

# ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

ТРАНСГЕНЕЗ. РАСТЕНИЯ

Лекция 6



# Словарь



**Экспрессия гена** – появление в клетках организма-реципиента биологически активного генного продукта

**Кассета экспрессии** – фрагмент ДНК, содержащий все необходимые элементы (промотор, терминатор) для экспрессии внедренного в него гена

# Причины внедрения в практику генетической инженерии растений



1

- **Необходимость увеличить продукцию растениеводства**

2

- **Исчерпанность генетического потенциала растений для классической селекции**

3

- **Необходимость быстрого получения новых сортов высокопродуктивных устойчивых растений**



*ТРАНСГЕНЕЗ РАСТЕНИЯ. Лекция 6*

# **ТЕХНИКА ТРАНСГЕНЕЗА**

# Этапы получения трансгенных растений (до принятия решения об интродукции)



- Создание и амплификация гДНК  
- Выбор и подготовка клеток-реципиентов  
для трансформации

- Встраивание трансгена в геном клетки-  
реципиента  
- Отбор трансформированных клеток

- Стимуляция регенерации побегов или  
эмбриогенеза из трансформированных  
клеток (in vitro)

- Адаптация пробирочных трансгенных  
растений к условиям теплицы

- Полевые испытания на биобезопасность



*ТРАНСГЕНЕЗ РАСТЕНИЯ. Лекция 6*

# **ЭТАП 1. ПОЛУЧЕНИЕ И АМПЛИФИКАЦИЯ РДНК (КАССЕТА ЭКСПРЕССИИ+ВЕКТОР)**

# Кассета экспрессии



**Промотор + целевой ген (трансген) + терминатор**

# Промоторы для кассеты экспрессии. Классификация



## КОНСТИТУТИВНЫЕ

Обеспечивают экспрессию на протяжении всего срока жизни трансгенного организма

## СПЕЦИФИЧНЫЕ

Обеспечивают избирательную активность, например, экспрессию только в клубнях

## ИНДУЦИБЕЛЬНЫЕ

Активируются под воздействием определенных факторов (хим. в-в, температуры и др.)

# Векторы для переноса и интеграции кассеты экспрессии. Основа



**Ti-ПЛАЗМИДЫ**

**Ri-ПЛАЗМИДЫ**

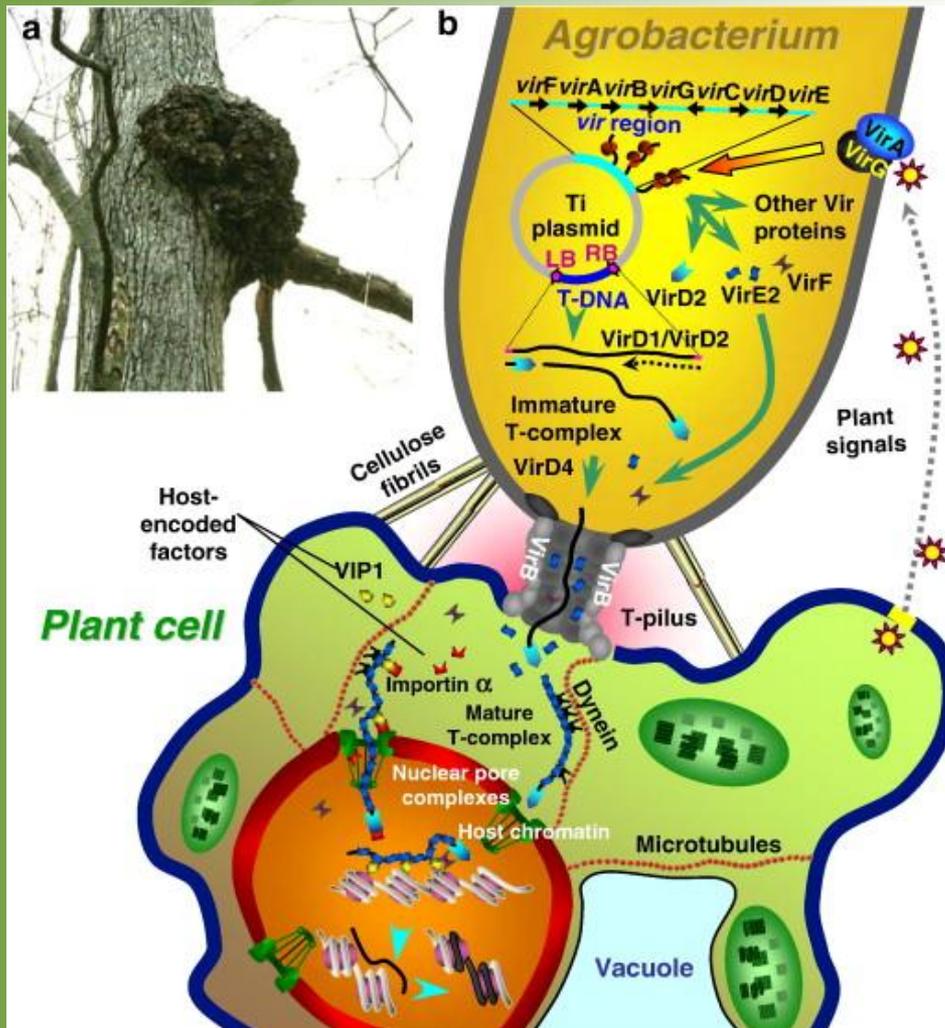
**ВИРУСЫ**



**ЭТАП 1.**

# **АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ. TI- И RI-ПЛАЗМИДЫ**

1980 г. М. Ван Монтегю и Д. Шелл  
открыли явление агробактеральной  
трансформации



Марк Ван Монтегю Джефф Шелл



<http://www.sciencephoto.com/>

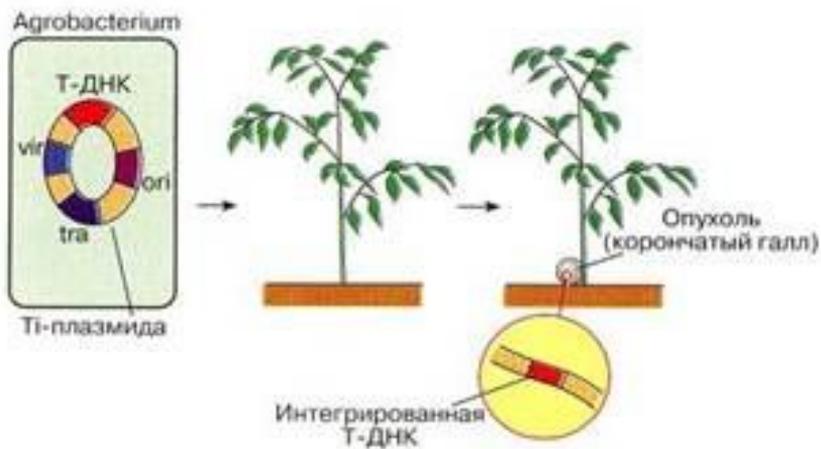
Грамотрицательные аэробы,  
почвенные микроорганизмы,  
фитопатогены

# Ti-плазмиды

tumor-inducing, опухолеобразующие поражают наземную часть растений



найжены в *Agrobacterium tumefaciens* – вызывающие образование у растений корончатых галлов, поражают, в основном, двудольные растения



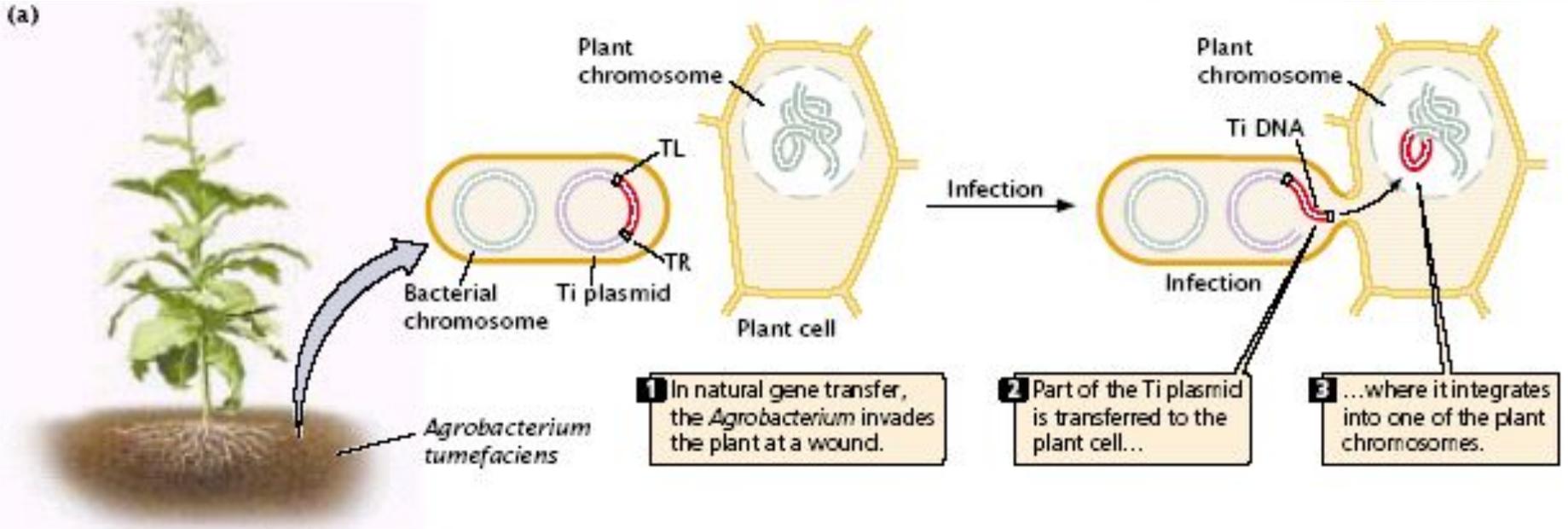
# Ri-плазмиды

root-inducing, вызывают образование «бородатого» корня, поражают ризосферу

найжены в *Agrobacterium rhizogenes* способны перемещаться в клетки корней высших растений, встраиваться в их ядерную ДНК и индуцировать избыточное разрастание корней

