

# **Тема: Методы генной инженерии в биотехнологии**

**Генетическая инженерия** - конструирование *in vitro* функционально активных генетических структур (рекомбинантных ДНК).

**Генетическая инженерия** - система экспериментальных приемов, позволяющих конструировать лабораторным путем (в пробирке) искусственные генетические структуры в виде так называемых рекомбинантных или гибридных молекул ДНК.

**Генетическая инженерия** - получение новых комбинаций генетического материала путем проводимых вне клетки манипуляций с молекулами нуклеиновых кислот и переноса созданных конструкций генов в живой организм, в результате которого достигается их включение и активность в этом организме и у его потомства.

При этом рекомбинантные ДНК становятся составной частью генетического аппарата реципиентного организма и сообщают ему новые уникальные генетические, биохимические, а затем и физиологические свойства.

Цель прикладной генетической инженерии заключается в конструировании таких рекомбинантных молекул ДНК, которые при внедрении в генетический аппарат придавали бы организму свойства, полезные для человека. Например, получение «биологических реакторов» - микроорганизмов, растений и животных, продуцирующих фармакологически значимые для человека вещества, создание сортов растений и пород животных с определёнными ценными для человека признаками. Методы генной инженерии позволяют провести генетическую паспортизацию, диагностировать генетические заболевания, создавать ДНК-вакцины, проводить генотерапию различных заболеваний.

## Генно-инженерные методы:

1. Методы получения генов.
2. Методы введения гена в вектор и их клонирование.
3. Методы трансформации животных и растительных клеток.
4. Скрининг – отбор бактерий или клеток, в которые встроился ген.
5. Экспрессия (функционирование) генов у реципиента.

# МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕНОВ

- Химический синтез
- Рестрикционный метод
- Ферментативный синтез
- Химико-ферментативный синтез генов

## 1. Химический синтез.

Расшифровав последовательность аминокислот в белке и используя генетический код, определяют последовательность нуклеотидов ДНК на участке гена и производят его синтез из нуклеотидов при помощи фермента полимераза-1. Таким путем в 1969 г. Корана впервые синтезировал участок молекулы ДНК, кодирующий аланиновую т-РНК, а в 1977 г. Бойер синтезировал ген соматостатина человека, а затем и ген инсулина. В 1977 г. В. Гилбертом, а также Ф. Сэнгером был предложен метод секвенирования, т.е. распознавания последовательности нуклеотидов в фрагментах нуклеиновых кислот. Метод химического синтеза генов оказался трудоемким и малоэффективным. Затем появились быстрые и простые методы синтеза сравнительно длинных олигонуклеотидов с определенной, заранее заданной, последовательностью нуклеотидов. Теперь довольно легко можно синтезировать последовательность до 100 нуклеотидов. Автоматизация этих процессов еще более облегчает и ускоряет синтез.

**2. Рестрикционный метод**, или получение генов с помощью специфических эндонуклеаз – рестриктаз. Эти ферменты открыты в 1953 г. у бактерий. С помощью рестриктаз расщепляют ДНК бактерий другого штамма или клетки-хозяина. К настоящему времени из разных микроорганизмов выделено более тысячи различных рестриктаз; в генетической инженерии используется около 200. Рестриктазы гидролизуют ДНК строго по определенным специфическим последовательностям, называемым сайтами рестрикции.

Каждая из рестриктаз узнает свой сайт рестрикции и разрезает ДНК либо внутри сайта, либо в непосредственной близости от него. Обозначение рестриктаз складывается из начальных букв латинского названия вида бактерии, из которой выделен фермент, и дополнительного обозначения, т.к. из бактерий одного вида может быть выделено несколько различных рестриктаз: *Escherichia coli* – Eco R1, Eco RV; *Thermus aquaticus* – Tag 1.

3. **Ферментативный синтез генов** стал возможен после открытия фермента обратной транскриптазы или ДНК-ревертазы, выделенной из онкогенных вирусов. Ревертазы могут синтезировать комплементарную цепь ДНК (к-ДНК) на РНК-матрице.

При помощи ДНК-зонда (одноцепочечная меченая молекула ДНК, комплементарная какому-либо участку и-РНК) находят информационную (матричную) РНК. Практически все эукариотические и-РНК содержат на своем 3' конце последовательность, состоящую из остатков аденина (поли А-последовательность), которая присоединяется к и-РНК в результате сплайсинга. Для начала реакции синтеза ДНК-ревертазе нужна затравка в виде небольшого двухцепочечного отрезка. Эту функцию выполняют короткие олигонуклеотиды из 18-20 тиминовых остатков (поли -Т), которые соединяются по принципу комплементарности с поли А-последовательностью и-РНК. В результате образуется гибридная и-РНК – к-ДНК молекула, причем на конце у нее будет синтезироваться короткий отрезок двухцепочечной ДНК – шпилька. Шпилька служит затравкой для синтеза второй комплементарной цепи ДНК, осуществляющегося уже ферментом ДНК-полимеразой.

Цепь и-РНК гидролизует РНК-азой, а шпилька (одноцепочечная ДНК) – эндонуклеазой S1. В результате получится двухцепочечная молекула к-ДНК, соответствующая структурному гену, с которого транскрибировалась исходная молекула и-РНК. К полученной ДНК присоединяют «липкие» концы для встраивания в плазмиду и размножения гена. Подобная схема была использована для получения генов, кодирующих инсулин, гормона роста, интерферона, альбумина, иммуноглобулинов и др. белков, производство которых уже налажено в промышленных масштабах. Возможно и соединение фрагментов ДНК с «тупыми» концами за счет действия ДНК-лигазы, но эффективность

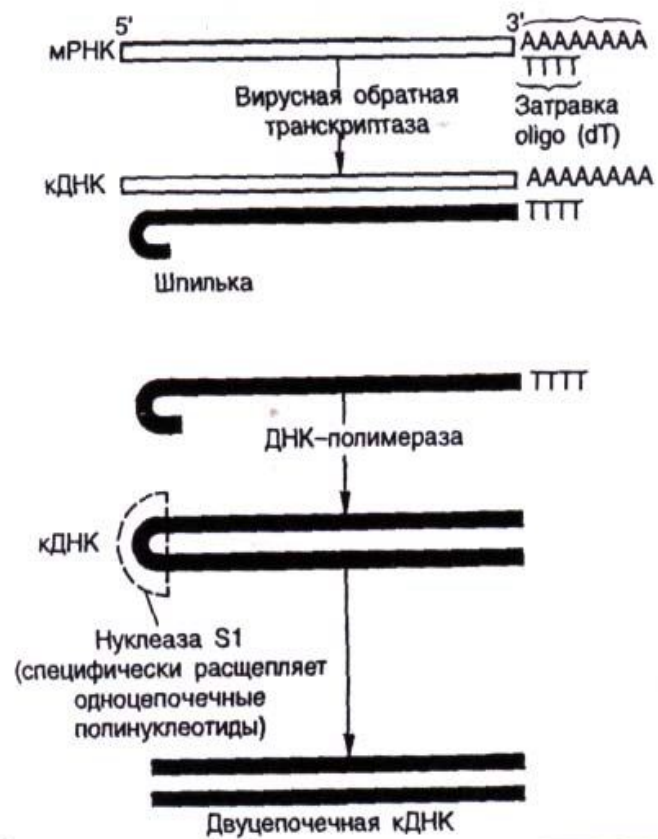


Схема синтеза двухцепочечной к-ДНК на м-РНК (и-РНК)



#### 4. Химико-ферментативный синтез генов

Химико-ферментативный синтез генов применяется наиболее часто. Химическим путем синтезируют олигонуклеотиды: линкеры, адаптеры, праймеры, промоторы, а гены синтезируют ферментативным методом.

