

Генная инженерия растений. Методы получения трансгенных растений устойчивых к различным факторам

1. Этапы получения трансгенных растений

Этапы:

- 1 этап – выбор гена и его клонирование;
- 2 этап – подбор генотипа растения-реципиента;
- 3 этап – создание генной конструкции, содержащей выбранный ген и векторную молекулу-переносчик ДНК;
- 4 этап – перенос векторной молекулы в геном растения с помощью наиболее приемлемого метода;
- 5 этап – регенерация растений из трансформированных клеток и отбор трансгенных растений.

2. Создание конструкций для генетической трансформации растений

Способы:

- 1) выделение либо синтез (химический, ПЦР) целевого гена (анализ его структуры, выделение кодирующей части, удаление ненужных частей);
- 2) присоединение к целевому гену регуляторной части – промотора;

Типы промоторов:

1. Конститутивные:

- для двудольных растений: 35S-промотор вируса мозаичности цветной капусты (CaMV); pos-промотор гена нопалин-синтазы агробактерий;
- для однодольных растений: промотор гена алкогольдегидрогеназы кукурузы (Adh); промотор гена актина 1 риса (Act).

2. Индуцибельные:

- Активируются при определенных условиях: температура, освещение, концентрация фитогормонов, механический стресс (поранение), обработке растений элиситорами.

Например, срезка растений индуцирует экспрессию целевого гена, продукт которого накапливается в собранной биомассе. Трансгенные растения можно выращивать как обычные вплоть до стадии уборки урожая.

Включение маркерных генов, по экспрессии которых можно судить о том, произошло встраивание чужеродного гена в геном реципиента или нет. Основным принципом работы маркеров – способность трансформированных клеток расти на селективной питательной среде с добавкой определенных веществ, ингибирующих рост и деление нетрансформированных, нормальных клеток.

Выделяют маркерные гены, отвечающие за устойчивость к антибиотикам (канамицину, тетрациклину, неомицину и др.), гены, отвечающие за устойчивость к гербицидам.

Включение репортерных генов, экспрессия которых приводит к изменению фенотипа трансгенного растения. Замена селективных генов на репортерные при отборе трансгенных растений исключает возможность

потенциального риска для окружающей среды и здоровья человека. Они позволяют выявлять временные и пространственные особенности экспрессии конкретного гена. Присоединение репортерного гена только к промоторной области позволяет исследовать в «чистом виде» ее роль в регуляции экспрессии изучаемого гена на уровне транскрипции. Репортерные гены кодируют нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано. В качестве репортерных используются гены:

- β -глюкуронидазы (GUS);
- зеленого флюоресцентного белка (GFP);
- люциферазы (LUC);
- хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT).

Наиболее часто используют гены GUS и GFP, в меньшей степени, LUC и CAT.

GUS является модифицированным геном из *E. coli*, кодирующим фермент β -глюкуронидазу, которая гидролизует различные глюкурониды. Позволяет провести гистохимическое окрашивание тканей *in situ* (например, в синий цвет).

GFP (green fluorescent protein) обнаружен у люминесцирующей медузы *Aequorea victoria*. Способен флуоресцировать в видимой (зеленой) области спектра при облучении длинноволновым УФ. Для проявления флуоресценции не требуется субстратов или кофакторов.

LUC кодирует фермент люциферазу (клонирована из бактерий и светлячка). Она вызывает свечение трансформированных клеток.

CAT отвечает за синтез хлорамфениколацетил трансферазы (выделен из *E. coli*). Этот фермент катализирует реакцию переноса ацетильной группы от ацетил-КоА к хлорамфениколу.

Определяется гистохимически, по изменению окраски ткани при добавлении соответствующего субстрата.

3. Методы введения генетического материала в растительные клетки

Встраивание рекомбинантной молекулы ДНК в векторную молекулу-переносчик. Вектор – молекула ДНК, способная к включению чужеродной ДНК и к автономной репликации, служащая инструментом для введения генетической информации в клетку.

Трансформация (трансфекция) – перенос векторной молекулы в геном растения. Непрямой перенос осуществляется с помощью агробактериальной трансформации, вирусной трансформации (трансдукция).

Прямой перенос осуществляется с помощью биобаллистического метода, микроинъекций, электропорации, упаковки в липосомы.

