

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ, МОЛОДЕЖИ И СПОРТА  
УКРАИНЫ  
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени В. Н. Каразина**

**ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ**

**Учебное пособие**

**Харьков 2013**

УДК 601:631.52 (057. 8)  
ББК 28.54я73  
Т41

Рецензенты: зав. кафедрой экологии и биотехнологии Харьковского национального аграрного университета им. В. В. Докучаева, член-кор. УААН, доктор с.-х. наук, профессор **В. К. Пузик**; доктор биол. наук, профессор каф. генетики Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина **Л. А. Атраментова**.

Утверждено к печати решением Ученого совета  
Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина  
(протокол № 14 от 27.12.2012.г.)

Т41 Генная инженерия растений : учебное пособие для студентов пятого курса биологического факультета / сост. : В. Ф. Тимошенко, В. В. Жмурко, В. В. Тимошенко. – Х. : ХНУ имени В. Н. Каразина, 2013. – 108 с.

### АНОТАЦИЯ

В учебном пособии «Генная инженерия растений» изложены методы генетического конструирования растений путем соматической гибридизации растительных клеток, слияния субклеточных структур, введения микроорганизмов в растительные клетки, а также трансформация растений с использованием векторов. Освещены способы использования векторов в генной инженерии растений и молекулярные методы доказательства трансгенности растений. Пособие предназначено для студентов – биологов вузов. Может быть полезно для специалистов, работающих в области генетической инженерии растений.

© Харьковский национальный университет  
имени В. Н. Каразина, 2013  
© Тимошенко В. Ф., Жмурко В. В.,  
Тимошенко В. В., сост., 2012  
© Дончик И.Н., макет обложки, 2013

## ВВЕДЕНИЕ

Первые трансгенные растения (растения табака со встроенными генами из микроорганизмов) были получены в 1983 г. Первые успешные полевые испытания трансгенных растений (устойчивые к вирусной инфекции растения табака) были проведены в США уже в 1986 г.

После прохождения всех необходимых тестов на токсичность, аллергенность, мутагенность и т.д. первые трансгенные продукты появились в продаже в США в 1994 г. Это были томаты Flavr Savr с замедленным созреванием, созданные фирмой «Calgen», а также гербицид-устойчивая соя компании «Monsanto». Уже через 1–2 года биотехнологические фирмы поставили на рынок целый ряд генетически измененных растений: томатов, кукурузы, картофеля, табака, сои, рапса, кабачков, редиса, хлопчатника.

В настоящее время получением и испытанием генетически модифицированных растений занимаются сотни коммерческих фирм во всем мире с совокупным капиталом более ста миллиардов долларов. В 1999 г. трансгенные растения были высажены на общей площади порядка 40 млн га, что превышает размеры такой страны, как Великобритания. В США генетически модифицированные растения (GM Crops) составляют сейчас около 50% посевов кукурузы и сои и более 30–40% посевов хлопчатника. Это говорит о том, что генно-инженерная биотехнология растений уже стала важной отраслью производства продовольствия и других полезных продуктов, привлекающей значительные людские ресурсы и финансовые потоки. В ближайшие годы ожидается дальнейшее быстрое увеличение площадей, занятых трансгенными формами культурных растений.

Первая волна трансгенных растений, допущенных для практического применения, содержала дополнительные гены устойчивости (к болезням, гербицидам, вредителям, порче при хранении, стрессам).

Нынешний этап развития генетической инженерии растений получил название «метаболическая инженерия». При этом ставится задача не столько улучшить те или иные имеющиеся качества растения, как при традиционной селекции, сколько научить растение производить совершенно новые соединения, используемые в медицине, химическом производстве и других областях. Этими соединениями могут быть, например, особые жирные кислоты,

полезные белки с высоким содержанием незаменимых аминокислот, модифицированные полисахариды, съедобные вакцины, антитела, интерфероны и другие «лекарственные» белки, новые полимеры, не засоряющие окружающую среду и многое, многое другое. Использование трансгенных растений позволяет наладить масштабное и дешевое производство таких веществ и тем самым сделать их более доступными для широкого потребления.

Практически все генно-инженерные разработки ставят конечной целью решение биотехнологических вопросов. Современная биотехнология – это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения.

Генная инженерия – наука о генетическом конструировании, направленном создании новых форм биологически активных молекул ДНК, генетически новых форм клеток, новых геномов и генетически новых организмов с помощью искусственных приемов переноса генов. В генной инженерии можно выделить два раздела: 1 – клеточная инженерия; 2 – генная инженерия, базирующаяся на использовании векторной ДНК.

## Глава 1. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

В разделе «Клеточная инженерия» показано существование методов, расширяющих арсенал способов гибридизации. Оказалось возможным сливать не только протопласты растений, принадлежащих к разным видам и даже к различным семействам, но и проводить такую гибридизацию, в которой один из компонентов системы слияния – протопласт, а второй – ядро или совокупность генетического материала цитоплазмы клетки.

Большой интерес представляет также рассматриваемая в данном разделе возможность введения в растительную клетку или популяцию растительных клеток микроорганизмов, что позволило бы изучить ряд теоретических вопросов и удешевить процесс культивирования на искусственных питательных средах.

Клеточная инженерия – метод генетического конструирования клеток нового типа, включающий их культивирование *in vitro*, гибридизацию и реконструкцию путем слияния протопластов, субклеточных структур, а также введения в клетки чужеродных органелл и др.

Для клеточной инженерии характерен клеточный уровень генноинженерных манипуляций.

С помощью ферментной обработки удаляют жесткие полисахаридные оболочки, а «голые» клетки (изолированные протопласты), выделенные из родительских организмов, при определенном экспериментальном воздействии, заставляют сливаться друг с другом. Из гибридных клеток, полученных таким путем, в дальнейшем регенерируют целые растения-гибриды.

Парасексуальная гибридизация, т.е. гибридизация соматических клеток, возможна благодаря разработке двух экспериментальных методов, стоящих на стыке физиологии и генетики растений – метода культуры клеток и тканей и метода изолированных протопластов.

Возможности, которые открывает метод культуры клеток и тканей, можно резюмировать следующим образом: разработаны условия и специальные питательные среды, при помещении в которые изолированные от растения

клетки дедифференцируются и начинают жить и размножаться как независимые одноклеточные организмы. При изменении условий культивирования, в частности изменении состава фитогормонов в питательной среде, клетки можно вернуть к организованному росту и получить целое растение.

Гибридизация с помощью слияния соматических клеток растения является примером, сходным с гибридизацией соматических клеток животных. Имеется, однако, одно фундаментальное различие: метод гибридизации соматических клеток животных позволяет получить гибридную клетку, в то время как слияния протопластов соматических растительных клеток приводит во многих случаях к получению гибридного растения. Благодаря указанному обстоятельству парасексуальная гибридизация является не только новым инструментом генетического анализа, но и может дополнить арсенал приемов практической селекции промышленных сортов сельскохозяйственных растений. Необходимость разработки нового способа гибридизации диктуется тем, что половое скрещивание представляет собой строго регламентированную систему скрещивания: в качестве родительских форм можно использовать определенные организмы в определенном состоянии. Результатом такой гибридизации являются потомки с вполне определенным набором генов. Следовательно, теоретически парасексуальная гибридизация представляет интерес в том случае, если с помощью этого метода окажется возможным:

- 1) скрещивать филогенетически отдаленные виды, которые невозможно скрестить половым путем;
- 2) получать ассиметричные гибриды, несущие весь генный набор одного из родителей наряду с несколькими хромосомами (или несколькими генами, или даже только цитоплазмой) другого;
- 3) создать систему гибридизации, включающую одновременное слияние трех и более родительских клеток;
- 4) получать гибриды, включающие сумму генотипов родителей.

## растительной клетки

Методы гибридизации, основанные на явлении индуцированного слияния соматических клеток, уже в течение 4 десятилетий успешно применяются в генной инженерии животных клеток. При использовании аналогичных приемов для растительной клетки основным препятствием долго было наличие жесткой целлюлозной оболочки, которая полностью исключала возможность слияния. Хотя голые протопласты механическим путем научились выделять еще в конце 19 века, развитие метода изолирования протопластов началось лишь с появлением энзиматических приемов выделения больших количеств «голых» протопластов.

В качестве исходного материала, как правило, используются клетки мезофилла листа либо протопласты каллусных тканей.

Слияние протопластов, выделенных механически, наблюдал еще Клостер в 1909 году. Индуцированного слияния добились впервые сотрудники Кокинга, используя в качестве индуктора слияния нитрат натрия. Разработанная ими методика малоэффективна и сейчас имеет лишь историческое значение. Впоследствии велись широкие исследования – поиски эффективного «фюзогена» (индуктора слияния). Была предложена обработка желатиной, раствором белка конвалина, относящегося к лектинам, изучались различные солевые растворы. В итоге, в качестве фюзогена стали использовать растворы с

*Каллус – недифференцированная ткань у растений, которая в естественных условиях развивается на раневых поверхностях, а в экспериментальных образует при культивировании in vitro кусочков ткани растений на специальных средах.*

высоким рН (9–11) и высокой концентрацией ионов  $Ca^{+2}$ . При этом протопласты предварительно агглютинируют, т.е. склеивают, с помощью концентрированных растворов полиэтиленгликоля (ПЭГ, молекулярная масса 1500–6000) либо путем центрифугирования. Методика ПЭГ – высокое рН и высокая концентрация  $Ca^{+2}$  хорошо зарекомендовала себя. Используя эту обработку, удается вовлечь в слияние 10–50% клеток. Увеличения эффективности слияния можно достичь, используя диметилсульфоксид

(ДМСО) в сочетании со щелочной средой и  $\text{Ca}^{+2}$ .

К основным недостаткам этого метода следует отнести высокую повреждаемость клеток (чем выше сливаемость, тем выше повреждаемость) и частое образование многоядерных продуктов слияния, которые в большинстве случаев нежизнеспособны.

Частота слияния протопластов меньше зависит от видовой принадлежности компонентов системы. Значительно большее влияние на процесс слияния оказывают, помимо внешних факторов, особенности ультраструктуры клеток данной ткани. Так, меристематические и каллусные протопласты очень легко заставить слиться. Значительно менее эффективно идет слияние вакуолизированных клеток, а также клеток с развитыми хлоропластами.

Остановимся бегло на нескольких процедурах методики слияния, чтобы иметь представление о способе получения гибридной клетки. Наиболее широко применяемой методикой является методика Као (1977). Суспензии протопластов двух родителей наносят в виде капель на стеклянную поверхность, оставляют в течение 5–15 минут для осаждения и наносят раствор ПЭГ из расчета 3 капли раствора на одну каплю суспензии клеток. Раствор ПЭГ готовят, добавляя 1г ПЭГ (мол. масса 1540 к 2 мл раствора, содержащего 0,1 М глюкозы, 10,5 Мм  $\text{CaCl}_2$  и 0,7 Мм  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 5,5). Спустя 10–15 мин. к препарату добавляют 0,5 мл раствора с высоким рН (10,5, а в ряде работ 10) и высоким (70 Мм, а в ряде работ 50–100 Мм) содержанием  $\text{Ca}^{+2}$ , обычно в виде хлоридной соли. Процедуру повторяют через 15 мин. Еще через 15 минут протопласты отмывают с интервалом в 5 минут осторожным отстаиванием раствора и добавлением питательной среды, общий объем среды для отмывки 15–20 мл. Протопласты культивируют в тонком слое, приблизительно в 0,5 мл, питательной среды.

При такой обработке сливаются от 10 до 50% клеток. Протопласты каллуса лучше сливаются, чем клетки мезофилла, а клетки табака эффективнее сливаются, чем клетки картофеля, моркови.

В ряде случаев обработка приводит к гибели почти всех не слившихся

протопластов. Критическими параметрами, определяющими эффективность слияния, является длительность воздействия раствора «высокое содержание  $\text{Ca}^{+2}$  и высокое рН». При слишком длительной обработке клетки не выживут, а недостаточная обработка не обеспечивает слияния. Оптимальные параметры подбираются экспериментальным путем и могут резко меняться даже в зависимости от окружающей температуры.

Одним из критериев, характеризующих эффективность метода индукции слияния, является «эффективность слияния», которая определяется как отношение количества ядер, находящихся в продуктах слияния к общему их количеству.

Для изучения механизма слияния протопластов необходим анализ общих черт в действии индукторов слияния. При слиянии можно выделить два процесса: адгезию протопластов и собственно слияние их мембран. Адгезия (от лат. *adhaesio* – прилипание), слипание поверхностей двух разнородных твердых или жидких тел, в данном случае – протопластов. Адгезия – следствие определенных свойств поверхности протопласта. Она редко наблюдается, если протопласты суспендированы в растворе не электролитического осмотика, такого, например, как маннит или сахароза, без добавления катионов. Этот факт свидетельствует о том, что поведение протопластов в растворе определяется электрокинетическими свойствами его поверхности. Заряженное состояние клеточной поверхности экспериментально можно определить путем электрофореза клеток. Зная передвижение в электрическом поле определенной напряженности можно определить электрокинетический потенциал клеточной поверхности. Например, потенциал клеток табака от 25 до 35 мВ.

Среды с высоким рН и высоким содержанием  $\text{Ca}^{+2}$  вызывают снижение поверхностного потенциала, что, видимо, связано с нейтрализацией поверхностного заряда. Это ослабляет силы отталкивания отрицательных зарядов поверхности клеток и происходит их агрегация. Агрегация клеток – слипание клеток в многоклеточное образование – агрегат, в данном случае используется как синоним термина адгезия.

В настоящее время нет экспериментальных доказательств снижения

поверхностного потенциала под действием ПЭГ, т.к. большая вязкость его раствора затрудняет проведение электрофореза. Однако на искусственных мембранах показано уменьшение поверхностного заряда под действием ПЭГ.

Агрегация под действием ПЭГ в отличие от  $\text{Ca}^{+2}$  практически необратима. Считается, что это связано с дегидратацией поверхности клеточных мембран, приводящей к тесному контакту между мембранами в агрегате.

Поверхностный заряд не следует путать с мембранным потенциалом. Первый создается за счет фиксированных зарядов мембраны, в то время как мембранный потенциал – результат трансмембранного переноса ионов.

Процесс слияния клеток общий для животных, растительных клеток и микроорганизмов. Показано, что слияние мембран, следующее за адгезией клеток, является результатом увеличения их текучести.

В условиях высокого рН и высокой концентрации  $\text{Ca}^{+2}$  у растительных протопластов происходит такое увеличение текучести. ПЭГ не вызывает увеличения текучести мембран и, соответственно, слияние происходит только лишь после отмывания от ПЭГ средой с высоким рН и высоким содержанием  $\text{Ca}^{+2}$ .

Электронномикроскопические исследования показывают, что слияние происходит в местах, свободных от внутремембранных белковых частиц. Эти участки имеют липидную природу и образовались, по-видимому, в результате отделения белковой фазы мембран от липидной вследствие воздействия высокого рН и высокой концентрации  $\text{Ca}^{+2}$ .

### **Слияние субпротопластов**

Проводятся исследования возможности слияния не целых протопластов, а такой реконструкции клетки, когда в качестве одного или обоих родителей используются субпротопласты: нуклеопласты (содержащие ядро, окруженное узкой каемкой цитоплазмы) или цитопласты – совокупность генетического материала цитоплазмы клетки. Проблемы, стоящие на этом пути, в настоящее время сводятся к отсутствию подходящих методик фрагментации и выделения больших гомогенных популяций интактных клеточных фрагментов.

Описан метод получения ядерных субпротопластов, содержащих немного цитоплазмы. Метод заключается в обработке цитохалазином В (50 мг/мл) и центрифугировании 40000g через слой 1,5 М сорбитола содержащего 50 мг/л цитохалазина В при 37°C. Такие субпротопласты называют еще минипротопласты. Были получены жизнеспособные гибридные клетки в результате слияния минипротопластов с протопластами из двух линий табака. Для получения субпротопластов проводят центрифугирование протопластов в растворах с непрерывным градиентом плотности. Градиент образуется за счет коллоидного силикагеля, в состав которого входит CaCl<sub>2</sub>. При этом из суспензии каллусных протопластов кукурузы, табака и белены удастся получить фракции цитопластов, содержащих не более 4% примесей ядерных протопластов. Пока имеется единичные работы по успешному применению цитопластов.

*Цитохалазин В (алкалоид из грибов) при добавлении к эукариотическим клеткам резко повышает проницаемость их мембран.*

### **Модификация клеток при поглощении протопластами изолированных клеточных органелл**

Изолированные протопласты способны поглощать из окружающей среды макромолекулы и частицы. Согласно концепции Коккина, поглощение имеет место вследствие эндоцитоза, который может быть усилен внешними воздействиями. Другие авторы акцентируют внимание на возможности пассивного проникновения через разрывы плазмалеммы, которые всегда имеют место на поверхности свежеизолированных протопластов.

Разработано несколько способов индукции поглощения органелл протопластами, в том числе:

- обработка органелл модификаторами мембран (лизоцим, NaNO<sub>3</sub>), в сочетании с центрифугированием;
- агглютинация смеси протопластов и изолированных органелл ПЭГ с одновременным центрифугированием.