*Линкеры* – короткие двухцепочечные олигонуклеотиды, содержащий сайты узнавания для ряда рестриктаз. *Адаптеры* – это линкеры, содержащие более одного сайта узнавания рестриктазой, они предназначен для соединения фрагментов с несовместимыми концами. *Праймеры* – короткие одноцепочечные фрагменты, комплементарные началу или концу гена. *Промотор* (80-10 нуклеотидов) – фрагмент ДНК, узнаваемый РНК-полимеразой.

Технология рекомбинантных ДНК использует следующие приемы:

- специфическое расщепление ДНК рестрицирующими нуклеазами, ускоряющее выделение и манипуляции с отдельными генами;
- быстрое секвенирование всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК, что позволяет определить границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую им;
- конструирование рекомбинантной ДНК;
- гибридизация нуклеиновых кислот, позволяющая выявлять специфические последовательности РНК или ДНК с большей точностью и чувствительностью, основанную на их способности связывать комплементарные последовательности нуклеиновых кислот;
- клонирование ДНК: амплификация *in vitro* с помощью цепной полимеразной реакции или введение фрагмента ДНК в бактериальную клетку, которая после такой трансформации воспроизводит этот фрагмент в миллионах копий;
- введение рекомбинантной ДНК в клетки или организмы.

# Методы введения гена в вектор и его

## клонирование

Очень важной операцией в ГИ является введение в клетку и стабильное поддержание генетической информации, содержащейся в рекомбинантных молекулах ДНК. ДНК, введенная в бактериальную клетку, гидролизуеться ее ферментами до нуклеотидов. Если даже ДНК «выживает» в клетке, то она утрачивается в процессе деления. Для того, чтобы рекДНК стала составной частью генома клетки, она должна либо интегрироваться в хромосому и реплицироваться за ее счет, либо быть способной к автономной репликации. Это достигается при помощи векторных молекул (векторов). РекДНК приносят в организм реципиента новые свойства: синтез аминокислот и белков, гормонов, ферментов, витаминов и др.

**Вектор** – молекула ДНК, способная переносить в клетку чужеродную ДНК и обеспечивать там ее клонирование или включение в геном. К векторам предъявляются определенные требования. Кольцевая молекула ДНК может реплицироваться в клетках, если содержит ДНК-репликатор (ori-последовательность). Вектор должен содержать: уникальные сайты рестрикации для нескольких рестриктаз, обладать определенной емкостью и не элиминировать встроенный фрагмент; иметь маркерный ген, облегчающий отбор клеток, несущих вектор, содержать Структурный ген, который должен экспрессироваться: специфические для клетки

В качестве **векторов** используют:

- плазмиды,
- бактериофаги,
- мобильные элементы,
- вирусы животных и растений
- хлДНК, мхДНК.

В настоящее время создано большое число векторов, и по профилю

использования их можно подразделить на несколько типов.

1. Векторы для клонирования фрагмента ДНК. Для этого используются чаще бактериальные плазмиды и фаги.
2. Экспрессионные векторы. Их используют для анализа конкретных последовательностей генов и их белковых продуктов, а также наработок конкретного белка.  
Экспрессионные векторы для эукариотических организмов всегда содержат т.н. экспрессионную кассету, состоящую из промотора, способного работать в данном организме, и сайта полиаденилирования.
3. Векторы для трансформации. Используются для введения чужеродного фрагмента ДНК в геном реципиента. Обычно такие векторы содержат специфические последовательности, способствующие интеграции в геном.

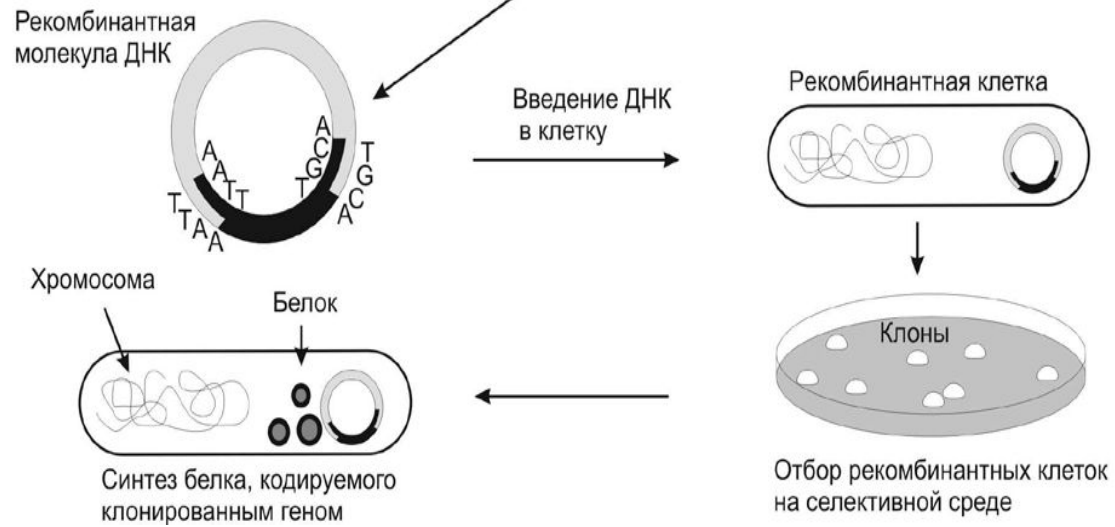
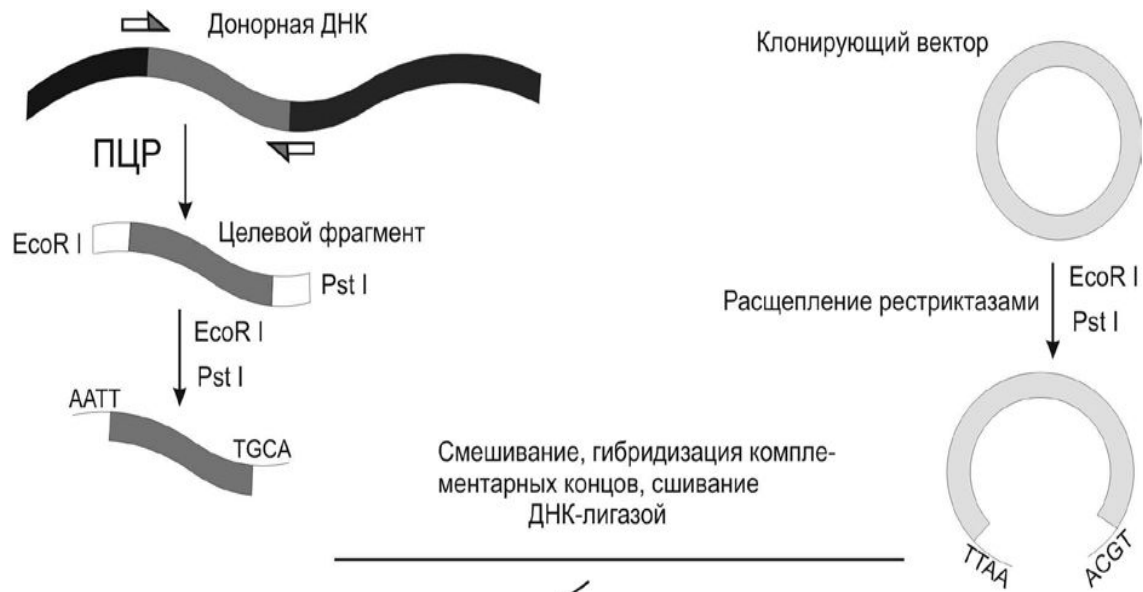
В качестве векторов *прокариот* используют плазмиды, фаги и их комбинации. Плазмиды – это бактериальные внехромосомные двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК с переменными молекулярными массами (1-3% генома бактериальной клетки). Используют плазмиды, способные размножаться автономно, давая до 200 копий, а под действием ингибитора биосинтеза протеинов (хлорамфеникола) – до нескольких тысяч.