4. Непрямой перенос генетического материала в растительные клетки

Вирусная трансформация растений – это метод введения генетического материала с использованием модифицированных вирусных векторов (на основе вирусов табачной мозаики, мозаики коровьего гороха и др.), обеспечивающий быстрое распространение трансгена, временную (транзистентную) экспрессию, высокую продукцию белков и редактирование генома. Ключевые методы включают агроинфильтрацию (введение вирусов через бактерию) и прямое заражение РНК/ДНК-транскриптами.

Использование вирусных векторов на основе ДНК или РНК:

1. Создание рекомбинантных вирусов, несущих целевой ген, который встраивается в вирусный геном.

2. Применение вирусов, способных к быстрой репликации и системному движению по растению, что позволяет быстро получить экспрессию гена во всем растении (*in planta*).

Методы:

1. Агроинфильтрации (*agroinfiltration*) основан на использовании *Agrobacterium tumefaciens* для доставки вирусных ДНК-векторов (агроинфекция) в клетки листа, что запускает вирусную репликацию.

2. Прямая инокуляция (заражение) основан на введении вирусной РНК или ДНК-транскриптов путем механического повреждения листа (натираание) или использования биолистки.

Конструирование векторных систем на основе T_i-плазмид:

1. Гены биосинтеза ауксинов и цитокининов должны быть удалены, т. к. фитогормоны будут подавлять регенерацию из трансформированных клеток целого растения;

2. Ген опина также должен быть удален, т. к. при его наличии может снижаться биомасса;

3. Участки ДНК, несущественные для клонирующего вектора, должны быть удалены, т. к. T_i-плазида имеет очень большой размер;

4. Необходимо внести сайт инициации репликации, обеспечивающий их поддержание в *E. coli*.

Техника агробактериальной трансформации состоит:

1. Получение штамма бактерии с векторной конструкцией.

2. Перенос стерильных листовых дисков либо других растительных объектов в жидкую среду, содержащую агробактерии.

3. Заражение клеток раневой поверхности эксплантов и встраивание T-ДНК с выбранным геном.

4. Перенос эксплантов на среду с антибиотиком, что приводит к избирательной гибели клеток агробактерий.

5. Культивирование эксплантов в присутствии антибиотика/гербицида для проведения селективного отбора трансформированных клеток.

6. Регенерация растений (рис. 3.1).

