболочки фага (они называются *cos*-сайтами, и именно благодаря им космиды получили свое название). **Белковая оболочка** делает космиду стабильнее, благодаря чему в нее можно загружать более длинные вставки.
- **Искусственные хромосомы** (см. Human artificial chromosome, Bacterial artificial chromosome, Yeast artificial chromosome) — это сложные и крупные конструкции, являющиеся, по сути, **микрохромосомами**. Они относительно стабильные и при этом обладают гигантской емкостью, в них можно вставлять сразу несколько генов. Однако из-за огромных размеров их гораздо труднее поместить в клетку.
- И, наконец, есть еще один вид векторов — **вирусные**



Вирусные векторы

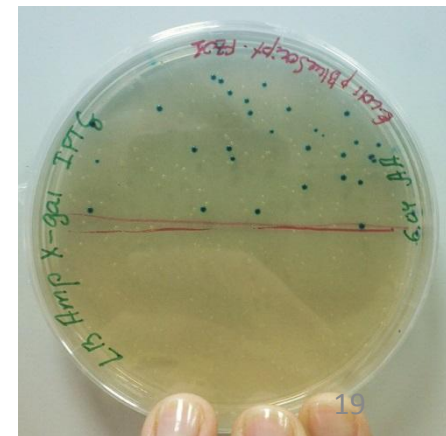
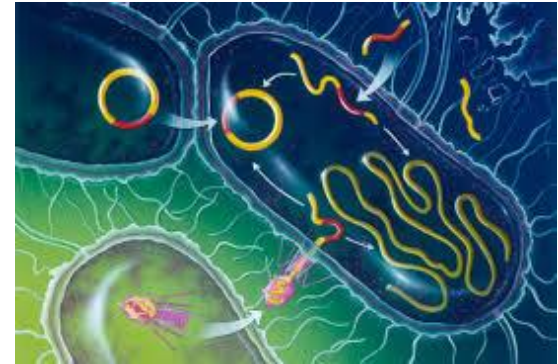


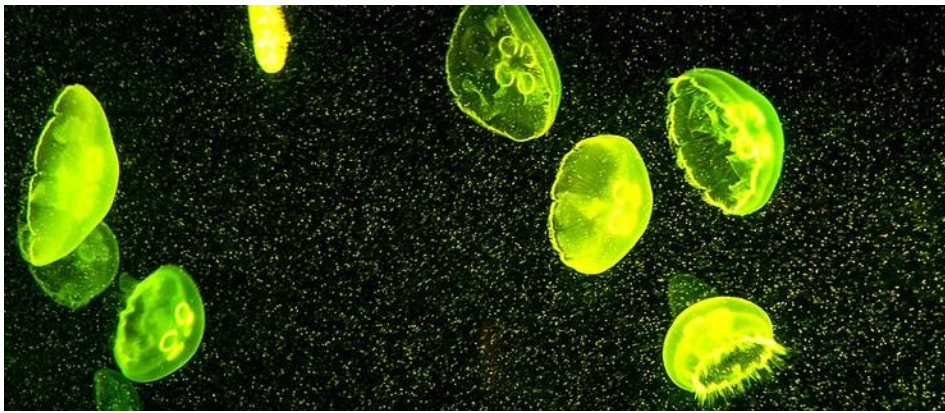
- **Ретровирусы** - РНК-содержащие вирусы, которые, оказавшись в клетке, синтезируют ДНК на основе своей РНК с помощью ревертазы (собственно, поэтому они и называются «ретро», ведь синтез ДНК на основе РНК — это, в каком-то смысле, шаг назад). Встраиваются в самые непредсказуемые участки генома, каждый раз разные, и это приводит к самым непредсказуемым последствиям. Могут заражать только делящиеся клетки.
- **Лентивирусы** - это род ретровирусов, которые умеют заражать не только делящиеся, но и неделящиеся клетки. Довольно емкие, то есть они способны вместить в себя крупные вставки. «Ленти» по латыни значит «медленный». Это слово очень точно отражает характер лентивирусов — они вызывают заболевания с необычайно длинным инкубационным периодом. Вирус СПИДа — это тоже, кстати, лентивирус.
- **Аденовирусы** - способны заражать не только делящиеся, но и неделящиеся клетки; ассортимент клеточных типов, которые они заражают, довольно широк. Но они не встраиваются в хозяйский геном. Кроме того, аденовирусы часто вызывают сильный иммунный ответ.
- **Аденоассоциированный вирус AVV** - встраивается в хозяйский геном, причем почти всегда не в первое попавшееся, а в строго определенное место. К тому же, он способен заражать и делящиеся, и неделящиеся клетки. И главный его недостаток — малая емкость. Он может