Эффективность метода зависит от числа клеток и органелл и может, судя

по данным световой микроскопии, быть довольно высокой. Так, эффективность пересадки ядер может достигать 20%, а хлоропластов 25%, причем поглощение происходит в 0,5% клеток-реципиентов.

Электронномикроскопическое исследование показало, что большая часть поглощенных хлоропластов не имели внешней оболочки и попали, видимо, в протопласты благодаря слиянию внешней оболочки хлоропласта и плазмалеммы.

В последнее время на животных клетках достигнуты значительные успехи в исследовании по пересадке изолированных метафазных хромосом. Применение подобного метода в отношении растительных клеток затруднено тем обстоятельством, что популяция растительных клеток с трудом поддается синхронизации фаз деления, что является необходимой предпосылкой выделения больших количеств изолированных хромосом. Обычными методами синхронизации деления клеток являются голодание (лишение ауксина, цитокинина, фосфата) или временное угнетение синтеза ДНК, что позволяет достичь частичной синхронизации. В литературе есть единичные сообщения о пересадке метафазных хромосом в растительные протопласты.

Дальнейшие исследования с целью разработки методов трансплантации органелл должны быть направлены на решение следующих вопросов.

1) По имеющимся данным изолированные органеллы чрезвычайно легко разрушаются при обработках индуцирующими поглощение веществами, в частности, пластиды при этом теряют структурную целостность. Поэтому имеет смысл разработать условия лучшей сохранности органелл, возможно, путем заключения их в липосомные частицы, как это делают с макромолекулами.

2) Все еще отсутствуют эффективные методы селекции для обнаружения реконструированных клеток в генетическом эксперименте. В случае пересадки пластид эти методы могли бы быть основаны на использовании внеядерных мутаций устойчивости к антибиотикам.

3) Совершенствовать методы выделения и фракционирования органелл растительной клетки.

## Генетическая изменчивость растительных клеток в связи с манипуляциями *in vitro*

Генетическая гетерогенность, характерная для большинства культур клеток растений, сильно затрудняет использование этих объектов в генетических исследованиях. Литературные данные о генетической гетерогенности растительных клеток в культуре можно резюмировать следующим образом.

1) В популяциях культивируемых штаммов клеток анеуплоидные (потерявшие одну хромосому), диплоидные и полиплоидные клетки обнаруживаются в начале культивирования. Процесс культивирования связан с постоянным, более (во время первых делений) или менее (впоследствии) быстрым качественным изменением числа хромосом в клетках популяции.

2) Поскольку процесс культивирования связан с изменением количества хромосом, анеуплоидные и полиплоидные клетки в длительнокультивируемых штаммах составляют значительную долю. Показано, что доля полиплоидных клеток находится в зависимости от баланса фитогормонов. Хромосомная

изменчивость является также и функцией генотипа.

*Клон – популяция клеток, образованная в результате бесполого размножения одной предковой клетки.*

*Протоклон – группа клеток, образовавшаяся из единственного протопласта.*

3) Таким образом, растения, полученные путем регенерации из культивируемых клеток, могут быть диплоидными, полиплоидными и анеуплоидными.

Из сказанного ясно, что понятие «клон клеток» в культуре тканей сохраняя физический смысл (происхождение от одной клетки), не всегда сохраняет смысл генетический (из-за высоких темпов хромосомной изменчивости).

Что касается растений полученных из изолированных протопластов, то они вполне жизнеспособны и часто не имеют заметных морфологических отклонений по сравнению с родительскими формами. Характерным изменением таких растений является увеличение их ploidy.

## Селекция мутантов

Широкие перспективы в генной инженерии открывает использование мутантов.

*Мутаген – физический или химический агент, увеличивающий частоту мутаций по сравнению со спонтанным уровнем.*

Миллионы и миллиарды клеток легко подвергаются действию мутагенов, которые затем можно поместить в селективные условия. Ранее всякую вариабельность (которая очень характерна для культуры клеток) объясняли одной и той же причиной – изменением числа хромосом. Действительно, анеуплоидные и полиплоидные формы составляют значительную часть популяции культуры клеток. Однако возникает все возрастающее количество работ, результаты которых не укладываются в представления об изменчивости в культуре лишь за счет изменений числа хромосом. Например, известно, что 1–2% растений картофеля, возникших из протопластов, намного более устойчивы к фитофторозу. Было также показано, что 13% растений-регенерантов из различных протоклонов (исходным материалом для которых служит мезофильные протопласты табака) были не восприимчивы к фитофторе. Большинство исследователей полагает, что генетическое варьирование является фундаментальным явлением, которое не находит полного объяснения в терминах традиционных представлений об изменчивости числа хромосом. Часто упоминаются криптические (т.е. незаметные при цитогенетическом анализе) хромосомные перестройки: перемещение подвижных генетических элементов, генные перестройки в связи с дифференцировкой, умножение или редукция числа копий гена и соматический кроссинговер.

*Соматический кроссинговер – это обмен между хроматидами гомологичных хромосом соматических клеток, в результате которого наблюдается комбинативная изменчивость, подобная той, которая регулярно генерируется мейозом.*

Анализ изменчивости в культуре клеток еще более усложняется, если принять во внимание, что изменчивость эукариотических клеток может иметь не только генетическую, но

и эпигенетическую природу. Эпигенетические изменения являются результатом взаимодействия между генами и средой их функционирования. Важно знать в какой мере наследственные изменения являются результатом собственно мутационных событий, а в какой мере они возникают вследствие изменения действия генов, т.е. эпигенетических изменений.

Для обозначения клеток с фенотипическими изменениями из осторожности часто используют термины «клеточные варианты», «вариантные линии». Этими терминами обозначают клетки, которые отличаются от стандартного или дикого типа клеток по одному или нескольким фенотипическим признакам. Для выяснения, имеет ли исследователь дело с мутацией или с эпигенетическим изменением, используют следующие критерии: 1) случайность возникновения клеточных вариантов; 2) сохранение стабильного фенотипа при отсутствии селекции; 3) была ли индукция с помощью мутагенов; 4) изменение активности и других свойств продукта гена; 5) межклеточную комплементацию; 6) локализацию гена и др.

*Комплементация в генетике, дополняюще друг друга действие двух форм (аллелей) одного гена или разных генов одного хромосомного набора. Межклеточная комплементация связана с синтезом у гетерозигот двух разных, но близких по своим функциям белковых молекул вместо одной у каждой из гомозигот.*

Назовем некоторые из изученных вариантных линий.

*Устойчивость к антибиотикам.*

Устойчивость к стрептомицину – ингибитору белкового синтеза на 70 S рибосомах. Клеточные линии, устойчивые к стрептомицину были выделены у табака и картофеля. Резистентность определялась по способностям клеток расти и зеленеть на

среде со стрептомицином. Были регенерированы целые растения. Признак наследовался по материнской линии, значит, мутации затрагивают пластом. Частота мутаций устойчивости к стрептомицину одна на  $10^6$  клеток.

Обнаружены линии табака, устойчивые к хлорамфениколу, другому антибиотику биосинтеза на 70 S рибосомах. Устойчивость обнаруживалась после регенерации растений и возврату к каллусным тканям, значит возникновение устойчивости – результат эпигенетических изменений.

Устойчивость к циклогексимиду – ингибитору белкового синтеза на 80 S рибосомах была обнаружена у линий табака и моркови. Устойчивость была связана с определенным состоянием дифференцировки и не наследовалась в половом процессе; в основе видимо лежала способность клеток в определенных эпигенетических состояниях биологически инактивировать антибиотик.

*Пигментные мутации.* Они относятся к наиболее обнаруживаемым. Индукция хлорофилл-дефектности и недостатка антоцианов у растений табака была получена при облучении пыльников  $\gamma$ -лучами. Аналогичные варианты были получены у регенерантов из каллусных клеток табака, где использовались химические мутагены. Изучали появление пигментных мутантов у клонов табака из мезофильных гаплоидных протопластов, облученных  $\gamma$ -лучами. Частота мутации увеличивалась пропорционально от  $5,7 \cdot 10^{-5}$  до  $8 \cdot 10^{-3}$  Дж. Было установлено, что это рецессивные менделевские признаки. Большинство пигментных мутантов способны расти в асептических условиях за счет гетеротрофного питания, поэтому они классифицируются как условно летальные.

*Устойчивость к засолению.* Клеточные клоны, способные расти на средах, содержащих 0,16–2% NaCl, были отобраны у табака, перца, белены, риса, люцерны, апельсина. Клеточные варианты сохраняют устойчивость при выращивании *in vitro* в течение нескольких поколений в отсутствие хлорида натрия. Растения были регенерированы из клеток табака и белены, и было обнаружено, что признак сохранялся в цикле каллус – растение – каллус. Генетический анализ не проводился.

*Устойчивость к низким температурам.* Устойчивые клетки табака и перца были выделены на основе способности восстанавливать рост при 25°C после выдерживания в течение нескольких дней при –3 и +5°C соответственно. Линии были стабильными при выращивании в культуре. Растения были регенерированы из клеток табака с меньшей устойчивостью и среди потомков устойчивых растений не наблюдалось.

*Устойчивость к металлам.* Клеточные линии томата и перца с устойчивостью к алюминию и петунии, резистентные к хлориду ртути,

представляют собой случаи, когда токсичные ионы поглощаются вариантными клетками в такой же степени, как и клетками дикого типа. Из клеток петунии были регенерированы растения с повышенной стойкостью к хлориду ртути.

*Устойчивость к гербицидам.* Устойчивые к пиклораму (4-амино-3,5,6-трихлоропиколиновой кислоте) клетки были отобраны у табака путем их культивирования в присутствии  $5 \cdot 10^{-4}$  М гербицида. Изменения возникали примерно с частотой  $2 \cdot 10^{-5}$ . Из семи линий удалось регенерировать растения со стабильным признаком устойчивости.

Выделены линии клеток томата устойчивые к параквату (1,1'-диметил-4,4'-дипиридилхлорид). Устойчивость возникла с частотой  $5 \cdot 10^{-8}$ . Из клеток ряда линий получены диплоидные растения. Изменения, обеспечивающие устойчивость к пиклораму и параквату, отнесены к ядерным мутациям.

Среди других упоминаемых в литературе клеточных линий с устойчивостью к гербицидам были обнаружены клеточные варианты резистентные к 2,4 Д (2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоте) у моркови, апельсина, лотоса.

Есть множество других клеточных вариантов с устойчивостью к неблагоприятным факторам среды.

### **Сохранение вариантных клеточных линий**

Чтобы сохранить клеточные линии, несущие определенные изменения, исследователи либо выращивали клетки в соответствующих питательных средах, время от времени проверяя их рост в присутствии селективного агента, либо регенерировали растения из мутантных клеток и поддерживали мутации в виде вегетативно-размножаемых стеблей или в виде семян. Однако все авторы согласны с тем, что лишь последний способ хранения является удовлетворительным, поскольку неорганизованный рост клеток *in vitro* неминуемо сопровождается накоплением различных наследственных изменений, и, кроме того, длительное культивирование приводит к потере морфогенетических потенций клеток.

После слияния клеток или протопластов, или поглощения органоидов, макромолекул, необходимо отделить трансформированные продукты. Селекция может применяться на клеточном уровне, либо на стадии регенерации растений.

### **Селекция продуктов гибридизации**

Селекция проводится методами генетической, физиологической комплементации, механической изоляции.

*Генетическая комплементация.* Это взаимодействие двух различных рецессивных мутаций, приводящее к формированию нормального, «дикого» или близкого к нему фенотипа. Примером такого метода может служить слияние клеток двух линий с различными рецессивными мутациями вызывающими хлорофильную недостаточность. Растения, гомозиготные по любому из этих генов, выращиваемые при интенсивном освещении, обесцвечиваются и гибнут. После слияния клеток, проводили регенерацию стеблей и выдерживали при непрерывном освещении. Предположительные гибриды обнаружались как уцелевшие растения.

Хлорофильные мутации относятся к наиболее распространенным у высших растений, поэтому использование генетической комплементации на их основе представляет собой один из наиболее надежных и простых путей получения парасексуальных гибридов. Недостаток в том, что стадия отбора отодвигается на этап регенерации.

*Физиологическая комплементация.* Термин физиологическая комплементация определяется как способность гибридных клеток жить и размножаться либо переходить к организменному росту в условиях культуры, при которых родительские клетки этого делать не в состоянии, причем неспособность родителей не связана с какой-либо определенной мутацией, а в ряде случаев является нормальной реакцией на внешние условия.

Один из методов физиологической комплементации предложил Кокинг. Сущность метода заключается в том, что вначале проводилось изучение альтернативных условий культуры, пригодных для роста клеток одного из

партнеров для слияния, но не пригодных для другого. Смешанную суспензию клеток после слияния помещают сначала в питательные среды, в которых, вследствие неспособности размножаться, элиминируют клетки одного из родителей, а затем переводят в условия, вызывающие аналогичную элиминацию клеток другого родителя. Развитию этого направления должен способствовать тот факт, что у гибридов часто наблюдается явление, подобное гетерозису, т.е. они делятся и растут значительно активнее, чем родительские.

*Механическая изоляция.* Сущность метода заключается в том, что используя морфологически различные типы клеток родителей, после слияния продукты соединившихся протопластов обнаруживают визуально под микроскопом, после чего их изолируют микропипеткой и продолжают культивировать.

Селекция гибридных клеток с помощью механической изоляции и индивидуального культивирования является в то же время и методом клонирования, поскольку мы имеем дело с клонами, возникшими в результате отдельных случаев гибридизации.

Этот метод удобен и тем, что не связан с использованием мутантов или предварительных исследований условий культивирования.

### **Методы анализа гибридов**

При слиянии система состоит из многих протопластов ( $10^3$ – $10^7$  клеток). В ней могут возникать нежелательные изменения – полиплоидия, т.е. кратное увеличение числа хромосом, а также генные, хромосомные мутации. Необходимо исключить случаи химерности, когда растения фенотипически имитируют то, чего хочет достичь исследователь в генетическом смысле. Для анализа полученных форм существует ряд методов, в том числе гибридологический анализ, цитогенетическое изучение, биохимические методы.

*Гибридологический анализ* – это метод, при котором проводят точный статистический учет распределения по фенотипическим классам потомков, полученных от скрещивания специально подобранных родительских форм. Это

используется в последующих экспериментах для определения генетической структуры родителей и их потомков. Если парасексуальные гибриды получены при использовании рецессивных мутантов, то при их самоопылении мутации должны выщепляться фенотипически. Это позволяет отделить гибриды.

*Цитогенетическое изучение.* Сюда входит изучение числа и морфологии хромосом гибридов, прежде всего в том случае, когда хромосомы исходных родительских клеток различаются между собой. Информация относительно числа хромосом у внутривидовых гибридов позволяет делать предположения о гибридности по ядру, однако эти методы не достаточно надежны из-за высоких темпов мутации в культуре. Такой анализ может вполне корректно исключить гибридность по ядру, например у цитоплазматических гетерозигот. Изучение размера и морфологии хромосом при анализе гибридов эффективно при дальнородственных комбинациях.

*Биохимические методы.* Проводится изучение множественных молекулярных форм ферментов. Широко используется электрофорез, определение активности ферментов. Сравнение электрофореграмм и активности энзимов может позволить установить наличие родительских генов. Так, анализ ключевого фермента фотосинтеза рибулозобисфосфаткарбоксилазы (РБФК) позволяет получить информацию одновременно о судьбе как ядерных, так и внеядерных генов в процессе гибридизации, поскольку большие субъединицы РБФК кодируются хлоропластной, а малые – ядерной ДНК. С помощью специальных приборов секвинаторов определяется нуклеотидная последовательность ДНК. Наличие тех или иных генов в изучаемой ДНК можно обнаружить с помощью гибридизации. Для этого анализируемую ДНК гибридизуют с радиоактивным фрагментом ДНК зондом, содержащим искомый ген. Если в анализируемой ДНК присутствует искомый ген, то на ней происходит связывание радиоактивного зонда. После отмывки не связавшегося зонда анализируемую ДНК проверяют на радиоактивность. Подробнее о гибридизационных методах анализа ДНК будет рассказано в 3-й главе.

## Судьба родительских геномов после гибридизации

Результаты проведенных исследований не позволяют с полной категоричностью интерпретировать генетические процессы, происходящие в цитоплазме при слиянии клеток. Сложность задачи обусловлена слабой изученностью внеядерных генов, а также сложностью цитоплазмона у высших растений. Считается, что оба генофора: пластидный и митохондриальный представляют кольцевые ДНК с молекулярной массой  $0,4-0,9 \cdot 10^8$  Д и кодирующей емкостью 150–300 полипептидов. Оба представлены

несколькими копиями в расчете на одну органеллу и имеют свои собственные аппараты репликации, т.е. они полуавтономны. Однако их автономия ограничена и подвержена строгому контролю генома. В опытах Глебы, Сытника и др. показано, что с помощью слияния протопластов возможно получение цитоплазматических гетерозигот гибридных растений, несущих внеядерные гены от обоих родителей. Вместе с тем в системе одновременно могут происходить: селективная элиминация генофоров, мутационная изменчивость,

генетическая рекомбинация. В качестве иллюстрации можно привести результаты исследований Глебы и Сытника. Одной из родительских пар был сорт табака Самсун у которого клетки хлорофиллдефектны. Другой родительской парой был нормальный в отношении фотосинтетического аппарата *Nicotiana tabacum*, имеющий пластиды дикого типа.