Используют конъюгативные плазмиды (F) и неконъюгативные (R, Col, D).

R-плазмиды содержат гены устойчивости к антибиотикам, Col-плазмиды обеспечивают синтез разных колицинов – высокоспецифических антибиотиков, подавляющих жизнедеятельность других штаммов и видов бактерий, D-плазмиды вызывают биодеградацию. Бактериальная клетка обычно может содержать в своем составе плазмиды только одного типа.

Встраивание чужеродной ДНК в векторную плазмиду – довольно редкое событие. Только одна из 10-30 полученных после легирования молекул будет рекомбинантной, т.е. нести в своем составе чужеродный фрагмент. Такие клетки отбирают на селективной среде с антибиотиками. Плазмидные векторы имеют небольшую емкость, в них можно клонировать фрагменты длиной не более 7-8 тысяч нуклеотидных пар (т.н.п.), т.е. они пригодны только для клонирования генов прокариот.

В генетической инженерии часто используют плазмиду pBR 322, которая содержит репликатор колициногенной плазмиды Col E1, ген устойчивости к антибиотикам – ампициллину (Amp<sup>r</sup>) и тетрациклину (Tc<sup>r</sup>).



Для прокариот сконструированы векторы на основе фага  $\lambda$ , в которые можно включать фрагменты чужеродной ДНК до 22 т.н.п. Из генома фага вырезают его собственную ДНК, оставляя концевые фрагменты фага неизменными, так как они необходимы для репликации и упаковки ДНК в головку фага (cos-сайты).

Для клонирования и переноса более крупных фрагментов ДНК (30-45 т.н.п.) были сконструированы искусственные векторы – *космиды*, содержащие cos-участок генома фага, за счет чего они могут упаковываться в голову фага  $\lambda$  и специальные последовательности (ori-сайт), позволяющие им реплицироваться по плазмидному типу. Космидами трансформируют клетки *E. coli*, где они размножаются как плазмиды, и каждая фаговая частица вызывает образование колонии индивидуального бактериального трансформанта.



Капсид с  
линейной  
ДНК

100 нм

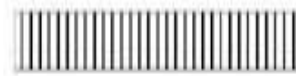
Нити  
отростка

А

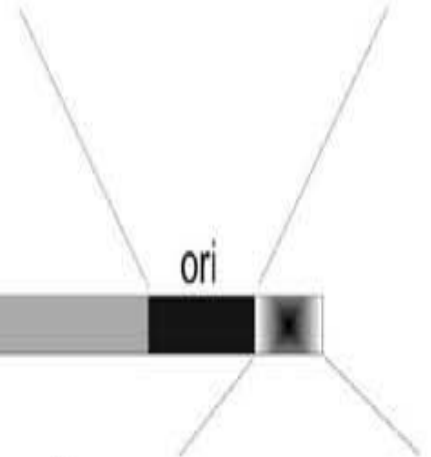


Б

Гены, кодирующие  
белки оболочки



Гены, важные для репликации



ori

Гены, ответственные за  
разрушение клетки фагом



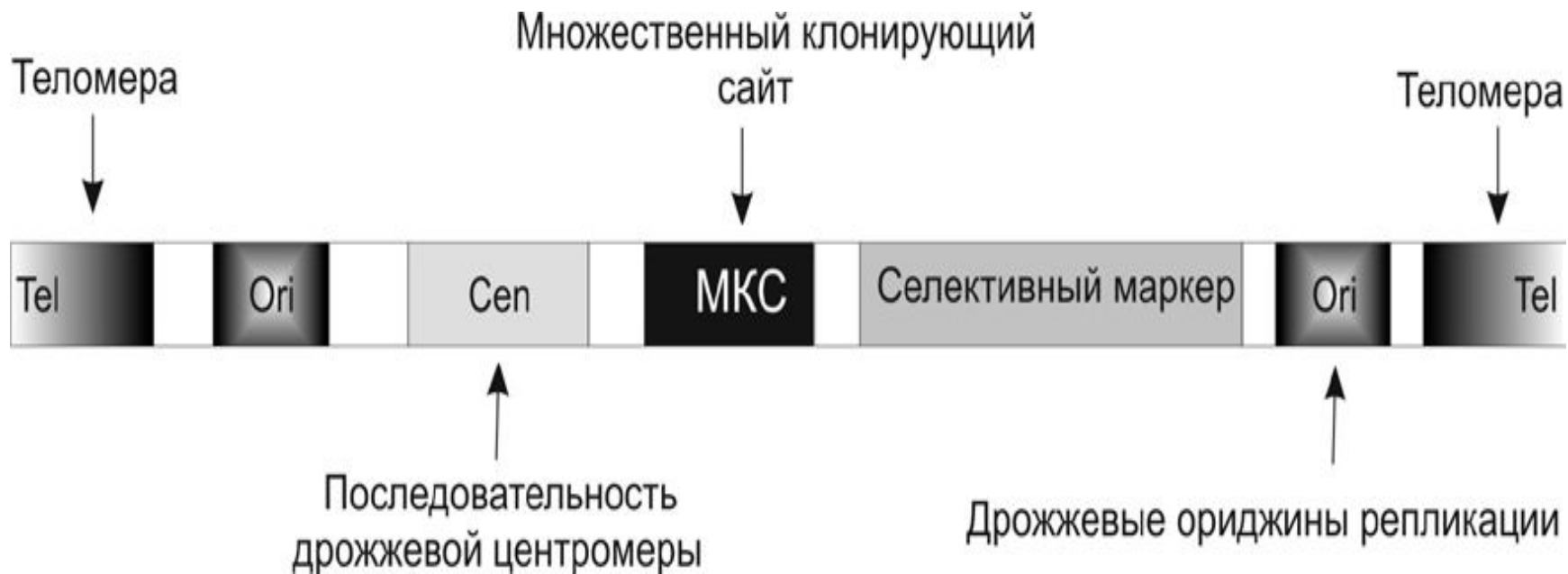
В



Клонирование фрагментов ДНК от 100 т.н.п. и более осуществляют в специально сконструированных векторах *VAC* и *VAC*.

*VAC*-векторы получены на основе F-плазмид бактерий и содержат гены, ответственные за репликацию и копияность этих плазмид в бактериальных клетках. Емкость *VAC*-векторов составляет 100-300 т.н.п.

*VAC*-векторы представляют собой искусственную дрожжевую минихромосому, содержат центромеру, теломеру и точку начала репликации. В такой вектор можно встроить фрагмент чужеродной ДНК более 100 т.н.п., и такая минихромосома, введенная в клетки дрожжей, будет реплицироваться и вести себя аналогично другим дрожжевым хромосомам при митозе.



Эукариотические вирусы применяются в качестве векторов. Практически используется только онкогенный вирус SV-40 и его производные. Все эти векторы – дефектные вирусы, не способные дать полноценные вирусные частицы в клетке хозяина.