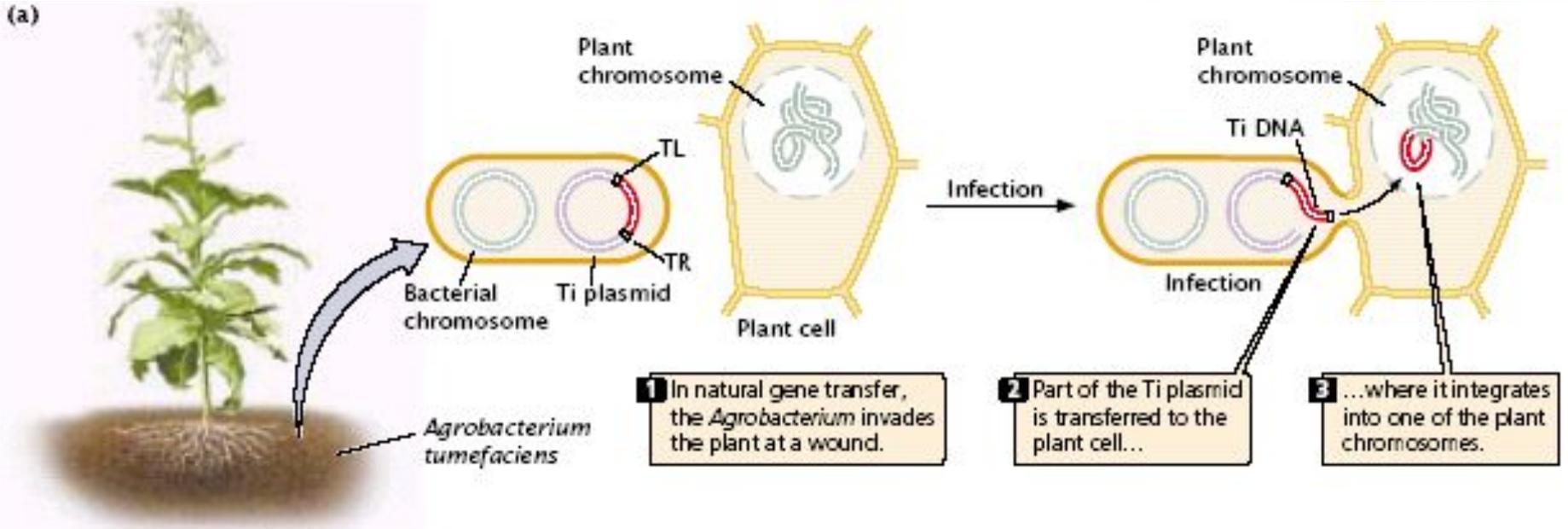


# Механизм действия агробактерий



1. При повреждении клетки растения в почву попадают продукты обмена веществ – ацетосирингон и гидроацетосирингон
2. Под их действием в плаزمиде агробактерий активируются гены *vir* (вирулентности), обеспечивающие вырезание Т-ДНК (от англ. transferred, переносимый) из Тi-плазмиды
3. В оболочке бактерии образуется разрыв, через который Т-ДНК переносится в растительную клетку
4. Фланкирующие последовательности встраивают Т-ДНК в геном растительной клетки

# Механизм действия агробактерий



5. В геноме растения Т-ДНК запускает синтез ферментов, необходимых для синтеза растительных гормонов: ауксина и цитокининов
6. Гормоны действуют на клетки растения и вызывают местное разрастание тканей
7. Включаются гены *nos* (нопалинсинтетазы), ферменты которых обеспечивают синтез в зараженных клетках опинов, которые Агробактерии используют как источник углеводов и азота

# Ti-плазмиды. Структура.



## Ауксины

(индол-3-уксусная к-та)  
- формирование корней, побегов, индукция соматического эмбриогенеза и пр.

## Цитокинины

(кинетин) – » –  
-ингибируют образование корней

## Опины

(нопалин)  
- производные аргинина

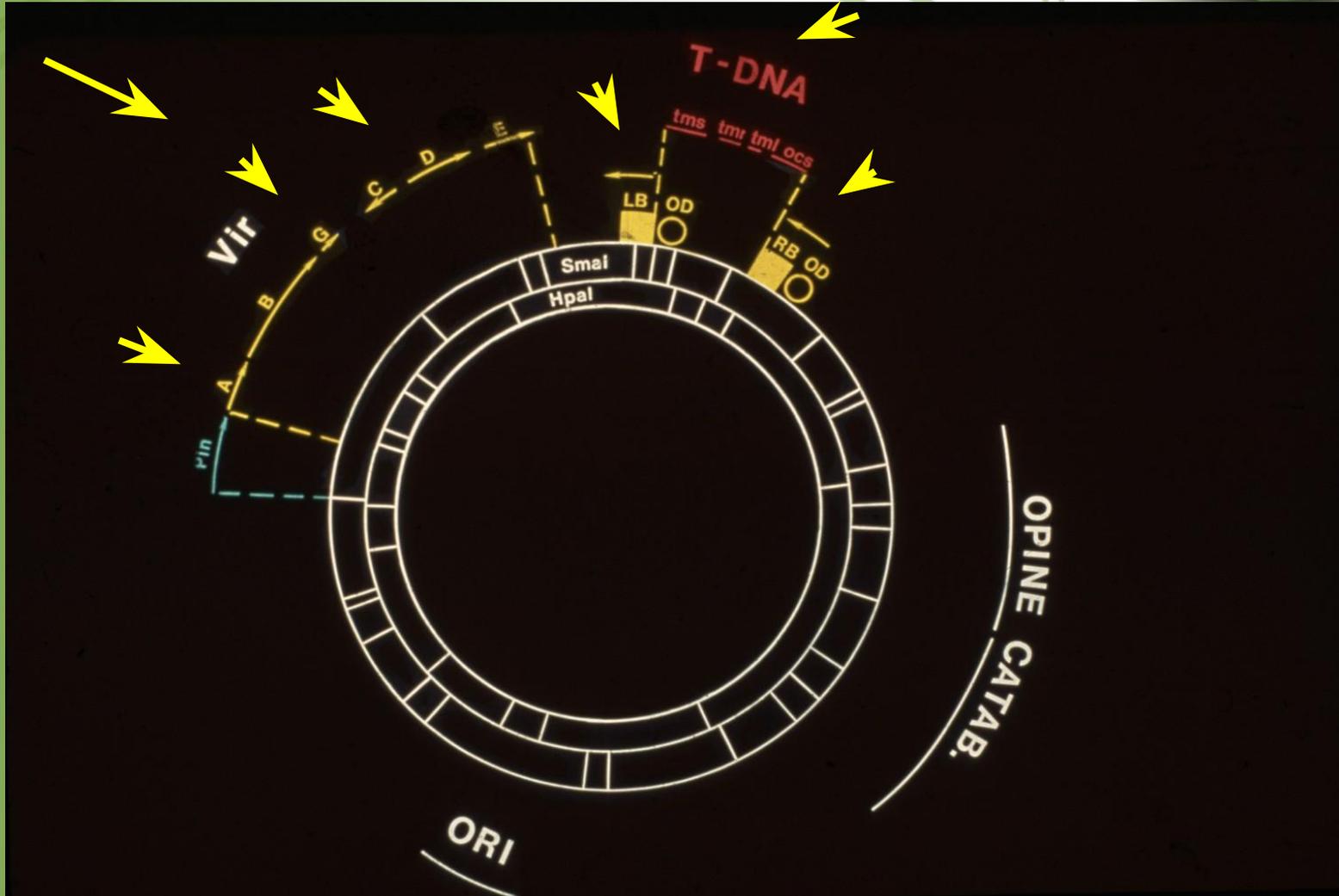
Размер от 200 т.п.н. до 800 т.п.н

Основные элементы:

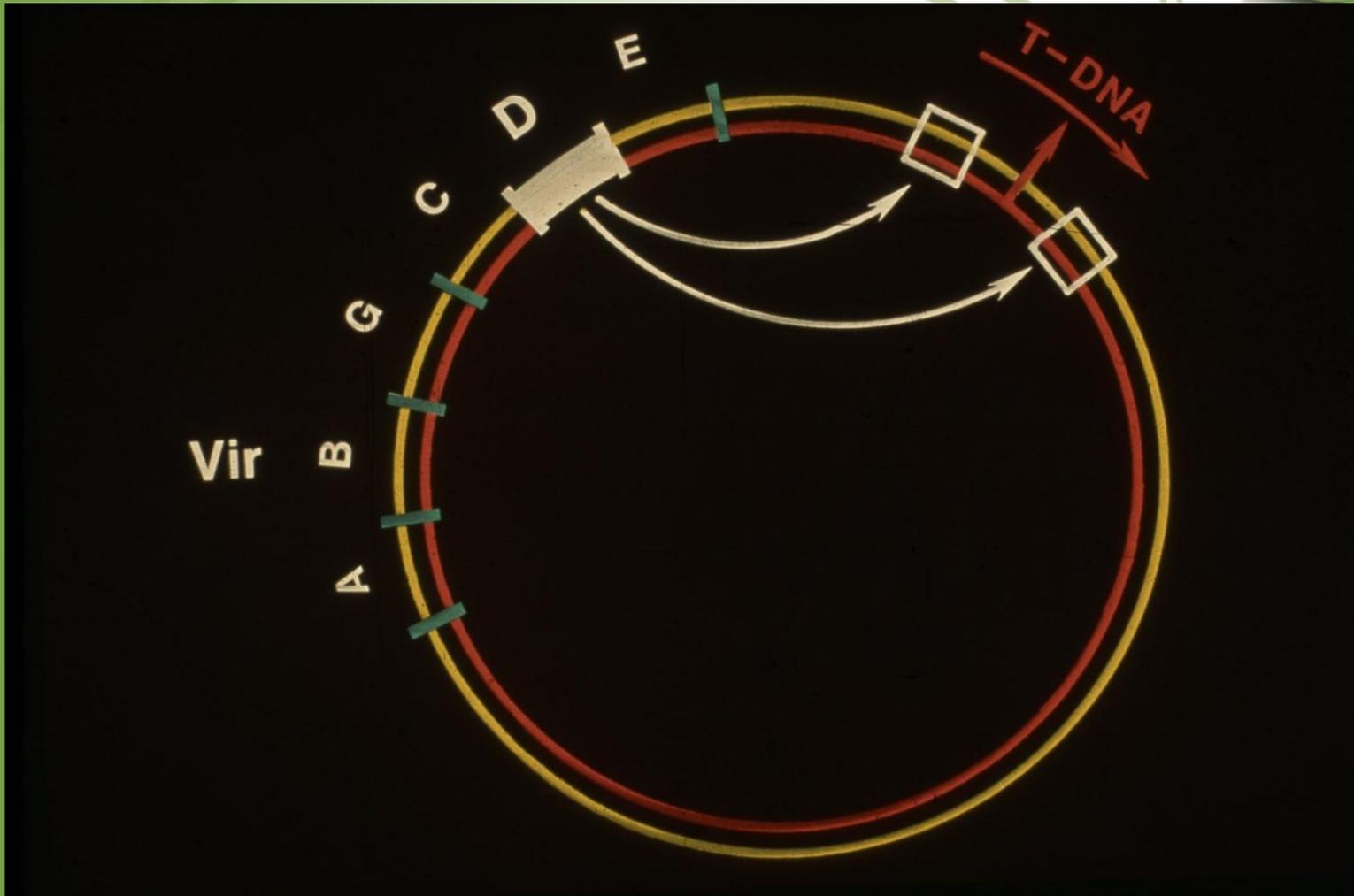
1. Ori-область
2. Vir-область
3. Область Т-ДНК



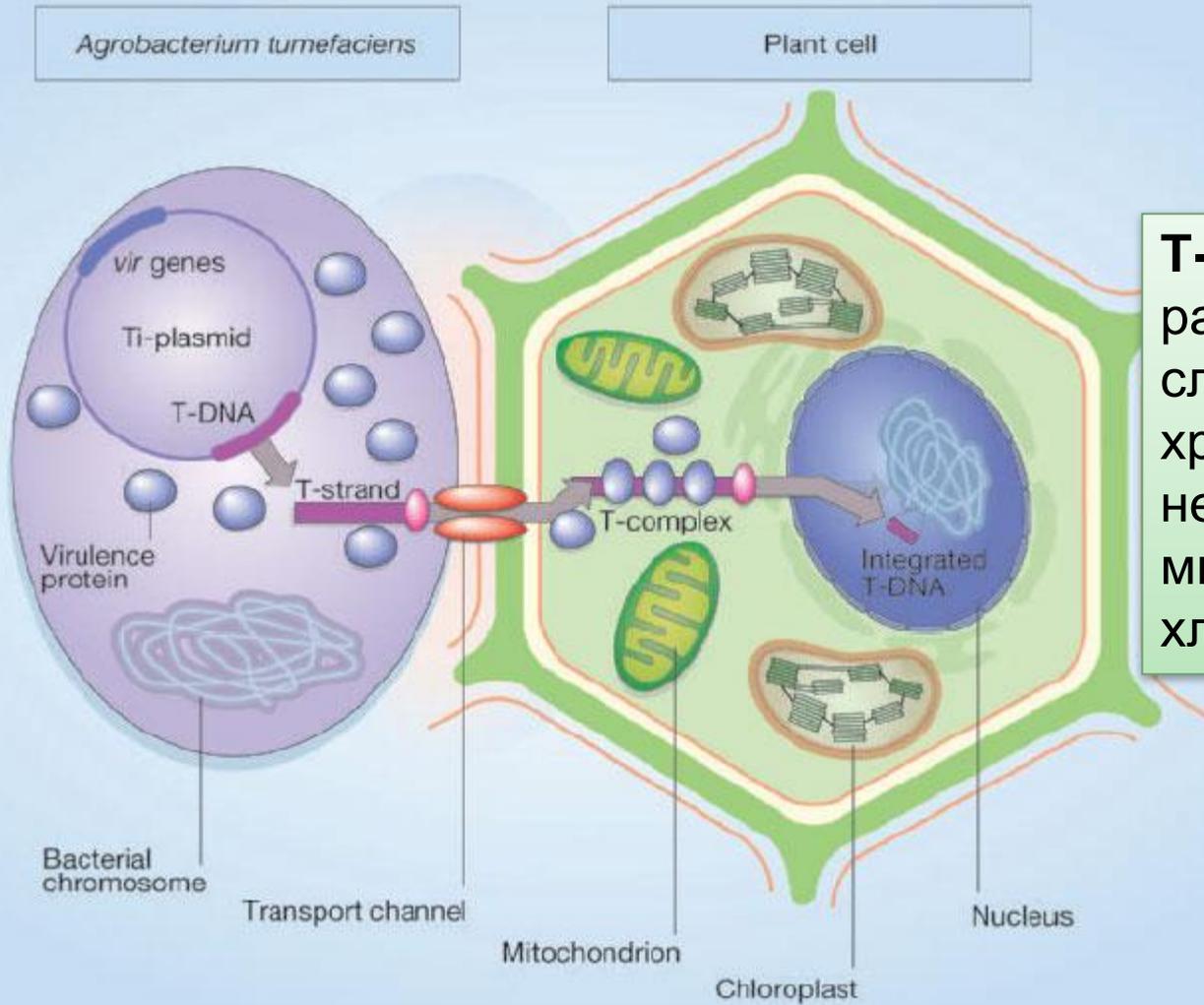
# Ti-плазмиды. Механизм действия



# Ti-плазмиды. Вырезание T-ДНК.



# Перенос Т-ДНК в растительный геном



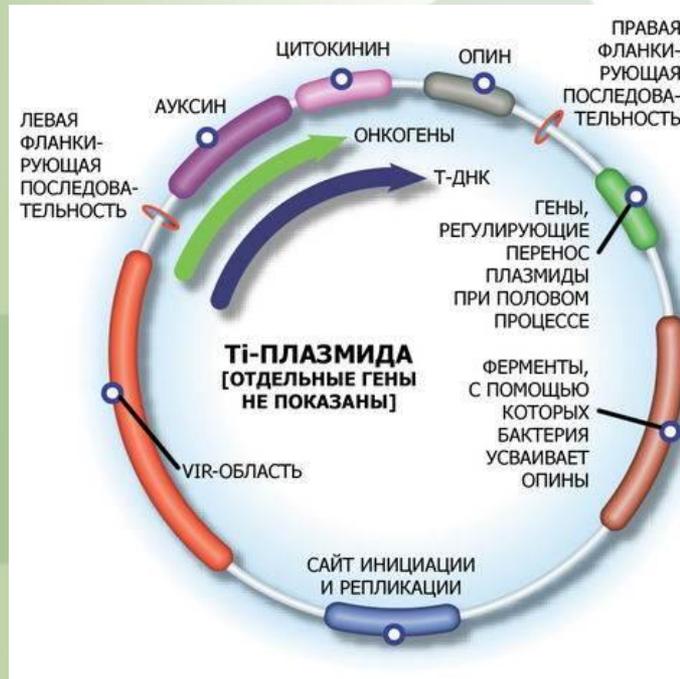
**Т-ДНК** встраиваются в разные, по-видимому случайные, точки хромосом, но никогда не интегрируют с ДНК митохондрий и хлоропластов