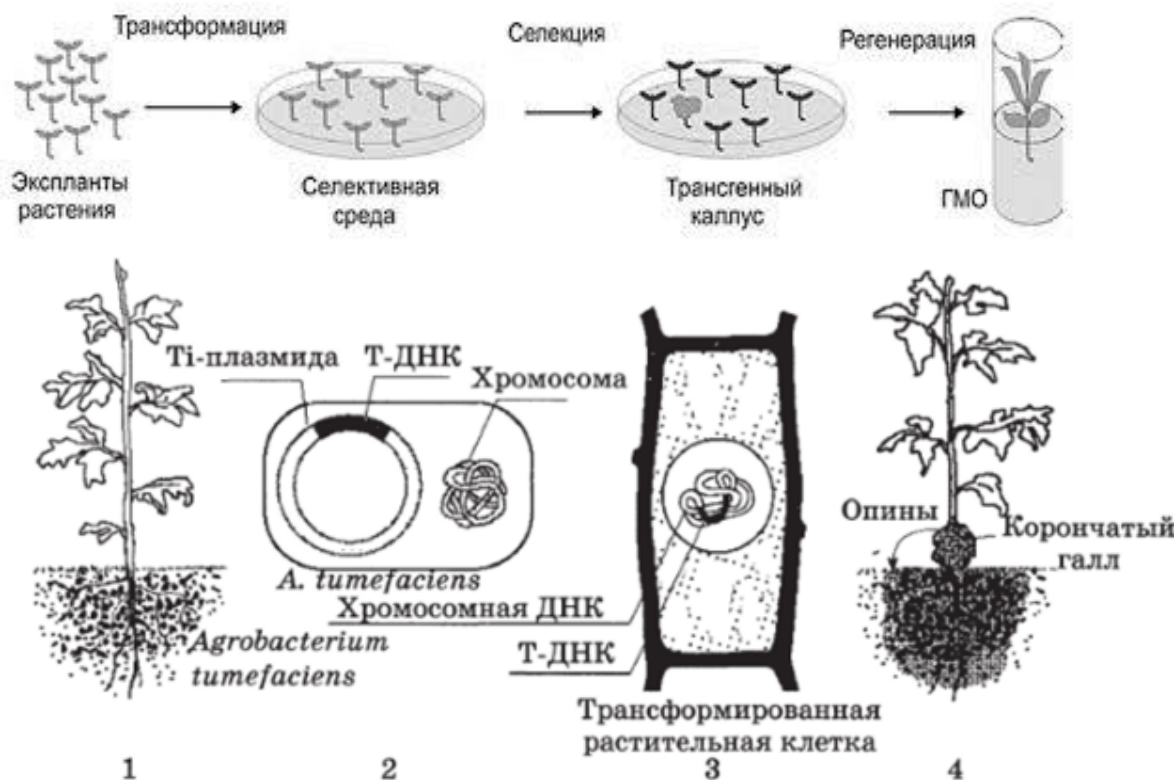


Рисунок 3.1. Использование агробактерии в генной инженерии (создание трансгенных растений): 1 – агробактерии существуют в ризосфере; 2 – строение *A. tumefaciens*; 3 – встраивание Т-ДНК в геном; 4 – образование опухоли

Вирусная трансформация — это процесс изменения генетического аппарата, морфологии и биохимических свойств клетки под воздействием вирусной инфекции.

5. Прямой перенос генетического материала в растительные клетки

Баллистический метод. Его суть заключается в использовании золотых или вольфрамовых сферических частиц диаметром 0,4–1,2 мкм, которыми покрывают ДНК, осажденной хлоридом кальция или ПЭГ, и «выстреливают» ими в клетки из специального «ружья», приводимого в действие сжатым воздухом или гелием. Частицы разгоняются до скорости 300–600 м/с и пробивают клеточную стенку и мембраны растительной клетки. Попав в клетку, ДНК, покрывающая частицы, интегрируется в растительную ДНК. Частота трансформации повышается при использовании линейной, а не кольцевой ДНК. Баллистический метод позволяет встраивать нужные гены не только в хромосомы растений, но и в геном их органелл – пластид.

Метод микроинъекция заключается в непосредственном введении растворов ДНК в клетку или ее ядро с помощью полых стеклянных микроигл. Клетка (протопалст) фиксируется на твердой поверхности. Под визуальным контролем на специальном микроскопе с помощью микроманипулятора производится введение микрокапилляра в ядро. С помощью специальной гидравлической системы через иглу подается от 1 до 5 пиколитров раствора ДНК с концентрацией от 0,1 до 1,0 мкг/мл. Данный метод имеет ограничения:

1. Необходимо закрепление клетки либо протопласта на поверхности стекла;
2. Трудоемкость и сложность используемого оборудования;
3. Наличие высококвалифицированного персонала, осуществляющего микроинъекцию.

Электропорация, метод основан на том, что импульсы высокого напряжения обратимо увеличивают проницаемость биомембран. В среду для электропорации вносят протопласты и необходимые фрагменты ДНК. Через среду пропускают высоковольтные импульсы (напряжение 200–350 В, длительность импульса 54 мс), приводящие к образованию пор (электропробой) в цитоплазматической мембране, время существования и размер которых достаточны, чтобы молекулы ДНК могли из внешней среды войти в протопласт в результате действия осмотических сил. Применима только для растительных протопластов.

Упаковка в липосомы. Данный метод используется для защиты экзогенного генетического материала от разрушающего действия рестриктаз. Липосомы – сферические оболочки, состоящие из фосфолипидов. Получают их путем резкого встряхивания смеси водного раствора и липидов, либо обрабатывая ультразвуком водные эмульсии фосфолипидов. Липосомы, состоящие из фосфатидилсерина и холестерина наиболее пригодны для введения ДНК в клетки животных и растений. Системы переноса с помощью липосом низкотоксичны по отношению к клеткам. Недостатком метода считаются высокие требования к протопластированию протопласты не должны иметь на поверхности даже остатков клеточной стенки. Кроме того, получение липосом несколько усложняет методику в целом.

Преимущества метода трансформации хлоропластов растений заключаются в следующем:

1. Хлоропласты содержат полноценную генетическую систему, сходную с прокариотической;
2. Хлоропласты не переносятся с пылью, следовательно, устраняется опасность распространения трансгенов с пылью;
3. У трансгенных растений, синтезирующих инсектициды, пыльца менее токсична для насекомых, не являющихся мишенью их токсического воздействия;
4. Позволяет получать очень высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков (до 25% от суммарного растворимого клеточного белка), т.к. для генома хлоропластов характерен высокий уровень полиплоидии (10–100 копий на хлоропласт) плюс большое число самих хлоропластов на клетку.