Для переноса генов в клетки растений широко используются Ti-плазмиды почвенных агробактерий (*Agrobacteria*). Они могут заражать двудольные растения и вызывать образование опухолей – корончатых галлов. Опухоли состоят из дедифференцированных клеток, интенсивно делящихся и растущих в месте заражения. В бактериальных клетках Ti-плазмиды реплицируются автономно; их кольцевая ДНК длиной около 200 т.н.п. Чаще всего встречаются Ti-плазмиды, кодирующие аминокислоты нопалин или октопин. После заражения фрагмент ДНК Ti-плазмиды выстраивается в ДНК растительной клетки, изменяя ее метаболизм и заставляя синтезировать вещества (опины), необходимые бактерии. Этот фрагмент ДНК Ti-плазмиды назван т-ДНК (трансформирующая ДНК); его длина примерно 23 т.н.п. На концах т-ДНК находятся прямые повторы (25 н.п.), которые (наряду с *vir*-областью) необходимы для вырезания ее из состава плазмиды и интеграции в геном растений.

В настоящее время конструируют производные Ti-плазмиды, в которых вставляют регуляторный участок T-области, а вместо ее структурных генов вшивают структурную часть гена, который надо ввести в растение. Такие гены безвредны для растения. На основе Ti-плазмиды сконструированы промежуточный и бинарный векторы.



Перспективным вектором считаются Ri-плазмиды из бактерий (*A. rhizodenes*),

вызывающих усиленное образование корешков при заражении бактериями. В отличие от Ti-плазмид Ri-плазмиды служат естественными безвредными векторами, так как трансформированные с их помощью растительные клетки сохраняют способность к морфогенезу и к регенерации здоровых растений.

В качестве векторов растений используются ДНК-содержащие вирусы (их только 1-2% от вирусов, инфицирующих растения). Это содержащий одноцепочечную ДНК вирус золотой мозаики фасоли (ВЗМФ) или вирус полосатой кукурузы, а также вирус с двухцепочечной ДНК – вирус мозаики цветной капусты (ВМЦК), поражающий в основном растения семейства крестоцветных. Фитовирусы отличаются высокой копийностью (10<sup>6</sup> молекул на зараженную клетку), малым размером, сильными промоторами. Однако фитовирусы имеют ряд недостатков: небольшую емкость, патогенность и неспособность встраиваться в хромосомы хозяина. Иногда геном ВМЦК встраивают в T-область Ti-плазмиды и в ее составе интегрируют в ядерный геном различных растений, при этом из состава фитовируса вырезаются области, обеспечивающие его вирулентность.

# Методы трансформации животных и растительных клеток

Векторные плазмиды и векторные вирусы со встроенными чужеродными генами называют гибридными (или химерными).

После конструирования рекомбинантных ДНК их с помощью трансформации вводят в реципиентный организм:

бактериальную, грибную, растительную или животную клетку. При этом производится предварительная обработка клеток соединениями,

способствующими проникновению ДНК внутрь клеток с последующим помещением их на селективную среду, в которой способны существовать только клетки, получившие векторную молекулу, например, в среду с определенным антибиотиком.

Процесс инфицирования клеток с помощью чужеродных

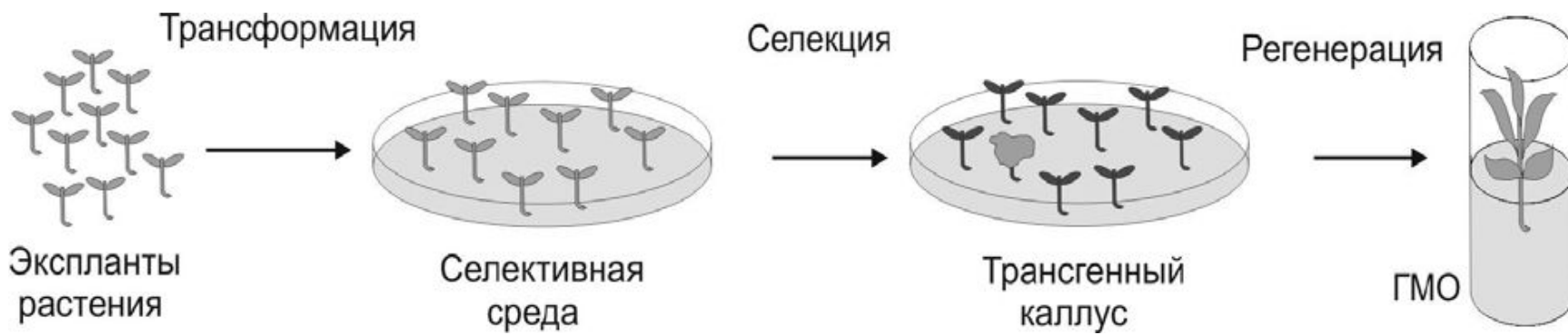
молекулу, например, в среду с определенным антибиотиком.

Процесс инфицирования клеток с помощью чужеродных

молекулу, например, в среду с определенным антибиотиком.

Практически общий способ трансформации и трансфекции основан на том, что при обработке клеток бактерий  $\text{CaCl}_2$  их мембрана становится проницаемой для ДНК.

Одним из самых распространенных методов получения трансгенных двудольных растений является кокультивация с агробактерией. Он основан на трансформации растительных эксплантов агробактериями, несущими векторную конструкцию, содержащую чужеродный ген, встроенный в область T-ДНК. Вектор должен иметь функциональный ген (прокатиотический или эукариотический), промотор, способный экспрессироваться в растительной клетке, и селективный маркер трансформации. В качестве эксплантов берут стерильные листовые диски, молодые корешки, семядоли, междоузлия. На экспланты наносят раны и кокультивируют с жидкой средой, содержащей агробактерии в течение 24-48 часов. Далее экспланты переносят на среду с антибиотиками (или гербицидами) для проведения селективного отбора трансформированных клеток. Кроме того, в среду добавляют соответствующие фитогормоны (для прямой регенерации или каллусообразования). Через 2-5 недель на трансформированном экспланте развиваются побеги, которые в дальнейшем отсаживают или переносят в почву. Выход трансгенных растений достаточно высок (10-60% в зависимости от вида растения).

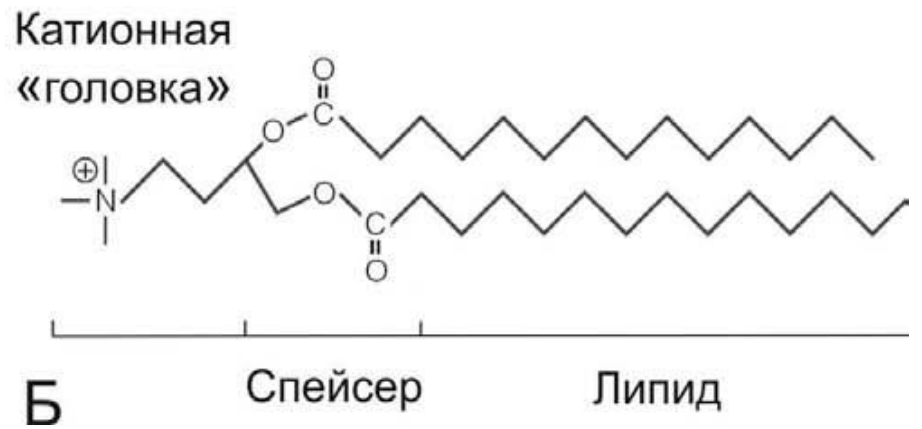
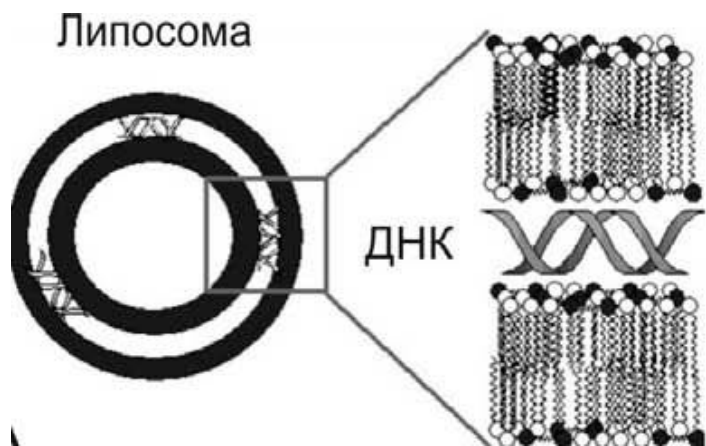




Существует несколько методов прямого переноса генов в растения и клетки животных. Сначала клеточная оболочка разрушается ферментами (целлюлазой, пектиназой), и остается один протопласт. Наибольшей эффективности трансформации удалось достигнуть методом электропорации и добавлением полиэтиленгликоля. При этом вектор может не содержать пограничных областей т-ДНК и *vir*-области, т.е. годится практически любой ДНК-вектор.