# Модификация Ti-плазмид для трансгенеза.

## Неонкогенная Ti-плазида



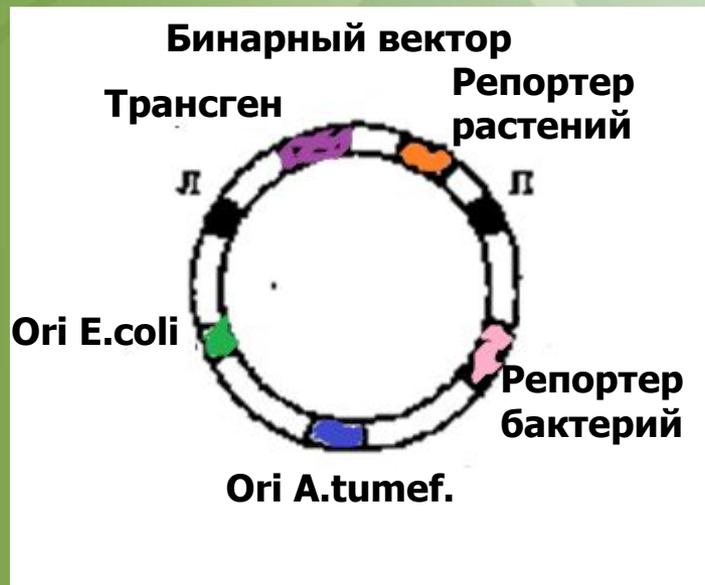
1. удаляется область T-ДНК
2. добавляется сайт инициации репликации (*ori*) плазмиды *Escherichia coli*
3. добавляются маркерные гены



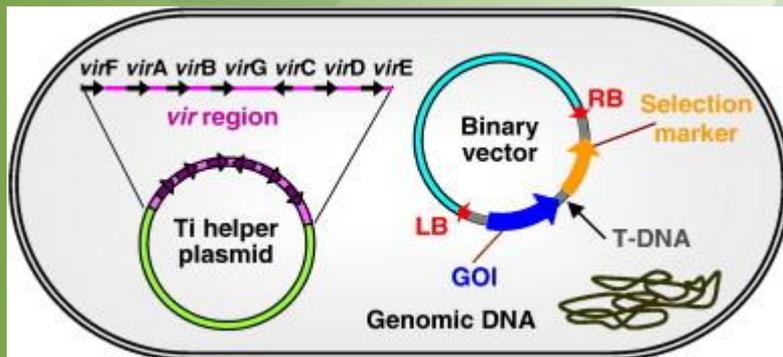
# Векторы для генетической трансформации растительных геномов. Бинарные векторы.



## БИНАРНЫЕ



- Содержат 2 сайта ori (для *E. coli* и для *A. tumefaciens*), T-ДНК, трансген
- Механизм действия:
1. вектор клонируют в *E. Coli*
  2. вектор переносят в *A.tumefaciens*, несущую неонкогенную Ti-плазмиду
  3. трансгенез



# Векторы для генетической трансформации растительных геномов. Коинтегративные

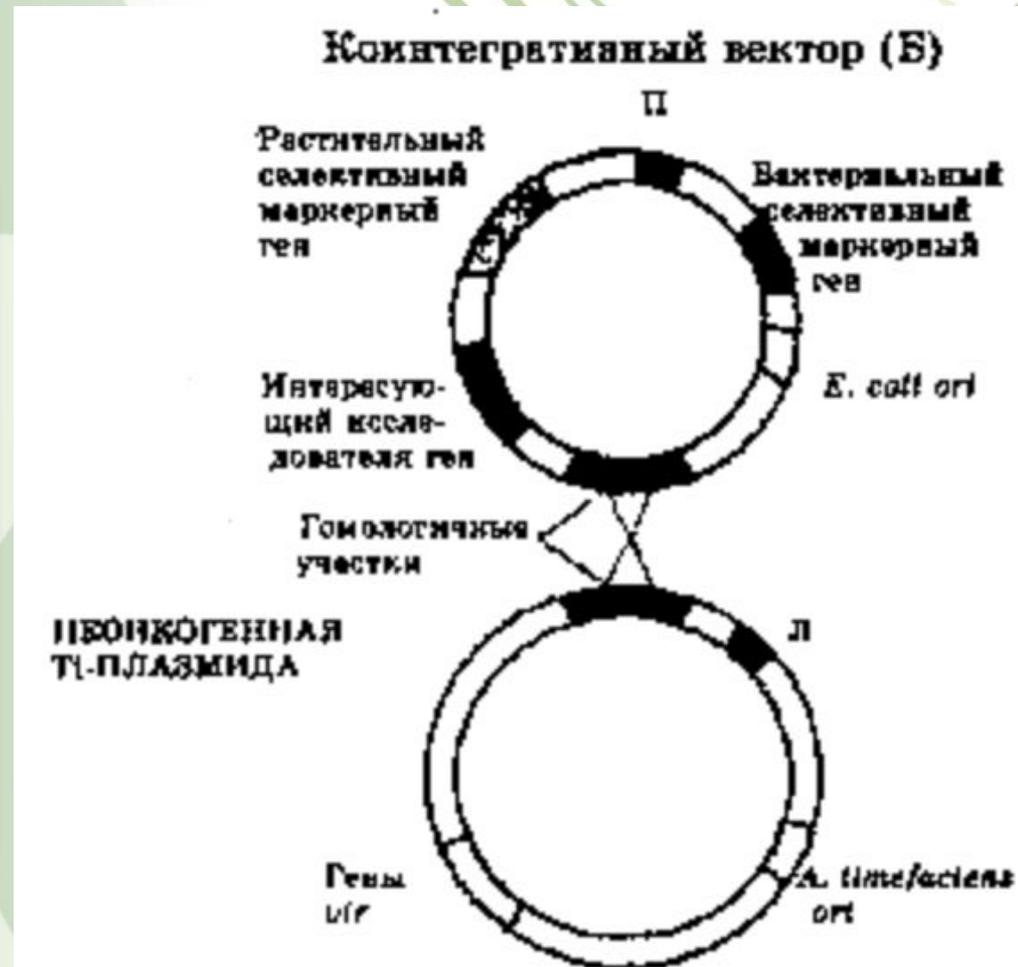


[http://www.znaytovar.ru/s/Tehnologii\\_sozdaniya\\_gmrasteni.html](http://www.znaytovar.ru/s/Tehnologii_sozdaniya_gmrasteni.html)

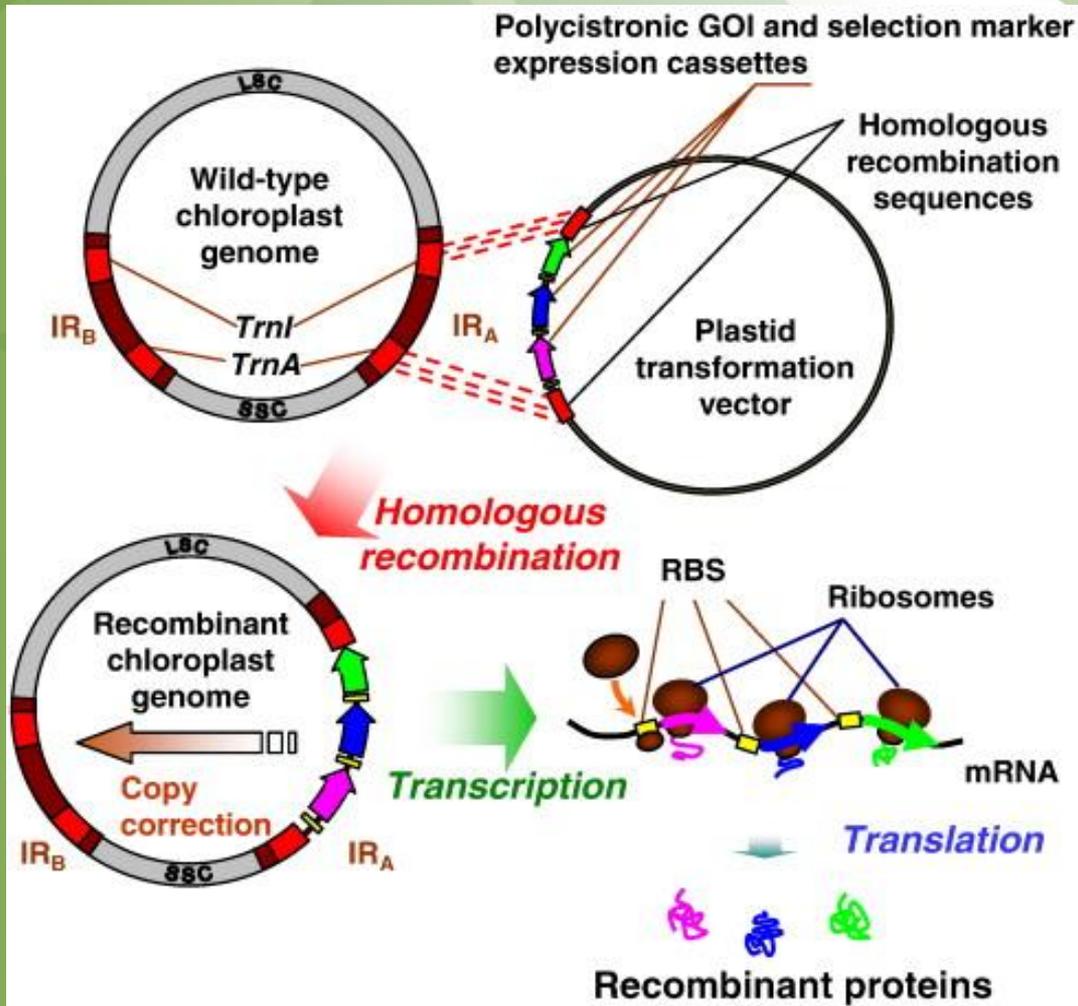
## КОИНТЕГРАТИВНЫЕ

Содержат *ori E. coli*, Т-ДНК, фрагмент гомологичный Т-ДНК неонкогенной Тi-плазмиды  
Механизм действия:

1. вектор клонируют в *E.coli*
2. в Т-ДНК встраивают трансген и клонируют в *E.coli*
3. вектор переносят в *A.tumefaciens* с неонкогенной Тi-плазмидой
4. образуется рекомбинантная плазмида
5. трансгенез



# Векторы для генетической трансформации растительных геномов. Коинтегративные

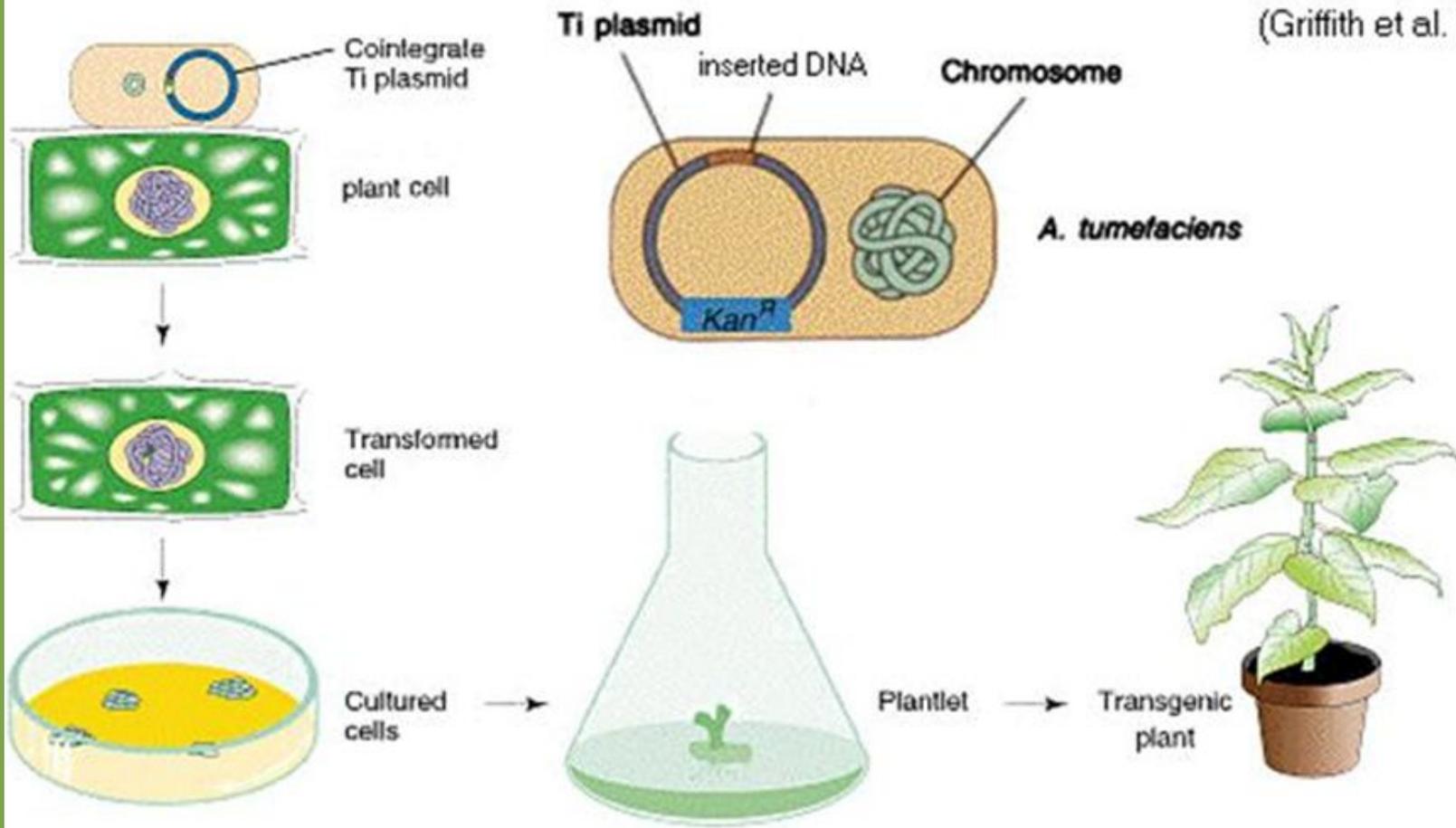


# Использование агробактерий в трансгенезе растений

недостаток системы агробактерий – это неспособность трансформировать злаковые



(Griffith et al. 1996)





**ЭТАП 1.**

# **ОПОСРЕДОВАННЫЙ ДНК ПЕРЕНОС ГЕНОВ. DMGT- ВЕКТОРЫ**

# DMGT-векторы

(DNA-mediated gene transfer)



## Вектор pCaMV $\text{CAT}$

- Челночный, может реплицироваться в клетках *E. coli* и клетках растений
- Несет промотор вируса мозаики цветной капусты (*CaMV*), контролирующий репортерный ген *E. Coli* хлорамфениколацетилтрансферазы (*cat*)

## Вектор pMON200

- Клонированный вектор
- Несет промотор гена нопалинсинтетазы (*nos*) *A. tumefaciens*, репортерный ген *E. Coli* неомицинфосфотрансферазы (*npt*)

# DMGT-векторы

(DNA-mediated gene transfer)



## Вектор pGV3850

- Коинтегративный вектор
- Несет промотор вируса мозаики цветной капусты (*CaMV*) и селективный маркерный ген *npt II* под промотором гена нопалинсинтетазы (*nos*)

## Вектор pBin 19

- Бинарный, клонирующий вектор
- Несет промотор гена нопалинсинтетазы (*nos*)





*ТРАНСГЕНЕЗ РАСТЕНИЯ. Лекция 6*

**ЭТАП 2. ВЫБОР И ПОДГОТОВКА  
РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК-РЕЦИПИЕНТОВ ДЛЯ  
ТРАНСГЕНЕЗА**

# Словарь



**Тотипотентность** – свойство клеток реализовать генетическую информацию ядра, обеспечивающую их дифференцировку, а также развитие до целого организма

**Каллус** – травматическая меристема, состоит из дедифференцированных, делящихся клеток

**Суспензионная культура** – культура соматических клеток, растущих в жидкой среде (глубинное культивирование)

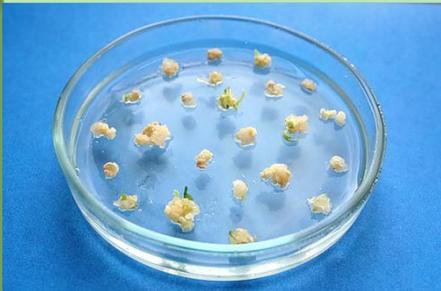
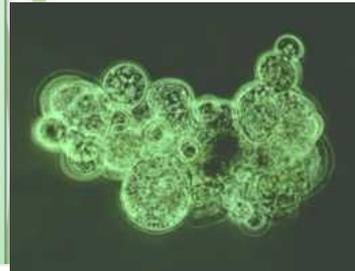
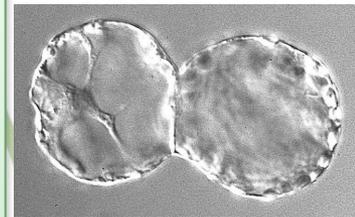
**Протопласт** – содержимое растительной клетки, лишённое клеточной стенки

**Меристемы** – образовательные ткани, состоят из интенсивно делящихся клеток

# При трансформации растений трансген может быть внесен:



1. в целые растений
2. в клетки каллусной либо суспензионной культуры
3. в интактные растительные клетки способные к вторичной регенерации
4. в хлоропласты
5. в протопласты
6. в зародыши