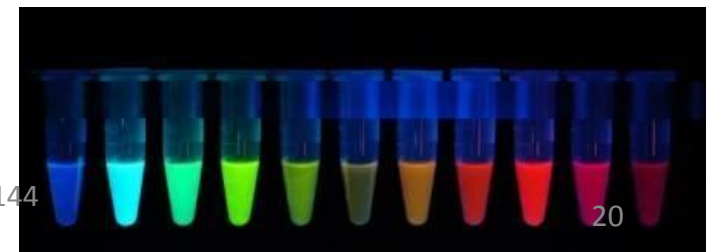
Селекция

- Процесс, при котором бактерия глотает плазмиду - **трансформация**. В естественных условиях в каждый момент времени трансформироваться может не вся популяция бактерий, а только ее часть; клетки, которые к этому способны, называются **компетентными**.
- Допустим, мы встроили в нашу плазмиду ген устойчивости к какому-нибудь антибиотику (такой ген называется **селективным маркером**).
- Можно, поместить сайт рестрикции внутрь какого-нибудь «заметного» гена (в присутствии которого бактериальные культуры меняют цвет). В результате можно будет отличить нужные колонии от ненужных просто на глаз, безо всяких манипуляций. По такому принципу работает, например, система бело-голубой селекции.

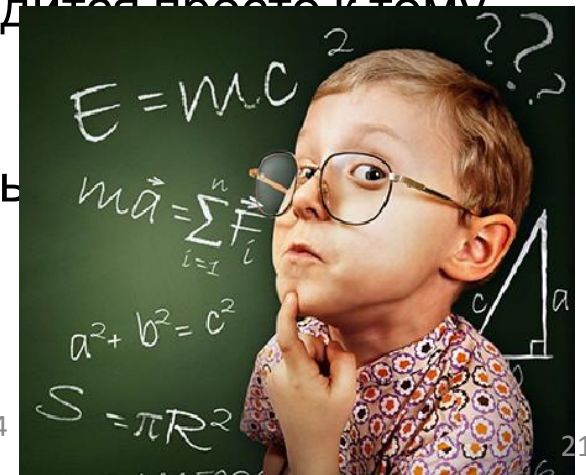




- Также применяются гены-«репортеры» — индикаторные гены, например, ген зеленого флуоресцирующего белка медузы, *gfp* (green fluorescent protein), светящийся в ткани растения ярко-зелёным светом.



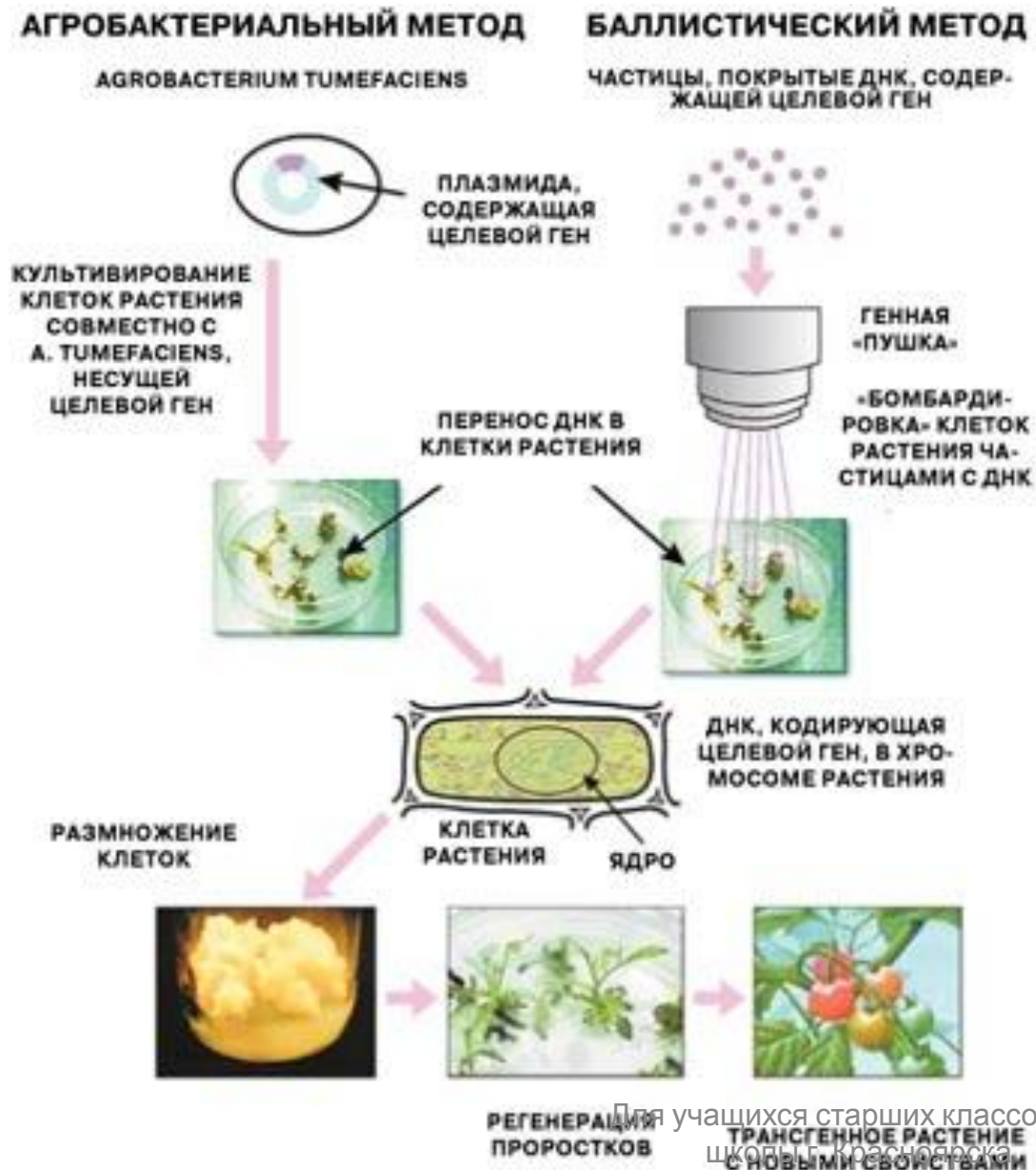
- За те несколько десятилетий, что существует методика молекулярного клонирования, были синтезированы тысячи разнообразных плазмид, из которых созданы гигантские базы данных (например, Addgene). В этих базах есть **плазмиды на все случаи жизни**. Есть те, в которые можно вшить не одну вставку, а несколько, и есть даже такие, которые уже несут в себе некоторые особенно популярные вставки. Поэтому, как правило, исследователи не синтезируют плазмиду для клонирования самостоятельно, а покупают уже готовую.
- При необходимости купленную плазмиду можно «довести до ума», вставив или убрав определенные участки (а потом эту модифицированную плазмиду тоже добавить в базу данных). Иными словами, часто задача ученого сводится просто к тому, чтобы подобрать подходящую плазмиду.
- Услуги по приготовлению нужной плазмиды <http://www.genecust.com/ru/produits.php>
- <http://petrogen.ru/plasmids/> и пр.