Метод электропорации основан на воздействии на клетки (протопласты) высоковольтным импульсом (200-350 В, длительность 54 мс), увеличивающим проницаемость биомембран. Молекулы ДНК поглощаются клетками через поры в клеточной мембране. После разведения раствора протопласты высеиваются на соответствующую среду для регенерации. Эффективность переноса определяется через 24-48 ч после электрошока.

Упаковка в липосомы используется для защиты экзогенного генетического материала, который вводится в протопласты растений, от нуклеаз. Липосомы – сферические образования, оболочка которых состоит из фосфолипидов. Их можно получить путем резкого встряхивания или обработки ультразвуком водных эмульсий фосфолипидов. Недостатком метода является его низкая трансформирующая активность (0,5-1%).



Метод микроинъекции ДНК в животные и растительные (протопласты прикрепляют к стеклам полилизинном) клетки, проводят непосредственно в их ядра.

Трансформация растительных протопластов происходит с эффективностью не более 10-15%, независимо от типа вектора, и подходит как для двудольных, так и для однодольных растений. Более 140 видов растений протрансформированы путем прямого переноса ДНК-вектора.

В соматические клетки животных ДНК вводится путем микроинъекции в ядро. Культуры клеток млекопитающих могут

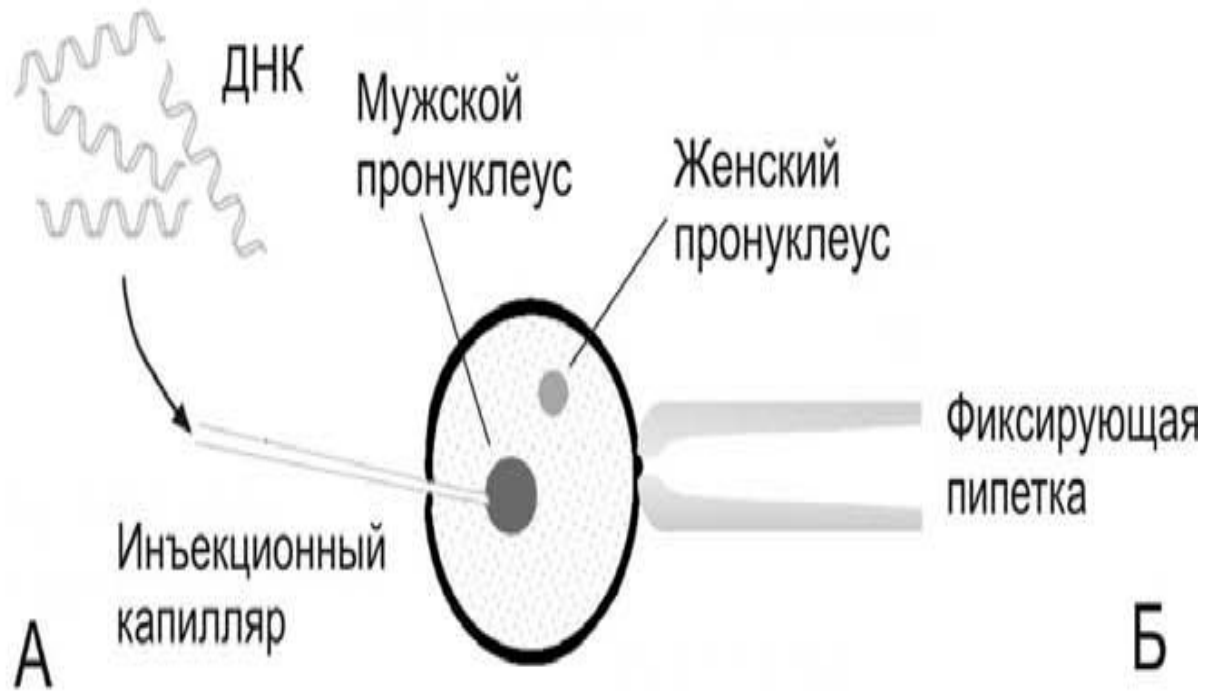
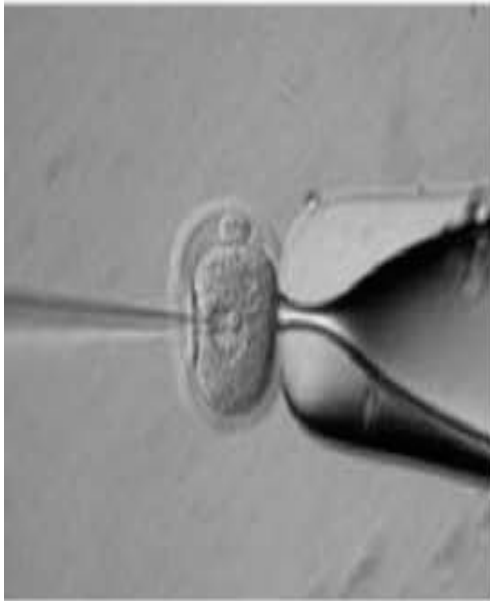
быть эффективным источником выделения ряда вирусных анти-

генов с целью получения вакцин для животных и человека.

В настоящее время разработаны способы введения генов в эмбриональные клетки млекопитающих, мух и некоторых рас-