После слияния протопластов провели анализ гибридных клеток и регенерантов из них. Как и следовало ожидать в случае пластидной химерности, т.е. цитоплазматической генетической гетерогенности среди регенерантов, наряду с белыми и зелеными были обнаружены пестролистные растения.

Генетическая рекомбинация – комбинация генов у потомков, отличающаяся от комбинации у их родителей. Это может быть связано с обменом последовательностей ДНК между хромосомами.

Были получены и более строгие доказательства биохимическим анализом. Авторы пришли к заключению, что полученные растения действительно являются гетерозиготными по некоторым внеядерным генам. В частности биохимический анализ полипептидов рибулозобисфосфаткарбоксилазы пестролистных растений показал, что эти формы гетерозиготны по генам, кодирующим строение малых субъединиц РБФК.

Указанная гетерозиготность продуктов слияния протопластов является следствием двуродительского наследования внеядерных генов. Одновременно, полученные растения унаследовали определяемый также внеядерными генами признак мужской стерильности только от одного из родителей, т.е. в отношении этих внеядерных генов имеет место одnorodительское наследование. Цитоплазматическая стерильность у табаков рассматривается как результат нескоординированности ядерных генов и плазмагенов.

В отношении ядерных генов лишь одно из 6 регенерированных растений было истинным гибридом (критерии – промежуточная форма строения листа, типичная для гетерозигот по ядерным признакам, анатомическая модификация строения цветков, характерная для гибридов).

*Плазмаген – цитоплазматический ген, находящийся в органелле эукариотической клетки.*

Все остальные растения были диплоидны и произошли, по-видимому, от клеток, в которых родительские ядра сорта Самсун по какой-то причине элиминировали. У плазмагенов в процессе размножения клеток может происходить и происходит появление новых комбинаций плазмагенов в гибридных клетках. Изучение ДНК позволили обнаружить перестройки, появившиеся в результате рекомбинации плазмагенов.

### **Межсемейственные гибриды клеток высших растений**

Успешных результатов такого направления не много. Остановимся на одной из таких работ. Као и Ваттер предприняли попытку получить гибриды клеток сои и табака.

Хромосомный анализ делящихся клеток и изучение изоферментов аспаратаминотрансферазы и акогольдегидрогеназы проводилось на 2–8-е

месяцы культуры. Также проводился анализ событий начальных дней культуры. Деление ядра в гибридных клетках оказалось несинхронным, и хромосомы табака проявляли тенденцию к реконструкции. Во время первых делений обнаруживались сверхдлинные хромосомы, кольцевые и с несколькими перетяжками, а также фрагменты хромосом. Спустя 1–2 месяца в культуре гибридов все еще обнаруживались длинные хромосомы и фрагменты хромосом. Через несколько месяцев число хромосом табака постепенно уменьшилось: стандартные типы хромосом табака стали встречаться только изредка; часто обнаруживались хромосомы с двумя и тремя перетяжками. Наблюдались широкие короткие хромосомы, которые могли быть реконструированными хромосомами табака. За это же время в каллусных культурах родителей морфология хромосом оставалась ненарушенной. Анализ

*Изозимы (изоферменты) – множественные формы одного фермента, которые катализируют одну и ту же реакцию, но различаются по аминокислотному составу, физико-химическим свойствам и регуляции.*

изоферментов подтвердил наличие изозимов как табака, так и сои во всех клеточных вариантах на ранних стадиях (2–4 месяца). Однако к 8 месяцу в большей части культуры

3 специфические изоферменты табака перестали выявляться, что хорошо согласуется с данными хромосомного анализа. О каких-либо проявлениях морфогенеза не сообщается.

Авторы нашли интересное продолжение этой работы. Гибридные клетки, потерявшие практически все хромосомы табака, были дважды беккроссированы путем слияния протопластов с мезофильными клетками табака.

*Беккроссирование – возвратное скрещивание: скрещивание гибридной клетки с одной из родительских форм.*

Первое слияние протопластов проводили через 27 месяцев после первой гибридизации, а второе – через 7 месяцев после первого возвратного скрещивания. В результате, в клеточных формах было значительно увеличено содержание хромосом табака, а также реконструированных хромосом. Кроме того, видоспецифические изоферменты

табака у полученной линии сохранились спустя даже 6 месяцев после второго возвратного скрещивания.

В лаборатории Глебы было проведено несколько аналогичных межсеме́йственных гибридизаций и, во всех без исключения случаях, наблюдалась видоспецифическая реконструкция хромосом одного из родителей. Причем, что характерно, в большей степени сохраняются хромосомы каллусного родителя, чем родителя представленного в момент слияния мезофильными клетками.

Таким образом, генетический материал отдаленных видов не остается неизменным. Трудно представить, что из таких гибридных нестабильных клеток могут быть морфологически совершенные растения. Возникает вопрос, нужны ли такие гибриды? Оказывается нужны.

Создавая в клетке беспорядок, как это не парадоксально, исследователь получает возможность изучить ряд вопросов, затрагивающих механизмы, лежащие в основе клеточной жизнедеятельности. Можно назвать несколько таких вопросов.

- 1) Меняется ли такая фундаментальная величина, как количество ДНК на хромосому при гибридизации?
- 2) Случайно ли расположение хромосом двух родителей в гибридном ядре, а если нет, то какова природа организации хромосом в ядре?
- 3) Образуется ли в гибридных ядрах гибридное ядрышко?

### **Использование соматической гибридизации близкородственных видов**

Не все культивируемые клетки способны к морфогенезу. Для решения такой проблемы Глебой был предложен метод парасексуальной гибридизации. Так, клетки табака, устойчивые к 5 метил-триптофану, но утратившие способность к морфогенезу, гибридизовались с нормальными клетками (мезофильными протопластами) того же вида, в результате восстанавливалась способность к морфогенезу.

Растительные формы, полученные в результате мутагенеза, часто аномальны в отношении гаметогенеза. Чтобы спасти полезную мутацию также

логично применять соматическую гибридизацию. С ее помощью мутации (рецессивные) также переводятся в гетерозиготные состояния и растения становятся способным к жизнедеятельности.

*Практическое использование гибридизации соматических клеток.* При межвидовых скрещиваниях часто половым путем достичь успеха не удастся. Полученные на сегодняшний день результаты позволяют предположить, что в этих случаях соматическая гибридизация окажется настоящей панацеей.

Так, получены фертильные гибриды, между двумя не скрещивающимися половым путем видами дурмана (*Datura innoxia* + *D. discolor*). Получены и другие гибриды дурмана, которые используются в коммерческих целях, так как в использованных комбинациях наблюдается гетерозис, сопровождаемый повышением содержания алкалоидов на 20–25% по сравнению с родительскими формами.

*Амфидиплоид – гибридный организм, сочетающий диплоидные наборы хромосом обоих родителей. В селекции амфидиплоиды используются для обеспечения плодовитости межвидовых гибридов.*

Другой практический успех в этой области связан с созданием межвидовых гибридов рода *Nicotiana*. Большинство исследований связано со скрещиванием ценных сортов табака, но с низкой устойчивостью к болезням, с дикими представителями этого рода. Для слияния использовались соматические диплоидные клетки и были получены фертильные амфидиплоиды, которые оказалось возможным прямо использовать в селекции.

Посредством гибридизации соматических клеток получен интересный материал для селекции картофеля. Сливали калусные протопласты культурного картофеля с мезофильными клетками дикого сородича.

Проведена успешная гибридизация между капустой и турнепсом, что позволило искусственным путем ресинтезировать естественный амфидиплоидный вид рапс.

## **Искусственные ассоциации с микроорганизмами**

Создание искусственных ассоциаций – новое, сравнительно молодое направление клеточной инженерии по получению новых клеток и клеточных систем путем введения микроорганизмов в клетки или в популяции культивируемых клеток растений. Экспериментальные клеточные системы называются ассоциациями. Ассоциации могут быть как внутриклеточные (эндосимбиотического типа), так и межклеточные (экзосимбиотического типа).

При получении ассоциаций на основе изолированных протопластов с микроорганизмами предполагается, что клетки должны приобретать новые свойства, обусловленные присутствием в них клеток микроорганизмов.

Цели создания ассоциаций.

- 1) Экспериментальная проверка теории эндосимбиотического происхождения эукариотической клетки.
- 2) Реконструирование отдельных стадий эволюционного процесса симбиогенеза.
- 3) Моделирование и изучение на клеточном уровне симбиотических отношений (например, клубеньковых бактерий с бобовыми растениями).
- 4) Повышение продуктивности клетки при выращивании в культуре.
- 5) Удешевление процесса культивирования растительных тканей.

Растительные клетки в культуре проводят биосинтез важных для медицины и промышленности веществ. Одним из требований рентабельности производства является возможность культивирования на простых по составу средах. Между тем, культуры растительных клеток требуют присутствия в средах витаминов, фитогормонов, аминокислот и т.д. Многим из перечисленного растительную клетку могли обеспечить микроорганизмы.

Кроме того, растительные клетки в культурах гетеротрофны или обладают ограниченной способностью к фотосинтезу. Одним из решений этой проблемы могло быть введение в эти культуры микроорганизмов, способных к фотосинтезу. Все это могло бы значительно упростить состав питательной среды.

*Ассоциации протопластов с микроорганизмами внутриклеточного типа.*

С целью получения ассоциации внутриклеточного типа предпринимались

неоднократные попытки введения микроорганизмов в клетки мезофилла злаков и других сельскохозяйственных растений.

Введение микроорганизмов в протопласты проводят при воздействии индуцирующих факторов. Микроорганизмы могут поглощаться протопластами. Так, протопласты гороха поглощали клетки *Rhizobium* непосредственно в процессе ферментативного разрушения клеточных стенок. В других случаях в качестве индуктора слияния использовали ПЭГ.

Поглощение микроорганизмов может происходить путем эндоцитоза. При действии ПЭГ микроорганизмы прилипают к плазмалеме, образуется инвагинация ее с последующим замыканием конца инвагинации. Образуется везикула.

При воздействии на протопласты розы поливинилового спирта происходило поглощение агробактерий протопластом. Причем поливиниловый спирт не оказывал токсического действия, которое наблюдалось в сравнительных опытах с использованием полиэтиленгликоля.

*Характеристика продуктов слияния и поглощения.* Системы, полученные путем слияния и поглощения, характеризовались ограниченной способностью к выживанию или культивированию. В протопластах кукурузы обнаружено быстрое движение цитоплазмы через 14 часов после поглощения цианобактерий, что служило признаком жизнеспособности растительных клеток. В некоторых случаях после поглощения протопласты регенерировали клеточную стенку, но как правило не делились, а спустя несколько суток разрушались.

Есть данные о сохранении интактности клеток и органелл микроорганизмов внутри протопластов. В протопластах гороха в везикулах наблюдали делящиеся клетки *Rhizobium*, однако не ясно, начали они делиться до или после поглощения. Исследование показало сходство процессов инфицирования в искусственной ассоциации и при получении корневого клубенька. Бактерии инфицировали до 10% клеток, обнаруживались в клетках хозяина в везикулах. В клетке они размножались, образовывали цепочки и проявляли нитрогеназную активность (1% от активности в клубеньках).

Деления цианобактерий в протопластах табака не происходило, хотя цианобактерии сохраняли целостность. Органеллы зеленых водорослей внутри протопласта в процессе культивирования деградировали, и только хлоропласты в цитоплазме клеток моркови обнаруживались через 10 суток. Фотосинтетическая способность введенных хлоропластов составляла лишь 5% от активности в клетке хозяина. Таким образом, для успешного продолжения работ в данном направлении требуется подбор партнеров; выбор адекватного способа слияния; отработка условий культивирования.

При поглощении бактерии везикула высвобождается в цитоплазму хозяина. В случае же использования зеленых водорослей происходила интеграция протопластов и водорослей, а органеллы водорослей высвобождались в цитоплазму протопластов. Оба эти способа введения микроорганизмов имеют свои недостатки. Везикулы могут сливаться с лизосомами и существует угроза разрушения микроорганизмов. А при слиянии мембран хозяина и зеленых водорослей происходит введение не целых микроорганизмов, а интактных органелл. В качестве альтернативного пути предлагается заключить микроорганизмы в липосомную оболочку. Преимущества данного приема в том, что искусственная мембрана будет сливаться с плазмалеммой протопласта, а микроорганизм целиком будет попадать в клетку хозяина.

*Введение микроорганизмов в популяции культивируемых клеток.* Способы получения смешанных популяций растительных клеток и микроорганизмов различны: внесение клетки микроорганизма непосредственно в каллусную или суспензионную среду; высев на поверхности агарозной среды рядом, таким образом, чтобы соприкосновения клеточных колоний не происходило; разделение совместно культивируемых клеток мембранами, обеспечивающими обмен продуктами метаболизма партнеров.

Были получены ассоциации каллусной ткани сои с клубеньковыми бактериями. Проводилось совместное культивирование клеток сои и клубеньковых бактерий в жидкой питательной среде. Аналогичные ассоциации получены с небобовыми: клетками пшеницы, риса, табака и др. Существенным

было то, что авторы смогли показать, что для индукции нитрогеназной активности достаточно тканевой жидкости как бобовых, так и не бобовых хозяев. В ассоциациях с растительными клетками происходит интенсивное размножение бактериальных клеток, при отсутствии размножения в чистых культурах на тех же средах. Причем сильный рост клеток связан не с наличием живых клеток растений, а с их метаболитами.

При введении в каллус клубеньковые бактерии локализуются, как правило, на поверхности клеток хозяина.

Бактериальные клетки часто угнетали рост растительных клеток, что связывается с накоплением ауксина в супероптимальных количествах. Однако в случае с бобовыми, часто наоборот, наблюдалось стимуляция роста каллуса.

Известна оказавшаяся удачной попытка регенерации растений табака из ассоциации каллусной культуры с *Rhizobium*. К сожалению, отсутствует информация о дальнейшей судьбе растения. Удачным оказался эксперимент по введению в культуру клеток табака цианобактерий. Смесь протопластов табака и цианобактерий обрабатывали раствором с высоким содержанием  $\text{Ca}^{+2}$ . Были подобраны условия, в которых те и другие выживали, образовалась смешанная каллусная культура сине-зеленого цвета. Цианобактерии росли на поверхности каллуса или проникали вглубь по межклетникам. Кроме того, часть цианобактерий локализовалась внутриклеточно в центральных вакуолях клеток табака, что, видимо, происходило в результате обработки  $\text{Ca}^{+2}$ . Смешанные каллусные культуры стабильны до двух лет, причем подавления роста одного компонента системы другим не наблюдалось. Из смешанной культуры регенерировали растение с участками сине-зеленого цвета – местами локализации цианобактерий. Цианобактерии образовывали цепочки, что свидетельствует об их размножении в побегах. Очевидно, что такая анатомическая особенность табака, как большие межклетники является определяющей для проникновения цианобактерий в каллус и растение. Из регенерантов первого поколения получен вторичный каллус, а из него – регенеранты второго поколения. В побегах цианобактерии имеют внутритканевую локализацию.

Результаты этих опытов позволяют говорить о развитии нового прикладного направления.

Таким образом, внутривидовая и межвидовая соматическая гибридизация дополняет набор современных методов селекции. Дальнородственные гибридные клетки используются для фундаментальных исследований. Методы введения микроорганизмов в растительную клетку нуждаются в дальнейшем совершенствовании. Необходимо вводить в протопласты целые микроорганизмы, а не их органеллы, поскольку в последнем случае продукты гибридизации нестабильны. Отдельные удачные эксперименты по введению микроорганизмов в популяцию растительных клеток свидетельствуют о перспективности этого направления. Дальнейшие исследования должны быть направлены на подбор партнеров для симбиоза и разработку сред для их совместного культивирования.

#### **Контрольные вопросы:**

1. Что такое клеточная инженерия?
2. В чем вы видите преимущества парасексуальной гибридизации в сравнении с половым скрещиванием?
3. Какие экспериментальные воздействия на протопласты стимулируют их слияние?
4. Каков механизм слияния протопластов?
5. Что такое субпротопласты, как их получают и для чего используют?
6. Какие успехи достигнуты в разработке метода модификации клеток путем индукции поглощения клеточных органелл и метафазных хромосом?
7. Что известно о генетической изменчивости растительных клеток, в связи с манипуляциями *in vitro*?
8. Что такое фенотипические варианты культивируемых клеток?  
Приведите примеры фенотипических вариантов.
9. Как сохранить вариантные клеточные линии?
10. Как проводится селекция продуктов гибридизации?
11. Какие используются методы для доказательства гибридности

- продуктов клеточной инженерии?
12. Какие изменения могут происходить в геноме гибридных клеток при межвидовой гибридизации?
  13. Какие изменения происходят в хромосомном наборе гибридных клеток при межсемейственной гибридизации?
  14. Приведите примеры использования на практике соматических гибридов близкородственных видов.
  15. Каковы цели создания искусственных ассоциаций растительных клеток с микроорганизмами?
  16. Что происходит с клетками микроорганизмов после их слияния с растительными протопластами?
  17. Каковы результаты экспериментальной работы по введению микроорганизмов в популяцию культивируемых клеток?