*ТРАНСГЕНЕЗ РАСТЕНИЯ. Лекция 6*

## **ЭТАП 3. ВСТРАИВАНИЕ ТРАНСГЕНА В ГЕНОМ РАСТЕНИЯ (В КЛЕТКУ-РЕЦИПИЕНТ)**

# Способы внесения трансгена в клетки растений



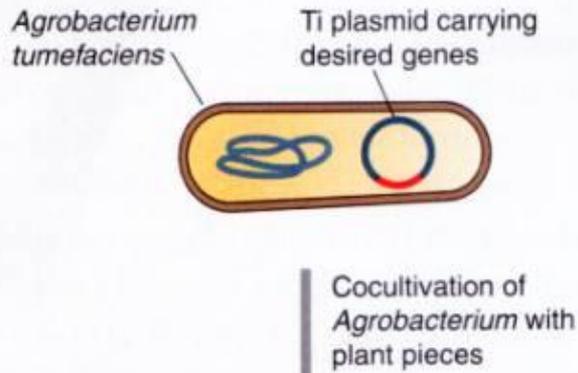
## Прямые методы

Электропорация  
Микроинъекция  
Биобалистика  
Со-культивирование  
Инокуляция

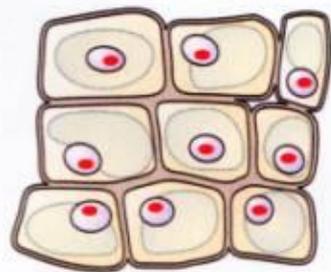
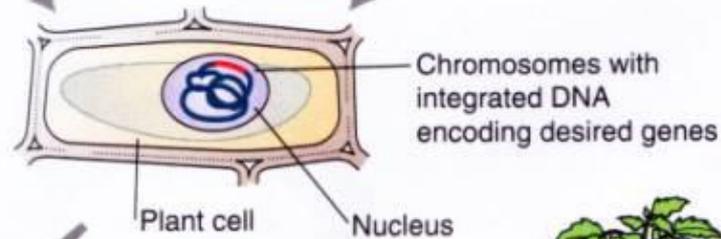
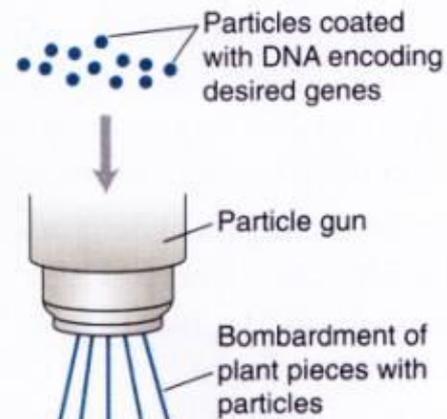
## Опосредованные методы

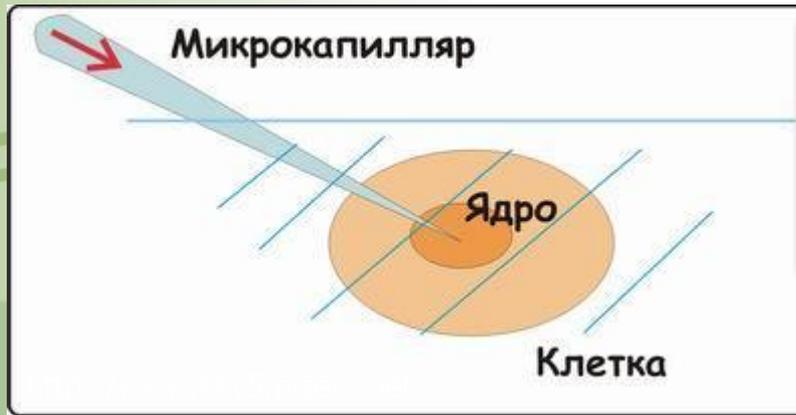
При помощи векторов:  
Ti-плазмиды  
Ri-плазмиды  
Вирусы

### Agrobacterium method

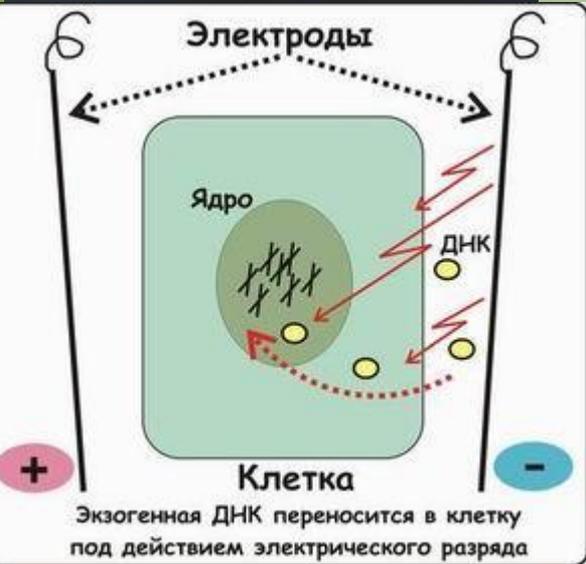


### Particle gun method





**МИКРОИНЪЕЦИЯ** - генетическую конструкцию инъецируют в клетку

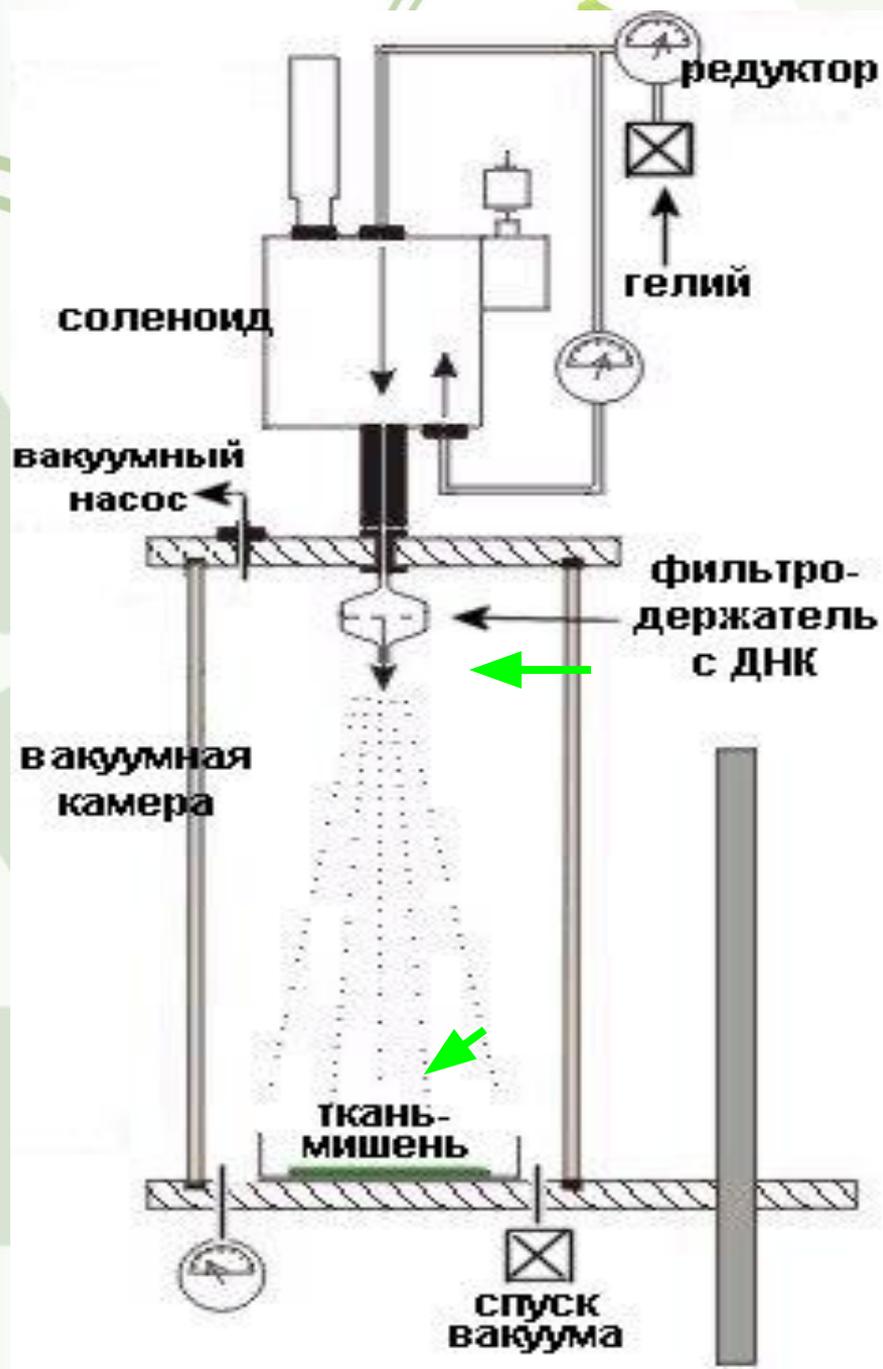


**БИОБАЛЛИСТИКА** - на нее частички вольфрама, платины или золота, диаметром от 0,1 до 3,5 мкм, напыляется векторная ДНК, содержащая трансген. «Заряды» из пушки, пробивая мембраны, входят в цитоплазму и ядра клеток.

**ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ** - клеточные мембраны, становясь проницаемой для экзогенных молекул ДНК под действием импульсов высокого напряжения, за счет формирования временных пор, через которые способны проходить экзогенные молекулы

# БИОБАЛИСТИКА

Общий вид и схема установки для биобаллистической доставки генов в клетки растений. Particle Inflow Gun,  
(John Finer, Philip Vain et al. 1992)



# Перенос трансгенов в растения



*via Agrobacterium*

Прямой перенос генов

Целое растение

**Инfiltrация**

Культивируемые *in vitro* клетки, компетентные к регенерации

**Инfiltrация  
микроинъекция  
со-культивирование**

Меристемы  
стеблевых апексов

**Биобаллистика**

микроинъекция  
со-культивирование

Зародыши

**Биобаллистика**

микроинъекция  
со-культивирование

Протопласты

**при помощи ПЭГ  
электропорация  
микроинъекция  
при помощи липосом**

Культивируемые *in vitro* клетки, компетентные к регенерации

**Биобаллистика  
электропорация  
при помощи лазера**

Метод	Эффективность применения и перспективы использования
Использование Ti-плазмид	Высокоэффективная система. Применима не для всех видов растений
Бомбардировка микрочастицами	Высокоэффективная система. Может использоваться для широкого круга растений и тканей
Использование векторов на основе вирусов	Неэффективный способ доставки ДНК в растительные клетки
Микроинъекции	Применение ограничивается тем, что инъекция одновременно может быть сделана только в одну клетку
Электропорация	Применение возможно для введения генов в протопласты
Слияние липосом	— « —
Прямое введение генов в протопласты	— « —



*ТРАНСГЕНЕЗ РАСТЕНИЯ. Лекция 6*

# **ЭТАП 4. ОТБОР ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК, РАСТЕНИЙ**

# Ti-плазмиды. Механизм действия



1

- бактериальные гены устойчивости к антибиотикам

2

- гены устойчивости к гербицидам

3

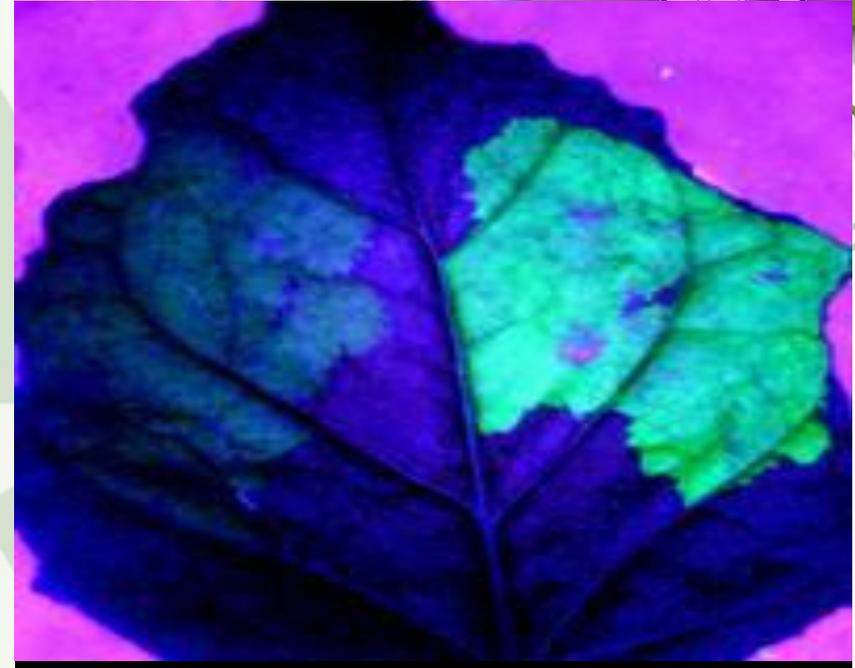
- ген изомеразы фосфат-6-маннозы (*prtI*)

4

- ген  $\beta$ -глюкуронидазы

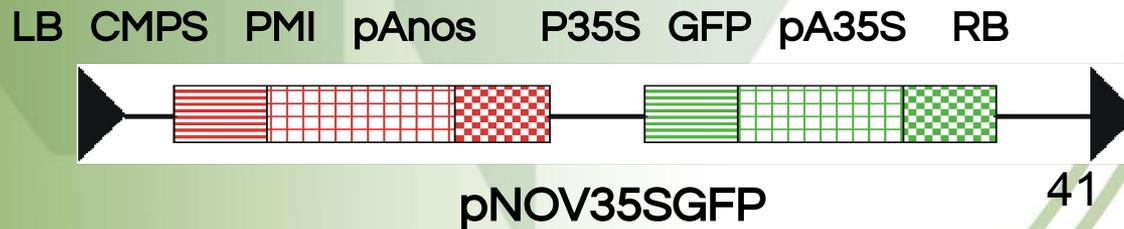
- ген зеленого флуоресцирующего белка (*GFP*)

# Alternative selection system based on the phosphomannose isomerase gene

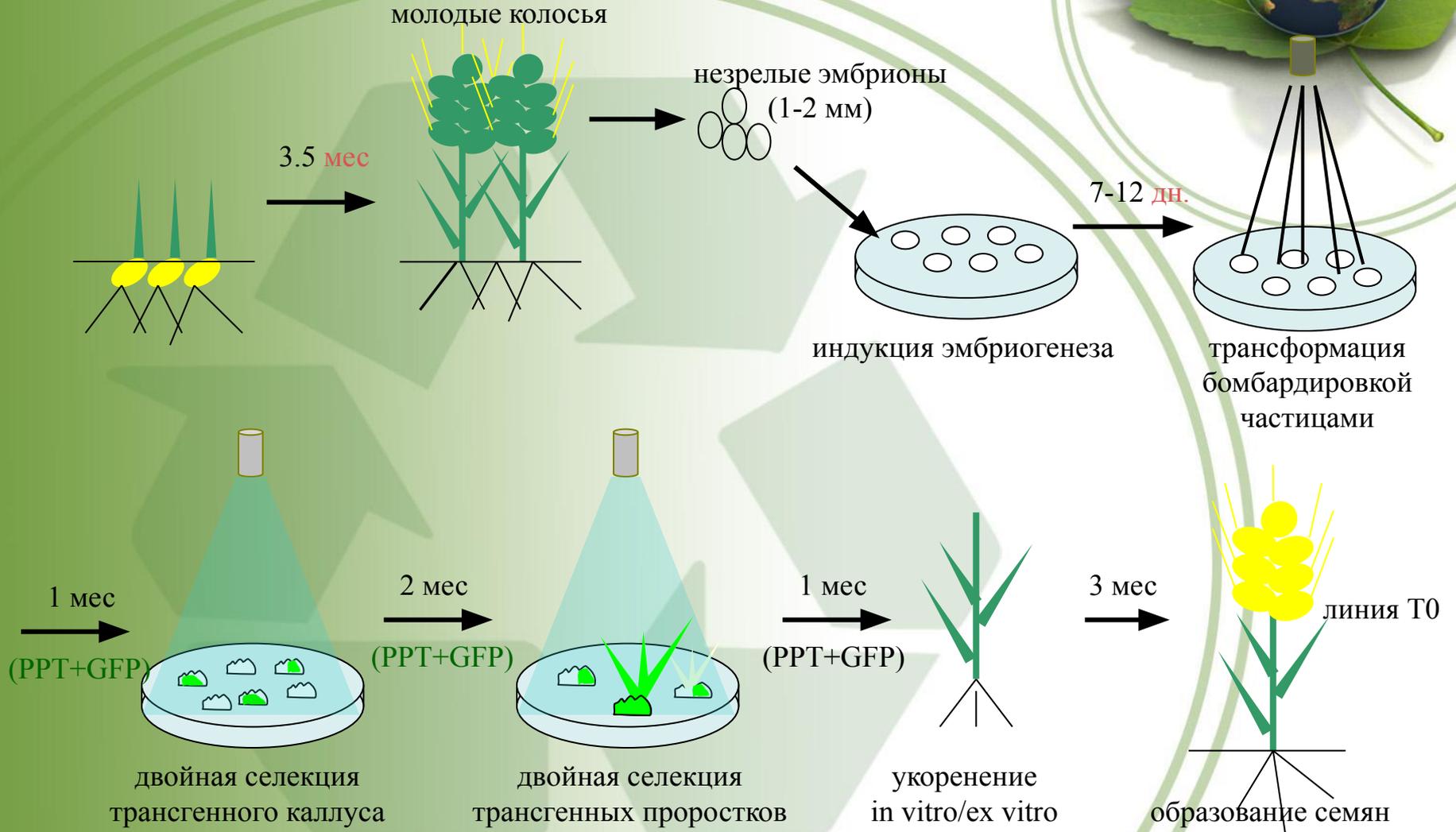


Rooting of transgenic plum on media with 10g/l mannose (right control)

GFP expression in transgenic plum shoots



# Протокол трансформации пшеницы: сочетание селекции на фосфинотрицине (PPT) с визуальной селекцией по экспрессии гена *gfp*