тений с целью изменения таких свойств организма, как скорость

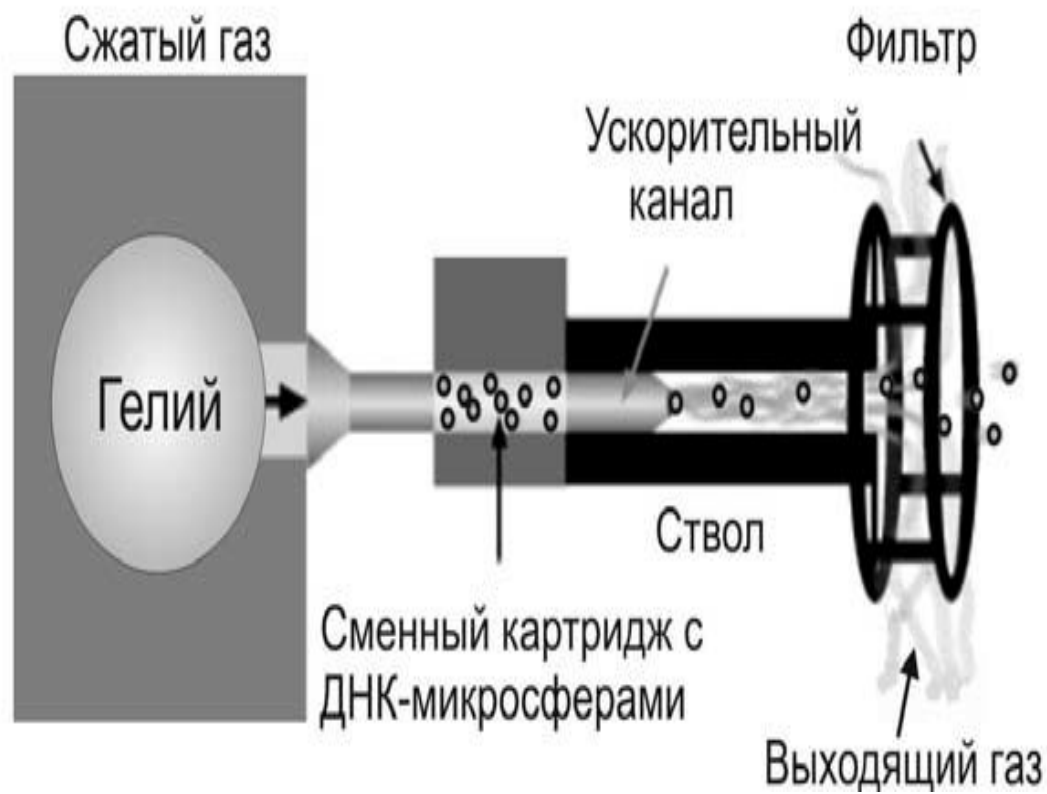
роста, устойчивость к заболеваниям и внешним воздействиям.



Микроинъекцию клонированных генов проводят в один или оба пронуклеуса только что оплодотворенной яйцеклетки. Затем 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 к-ДНК вируса лейкемии мышей. Выживает обычно от 10 до 30% яйцеклеток, а доля мышей, родившихся из трансформированных яйцеклеток, составляет до 40%. Уровень экспрессии чужеродного гена зависит от места интеграции ДНК с хромосомой, от дифференцировки тканей.

Метод биобаллистической трансформации является одним из наиболее эффективных методов трансформации однодольных растений, хотя может быть применим и для двудольных. На мельчайшие частички вольфрама, платины или золота диаметром 0,6-1,2 мкм напыляется ДНК-вектор. Эти частицы помещаются внутрь биобаллистической пушки, а под нее (на расстоянии 10-15 см) ставится в чашке Петри каллус или суспензия клеток с агаризированной средой. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм. В момент сбрасывания давления вольфрамовые или золотые частички с огромной скоростью выбрасываются из пушки и, разрывая клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядро клеток. Центральные клетки, как правило,





# Экспрессия чужеродных генов в геноме эукариот и прокариот

Чтобы ген экспрессировался, вектор должен иметь специфические для данной клетки промотор и терминаторы транскрипции, а также сигнал полиаденилирования, для того, чтобы эукариотическая РНК-полимераза могла транскрибировать бактериальную последовательность (и-РНК), а затем и-РНК связывалась с рибосомами (R-сайт) и транскрибировала бактериальный белок в растительной или животной клетке. Экспрессию трансгенов обеспечивают сильные промоторы. Нужна защита чужого гена от эндонуклеаз, а чужого генного продукта от протеаз. Поэтому используют мутантные штаммы бактерий со сниженной активностью этих ферментов. Гибридные гены создаются также для обеспечения секреции чужеродного генного продукта из клетки. У *E. Coli* эту функцию выполняет мембранный липопротеин.

Наиболее успешно клонирование генов и получение их продуктов осуществляется в *E. coli*. Однако получение продуктов из других групп организмов, особенно эукариот, в клетках *E. coli* ограничено, так как у них отсутствует сплайсинг и не происходит гликолизирование белков (когда молекулы приобретают свои функциональные и антигенные свойства).

У дрожжей *S. cerevisia* есть сплайсинг, но он происходит не совсем так, как у высших эукариот, и гены им нужно вводить без интронов. Существует у дрожжей и гликолизирование, хотя его функция несколько иная.

Удалось ввести ген лейкоцитарного интерферона человека в дрожжи и добиться его экспрессии, но для этого заменили промоторную и лидерную части гена на соответствующие области алкогольдегидрогеназы дрожжей.

Если ген вводят в клетки животных в виде внехромосомных элементов, то он легко элиминировается, поэтому ген необходимо встроить в хромосому. Клетки с «чужими» генами имеют пониженную скорость роста. Это сдерживает работы по генной инженерии.

У животных работают промоторы только 4 генов: металлотioneина, трансферрина, иммуноглобулина и эластазы. Они способны экспрессировать присоединенные к ним гены. Если бактериальные гены трансформированы растениям, то нужно заменить бактериальные промоторы на промоторы растительных генов либо на другие, которые могут инициировать транскрипцию в растительной клетке.

В качестве промотора для экспрессии бактериальных генов наиболее часто используют промотор 35S-РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV), который обеспечивает транскрипцию в геномах как двудольных, так и однодольных растений, и высокий уровень экспрессии гена, находящегося под его контролем. Даже при трансформации растительной клетки растительным геномом часто заменяют его собственный промотор на промотор 35S CaMV как более сильный. Иногда используют искусственно полученный МАС-промотор, который представляет собой удвоенную последовательность 35S CaMV.

В последнее время все большее значение приобретают также специфические промоторы; гены под их контролем экспрессируются только в определенных тканях (например, пантатиновый промотор будет экспрессировать ген только в клубнях картофеля).

В генной инженерии используются индуцибельные промоторы, которые экспрессируют гены только в определенных условиях (при поранении или в присутствии ионов металлов). Недостатком многих тканеспецифических и индуцибельных промоторов

На экспрессию трансгена влияет также место интеграции его в растительный геном. Очень часто т-ДНК встраивается в гетерохроматиновые районы, где экспрессия гена не будет происходить. Ситуацию можно преодолеть только повторными трансформациями.

Для выявления экспрессии чужеродных генов на ранних стадиях получения трансгенных растений используют маркеры экспрессии – репортерные гены, генные продукты которых легко выявляются. Наиболее широко используемый репортерный ген GUS кодирует фермент  $\beta$ -глюконидазу и при добавлении субстрата расщепляет его с получением соединения, окрашенного в ярко-голубой цвет. Другой репортерный ген при экспрессии образует флюоресцирующий белок, который также легко выявляется.

## ГМО-продукты

Что такое генетически измененный (модифицированный) продукт? Это продукт, получаемый из трансгенного организма, когда выделенный в лаборатории ген одного организма пересаживается в клетку другого. Трансгенные продукты произведены на базе растений, животных и микроорганизмов в которых искусственным путем были заменены в молекуле ДНК один или несколько генов. ДНК – носитель генной информации – точно воспроизводится при делении клеток, что обеспечивает в ряду поколений клеток и организмов передачу наследственных признаков и специфических форм обмена веществ.