## **Глава 2. ТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЕКТОРОВ**

В главе рассматриваются природные векторы (переносчики генов), а также их использование для конструирования инструментов генной инженерии – векторов, обеспечивающих получение ДНК с новой комбинацией генов в растении. Освещены также способы использования векторов в генной инженерии. Они очень разнообразны: от трансформации растительного материала с помощью агробактерий, содержащих специально сконструированные векторы, до методов химического и физического стимулирования поглощения ДНК вектора протопластами.

Трансформация – направленная модификация генома клетки (растения) с

помощью рекомбинантной ДНК из клетки  
другого генотипа, которая поглощается

*Рекомбинантная ДНК – новая последовательность ДНК, образованная in vitro.*

(интегрируется) в геном модифицируемого объекта.

Вектор – это молекула ДНК, способная переносить генетическую информацию из одного генетического окружения в другое. Вектор должен отвечать ряду требований.

- 1) ДНК вектора должна быть способна к автономной репликации, и акцептировать генетическую информацию для передачи ее растению, вектор должен содержать специфический сайт для интеграции в него чужеродного гена, который необходимо клонировать, а также необходима совместимость и стабильность системы вектор – внедряемая ДНК.
- 2) Вектор должен гарантировать репликацию в большом числе копий и экспрессию чужеродной ДНК в трансформированных клетках.
- 3) Вектор должен быть способен к распространению внутри растения.
- 4) Если требуется, наследуемое изменение трансформированного растения вектор или его производное должно стабильно поддерживаться в новом хозяине.
- 5) Трансформированная клетка должна быть выделена и из нее регенерировано растение, должна быть селективная система, позволяющая идентификацию организмов с внедренными генами.
- 6) Клонированный ген должен передаваться и соматическим и половым путем.
- 7) Весьма желательным для вектора является широкий спектр хозяев.

### **Векторы генной инженерии растений**

Потенциальные векторы могут быть классифицированы на три категории.

1. Векторы, полученные на основе растительных патогенов (вирусов, виридов), которые характеризуются естественной способностью к введению в клетку чужеродной ДНК.
2. Векторы, полученные на основе мобильных генетических элементов. Их еще называют подвижные элементы, транспозируемые элементы, транспозоны. Транспозоны способны менять свою локализацию в геномах.

3. Векторы, полученные на основе природных растительных векторов. Представители Ti- или Ri-плазмида.

Теперь более подробно о каждой группе векторов.

### *Вирусы*

Среди растительных вирусов группа каулимовирусов – изометрических вирусов мозаики цветной капусты CaMV (Caulimovirus mosaic virus) рассматриваются наиболее часто как потенциальный вектор для введения чужеродной ДНК в растение. Это связано с тем, что CaMV являются вирусами растений, содержащими двунитевую ДНК, с которой легче всего манипулировать при использовании технологии рекомбинантных ДНК для их потенциального применения в качестве векторов. Геном CaMV имеет длину 8 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) и ДНК обнаруживается в линейной, кольцевой, закрученной или завязанной в узел форме. Она обладает уникальными (один раз встречающимися в данной молекуле) сайтами для гидролиза эндонуклеазами SalGI и XhoI. Эти сайты могут быть использованы для превращения ДНК CaMV в линейную молекулу с последующим лигированием с подходящим плазмидным вектором E. Coli, в результате чего образуется гибридная плазмида, которая может быть клонирована в E. coli. Транскрипция генома CaMV ассиметрична – только  $\alpha$ -нить продуцирует стабильные РНК-транскрипты. Перед С5' концом транскриптов найдены типичные эукариотические промоторные сигналы. Очевидно, синтез вирусной РНК осуществляется полимеразой хозяина. На интеграцию вирусной ДНК с геномом хозяина данных нет. CaMV инфекция не передается через семена и нет оснований думать, что происходит интеграция геномов вируса и растения.

Данный вирус поражает главным образом растения семейства капустные.

Нуклеотидные последовательности CaMV указывают на то, что обширные области генома кодирует белок. Чтобы встроить новую ДНК необходимо идентифицировать области, куда можно было бы внедрить нужные гены так, чтобы это не отражалось на интересующих исследователей областях. Есть сообщение об успешном внедрении экзогенных ДНК, в частности  $\gamma$ -ДНК в вирус и ее размножении в растениях. Принципиальный интерес к CaMV как

вектору основан на том, что его ДНК может быть введена непосредственно в растение просто путем втирания в листья и вирус распространяется по всему растению. Это дает основание рассматривать возможности введения чужеродной ДНК в растение, а не в клеточную культуру.

Введение вирусной ДНК эффективно – нужно всего лишь 1–5 мкг клонированной ДНК на растение и почти 100% растений становятся инфицированными.

СаMV можно манипулировать *in vitro* как с бактериальной плазмидой и затем вводить в растение. Особым преимуществом СаMV является то, что он проникает во все клетки. К трудностям использования относится ограниченность круга хозяев.

В настоящее время привлекает внимание группа геминовирусов, содержащих однонитевую ДНК. Например, вирусы могут хорошо дополнять СаMV потому что имеют различный круг хозяев. Геминовирусы аккумулируются в ядрах растительных клеток и инфицируют многие сельскохозяйственные культуры – кукурузу, бобы, томаты, пшеницу, табак и многие тропические растения.

### *Вироиды*

Около 40 лет назад считалось, что все инфекционные болезни растений и животных вызваны или микроорганизмами (бактерии, грибы) или вирусами. Было известно, что самые мелкие вирусы, способные к независимой репликации, имеют геномы с молекулярной массой 1 млрд. Поэтому резонно было предположить, что этот размер представляет собой минимальное количество информации, необходимой для кодирования вирусом своих продуктов и подавления метаболизма клетки-хозяина. Действительно, хотя и известны меньшие вирусы, они для репликации нуждаются в вирусах-помощниках, находящихся в той же клетке. Но в 1971 году было показано, что болезнь «веретенообразность клубней» картофеля вызвана небольшими неинкапсулированными молекулами автономно реплицирующейся РНК – вириоидами. Оказалось, что вириоиды вводят в хозяйскую клетку еще меньшую информацию.

Вироиды реплицируются за счет фермента хозяина механизмом типа катящихся колец с кольцевым виroidом в качестве матрицы.

Благодаря ряду особенностей виroidы рассматриваются в качестве потенциальных векторов:

- 1) вызывают инфекцию всего растения и могут сами мигрировать по растению;
- 2) переносятся через клеточный сок;
- 3) некоторые виroidы передаются через семена (значит, они интегрируются с геномом хозяина);
- 4) инфицируют широкий ряд растений.

### *Транспозоны*

Одним из перспективных векторов для переноса генетической информации в растение является вектор, сконструированный на основе мобильных генетических элементов.

В 70-е годы прошедшего столетия в молекулярной генетике появилось новое понятие – нестабильность генома. Этому важнейшему феномену посвящена монография Р. Б. Хенсина «Непостоянство генома». Оказалось, что в геноме, считавшимся многие годы незыблемым, определенные сегменты ДНК могут менять свою локализацию, то есть мигрировать или, как еще принято говорить у генетиков, транспозировать. Однако это понятие ни в коей мере не отменяет основного постулата классической генетики о постоянстве генома.

Первая группа транспозирующихся элементов (ТЭ) получила название инсерционных последовательностей – это простые транспозоны, обозначаются IS с номерами (рис. 1).

Каждый IS обладает короткими инвертированными концевыми повторами, 15–25 пар нуклеотидов. Эти повторы представляют собой два участка одной и той же двунитевой ДНК, имеющие одинаковые нуклеотидные последовательности, но расположены в противоположной (обратной) ориентации.

ДНК IS фланкирована очень короткими прямыми повторами. Мишень содержит до внедрения только один такой повтор (5 или 9 пар нуклеотидов).

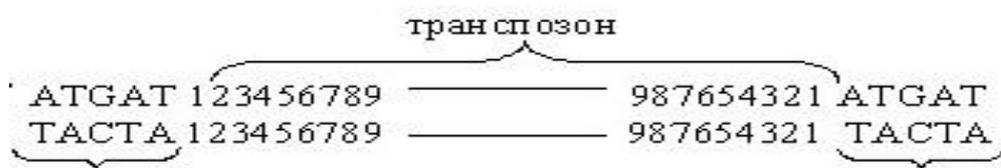


Рис. 1. Схема транспозона

Наличие прямых и обратных повторов указывает на присутствие транспозона. Рамка считывания несет информацию о белках.

Сложные транспозоны обозначаются  $T_n$  с номерами. Один класс представлен сложными элементами, состоящими из центральной части, несущей маркер, например лекарственной устойчивости, фланкированной с каждой стороны родственными последовательностями – плечами – длинными концевыми повторами. Плечи могут иметь либо одинаково ориентированную, либо инвертированную последовательность. Иногда плечи состоят из IS элементов. В случае  $T_n$ , на каждом плече по IS<sub>1</sub>. В других случаях плечи напоминают IS элементы.

Все модули имеют концевые инвертированные повторы, поэтому сложный транспозон также заканчивается короткими инвертированными повторами. Если же плечи имеют инвертированную ориентацию друг относительно друга, короткие повторы на концах  $T_n$  идентичны.

Природа транспозиционного события состоит в разрезании сайта мишени рестриктазой (рис. 2), куда внедряется транспозон (рис. 3). Рестриктазы (рестрикционные эндонуклеазы) ферменты, разрезающие ДНК по определенным нуклеотидным последовательностям, которые они «узнают». Эти последовательности называются сайтами рестрикции. Образование и достройка ступенчатых концов делают понятными наличие прямых повторов ДНК мишени в сайте внедрения.

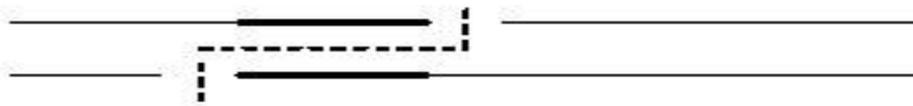


Рис. 2. Схема разрезания ДНК

Рекомбинация между любой парой прямых повторов будет приводить к делеции, т.е. утрате ДНК между ними (рис. 4). Промежуточная область вырезается в виде кольцевой ДНК. Хромосома сохраняет одну копию прямого повтора. В случае  $T_9$  (который заключен между двумя  $IS_1$ )

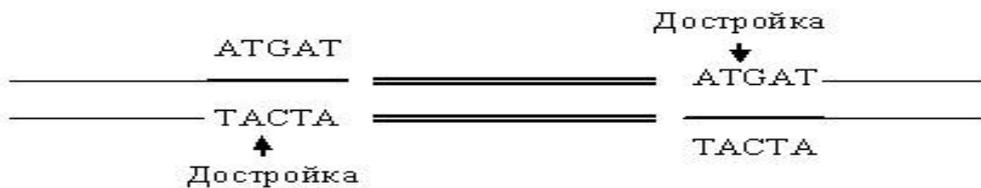


Рис. 3. Схема встраивания транспозона

рекомбинация приведет к замене  $T_9$  на  $IS_1$ .

В чем же заключается смысл предусмотренного природой процесса перемещения отдельных сегментов ДНК. В результате внедрения, транспозоны прерывают соответствующий ген и он перестает функционировать.

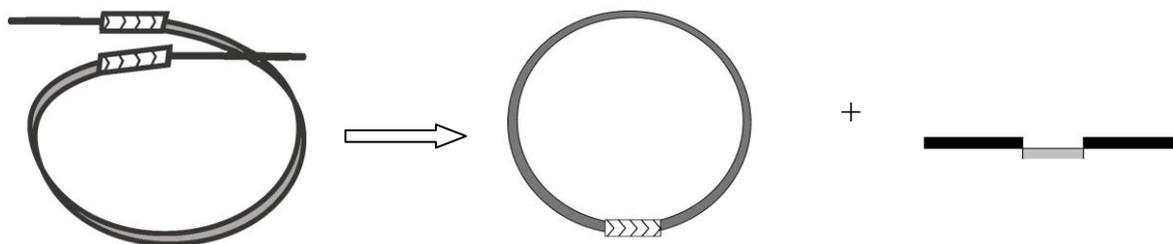


Рис. 4. Схема делетирования кольцевой ДНК

Таким образом, транспозоны играют значительную роль в эволюции. Кроме того, транспозоны несут в себе сигналы для начала считывания информации. Внедряясь в новые области ДНК, они изменяют процесс считывания

информации. У бактерий ряд транспозонов несет гены устойчивости к антибиотикам. Они могут передаваться из одной клетки к другой. В результате, у данного вида возрастает число бактерий выживающих при высоких концентрациях антибиотика. В индивидуальном развитии высших организмов на определенных этапах происходит включение или выключение определенных программ. В этом ключевую роль также играют транспозоны. Можно считать экспериментально доказанным участие мигрирующих элементов в образовании опухолей.

Наибольшее применение в качестве векторов в настоящее время нашли плазмиды – внехромосомные, автономно реплицирующиеся, кольцевые молекулы ДНК бактерий. Почвенные бактерии или агробактерии содержат плазмидную ДНК, способную генетически трансформировать растительную клетку.

#### *Агробактерии*

*Agrobacterium tumefaciens* и *Agrobacterium rhizogenes* представляют собой почвенные бактерии, которые в участках повреждения двудольных растений вызывают заболевания, называемые соответственно «корончатым галлом» и «косматым корнем». Среди однодольных растений только некоторые представители семейств *Liliaceae* и *Amaryllidaceae* оказались в слабой степени восприимчивы к заболеванию корончатых галлов. Причины подобного ограничения круга хозяев в настоящее время не раскрыты. Однажды начавшись, опухолевый рост может продолжаться и в отсутствие бактерий, а опухолевая ткань способна расти в асептических условиях в культуре на питательной среде, не содержащей экзогенных ауксинов и цитокининов, которые в норме необходимы для стимуляции роста растительных тканей *in vitro*.

Опухолевые ткани синтезируют новые производные аминокислот и сахаров, известные как опиины. Тип опиина, синтезируемого в опухоли (например нопалин, октопин, агроцинопин, маннопин и агропин), зависит от штамма агробактерий, вызвавшего ее образование. Октопин и нопалин – опиины – образуются из аргинина; их легче всего обнаружить в ткани корончатых галлов.

В соответствии с этим многие широко распространенные штаммы *Agrobacterium tumefaciens* классифицируют как штаммы октопинового или нопалинового типа. В опухолях косматого корня, вызываемых *A. rhizogenes*, как правило, обнаруживается агропин. Штаммы агробактерий, вызывающие образование опухолей, способны к избирательному катаболизму опинов того типа, синтез которых индуцируют, используя последние в качестве источников углерода и азота.

Как индукция опухолей, так и синтез опинов обусловлены бактериальными плазмидами.

#### *Ti-плазмиды*

Ti-плазмиды (от англ. Tumour inducing – образующие опухоль), обнаруженные (рис. 5) во всех вирулентных штаммах *A. tumefaciens*, имеют размеры около 200–250 тыс. пар нуклеотидов (т. п. н.) и стабильно сохраняются в агробактериях при температуре ниже 30°C. Согласно данным ДНК-ДНК-гибридизации в Ti-плазмидах различных штаммов агробактерий имеются четыре области гомологии. Генетический анализ показал, что две области, T-ДНК (от англ. Transferred) и *vir*-область (от англ. virulence), связаны с опухолеобразованием, тогда как две другие (Cop – гены и ORI – область плазмиды вовлечены в конъюгационный перенос и репликацию плазмид в клетках агробактерий.

В процессе опухолеобразования определенная последовательность Ti-плазмиды, T-ДНК, переносится в клетки растения и встраивается в их ядерный геном без заметных перестроек. T-ДНК стабильна в растительном геноме. В растительную ДНК может включаться одна или более копий T-ДНК, и хотя множественные копии T-ДНК могут образовывать тандемные повторы, они могут быть разбросаны по геному – и сцеплены с различными районами растительной ДНК. Место встраивания T-ДНК в растительную ДНК, по-видимому, случайно. В различных Ti-плазмидах найдены области, гомологичные T-ДНК. В обычно используемых напалиновых штаммах *A. tumefaciens* размер области T-ДНК составляет около 24 т. п. н. В некоторых корончатых галлах октопинового типа выявлены два несмежных сегмента T<sub>L</sub> (T-левая T-ДНК) и T<sub>R</sub> (T-правая). Последовательность T<sub>L</sub> (14 т.п.н.) обнаружена

во всех линиях трансформированных клеток.  $T_R$  (7 т. п. н.), которая происходит из района  $T_i$ -плазмиды, локализуящегося правее  $T_L$ -ДНК, обнаружена в некоторых опухолевых линиях, причем число ее копий может отличаться от такового для  $T_L$ . Последнее обстоятельство указывает на независимость процессов переноса  $T_L$  и  $T_R$ .