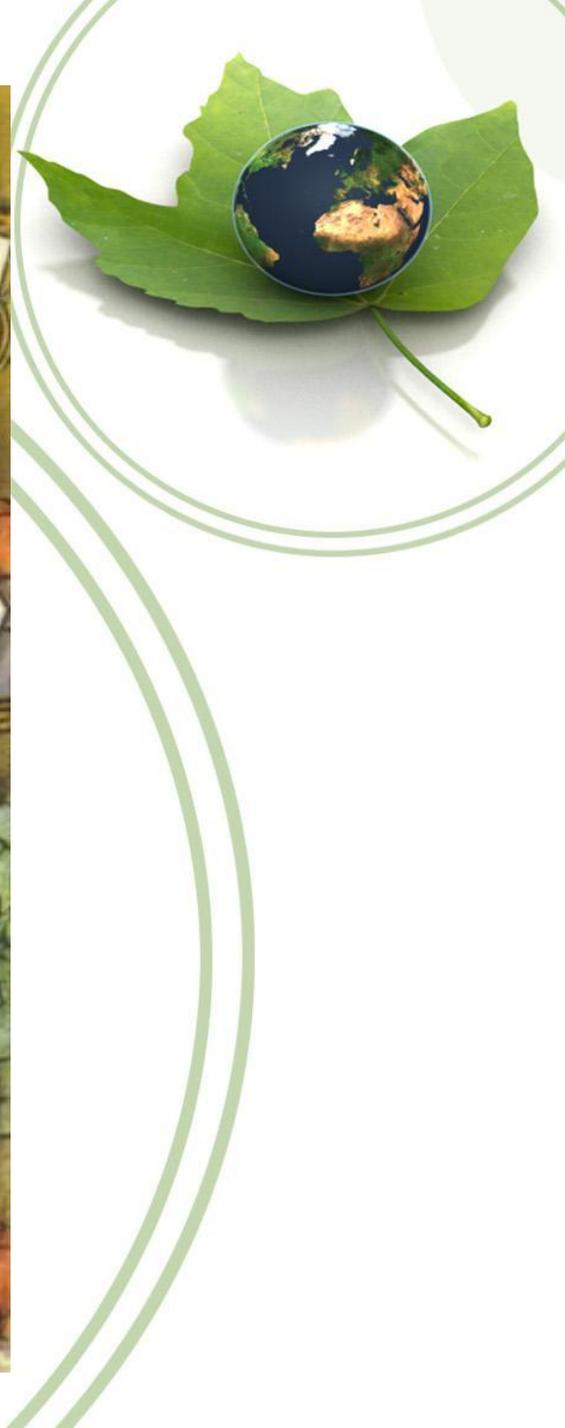






*ТРАНСГЕНЕЗ РАСТЕНИЯ. Лекция 6*

# **ВНЕДРЕНИЕ В ПРАКТИКУ**



# Предмет биотехнологии растений



**Генетическая трансформация растений – позволяет создавать растения:**

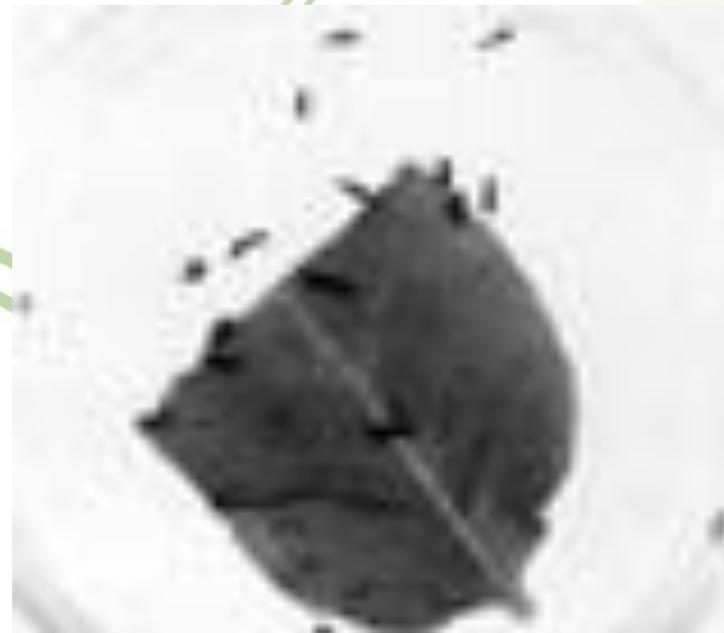
**а) устойчивые к биотическим и абиотическим стрессам**

**б) с улучшенными технологическими и питательными свойствами**

**в) производящие вакцины, полимеры (пластик и каучук), топливо и смазочные материалы**



**контроль**



**трансгенное**

Устойчивость трансгенного табака с геном *bt* к личинкам непарного шелкопряда

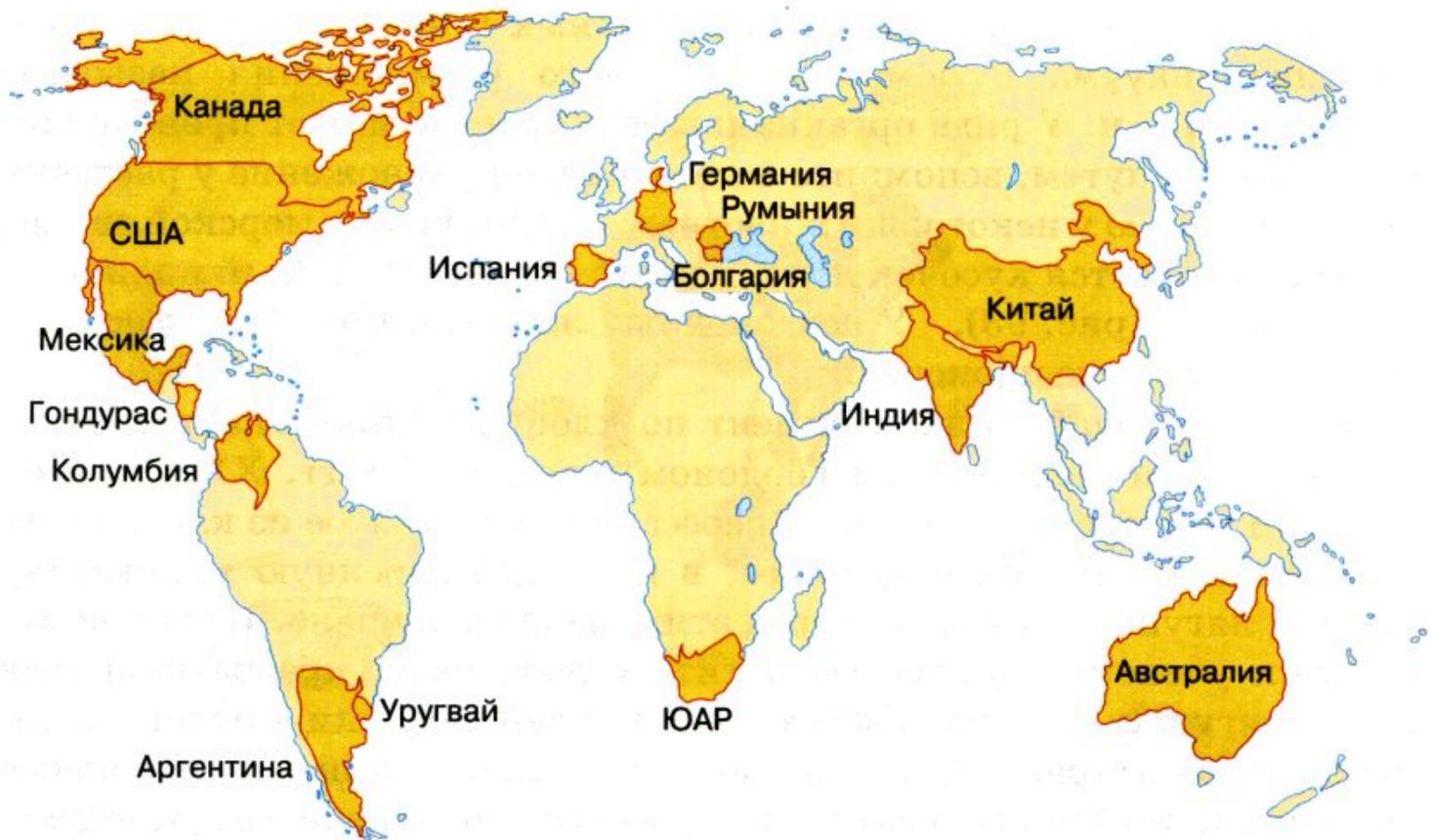




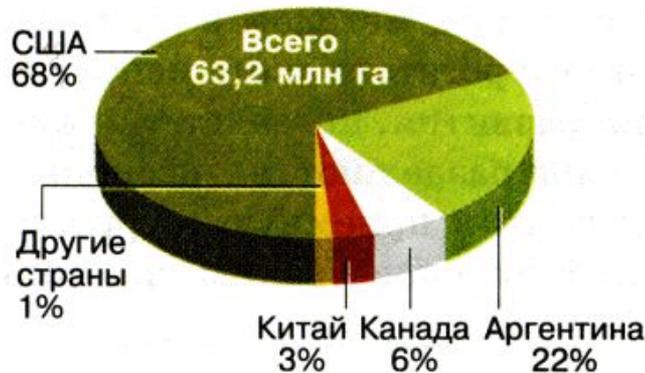
**контроль**  
**клон 1**

**клон 2**





Площади посевов  
трансгенных культур



**Рис. 92.** Страны, выращивающие трансгенные растения.

Практически всю площадь посевов трансгенных культур занимают генетически модифицированные сорта четырех растений: сои (62%), кукурузы (24%), хлопчатника (9%) и рапса (4%). Уже созданы сорта трансгенного картофеля, помидоров, риса, табака, свеклы и других культур