НАСЛЕДОВАНИЕ ТРАНСГЕНОВ

- Чужеродные ДНК, перенесенные в растительные клетки с помощью различных методов, обычно встраиваются в ядерный геном и, как правило, наследуются в соответствии с законами Менделя.
- В случае проведения перекрестного опыления с нетрансформированным растением наследование трансгена должно быть в соотношении 1:1. В некоторых случаях наследуемый ген может распределяться в потомстве самоопыленных растений с другой частотой, например, 15:1 (в случае 2-х вставок).

Схематическое изображение получения ГМО



- После получения таких растений в лабораторных условиях проводится апробация выращивания в открытом грунте, получение семян с закреплёнными признаками и жесточайшая экспертиза биобезопасности.

- Надо понимать, что с помощью генетической инженерии **не создают совершенно новые растения**, а только «улучшают» уже адаптированные к определенным условиям внешней среды и к технологиям возделывания сорта и гибриды.
- **Не должны меняться** ни морфология созданного ГМ организма, ни его внутренние свойства, ни химический состав продуктов, которые образуются растением.



Определение ГМО

- Именно на **генетической идентификации (методом ПЦР) определённых вставок** и основано определение всех ГМО в продуктах питания и в кормах для животных.
- Общий скрининг ГМО растительного происхождения проводят по наличию специфичных регуляторных последовательностей (например, промотор *CaMV 35S*, промотор *FMV 35S* и терминатор *NOS*) или гены (*pat*, *cp4*, *epsps*, *bar*, *cry3A*).
- Линии сои *BPS-CV127-9* и *MON-87701*, например, не содержат регуляторные последовательности *CaMV 35S*, *FMV 35S* и *NOS*, а также гены *pat*, *bar*, *cp4* *epsps*. Обнаружить эти линии можно с помощью тест-систем с BPS-CV и MON регулируемыми последовательностями.
- Пример компаний которые выпускают и продают тест-системы:
 1. <http://www.syntol.ru/catalog/nabory-reagentov-dlya-ptsr-v-realnom-vremeni/analiz-gmo-metodom-ptsr-v-realnom-vremeni.html>
 2. <http://www.interlabservice.ru/catalog/reagents/?sid=2283>
 3. <http://fsvfn.ru/fsvps-docs/ru/events/2008/14/files/1/9.pdf>
 4. <http://dna-technology.ru/dnaproducts/reagents/no-med/>