В опухолевых клетках Т-ДНК транскрибируется (рис. 5, б) с образованием различных полиаденилированных мРНК. Количество накапливающихся в клетках транскриптов Т-ДНК относительно невелико по сравнению с другими растительными мРНК, а относительное их содержание может быть различным. Определение нуклеотидной последовательности Т-ДНК нопалинового типа позволило идентифицировать 13 протяженных открытых рамок считывания, тогда как в октопиновых  $T_L$ - и  $T_R$ -ДНК обнаружено соответственно 8 и 6 протяженных открытых рамок. Транскрипты правой части нопалиновой т-днк функционально эквивалентны транскриптам  $T_L$ -ДНК. общая организация генов Т-ДНК и их фланкирующих областей (последовательностей ДНК расположенных с обеих сторон генов) сходна с таковой эукариотических генов, хотя они не содержат интронов. один из генов октопиновой  $T_L$  области (транскрипт 3) кодирует октопинсинтазу (*ocs*). В нопалиновых плаزمиде гены опинсинтаз включают и гены нопалинсинтазы и агроцинопинсинтазы (*acs*). В октопиновых  $T_i$ -плазмиде  $T_R$ -ДНК область кодирует два белка, ответственных за синтез маннопина, и один – за превращение маннопина в агропин. Локус *tmr* (транскрипт 4) кодирует фермент, участвующий в синтезе цитокинина; мутации в этом локусе приводят у некоторых растений к пролиферации корней из ткани корончатых галлов («rooty» или «корневые» мутанты). Локус *tms1* и *tms2* (транскрипты 1 и 2) определяют нерегулируемый синтез ауксинов, и мутации в любом из них у многих типов растений обуславливают появление побегов из ткани корончатых галлов («snooty» или «побеговые» мутанты). Таким образом, Т-ДНК содержит гены (*tms 1*, *tms2* и *tmr*), продукты которых препятствуют нормальной регуляции метаболических процессов, вовлеченных в синтез фитогормонов, что и приводит к онкогенному фенотипу. Следовательно, эти гены (*tms 1*, *tms2* и *tmr*) можно отнести к так называемым онкогенам, т.е. генам,

индуцирующим образование опухоли. Однако следует отметить, что входящие в состав T-ДНК гены не участвуют в переносе T-ДНК в растительные клетки и не влияют на её стабильность в геноме растения.

#### *Ri – плазмиды*

Индукция заболевания косматого корня бактериями *A. rhizogenes* аналогична трансформирующему действию *A. tumefaciens*. Под контролем *vir*-области две отдельные области T-ДНК плазмиды переносятся в растительный геном T<sub>L</sub>- и T<sub>R</sub>. T<sub>R</sub>-ДНК содержит гены, кодирующие опины (маннопин или агропин), и, соответственно этому, штаммы характеризуют по их специфическим опиновым генам. T<sub>R</sub>-ДНК, кроме того, содержит два гена, кодирующие ауксин. Эти гены в значительной степени гомологичны ауксиновым генам *A. Tumefaciens*. T<sub>L</sub> T-ДНК *A. rhizogenes* полностью секвенирована; она содержит по крайней мере 11 открытых рамок считывания, сходных с эукариотическими, которые снабжены необходимыми элементами промоторов и сигналами полиаденилирования (последние должны функционировать после переноса в растительный геном). Для поддержания фенотипа косматого корня нет абсолютной необходимости в T<sub>L</sub>, однако штаммы *Agrobacterium*, несущие как T<sub>L</sub>, так и T<sub>R</sub>, более вирулентны и заражают большее число видов растений, чем штаммы, несущие только одну T-ДНК.

#### *Механизм переноса T-ДНК*

Механизм переноса T-ДНК сходен с конъюгацией у бактерий. Контакт агробактерий с соединениями, выделяющимися из поврежденной ткани растения, приводит к транскрипции *vir*-области Ti-плазмиды. Одно из химических веществ, высокоактивных в этом отношении, было идентифицировано как ацетосирингон (3,5-диметокси-4-оксиацетофенол). Гены *virA* и *virG* экспрессируются в вегетативно растущих бактериях, хотя *virG* транскрибируется на низком уровне. Считается, что при действии выделений из поврежденных растительных клеток или чистого ацетосирингона на агробактерии продукт гена *virA* (возможно, ассоциированный с мембраной) узнает и взаимодействует с ацетосирингоном, а также передает этот внеклеточный сигнал внутрь клетки, что приводит к активации продукта гена

*virG*. Измененный белок *virG* затем активирует остальные гены вирулентности (*vir B, C, D* и *E*), а также повышает уровень транскрипции самого локуса *virG*.

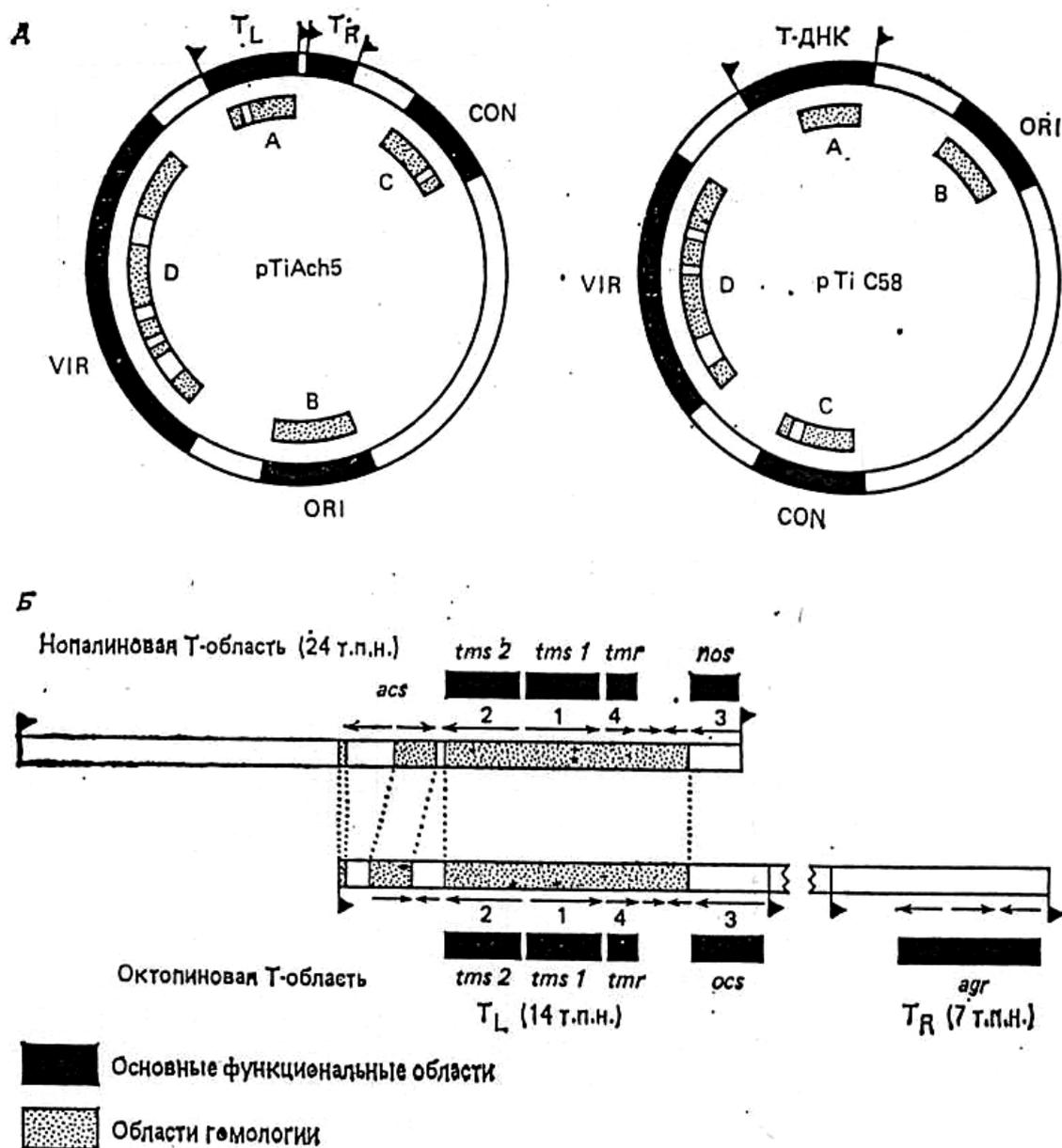


Рис. 5. Общая организация и экспрессия Ti-плазмид октопинового и нопалинового типов

**А.** Карты Ti-плазмид октопинового (pTiAch5) и нопалинового (pTiC58) типов, показывающее относительное расположение и размеры функциональных областей. Области наиболее сильной гомологии между двумя плазмидами имеют черный цвет. Флажками обозначены прямые повторы длиной 25 п.н.; CON – области, кодирующие функции конъюгации; ORI – область репликации

и начала репликации (ориджин); VIR – область вирулентности; тДНК, T<sub>L</sub> и Ti-области, содержащие T-ДНК (от англ. Transferred).

**Б.** Карты T-областей плазмид нопалинового и октопинового типа; показаны основные функциональные домены, области гомологии и транскрипты.

Идентифицированные продукты транскрипции обозначены: 3 (nos) – нопалинсинтаза, 3 (ocs) – октопинсинтаза, acs – агроцинопинсинтаза, 1 (*tms1*) – триптофанионоксигеназа, 2 (*tms2*) – индол-3-ацетамидгидролаза, 4 (*tmr*) – диметилаллил (DMA)-трансфераза, *agr* – три транскрипта, необходимые для синтеза агропина

Индукция *vir*-генов сопровождается появлением одноцепочечных разрывов внутри пограничных последовательностей длиной 25 п. н., фланкирующих T-ДНК, и одноцепочечных линейных молекул, которые соответствуют T-ДНК. Предполагают, что соответствующей эндонуклеазной активностью обладают продукты оперона *virD*. С помощью до конца не изученного механизма, который, возможно, аналогичен бактериальной конъюгации, T-ДНК переносится в клетку растения и стабильно встраивается в ядерную ДНК. Вероятно, что в этом процессе участвуют белки, кодируемые опероном *virE*. Конъюгация у бактерий – это форма полового процесса, при которой происходит передача генов, сцепленных с F-фактором (ДНК, контролирующей конъюгацию).

Области T-ДНК как у *A. tumefaciens*, так и у *A. rhizogenes* фланкированы прямыми повторами длиной 25 пар нуклеотидов (см. рис. 5 А), и концы T-ДНК, интегрированной в растительный геном, обнаруживаются вблизи этих последовательностей. Удаление правой границы в Ti-плазмиде нопалинового типа нарушает образование опухоли, однако, когда олигонуклеотид длиной 25 п. н. встраивается в правильной ориентации в Ti-плазмиду, опухолеобразование восстанавливается.

### **Плазмиды агробактерий как векторы для трансформации**

Природная способность агробактерий переносить определенные последовательности ДНК в растительный геном была использована при конструировании ряда векторов для трансформации растений с учетом различных особенностей процесса трансформации под действием

агробактерий. В начале 80-х годов 20 века многие группы исследователей модифицировали Ti-плазмиды таким образом, чтобы удалить все онкогены T-ДНК. При этом было обнаружено, что кодируемые Ti-плазмидой онкогены не участвуют ни в переносе T-ДНК в растительную клетку, ни в ее интеграции с ядерной ДНК. Следовательно, эти гены можно заменить, встроив вместо них чужеродную ДНК. При этом плазида теряет онкогенные свойства. Введение чужеродной ДНК заключается в разрезании вектора соответствующими рестрикционными ферментами и последующем лигировании ДНК. Большинство векторов, использованных для генетической инженерии бактерий, небольшие и состоят из 3–15 т.п.н. Для растений же используются большие плазмиды 200–250 т.п.н. Такие плазмиды имеют большое число сайтов рестрикции. Так, число расщеплений рестриктазой Eco P1 у плазмиды С 58 достигает 50, что сильно затрудняет ее полноценную сборку. Сконструировать мини Ti-плазмиду проблематично, потому что *vir* и *ops* гены локализованы в разных районах плазмиды. В этой связи разработаны альтернативные подходы для введения генов в T-область. Основным принципом одного из таких подходов является конструирование челночных или промежуточных векторов. Промежуточный вектор – это плазида для клонирования в *E. coli*. Это небольших размеров вектор, в который встроен фрагмент T-области. Кроме того, плазида содержит репликон широкого круга хозяев. Используя плазмиды, способные реплицироваться как в *E. Coli*, так и в *A. Tumefaciens*, можно размножить нужный ген в *E. coli*, а затем рекомбинантную плазмиду перенести в *A. tumefaciens*, несущую Ti-плазмиду. Если рекомбинантная плазида будет иметь с обеих сторон клонируемого в *E. coli* х-гена последовательности T-ДНК, то в результате гомологичной рекомбинации между последовательностями T-ДНК в Ti-плазмиде и в

*Репликон – фрагмент ДНК, находящийся под контролем рядом расположенного и инициирующего репликацию локуса, ведущего себя как автономная единица в течение репликации ДНК.*

*Лигирование – процесс соединения двух линейных молекул нуклеиновых кислот посредством фосфодиэфирных связей с помощью фермента лигазы.*

промежуточном векторе может произойти включение клонируемого х-гена в заданный участок Т-ДНК Ti-плазмиды. В дальнейшем необходимо осуществить отбор плазмиды, содержащей в составе Т-ДНК х-ген.

Другой подход к использованию Ti-плазмид в качестве векторов для генной инженерии заключается в физическом разобщении Т-ДНК и функций, отвечающих за перенос. Было показано, что при локализации Т-ДНК целиком на одной плазмиде, а всех остальных функций вирулентности Ti-плазмиды на другой плазмиде в том же штамме *A. tumefaciens* возможен перенос генов Т-ДНК в растительную клетку. Так, стало известно о возможности использования системы двойных или **бинарных векторов**, в которой один из векторов несет vir-область, а другой Т-ДНК. При таком подходе легко манипулировать с Т-ДНК in vitro. И плазида с Т-ДНК имеет меньшие размеры.

#### *Эксперименты по экспрессии чужеродных генов в растениях*

Первые перенесенные чужеродные гены не экспрессировались в растении. Поскольку код ДНК универсален для всех живых организмов, то причина этого видимо в регуляторных системах. Для эффективной экспрессии чужеродных генов необходимо, чтобы эти гены имели подходящие сигналы узнавания.

Поскольку опиназные гены активно экспрессируются в растении, были изучены октопиназный и нопалиназный гены. Для изучения регуляции экспрессии генов Т-ДНК в растениях, были определены нуклеотидные последовательности и точная локализация С3'- и С5'-концов октопиназного гена Ti-плазмиды рTiВ6S3 и нопалиназного гена рTiТ37. Хотя оба гена имели бактериальное происхождение, они обладали многими характеристиками,

*Промотор – активная последовательность ДНК, расположенная перед сайтом инициации гена, с которым может связываться РНК-полимераза и инициировать транскрипцию.*

присущими для эукариотических генов. Оба гена имеют последовательности ТАТА в 5'-области перед стартом транскрипции и последовательность ААТАА, аналогичную сигналам полиаденилирования эукариотических генов на С3'-конце. Рамка считывания начинается с первого АУГ-кодона. Сложный характер промоторов свидетельствует о приспособленности к транскрипции в

эукариотической клетке. С помощью мутаций были определены размеры областей промоторов октопин и нопалинсинтеазных генов – они оценивались в 292 и 261 п.н. соответственно. Использование этих промоторов дало хорошие результаты при конструировании плазмид, они обеспечивали высокую экспрессию перенесенных генов.

Позже были выделены и охарактеризованы растительные промоторы, контролирующие экспрессию чужеродных белков в специфических клетках на определенных стадиях роста и развития растения. Например, вместо сильного 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты, функционирующего во всех растительных тканях в течение всей жизни растения, использовали промотор гена малой субъединицы фотосинтетического фермента рибулозобисфосфаткарбоксилазы, работающего только в фотосинтезирующих тканях, например в листьях. Аналогично для контроля экспрессии некоторых чужеродных генов использовали растительные промоторы, функционирующие только в специфических тканях или только при неблагоприятных условиях.

Кроме промотора, экспрессию чужеродных генов могут усиливать некоторые другие элементы, в частности энхансерные последовательности, расположенные на расстоянии от одной до нескольких сотен нуклеотидов до промотора и сигналы терминации транскрипции. Энхансер, усилитель – последовательность ДНК размером 50–100 п.н., имеющая важное значение для эффективной транскрипции многих растительных генов и функционирующая независимо от ее ориентации и положения в ДНК.