ГМ-продукты – большой и перспективный бизнес. В мире уже сейчас 60 миллионов гектаров занято под трансгенные культуры. Их выращивают в США, Канаде, Франции, Китае, Южной Африке, Аргентине. Продукты из этих стран ввозятся в Россию и Казахстан – та же соя, соевая мука, кукуруза, картофель и другие. В результате генетической трансформации организм приобретает новые свойства, например, чтобы помидоры и клубника были морозоустойчивее, им "вживляют" гены северных рыб; чтобы соя была гербицидоустойчивой, в нее внедряют гены петунии, а также некоторых бактерий и вирусов. Соя – один из основных компонентов многих кормов для скота и почти 60% продуктов питания. В настоящее время зарегистрировано множество видов продуктов из модифицированной сои, среди которых: фитосыр, смеси функциональные, сухие заменители молока, мороженое "Сойка-1", концентраты соевого белка, соевая мука, модифицированные бобы сои, соевые белковые продукты, соевые питательные напитки, крупка соевая обезжиренная, комплексные пищевые добавки в

Получение трансгенных растений является на данный момент одной из перспективных и наиболее развивающихся направлений агропроизводства. Существуют проблемы, которые не могут быть решены такими традиционными направлениями как селекция, кроме того, что на подобные разработки требуются годы, а иногда и десятилетия. Создание трансгенных растений, обладающих нужными свойствами, требует гораздо меньшего времени и позволяет получать растения с заданными хозяйственно ценными признаками, а также обладающих свойствами, не имеющими аналогов в природе.





Создание трансгенных растений в настоящее время развиваются по следующим направлениям:

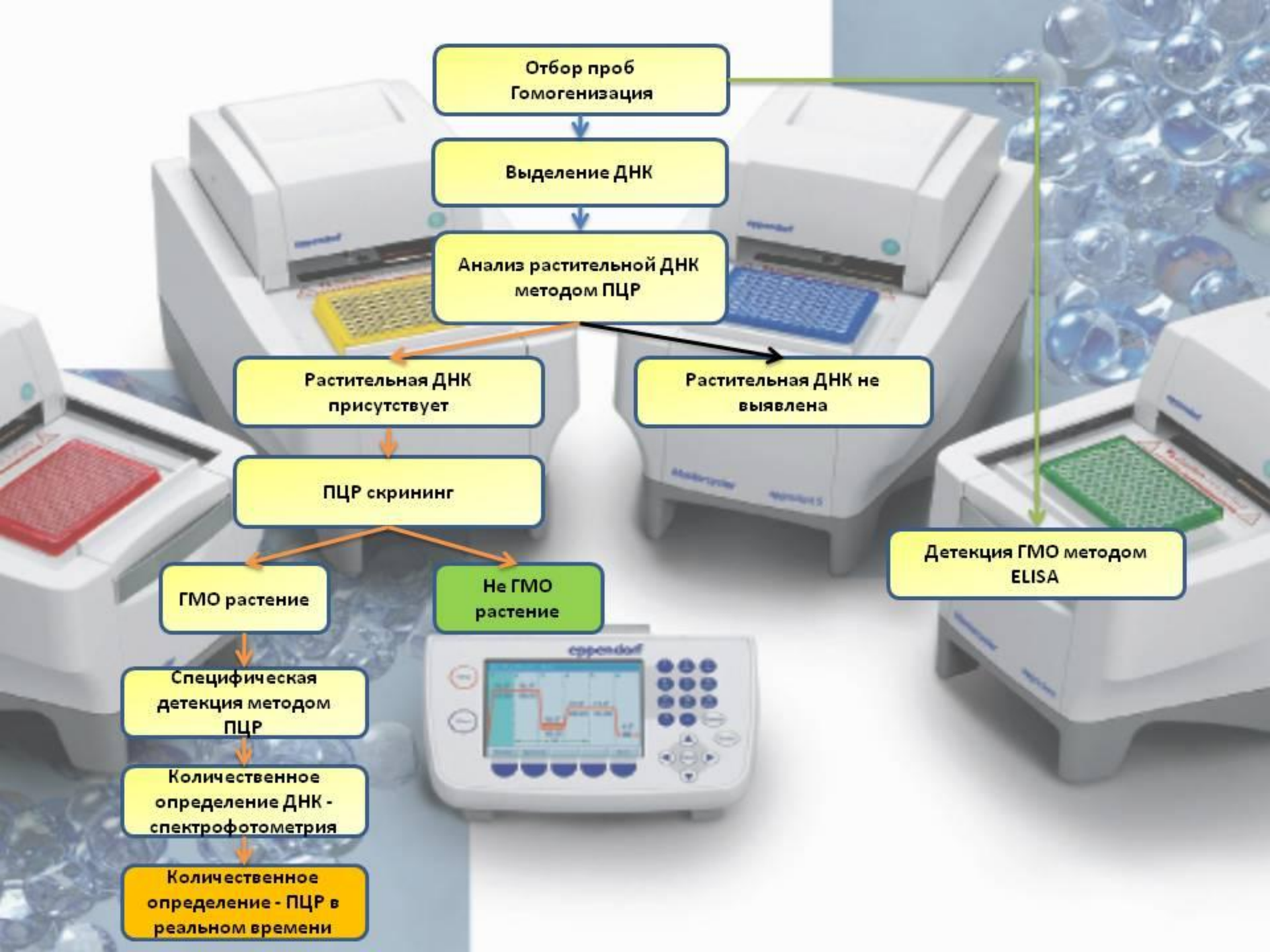
1. Получение сортов сельскохозяйственных культур с более высокой урожайностью.
2. Получение сельскохозяйственных культур, дающих несколько урожаев в год (например, ремонтантные сорта клубники, дающие два урожая за лето).
3. Создание сортов сельскохозяйственных культур, токсичных для некоторых видов вредителей (например, ведутся разработки, направленные на получение сортов картофеля, листья которого являются токсичными для колорадского жука и его личинок).
4. Создание сортов сельскохозяйственных культур, устойчивых к неблагоприятным климатическим условиям (например, были получены устойчивые к засухе трансгенные растения, имеющие в своем геноме ген скорпиона).
5. Создание сортов растений, способных синтезировать некоторые белки животного происхождения (например, в Китае получен сорт табака, синтезирующий лактоферрин человека).

Таким образом, создание трансгенных растений позволяет решить целый комплекс проблем, как агротехнических и продовольственных, так и технологических, фармакологических и т. д. Население земли растет год от года. Некоторые ученые считают, что через 20 лет нам придется кормить на два миллиарда человек больше, чем сейчас, при том, что уже в настоящее время хронически голодают 750 миллионов.

Кроме того, с помощью трансгенных организмов решаются экологические проблемы. К примеру, сейчас уже не используются пестициды и другие виды ядохимикатов, которые нарушали естественный баланс в локальных экосистемах и наносили невосполнимый ущерб окружающей среде

# Скрининг ГМО

Рекомбинантные клоны могут быть идентифицированы по синтезируемому ими продукту. Для полного доказательства присутствия в геноме растений последовательности т-ДНК проводят анализ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и молекулярного анализа, основанного на блотгибридизации хромосомной ДНК трансгенного растения с использованием в качестве радиоактивного зонда фрагменты т-ДНК. Кроме того, проводят дополнительный анализ экспрессии функционального гена методом выявления соответствующей и-РНК или белка.



## Проблемы биобезопасности

Сторонники употребления генетически модифицированных продуктов считают, что они безвредны для человека и даже имеют преимущества. Главный аргумент, который приводят в защиту ученые эксперты всего мира, гласит: “ДНК из генетически модифицированных организмов так же безопасна, как и любая ДНК, присутствующая в пище. Ежедневно вместе с едой мы употребляем чужеродные ДНК, и пока механизмы защиты нашего генетического материала не позволяют в существенной степени влиять на нас”.

Экологические организации (например, "Гринпис"), объединение “Врачи и ученые против генетически модифицированных источников питания” считают, что рано или поздно “пожинать плоды” придется. Причем, возможно, не нам, а нашим детям и даже внукам. Как "чужие", не свойственные традиционным культурам гены повлияют на здоровье и развитие человека? В 1983 году США получили первый трансгенный табак, а широко и активно использовать в пищевой промышленности генно-модифицированное сырье начали всего какие-нибудь пять-шесть лет назад. Что будет через 50 лет, сегодня никто предсказать не в состоянии. Трансгенные продукты поступают в свободную продажу и уже охватывают несколько сотен наименований, хотя созданы они были всего несколько лет назад. Противники трансгенов подвергают сомнению и методы оценки таких продуктов на безопасность. Т.о.вопросов больше, чем ответов.