Некоторые специфичные гены – мишени для определения ГМО

- Ген ***bar*** – устойчивость трансгенных растений к гербициду биолафосу
- Ген ***pat*** – устойчивость трансгенных растений к гербициду фосфинотрицину
- Конструкция ***СТР2-CP4EPSPS*** - устойчивость трансгенных растений к гербициду Roundup Ready
- Ген ***cryIA(b)*** - ген кристаллического белка- устойчивость к инсектицидам
- Ген ***ampR*** - ген резистентности к ампициллину
- Ген ***p35S*** - промотор вируса мозаики цветной капусты
- Ген ***NOS*** – терминатор плазмиды *Agrobacterium tumifaciens*.
- Их количество растёт с каждым годом, и все они добавляются к тест-системам.

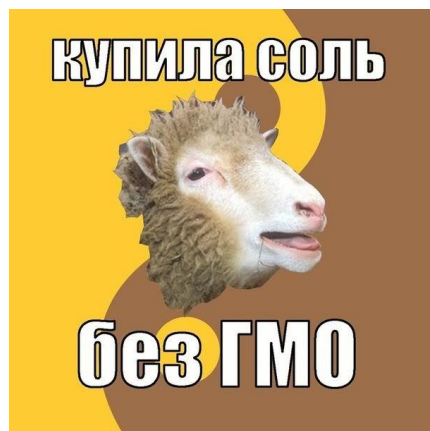
ПОЛУЧЕННЫЕ К НАСТОЯЩЕМУ ВРЕМЕНИ ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ

- в США поступило в продажу соевое масло с низким содержанием линоленовой кислоты;
- в Австралии создан сорт кресс-салата, обогащенный полиненасыщенными омега-3 жирными кислотами, которые снижают риск сердечно-сосудистых заболеваний;
- выведены ГМ-сорта томатов с вакциной против атипичной пневмонии;
- картофеля, снижающего риск заражения гепатитом В,
- а также риса с вакциной от аллергических реакций типа сенной лихорадки;
- в Японии создан ГМ-сорт сои, обогащенной новокинином (в природе содержится преимущественно в яичном белке), который улучшает рост волос и замедляет их выпадение при химиотерапии за счет синтеза новых кровеносных сосудов и улучшения микроциркуляции в коже головы.
- модифицированные тополя в лабораторных условиях поглощают до 91% трихлорэтилена — наиболее частого загрязнителя грунтовых вод в США (пока эксперимент)
- Так, в Европе примерно 4% взрослых и 8% детей страдают аллергией на различные продукты питания, и каждый седьмой из них — аллергией на томаты. Поэтому не удивительно, что результатом одной из первых работ по созданию не вызывающих аллергии биотехнологических культур стали разработанные немецкими учеными гипоаллергенные помидоры, которые содержат на 90% меньше аллергенного вещества (белок профилин) чем плоды традиционных сортов.

- Прежде чем новый трансгенный сорт будет зарегистрирован, он должен пройти испытания на биологическую и пищевую безопасность. Это закреплено в законодательстве России.
- Все необходимые мероприятия достаточно длительные и очень затратные для компаний-разработчиков. На сегодняшний день зарегистрировано **23 сорта растений (по состоянию на 03.2016 г.)**, продукты получаемые из которых могут употребляться в пищу на территории нашей страны.
- Пока что законодательно трансгенные растения не разрешается выращивать на полях Российской Федерации (на 2005 год), поскольку ни один, даже из зарегистрированных сортов, не прошел необходимой для этого экологической экспертизы. Исключение составляют экспериментальные поля, на которых в ходе испытаний на пищевую безопасность проверяется способность растений давать потомство, нормально развиваться, поддерживать новый признак и т.д. К таким полям предъявляются повышенные карантинные требования, не допускающие «расползания» семян растений на другие территории.

Литература

1. <http://lectoriy.mipt.ru/course/Biology-Molecular-14L#lectures>
2. <http://lectoriy.mipt.ru/course/Biology-Genetics-13L#lectures>
3. <http://lectoriy.mipt.ru/course/Biology-PersonalMedicine-14L>
4. Ралдугина, Г.Н. Трансгенные организмы: как и для чего их получают // Биология для школьников. – 2011. - № 1. – С. 2-23 <http://www.den-za-dnem.ru/page.php?article=796>
5. http://elementy.ru/nauchno-populyarnaya_biblioteka/431719/Molekulyarnoe_klonirovanie_ili_Kak_pomestit_v_kletku_chuzherodnyy_geneticheskiy_material
6. <http://fsvfn.ru/fsvps-docs/ru/events/2008/14/files/1/9.pdf>
7. <http://poznayka.org/s34188t1.html>
8. И пр.



Для учащихся старших классов 144
школы г. Красноярск