Были протестированы ДНК-конструкции, содержащие все или некоторые из следующих элементов: 35S-промотор; сигнал терминации транскрипции гена нопалинсинтазы; от одного до семи тандемных повторов энхансерных элементов; так называемая U последовательность, которая предположительно усиливает экспрессию гена на уровне трансляции. Наиболее эффективная конструкция содержала семь энхансерных элементов, при этом уровень экспрессии чужеродного гена в трансгенных растениях табака и риса был намного выше, чем в случае 35S-промотора без других регуляторных последовательностей. Протестированные промоторные

конструкции контролировали экспрессию в трансгенных растениях широкого круга чужеродных генов. Такое разнообразие, вероятно, объясняется тем, что Т-ДНК встраивалась в разные сайты в геноме растения. Проводится работа по созданию сильных тканеспецифичных промоторов, регулируемых в процессе развития растения.

#### *Применение репортерных генов при трансформации клеток растений*

Для идентификации трансформированных клеток необходимо иметь возможность обнаруживать чужеродную ДНК, интегрированную в геномную ДНК растения. Более того, при исследовании сигналов регуляции транскрипции и их функций в специфических растительных тканях (листьях, корнях или цветках) зачастую важно уметь количественно оценивать уровень экспрессии гена, кодирующего легко идентифицируемый продукт. Все это требует применения репортерных генов, которые сшиваются с регуляторной областью трансформирующего растения генов. Репортерные гены легко обнаруживаются (тестируются), и поэтому по ним можно обнаружить перенесенный в растение трансформирующий ген. Они также позволяют проводить отбор трансформированных клеток на этапе селекции. Гены, по которым проводят отбор трансформированных растений, называют еще селективными. Было протестировано несколько разных генов, которые можно использовать как доминантные селективные маркеры, и генов, чей белковый продукт можно обнаружить с помощью специальных методов. Поскольку многие из репортерных генов имеют бактериальное происхождение, они были снабжены регуляторными последовательностями, обеспечивающими их экспрессию в растительных клетках. Проводя отбор по доминантному маркеру, можно получить культуру, содержащую только трансформированные клетки. Так, в присутствии канамицина выживают только клетки растений, синтезирующих активную неомицинфосфотрансферазу. Используются гены устойчивости к другим антибиотикам: гигромицину, циклогексимиду, стрептомицину.

Выбор того или иного репортерного гена диктуется характером конкретного эксперимента. Если экспрессия гена мешает нормальному росту

растения, то его нельзя использовать как репортерный. Кроме того, по мнению экспертов-биотехнологов, присутствие некоторых генов и их продуктов может приводить к загрязнению коммерческого продукта. В связи с этим лучше не вводить гены устойчивости к антибиотикам в сельскохозяйственные растения.

В качестве репортерных генов используют гены, кодирующие  $\beta$ -D-глюкуронидазу. В системах трансформации чаще всего используется ген  $\beta$ -D-глюкуронидазы *E. coli* (GUS-ген). Он кодирует стабильный фермент, обычно отсутствующий в растениях, который катализирует расщепление  $\beta$ -D-глюкуронидов. Его активность в трансформированных растительных тканях можно обнаружить по появлению синей окраски в результате гидролиза неокрашенного субстрата – 5-бром-4-хлор-3-индолил-глюкуроновой кислоты. Альтернативный, более чувствительный метод детекции присутствия перенесенных генов связан с проявлением активности продуктов GUS-генов в растительных экстрактах. Фермент  $\beta$ -D-глюкуронидаза обуславливает флуоресценцию продукта гидролиза 4-метилумбеллиферил-D-глюкуронида.

Клонирован ген зеленого флуоресцентного белка из медузы. Удалось сконструировать ген, который правильно транскрибируется в растении. В ультрафиолетовом свете вытяжка из растений светится в зеленой части спектра. Благодаря внедрению трансгенных растений в сельском хозяйстве для последних двух маркеров возник новый аспект применения. Использование трансгенных растений проверяется. И для этих целей очень удобны методы детекции флуоресцирующих объектов.

#### *Получение трансгенных растений, не содержащих селективных генов*

Обычно при введении чужеродного гена в растение, одновременно вводится и селективный маркерный ген. Хотя до сих пор не было никаких указаний на то, что какой-либо из этих генов оказывает неблагоприятное воздействие на человека, животных или окружающую среду, однако последствия, к которым в принципе может привести включение в растения селективных маркерных генов, вызвали беспокойство общественности.

Например, продукты некоторых маркерных генов могут оказаться аллергенами или токсичными веществами, а гены устойчивости к антибиотикам могут попасть в патогенные почвенные микроорганизмы. Кроме того, присутствие селективных маркеров технически затрудняет трансформацию трансгенных растений дополнительными генами, поскольку один селективный маркер не может использоваться дважды. Были разработаны методы получения трансгенных растений без каких-либо маркерных генов.

Один из экспериментальных подходов к получению безмаркерных трансгенных растений включает совместную трансформацию растений двумя разными ДНК, одна из которых несет маркерный ген, а другая – интересующий исследователя чужеродный ген. В этом случае от 30 до 80% растений содержат оба гена, которые, однако, интегрированы в разные сайты хромосомной ДНК. После отбора трансформантов маркерный ген можно удалить из трансгенного растения с помощью обычного скрещивания.

В рамках другого подхода, селективный маркерный ген встраивают между мобильными растительными элементами (Тn-элементами) и такую конструкцию вводят в Т-ДНК вместе с геном транспозазы, которая вырезает участок ДНК между Тn-элементами и перемещает его в другой хромосомный сайт. В процессе встраивания Т-ДНК в ДНК растения-хозяина в 90% случаев селективный маркер, находящийся между двумя Тn-элементами, оказывается в другом сайте хромосомной ДНК, при этом, с вероятностью 50%, этот сайт находится далеко от исходного. Таким образом, селективный маркерный ген может использоваться для идентификации трансформированных растений, а затем удаляться при скрещивании.

#### *«Молчание» генов*

При встраивании большого числа одинаковых генов транскрипции их не происходило. То же наблюдалось в присутствии комплементарной ДНК. Это явление называют «молчанием» генов. Часто «молчание» генов коррелирует с метилированием. Возможно, что метилирование – результат узнавания ДНК как чужеродной (по соотношению АТ/ГЦ). Например, гены синтеза

антоцианов, перенесенные в петунию, были гиперметилованы и не транскрибировались, тогда как соседние гены были гипометилованы и активны. Метилирование может быть вызвано ДНК–РНК взаимодействием. Существует мнение, что накопление РНК до некоего критического уровня вызывает быструю ее деградацию. Этот механизм, возможно, выработался как защита от вирусной РНК. Таким образом, растение способно регулировать уровень экспрессии перенесенных генов.

Явление молчания генов может ограничить генноинженерный перенос даже при наличии сильных промоторов. В то же время это явление интересно с точки зрения процессов регуляции.

### **Препаративное выделение плазмид из *E. coli* в больших объемах**

Выделение плазмид в больших количествах из бактерий – это важный этап любой серии манипуляций, имеющей целью встраивание генов в трансформирующие векторы растений. Плазмиды могут содержать ген, предназначенный для переноса в растение. Разделение хромосомной и плазмидной ДНК основано на наблюдении, что существует узкая область рН 12,0–12,5, в которой хромосомная ДНК денатурирована, а плазмидная ДНК – нет.

Клетки обрабатывают ферментом лизоцимом для ослабления клеточной стенки, а затем лизируют додецилсульфатом натрия (ДСН) в присутствии NaOH. Отношение объемов суспензии клеток и щелочного ДСН имеет важное значение и должно строго соблюдаться, поскольку определяет конечное значение рН смеси. После нейтрализации, хромосомная ДНК ренатурирует, образуя нерастворимый сгусток, тогда как плазмидная – остается в растворе. Плазмиду осаждают из супернатанта этанолом, а затем очищают путем центрифугирования в градиенте плотности. Раствор ДНК смешивают с бромистым этидием (БЭ) и центрифугируют в градиенте плотности хлористого цезия. БЭ связывается с ДНК и уменьшает ее плотность. Поскольку кольцевая ДНК менее способна раскручиваться, чем линейная, в плазмидные молекулы проникает меньшее количество БЭ, и их плотность, следовательно, выше, чем у

линейной хромосомной ДНК. Хотя бактерии содержат кольцевые хромосомы, они слишком велики, чтобы выдержать процедуру выделения и остаться интактными, и, таким образом, в градиенте CsCl плазмидная ДНК локализуется в зоне, расположенной ниже зоны хромосомной ДНК. Обнаруживается ДНК в ультрафиолетовом свете. С помощью данного метода из 500 мл исходной культуры обычно получают 1–2 мг плазмидной ДНК, свободной от примесей РНК и хромосомной ДНК.

*Бромистый этидий (3,8-Диамино-5-этил-6-фенилфенантридиум бромид)— широко применяемый в молекулярной биологии агент для выявления ДНК. БЭ связывается с ДНК и при освещении ультрафиолетовым светом флюоресцирует оранжевым цветом, причем при связывании с ДНК интенсивность флюоресценции увеличивается в 20 раз.*

### **Введение чужеродных генов в хлоропластную ДНК**

У большинства высших растений в каждой клетке листа присутствует примерно 100 хлоропластов и каждый хлоропласт содержит примерно 100 копий хлоропластной ДНК. Для стабильной генетической трансформации хлоропластов, с целью изменения их функциональных характеристик, необходимо вводить чужеродные гены в хлоропластную, а не в хромосомную ДНК, длина которой примерно в  $10^4$ – $10^5$  раз больше. Кроме того, необходимо, чтобы чужеродные гены присутствовали во всех из примерно  $10^4$  молекул хлоропластной ДНК, содержащихся в одной клетке. Вначале чужеродные гены вводили в ДНК хлоропластов в составе плазмидного вектора, несущего неселективную чужеродную ДНК и селективный маркер, например ген устойчивости к антибиотику, ограниченные специфическими последовательностями хлоропластной ДНК. Селективный маркер – это ген, по которому проводится отбор трансформированных клеток. Такая стратегия была весьма эффективной, однако нередко селективный маркер мешал экспрессии фланкирующих хлоропластных генов. Чтобы решить эту проблему, разработали стратегию, в которой селективный маркер и чужеродный ген не были физически связаны друг с другом. Для этого, растения табака трансформировали смесью одинаковых количеств двух

разных плазмид: одна содержала селективный маркер (ген устойчивости к спектиномицину), фланкированный ДНК из одного участка хлоропластной ДНК, а вторая – чужеродный ген (ген устойчивости к канамицину), фланкированный последовательностями из другого участка хлоропластной ДНК. Такая трансформация двумя плазмидами называется котрансформацией. Оба гена имели прокариотические сигналы транскрипции, что обеспечивало их транскрипцию в хлоропластах, но не в ядре. Последовательности хлоропластной ДНК в плазмиде были организованы таким образом, что рекомбинация или встраивание в геном хлоропластов не приводила к нарушению работы какого-либо хлоропластного гена. После введения плазмид отбирали трансформированные растения табака на среде со спектиномицином. Хлоропласты из отобранных трансформантов проверяли на наличие продукта, детерминируемого геном устойчивости к канамицину (чужеродным неселективным геном). Примерно 30% спектиномицинустойчивых трансформантов экспрессировали также ген устойчивости к канамицину, что указывает на применимость котрансформации для введения чужеродных генов в хлоропластную ДНК.

### **Обработка ДНК ферментами рестрикции и лигирование**

Рестриктазы впервые были открыты благодаря их действию на чужеродную ДНК, попавшую в бактериальную клетку. Они представляют собой основной рабочий инструмент молекулярного биолога. К настоящему времени охарактеризованы многочисленные ферменты рестрикции, но наибольшее внимание уделяется рестриктазы типа II, поскольку именно они узнают определенные последовательности нуклеотидов внутри или около сайта их действия и разрезают обе нити двухцепочечной молекулы ДНК как показано на рисунке 2. Обычно за единицу (ед.) активности рестриктазы принимают активность, при которой 1 мкг ДНК фага *K* разрезается за 1 ч при 37 °С. На активность фермента может влиять ряд факторов: температура, ионный состав буфера, степень загрязнения ДНК, а также уровень и специфичность

метилирования ДНК. При обычной обработке ДНК рестриктазами удобно проводить реакцию в небольшом объеме, например в 20–40 мкл, когда раствор ДНК, десятикратную концентрацию буфера и фермент доводят до нужного объема стерильной дистиллированной водой.

Хотя для каждого фермента оптимальный состав буфера свой, чаще всего используют три типа буфера:

- десятикратный с высокой ионной силой – 100 мМ трис, pH 7,5; 100 мМ MgCl<sub>2</sub>; 1000 мМ NaCl;
- десятикратный со средней ионной силой – 100 мМ трис, pH 7,5; 100 мМ MgCl<sub>2</sub>; 10 мМ дитиотрейтол; 500 мМ NaCl;
- десятикратный с низкой ионной силой – 100 мМ трис, pH 7,5; 100 мМ MgCl<sub>2</sub>; 10 мМ дитиотрейтол.

Лигирование – это прием в генетической инженерии, в ходе которого чужеродная ДНК встраивается между двумя концами плазмидной ДНК с помощью фермента лигазы.

Для увеличения выхода кольцевых молекул ДНК со вставленным участком чужеродной нуклеиновой кислоты (гетеродимеров) используют различные стратегии, одна из которых – дефосфорилирование. Данные методы обычно предотвращают замыкание в кольцо одного или обоих фрагментов до того, как произойдет межмолекулярная реакция.

Чтобы получить максимальный выход нужных кольцевых гетеродимеров, важно, чтобы немодифицированная вставка присутствовала в реакции лигирования в правильном соотношении с плазмидной ДНК.

Не все полученные в процессе лигирования рекомбинантные молекулы ДНК будут удовлетворять задаче эксперимента. По окончании лигирования обнаруживаются разнообразные молекулы, включая мультимеры вставок или вектора, лигированные на себя.

После трансформации *E. coli* или *A. tumefaciens* нужными генами, необходимо идентифицировать колонии бактерий, содержащие рекомбинантные молекулы ДНК нужного типа.

## **Введение рекомбинантных плазмид в бактериальные клетки**

Впервые трансформацию *E. coli* очищенной ДНК осуществили в 1970 г. Мандел и Хига путем инкубации бактерий с ДНК бактериофага *K* в растворе  $\text{CaCl}_2$  при  $0^\circ\text{C}$ . Последующее развитие метода плазмидной трансформации продолжалось эмпирически. Современная процедура включает получение «компетентных» клеток. Компетентная клетка – бактерия, находящаяся в таком физиологическом состоянии, когда она может воспринимать экзогенные молекулы ДНК, быть реципиентом экзогенной ДНК. Такие бактерии можно использовать непосредственно или хранить в замороженном виде в состоянии компетентности, а затем использовать в нужный момент. Большинство методов включает взаимодействие бактерий и плазмиды при низкой температуре в присутствии дивалентных катионов, однако показано, что воспроизводимость и эффективность трансформации усиливают некоторые дополнительные факторы. К последним относятся используемый штамм и условия роста бактерий, качество воды и реактивов, использованных для приготовления растворов, чистота посуды и добавление диметилсульфоксида и дитиотреитола в буфер для трансформации.

При трансформации *E. coli* рекомбинантными плазмидами – продуктами реакций лигирования – важно поставить контрольные опыты по трансформации как для установления эффективности трансформации используемых компетентных клеток, так и для проверки надежности селекции и методик отбора трансформантов.

## **Основные методы трансформации растительных клеток с помощью агробактериальных векторов в составе *Agrobacterium tumefaciens***

Индукция образования корончатого галла и косматого корня агробактериями обычно происходит в участках поранения, и растительные клетки, как полагают, компетентны для трансформации только в течение короткого промежутка времени, вероятно, соответствующего S-фазе клеточного цикла, когда происходит репликация генома. Поранение может привести к следующим последствиям:

- 1) обеспечить бактериям доступ к участкам узнавания на поверхности

клеток;

2) стимулировать связанное с раневым ответом деление клеток, обеспечивающее компетентность растительных клеток для трансформации;

3) стимулировать продукцию образующихся в ране соединений, например ацетосирингона, которые привлекают агробактерии и активируют *Vir*-гены, необходимые для переноса T-ДНК.

Таким образом, для достижения трансформации клетки, растения должны находиться в S-фазе и быть легкодоступны для вирулентных агробактерий.

Эксплантат – это стерильный кусочек растительного материала, который помещают на питательную среду для получения каллуса и регенерантов. Хотя клетки эксплантата способны к регенерации в побеги, их расположение может препятствовать контакту с агробактериями и, следовательно, трансформации.

Особенно важно отметить, что зачатки многих органов в сложных эксплантатах, таких как сегменты гипокотилей и стебля, часто развиваются из покоящихся меристем или специфичных тканей, глубоко запрятанных под несколько слоев клеток эксплантата.