Чем нам грозят генетически модифицированные продукты питания и сельскохозяйственные культуры и почему необходим глобальный мораторий на их производство?

При наличии минимальных законодательных ограничений или полном их отсутствии, без специальной маркировки и с пренебрежением к установленным наукой правилам, биоинженеры уже создали сотни новых видов продуктов, забыв о рисках для человека и окружающей среды, а также о негативных социально-экономических последствиях для нескольких миллиардов фермеров и сельских поселений во всем мире. В настоящее время в США продается и выращивается около полусотни ГМ-сельскохозяйственных культур и продуктов питания. Отмечается их широкое проникновение в пищевые цепи и окружающую среду в целом. Более 70 млн. акров земли занято в США под трансгенные культуры, свыше 500 тыс. коров молочных пород регулярно получают рекомбинантный гормон роста крупного рогатого скота (rBGH) фирмы Monsanto. Согласно данным самих биотехнологов, в ближайшие 5-10 лет все продукты питания и ткани в США будут содержать генетически измененный материал.

Как указал британский молекулярный биолог доктор Майкл Антониу, манипуляции с генами приводят к "неожиданному появлению токсинов в трансгенных бактериях, дрожжах, растениях и животных, причем это явление остается незамеченным до тех пор, пока не нанесет серьезный ущерб чьему-либо здоровью".

Риск от использования генетически модифицированных продуктов питания и сельскохозяйственных культур можно разделить на три категории: риск для здоровья людей, риск для окружающей среды и социально-экономический риск. Краткий обзор этих рисков, как уже доказанных, так и возможных, предоставляет убедительные аргументы в пользу необходимости глобального моратория на производство трансгенных культур и организмов.

**К пищевым рискам относят: 1)**

Непосредственное действие токсичных и аллергенных трансгенных белков ГМО. 2)

Риски, опосредованные плеiotропным действием трансгенных белков на метаболизм растений. 3) Риски,

опосредованные накоплением гербицидов и их метаболитов в устойчивых сортах и видах сельскохозяйственных растений 4)

Риски горизонтального переноса трансгенных конструкций, в первую очередь в геном симбионтов для человека и животных бактерий

- **Экологические риски:** 1) Снижение сортового разнообразия сельскохозяйственных культур вследствие массового применения ГМО, полученных из ограниченного набора родительских сортов. 2) Неконтролируемый перенос конструкций, особенно определяющих различные типы устойчивости к пестицидам, вредителям и болезням растений, вследствие переопыления с дикорастущими родственными и предковыми видами. 3) В связи с этим снижение биоразнообразия дикорастущих предковых форм культурных растений и формирование «суперсорняков». 4) Риски неконтролируемого горизонтального переноса конструкций в ризосферную микрофлору. 5) Негативное влияние на биоразнообразие через поражение токсичными трансгенными белками нецелевых насекомых и почвенной микрофлоры и нарушении трофических цепей. 6) Риски быстрого появления устойчивости к используемым трансгенным токсинам у насекомых - фитофагов, бактерий, грибов и других вредителей, под действием отбора на признак устойчивости, высокоэффективного для этих организмов. 7) Риски появления новых, более патогенных штаммов фитовирусов, при взаимодействии фитовирусов с трансгенными конструкциями, проявляющими локальную нестабильность в геноме растения - хозяина и тем самым являющимися наиболее вероятной

- **Агротехнические риски:** 1) Риски непредсказуемых изменений нецелевых свойств и признаков модифицированных сортов, связанные с плейотропным действием введенного гена. Например, снижение устойчивости к патогенам при хранении и устойчивости к критическим температурам при вегетации у сортов, устойчивых к насекомым - вредителям. 2) Риски отсроченного изменения свойств, через несколько поколений, связанные с адаптацией нового гена генома и с проявлением как новых плейотропных свойств, так и изменением уже декларированных. 3) Неэффективность трансгенной устойчивости к вредителям через несколько лет массового использования данного сорта. 4) Возможность использования производителями терминальных технологий для монополизации производства семенного материала.
- Риски, связанные с производством БТ продукции, начали обсуждаться в научной литературе с 1983 г. К середине 80 - х г. в развитых странах вырабатывается государственная политика по биотехнологии. Так, например, в США контроль за использованием ГМО находится в юрисдикции трех агентств, американского Агентства по охране окружающей среды, американского Министерства сельского хозяйства, и американского Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов. Существует так же координационный комитет, осуществляющий согласованную работу всех трех ведомств по данному вопросу. В Казахстане закон о Биобезопасности ГМО находится на рассмотрении в правительстве. А проекты по контролю оборота ГМО с участием аналогичных ведомств поступили на рассмотрение Министерств в этом году.



# Токсины ГМО

- ГМ-продукты могут содержать токсины и представлять угрозу для здоровья людей. В 1989 году в результате пищевой добавки L-tryptophan погибло 37 и пострадало (в т.ч. получило пожизненную инвалидность) свыше 5000 человек (у которых было обнаружено болезненное и нередко приводящее к летальному исходу поражение кровеносной системы – эозинофильно-миальгический синдром), прежде чем Служба продовольствия и медикаментов США аннулировала свое разрешение на розничную продажу продукта. Производитель добавки, третья по величине японская химическая компания Showa Denko, на первом этапе, в 1988-1989 годах, использовала для ее изготовления генетически измененную бактерию. По-видимому, бактерия приобрела свои опасные свойства в результате рекомбинации ее ДНК. Showa Denko уже выплатила пострадавшим свыше 2 млрд. долларов США в качестве компенсации.
- В 1999 году британские газеты описали исследования ученого Роуэттовского института доктора Арпада Пуста обнаружившего, что генетически измененный картофель, в ДНК которого были встроены гены подснежника и часто используемого промотора – вируса капустной мозаики, вызывает заболевания молочных желез. Было обнаружено, что "картофель-подснежник" значительно отличается по своему химическому составу от обычного картофеля и поражает жизненно важные органы и иммунную систему у питающихся им лабораторных крыс. Самым тревожным является то, что заболевание у крыс возникло, видимо, под воздействием вирусного промотора, используемого практически во всех генетически модифицированных продуктах.

# Пищевые аллергии

Угрозу массового заболевания, вызванного употреблением в пищу трансгенных продуктов, удалось предотвратить в 1996 году ученым штата Небраска, благодаря тестам на животных обнаружившим, что ген бразильского ореха, введенный в ДНК сои, способен вызвать смертельно опасную аллергию у людей, чувствительных к этому ореху. Люди, страдающие пищевыми аллергиями, последствия которых могут быть самыми различными – от легкого недомогания до внезапной смерти – едва не стали жертвами воздействия чужеродных протеинов, встроенных в ДНК обычных пищевых продуктов. А поскольку многие из этих протеинов никогда не были частью рациона человека, тщательное тестирование на безопасность (включающее в себя длительные исследования на животных и на людях-добровольцах) необходимо для предотвращения опасных ситуаций в будущем.

Обязательная маркировка ГМ-продуктов также необходима, чтобы страдающие пищевыми аллергиями могли избегать таких продуктов и чтобы службы здравоохранения были в состоянии обнаружить источник аллергена в случае возникновения заболеваний, вызванных употреблением генетически модифицированной пищи.