В пределах конкретных видов для многих приложений генетической инженерии растений важно идентифицировать культивируемые растительные клетки, которые как компетентны для трансформации, так и способны регенерировать в целые растения (эксплантаты). Эксплантаты могут варьировать по сложности от изолированных протопластов до целых проростков или фрагментов зрелых органов. Исходя из предположения, что поверхность по крайней мере некоторых клеток эксплантатов двудольных растений доступна для контакта с агробактериями и, эти клетки способны делиться *in vitro*, при разработке системы трансформации нового растения, прежде всего, надо рассмотреть возможность воспроизводимой регенерации данных растений. Многое зависит от эмпирического опыта подбора подходящей среды для регенерации побегов. Однако нельзя не учитывать основную анатомию, физиологию и характер развития выбранного растения при идентификации подходящих эксплантатов для культуры ткани, которые на какой-то стадии перейдут к регенерации побегов. Без этих фундаментальных

знаний поведение эксплантатов будет непредсказуемым и, следовательно, обострит любые проблемы, связанные с идентификацией возможно редких, трансформированных тканей. Например, внешние условия роста донорного растения и размер эксплантата часто определяют последующее поведение клеток в культуре ткани.

В больших гетерогенных эксплантатах, например сегментах листа, обычно только клетки определенных областей, в ответ на воздействие ростовой среды, переходят к делению и/или формированию зачатка органа. Часто на обширных участках эксплантата наблюдается слабый ростовой ответ, разрушение хлорофилла, почернение (обычно вызываемое продукцией полифенольных соединений) или разбухание клеток, что сильно увеличивает размер эксплантата. Эти три основных типа ответа часто оказывают ингибирующее действие на трансформацию. Однако важно осознавать, что присутствие исходного материала донорного растения, вероятно, в результате эндогенных уровней гормонов или особого типа физиологии эксплантата, часто оказывает сильное воздействие на клетки, начавшие интенсивно делиться в ответ на культивирование. Например, у многих видов, с высокой частотой удается индуцировать зачаток органа непосредственно из свежих эксплантатов тканей

или каллуса, все еще находящегося в контакте с исходным эксплантатом, тогда как устоявшийся каллус, изолированный от таких эксплантатов, может потерять способность к регенерации побегов даже после одного пассажа.

*Пассаж – 1. Повторяющиеся пересевы культуры клеток.*

*2. Инфицирование различных хозяев одним и тем же паразитом.*

*Эмбриогенез, в данном случае – это неполовой способ размножения, основанный на тотипотентности растительных клеток.*

*Эмбриогенные клеточные линии сохраняют способность к органогенезу длительный период времени и позволяют получить генетически однородный селекционный материал.*

Регенерация обычно с трудом происходит из трансформированных недифференцированных тканей, полученных из культивируемых более

нескольких месяцев клеток суспензии, а еще с большим трудом из каллусов, полученных из протопластов. Таким образом, прежде чем осуществлять трансформацию любой разновидности растений, чрезвычайно важно определить наиболее чувствительный эксплантат. Для многих культурных видов главной трудностью остается трансформация клеток, способных к регенерации побегов (органогенезу) или способных к эмбриогенезу, и поэтому большинство методов разработано в результате экспериментов на модельных системах культуры тканей, таких как табак и петуния. Для ясности, большинство из рассматриваемых ниже методик основано на использовании именно таких модельных систем. В целом, все основные манипуляции с культурой ткани должны быть действенными для успешной разработки системы трансформации конкретных видов растений.

## **Трансформация с помощью онкогенных штаммов дикого типа**

### ***A. tumefaciens* и *A. rhizogenes***

Индукция корончатых галлов может быть достигнута во всех случаях, когда Ti-плазида содержит *vir*- и *onc*- гены, а индукция косматого корня при использовании штаммов *A. rhizogenes* дикого типа, содержащих Ri-плазмиды.

Для большинства видов наиболее подходящим материалом для индукции опухоли служат стерильные проростки или размножаемые *in vitro* растения. Очень важно использовать стерильный растительный материал, чтобы избежать контаминации (заражения) трансформированной растительной ткани посторонними микроорганизмами. Такие загрязнения, если их не контролировать с помощью антибиотиков, инфицируют культуральную среду и могут привести к гибели растительных клеток. Кроме того, они способны исказить результаты любых биохимических или молекулярных исследований, проводимых на трансформированном материале. Если семена или

размножаемые *in vitro* растения недоступны, тогда, в отдельных случаях, следует инокулировать растения *in vivo*, а также

*Инокуляция (inoculation) – введение. В данном случае введение небольшого количества микроорганизмов в популяцию культивируемых клеток, ткань.*

стерилизовать ткань корончатого галла или косматого корня и перенести ее в культуру. В других случаях, для индукции опухоли *in vitro*, можно использовать поверхностно стерилизованные эксплантаты материала, растущего в теплице, при условии, что стерильность эксплантатов строго контролируется.

Подходящими эксплантатами считаются целые стерильные проростки, части проростков (например, гипокотили, семядоли, листья и корни), кусочки выращенной в теплице рассады или размножаемых *in vitro* растений. Состав используемых сред в какой-то мере зависит от вида растения и типа эксплантата. С другой стороны, фрагменты запасующих тканей (клубней, главных корней) часто сохраняют жизнеспособность в течение нескольких недель при культивировании на агаризованной среде, содержащей только неорганические соли. У большинства видов растений корончатые галлы или косматые корни развиваются на больших эксплантатах, культивируемых на простых средах, не содержащих фитогормонов. Главное требование к ростовой среде, используемой при трансформации и развитии опухоли, заключается в том, чтобы она обеспечивала жизнеспособность эксплантата при ограниченном образовании каллуса. При использовании небольших эксплантатов, в состав среды можно включить и микродобавки ростовых веществ, чтобы сохранить эксплантат и обеспечить ограниченное деление окружающих рану клеток, во время инкубации с агробактериями. Проблему выживаемости эксплантата можно решить, помещая в среду большое количество небольших эксплантатов, чтобы поддерживать высокую плотность инокулируемого растительного материала. Следует подчеркнуть, что большинство тканей корончатых галлов и косматого корня после срезания с поверхности эксплантатов способны расти на простых средах, часто не содержащих фитогормонов и содержащих антибиотики, которые инактивируют бактериальные, но не растительные клетки. Таким образом, для спасения трансформантов редко требуются сложные среды, что оставляет достаточно возможностей для эмпирического подбора сред.

Поскольку физиологически и морфологически нормальные растения

невозможно регенерировать из онкогенных клеток корончатых галлов, большинство современных векторов на основе Ti-плазмид неонкогенны. Как упоминалось выше, главная особенность онкогенных систем трансформации с помощью агробактерий состоит в том, что галлы и косматые корни вырастают из эксплантатов, и, следовательно, трансформированные клетки легко отличить. Это очень важное свойство, поскольку трансформация эксплантатов с помощью неонкогенных векторов часто не позволяет отобрать по селективному признаку трансформированные ткани на фоне нетрансформированных клеток. Таким образом, онкогенные векторы, которые к тому же несут гены устойчивости к антибиотикам, очень полезны для быстрого подбора наилучших эксплантатов и методик инокуляции, чтобы получить оптимальную трансформацию.

### **Трансформация больших гетерогенных эксплантатов с помощью неонкогенных Ti-плазмидных векторов**

Приступить к эксперименту по трансформации с помощью неонкогенных векторных систем следует после выбора подходящих эксплантатов и условий инокуляции и селекции, позволяющих получать резистентные к антибиотику каллусы с помощью онкогенных штаммов агробактерий. Необязательно, что условия, дающие эффективную трансформацию определенного эксплантата с помощью онкогенной векторной системы, подойдут для трансформации с помощью неонкогенных векторов. Неонкогенные ткани гораздо чувствительнее к условиям культивирования, поскольку в них, очевидно, не проявляются физиологические и ростовые свойства ткани корончатых галлов и косматого корня. И в этом случае корректировать условия культивирования, подбор селективных генов можно только эмпирически.

Большие гетерогенные эксплантаты представляют собой срезы органов, содержащие огромное количество клеток. Например, такие эксплантаты, как листовые диски или сегменты стебля, клубня, корня, черешка и проростка, часто содержат различные типы тканей и клеток, способных при культивировании *in vitro* дедифференцироваться и переходить к пролиферации.

После обработки подобных эксплантатов агробактериями для регенерации трансформированных растений можно использовать три основных способа.

1. Трансформированные побеги можно регенерировать из каллуса, развивающегося на эксплантатах в селективных условиях, используя среду для индукции побегов, содержащую антибиотики.
2. Побеги можно регенерировать непосредственно из эксплантатов на среде для регенерации и провести скрининг, т.е. тестирование на экспрессию маркеров трансформации. Кроме того, трансформированные побеги можно определить по нормальной способности к корнеобразованию на селективной среде.
3. Трансформированные побеги можно регенерировать через стадию каллуса. В этом случае с помощью культивирования на соответствующей селективной среде на эксплантатах получают каллусы. Затем, из установившихся трансформированных тканей (калусных или суспензионных культур) индуцируют индивидуальные побеги на среде для регенерации.

Итак, побеги можно регенерировать либо непосредственно из эксплантатов, либо через стадию каллуса, а селекцию проводить или одновременно с регенерацией, или после нее.

При использовании агробактерий в качестве трансформирующих векторов существенно, чтобы достаточное число интактных клеток в участках поранения тканей эксплантатов переходила к дедифференцировке и клеточному делению. Следует сохранить на минимальном уровне прямой органогенез и продолжающийся рост из предсуществующих меристем, поскольку нет уверенности, что клетки, вступившие на этот путь развития, могут быть трансформированы. Если не контролировать последние два пути развития, то придется применять лабораторные методы отбора для идентификации трансформированных побегов на фоне гораздо большей популяции побегов, полученных из нетрансформированных тканей.

В качестве примера ниже описывается получение подходящих эксплантатов из тепличных растений табака (листовых дисков) и из культивируемых *in vitro* проростков льна (гипокотилей).

Разработка системы неонкогенной трансформации для больших

гетерогенных эксплантатов сводится к следующим этапам:

1. Определяют подходящую среду, которая стимулирует регенерацию побегов из участков поранения (желательно у ряда эксплантатов).

Важно убедиться, что зачатки побегов не развиваются из клеток, находящихся в глубоких слоях первоначального эксплантата, поскольку они не чувствительны к агробактериям.

2. Определяют наиболее благоприятные внешние условия для роста растения-донора, чтобы получить наиболее чувствительные эксплантаты.

3. Устанавливают оптимальный тип и размер эксплантата, который можно использовать при данном объеме среды и в данной культуральной посуде.

4. Подбирают концентрации соответствующего антибактериального агента (например, цефотаксима или карбенициллина), которые ингибируют рост агробактерий, но еще допускают более или менее нормальное образование каллуса и регенерацию побегов.

5. Определяют минимальные концентрации селективирующих агентов (антибиотиков, например – канамицина, гигромицина, блеомицина, или гербицидов, например – глифосата), которые подавляют: а) образование каллуса; б) регенерацию побегов и в) укоренение побегов.

6. Подбирают условия инокуляции и инкубации, которые позволяют эксплантату достаточное время оставаться жизнеспособным при контакте с агробактериями, чтобы обеспечить возможность трансформации без нарушения образования каллуса или регенерации побегов.

### **Прямая регенерация трансформированных растений: трансформация листовых дисков табака**

Во многих случаях при культивировании растительной ткани легче регенерировать побеги из эксплантатов органов, чем из полученных на основе протопластов тканей или устоявшихся (адаптированных) каллусных культур. Онкогенная область T-ДНК во многих широко используемых неонкогенных векторах *A. tumefaciens* заменена на доминантный селективный маркерный ген неомицинофосфотрансферазы (NPT). Неомицинофосфотрансфераза

фосфорилирует и таким образом инактивирует антибиотик неомицин/канамицин, который в норме токсичен для клеток высших растений. Трансформированные клетки в месте поранения, экспрессирующие ген NPT, можно отбирать на средах, содержащих антибиотик. В другом случае инокулированные эксплантаты можно поместить на среду для регенерации побегов. Побеги развиваются непосредственно из трансформированных клеток с небольшим дополнительным образованием каллуса. Агробактерии удаляют путем обработки антибиотиками, которые нетоксичны для растительных клеток, такими, как цефотаксим.

Листовые диски, полученные от размножаемых *in vitro* или тепличных растений, особенно удобны для экспериментов по трансформации пасленовых, например *Nicotiana tabacum*, *Petunia hybrida* и томатов, а также некоторых других семейств. При культивировании на соответствующих средах листовые диски быстро переходят к формированию каллуса в области срезанных краев эксплантата, особенно там, где они находятся в контакте со средой. Если такие эксплантаты поместить непосредственно на среду для регенерации побегов, то в течение короткого промежутка времени (10–15 дней) вблизи срезанных краев появляются побеги вместе с сопутствующим каллусом. Среда, которая стимулирует регенерацию из листовых дисков, обычно отличается высоким отношением цитокининов к ауксинам.

Описанная ниже методика трансформации предусматривает использование листовых дисков *Nicotiana tabacum*. Важно отметить, что срезы листовых пластинок табака не содержат покоящихся почек или зачатков органов и, следовательно, большинство побегов, формирующихся у края среза, происходит из дедифференцированных клеток, чувствительных к трансформации агробактериями. Многие другие типы эксплантатов содержат покоящиеся меристемы или почки и могут преимущественно продуцировать зачатки побегов из меристем камбия или других глубоких слоев клеток эксплантата, которые нечувствительны к агробактериям. Такова ситуация с гипокотильями льна и для подобных эксплантатов требуется другой подход к регенерации трансформированных побегов.

### *Методика получения трансформированных побегов*

1. Помещают молодые, полностью распустившиеся листья табака в плоский стерильный сосуд из пирекса и заливают 10-процентным раствором моющего средства Domestos. Осторожно, чтобы не повредить листья, удаляют все пузырьки с поверхности листьев путем осторожного помешивания стерильным шпателем и оставляют на 15 мин.

2. Тщательно ополаскивают 4 раза в 400 мл стерильной воды.

3. Работая на стерильной белой кафельной плитке, удаляют все белые, поврежденные при стерилизации участки листьев и среднюю жилку, а затем разрезают лист на квадраты площадью 0,5–1 см<sup>2</sup> с помощью стерильного скальпеля. Режущий инструмент следует регулярно стерилизовать, погружая в спирт и обжигая в пламени горелки. Перед тем как разрезать эксплантат, инструменты необходимо охладить. Подготавливают достаточное количество материала, чтобы получить 200 кусочков листа, однако во избежание высыхания не следует нарезать сразу весь материал. Достаточно за один раз нарезать кусочки листа на 2–3 чашки. Помещают по 10-12 кусочков листа на каждую из 20 чашек со средой Мурасиге – Скуга (MS) и герметизируют чашки липкой лентой. Инкубируют чашки в течение 2 суток при 24–26°C и низкой освещенности (2000 люкс, фотопериод 16 ч).

4. Эксперимент включает следующие контроли:

Контроли (8 чашек). Помещают по два неинокулированных контроля на каждую из нижеперечисленных сред:

MS; MS + цефотаксим (Сх); MS + канамицин (Km); MS+Сх+Km;

Инокуляции (12 чашек). Помещают кусочки листа в разведенную 1:50 суспензию ночной культуры соответствующего штамма агробактерий, стряхивают избыток жидкости и помещают их на исходную чашку с MS.

*Ночную культуру бактерий получают следующим образом: засевают питательную среду, содержащую соответствующий селективный антибиотик, колонией бактерий, инкубируют в течение ночи при 37°C и интенсивном встряхивании.*

Обматывают края чашки липкой лентой и инкубируют (24–26 °C) при слабой освещенности (2000–4000 люкс) еще 2–4 дня.

5. После инкубации с агробактериями в течение

2 суток или при появлении видимых бактериальных колоний переносят инокулированные кусочки листа на следующие среды: 6 чашек S+Cx+Km; 6 чашек MS+CX.

6. Инкубируют чашки при низкой освещенности (2000–4000 люкс) и температуре 24–26°C, периодически наблюдая за развитием побегов и каллуса.

Следующий этап процедуры трансформации – срезание побегов, развившихся в различных условиях обработки, и перенесение их на селективную среду для укоренения и выявления трансформированных побегов. Если эксперимент по трансформации данного сорта проводится впервые, то прежде, чем переносить побеги, важно сделать некоторые наблюдения, помогающие спланировать дальнейшие эксперименты с помощью метода листовых дисков.

Определяют участки образования каллуса и регенерации побегов. Определяют число и размер побегов, получаемых при каждой обработке, и оценивают:

- нормальную способность листовых дисков формировать каллус и регенерировать побеги;
- влияние антибиотика, подавляющего развитие *A. tumefaciens* (в данном случае, цефотаксима) на образование каллуса и регенерацию побегов.

Подбирают концентрации селективного антибиотика (канамицина). Нетрансформированные побеги иногда выживают в процессе селекции – это явление часто рассматривают как «пробой». Однако корни, как правило, в большей степени чувствительны к антибиотикам, и, следовательно, способность побегов укореняться на селективной среде, содержащей более высокие концентрации селективного агента представляет собой весомое доказательство их трансформированной природы.

Срезают достаточно большие побеги, чтобы с ними было легко манипулировать (>0,5 см), и полностью удаляют каллус.

Подрезают нижнюю часть побега, пока не останется верхушечная почка и два или три листа с пазушными почками.

Помещают срезанные побеги основанием вниз в агар со средами MS+Cx) и

MS+Sx+Km и инкубируют при 24–28°C и средней освещенности (4000 люкс). Контрольный опыт на среде, не содержащей селективного агента, необходим, чтобы удостовериться в том, что укоренение происходит нормально.

В последующие 5–20 дней периодически наблюдают за эксплантатами побегов, следя за появлением признаков образования корней, хлороза и формирования новых листьев. В большинстве случаев только трансформированные побеги успешно укореняются на среде, содержащей канамицин.

### **Поддержание и размножение трансформированных побегов**

Для размножения культивируемых побегов многих видов растений известны два основных способа. Побеги можно высадить в компост, выращивать их фотоавтотрофно и размножать путем получения семян. Это, разумеется, необходимо для изучения нормальной экспрессии и наследования перенесенного гена. Однако может оказаться, что после длительной тяжелой работы регенерировано всего несколько трансформированных побегов. В этих случаях целесообразнее размножить этот чрезвычайно ценный материал вегетативно. Такая необходимость возникает потому, что многие гетеротрофные побеги не приживаются в почве как фотоавтотрофные растения (культивируемые побеги не способны к интенсивному фотосинтезу, а зависят от питательных веществ, содержащихся в ростовой среде). До тех пор пока растения не сформируют восковую кутикулу, многие из них будут увядать и никогда не восстановятся. Кроме того, в этих условиях растения очень восприимчивы к поражению грибами. Возможна и атака вредителей или болезнетворных микроорганизмов прежде, чем завяжутся семена, так что разумно сохранять линии растений в культуре. Для примера описано размножение побегов табака.

#### *Размножение побегов табака с помощью пазушных почек*

1. Удаляют укорененные побеги со среды и помещают на стерильную белую кафельную плитку.
2. Разрезают стебель на несколько частей, каждая из которых содержит

пазушную почку. Удаляют листья, оставив только короткие (2–3 мм) отрезки черешков.

3. Помещают отрезок морфологически нижним концом в питательную среду MS+Cx. Инкубируют при низкой освещенности (2000–4000 люкс) и температуре 24–26°C, периодически наблюдая за развитием побегов из пазушных почек.

4. Развившиеся пазушные побеги срезают. Они могут быть использованы для размножения, как описано выше.

5. При получении достаточного количества побегов их укореняют и переносят в почву, выращивая в теплице.

### **Регенерация трансформированных растений через стадию каллуса: трансформация эксплантатов проростков льна**

Трансформацию эксплантатов проростков льна проводят путем их инокуляции в культуре агробактерий, совместном культивировании двое суток, последующем удалении агробактерий с помощью антибиотика и получении трансформированного каллуса, из которого регенерируются трансформированные побеги.

Одна из важнейших задач при разработке методики генетической трансформации любых видов растений заключается в идентификации подходящих эксплантатов, из которых может произойти эффективная регенерация побегов. Обычный подход – это определить эксплантат и комбинации сред, которые стимулируют регенерацию растения путем органо- или эмбриогенеза. Невозможно предсказать условия, приводящие к регенерации побегов у каждого вида, поэтому изложенная ниже методика дает только общие принципы поиска. Как правило, если литература по культивированию какого-либо отдельного вида отсутствует, можно попытаться осуществить регенерацию путем случайного подбора сред, успешно используемых для других видов. Не существует твердых и простых правил составления оптимальной среды для регенерации, и состав среды можно определить только эмпирическим путем. Однако обнаружено, что

определенные типы эксплантатов регенерируют более легко, чем другие. Чаще это гетерогенные эксплантаты, содержащие различные типы клеток, некоторые из них могут реагировать на определенные среды непосредственным формированием зачатков побега или даже эмбриогенезом. Примеры гетерогенных эксплантатов включают гипокотили, стебли проростков и черешки. Гомогенные эксплантаты, такие как семядоли, полоски эпидермиса и запасаящая паренхима, в норме содержат клетки одного или очень небольшого числа типов и, таким образом, имеют тенденцию реагировать на воздействие среды для регенерации по принципу «все или ничего», что часто затрудняет поиск правильной среды для регенерации.

Трансформация через стадию каллуса будет описана на примере проростков льна, однако с помощью сходной методики были трансформированы и другие виды. В предварительных экспериментах на растениях льна комбинация эксплантатов гипокотилиа размером 1–2 мм, вырезанных из стерильных проростков двухдневного возраста, давала наиболее воспроизводимую индукцию каллуса и регенерацию на среде MS. К сожалению, при всех комбинациях эксплантатов и среды большинство побегов возникает путем прямого формирования зародышей в глубоких клеточных слоях ткани исходного эксплантата. В этом заключена основная трудность, поскольку такие клетки не чувствительны к трансформации агробактериями. Однако часто бывает так, что образовавшийся на эксплантатах каллус, в котором происходит развитие большого числа зачатков побегов, тоже способен к регенерации, особенно если он еще прикреплен к первоначальному эксплантату. Такой каллус, предварительно «заложный» благодаря росту в местах поранения на регенерирующих эксплантатах, может продолжать регенерировать после срезания и переноса на свежую среду для регенерации по крайней мере в продолжение одного или двух пассажей. Способность такого каллуса регенерировать в селективных условиях после удаления из ткани первоначального эксплантата сильно уменьшает вероятность того, что какие-либо регенерирующие побеги могут возникнуть путем непосредственного формирования зародыша без дедифференциации клеток, и, следовательно,

более вероятно, что такие побеги трансформированы.

## **Получение стерильных проростков льна и регенерация из explantатов побегов льна**

### *Выращивание стерильных проростков льна*

Стерильные проростки представляют собой удобный источник растительного материала для экспериментов по трансформации по следующим причинам:

1. Не требуются сложные среды для получения проростков и количество растений лимитируется только наличием семян.
2. Легко следить за стерильностью перед инокуляцией.
3. Проростки содержат гетерогенную смесь легко эксплантируемых тканей.
4. Образование каллуса и регенерация побегов из материала проростков эффективна у многих видов растений.

Вначале стерилизуют семена в банке на 200 мл 10-процентным раствором коммерческого отбеливателя в течение 20 мин. Время от времени встряхивают, чтобы не допускать прилипания семян друг к другу или к банке.

Далее тщательно ополаскивают 6 раз стерильной водой. Удаляют избыток воды и с помощью стерильного шпателя переносят семена в сосуд, содержащий стерильный вермикулит, смоченный питательным раствором Кнопа. Равномерно распределяют семена по поверхности вермикулита с помощью стерильного шпателя. Закрывают крышку банки и инкубируют (24–26°C) при средней освещенности (4000 люкс) с фотопериодом 16 ч.

### *Регенерация побегов из explantатов проростков*

1. Через два дня после прорастания переносят проростки льна из стерильной культуры и помещают в стерильную чашку Петри.
2. Нарезают explantаты гипокотыля, семядолей и корня длиной 1–2 мм и помещают по 15–20 explantатов на среду MS+Sx. Инкубируют на свету (3000–4000 люкс) при 24–26°C.
3. Регулярно наблюдают за образованием каллуса и органоогенезом на explantатах, обращая особое внимание на локализацию и стадию развития

любых регенерирующих побегов.

Через три недели эксплантаты образовывали каллус по краям среза гипокотилия и происходила регенерация нескольких побегов. Через шесть недель эксплантаты покрывались побегами на различных стадиях развития. Гистологический анализ показал, что эти побеги развиваются путем прямого формирования зародышей из слоя клеток внутри или вблизи сосудистых тканей. Эти побеги трансформированными быть не могут. Вместе с тем, по краям среза гипокотилия льна можно индуцировать образование каллуса и цефотаксим не влияет на нормальное развитие каллуса. Следовательно, эти участки клеточного деления на эксплантатах гипокотилия льна представляют собой источник компетентных клеток для трансформации агробактериями. Цефотаксим мало влияет и на регенерацию побегов.

### **Трансформация гипокотилей, регенерация из трансформированного каллуса, селекция, размножение и укоренение трансформированных побегов**

#### *Методика трансформации*

1. Подготавливают следующие чашки для инокуляции агробактериями:  
*Серия А:* две чашки, содержащие по 20 мл разведенной в 50 раз ночной культуры агробактерий в MS. *Серия Б:* две чашки, содержащие по 20 мл MS (контроль).
2. Соблюдая стерильность, удаляют проростки из сосудов и помещают на стерильную белую кафельную плитку. Не переносят сразу слишком много проростков, поскольку они могут высохнуть.
3. С помощью стерильных пинцета и скальпеля из каждого проростка нарезают сегменты гипокотилей длиной по 1–2 мм. Гипокотили обычно легко узнать по зеленой окраске. Режущие инструменты следует регулярно стерилизовать, смачивая их в спирте, обжигая в пламени горелки и охлаждая перед тем, как разрезать эксплантаты. Нарезают по 40 сегментов гипокотилия для каждой серии.
4. Помещают сегменты гипокотилия (20 сегментов на чашку) на чашки,

приготовленные, как указано на стадии 1, и оставляют в ламинарном боксе на 2 ч).

5. Переносят с помощью стерильного пинцета инокулированные и неинокулированные сегменты гипокотыля с каждой чашки на чашки со средой MS (по 4 чашки) и обматывают края чашек липкой лентой.
6. Инкубируют чашки при 24–26°C с фотопериодом 16 ч (3000–4000 люкс) от 16 ч (в течение ночи) до 2 суток. Переносят на содержащую антибиотик среду прежде, чем появятся колонии агробактерий.
7. С помощью стерильного скальпеля переносят все сегменты гипокотыля с одной чашки каждой серии на 5 чашек со средой MS+Cx, а сегменты гипокотыля с другой чашки каждой серии на 5 чашек со средой MS+Cx+Km.
8. Обматывают края чашек липкой лентой и инкубируют, как на стадии 6. Периодически наблюдают за развитием побегов и каллуса.

*Регенерация побегов из трансформированного каллуса*

1. Наблюдают за инокулированными (серия А) и контрольными (серия Б на среде MS+Cx) эксплантатами и определяют, происходит ли нормальное образование каллуса и регенерация после обработки и без обработки агробактериями. Аналогичным образом проверяют контрольные и инокулированные эксплантаты на селективной среде (MS+Cx+Km) и отмечают появление любого трансформированного каллуса или побегов.
2. Осторожно срезают каллус с инокулированных эксплантатов, переносят на свежую селективную среду (MS+Cx+Km) и инкубируют при 24–26°C и 3000–4000 люкс (с 16-часовым фотопериодом) в течение 2–6 недель. Резистентные к канамицину каллусы продолжают расти на селективной среде. Аналогичным образом переносят все каллусы, образовавшиеся на неинокулированных проростках, на среду MS+Cx и инкубируют, как описано выше.
3. Отмечают регенерацию побегов из Km и контрольного каллусов. Регенерация побегов из недифференцированных клеток – гораздо более редкое событие, чем формирование побегов из первичных эксплантатов.
4. Важно иметь в виду, что у большинства видов каллус, формирующийся на

эксплантатах, помещенных на селективные среды, может лишь частично состоять из трансформированных, резистентных к антибиотику клеток. Таким образом, критический момент – это достижение правильного соотношения ткань – среда, чтобы обеспечить достаточное количество трансформированных клеток.

#### *Селекция, размножение и укоренение трансформированных побегов*

Оценить трансформированный статус любых регенерированных побегов можно по их способности к росту в присутствии селективного агента. Однако нетрансформированные организованные ткани, как правило, достаточно устойчивы к тем концентрациям антибиотиков, которые в норме подавляют рост каллуса. Таким образом, трансформированный фенотип должен быть подтвержден при тестировании активности маркерного фермента и выявлении Т-ДНК.

Следует отметить, что гибридизация ДНК по Саузерну (подробно описанная в разделе III) обеспечивает строгое доказательство того, что побеги, регенерированные из Km-каллусов в описанных выше условиях являются трансформированными.

Кроме того, следует обратить внимание на то обстоятельство, что зародыши побегов, образующиеся на недифференцированных каллусах, предположительно развиваются из отдельной «активированной» клетки. При регенерации побегов из гетерогенного (в отношении типа клеток) каллуса на селективной среде эффективно образуются трансформированные клоны. До сих пор не существует доказательств того, что из гетерогенной смеси трансформированных и нетрансформированных клеток развиваются химерные, т.е. генетически неоднородные побеги.

#### *Методика*

1. Не захватывая каллус, срезают у основания достаточно большие побеги (более 0,5 см), чтобы с ними было легко обращаться.
2. Удаляют все листья у основания побега и быстро помещают 3–4 побега основанием вниз в среду MS+Sx+Km.
3. Закрывают крышку сосуда, не затягивая полностью, и обматывают края

липкой лентой. Инкубируют при 24–27°C при умеренной освещенности (4000 люкс) с 16-часовым фотопериодом.

4. Отмечают рост как трансформированных, так и нетрансформированных побегов в течение нескольких последующих недель. Побег с инокулированных эксплантатов продолжают развиваться, тогда как рост нетрансформированных побегов в течение нескольких дней угнетается и побеги обесцвечиваются.
5. Трансформированные побеги, удлинившиеся на среде MS+Cx+Km, можно размножить вегетативно, срезая секции междоузлий и помещая их обратно на ту же самую среду. Пазушные побеги должны развиваться из пазушных почек на срезах междоузлий в течение 1–2 недель. Селекция и размножение побегов до переноса на среду для укоренения устраняет две проблемы:
  - а) необходимость получения укоренившихся трансформированных побегов (которые очень трудно получить в случае льна) для вегетативного размножения;
  - б) использование цефотаксима на стадии укоренения, поскольку любые агробактерии, которые еще растут на регенерированных побегах, будут уничтожены уже во время стадии селекции и размножения.
6. Укореняют побеги, отобранные и размноженные на MS+Cx+Km, путем переноса здоровых пазушных побегов на среду для укоренения льна (0,5-кратная MS+Km) Отмечают развитие корневой системы в течение последующих 2–3 недель.

### **Выделение мезофильных протопластов табака**

Растительный протопласт – это по существу клетка с удаленной клеточной стенкой. При правильном культивировании протопласты будут заново синтезировать клеточную стенку и вступят в митоз. Таким образом, культивирование протопластов – это удобный путь получения популяций, состоящих из отдельных клеток. Процедура выделения протопластов зависит от вида растения и природы исходного материала (например, мезофилл листа, срезы проростков или культивируемые в суспензии клетки). Протопласты

обычно высвобождают из растительных тканей путем расщепления клеточной стенки смесью пектиназ, целлюлаз и гемицеллюлаз, растворенных в среде с высоким осмотическим давлением. Такая среда сдерживает тургор и не дает клеткам лопнуть.

У многих видов культурных растений не определены благоприятные условия для восстановления клеточной стенки и последующего деления выделенных протопластов. В случае других видов растений сообщалось о низкой частоте деления. Отметим, что для трансформации необходимо использовать достаточно жизнеспособные протопласты, чтобы они могли пережить совместное культивирование с агробактериями или физические методы введения ДНК, например микроинъекцию, электропорацию и химически индуцированный эндоцитоз (см. главу III). Разработка эффективной системы получения протопластов у ранее неизученных видов (или даже различных разновидностей одного и того же вида) требует больших временных затрат и значительных усилий и должна проводиться только в том случае, если другие пути получения трансформантов не увенчались успехом. В частности, до сих пор не удавалось эффективно регенерировать нормальные побеги из протопластов основных видов злаковых и зерновых бобовых культур. Кроме того, регенерация побегов остается проблематичной для многих овощных и фуражных бобовых культур, несмотря на то, что для них были успешно разработаны методики. В приведенном эксперименте в качестве модельной системы используется выделение и культивирование мезофильных протопластов из листьев *N. tabacum*.

#### *Методика выделения протопластов*

1. Срезают почти полностью распутившиеся листья с растений табака двухмесячного возраста.
2. Стерилизуют листья, погружая их на 20 мин. в 10-процентный коммерческий отбеливатель (например, Domestos), а затем ополаскивают 5 раз в 400 мл стерильной воды.
3. Дают листьям подсохнуть в потоке воздуха ламинарного бокса. Переносят листья (нижним эпидермисом вверх) на стерильную белую кафельную

плитку и тонким пинцетом удаляют нижний эпидермис.

4. Оставляя центральные жилки, вырезают участки листовой пластинки (с которых удален эпидермис) и подвергают клетки плазмолизу. Для этого кусочки листа с незащищенным мезофиллом помещают на поверхность жидкой питательной среды MS с повышенным содержанием сахарозы, которое вызывает плазмолиз клеток данного вида (30 мл), находящейся в чашке Петри. Постоянно следят за тем, чтобы кусочки листа не высыхали.
5. Когда чашка будет полностью заполнена кусочками листьев, с помощью стерильного шприца на 60 мл удаляют среду и заменяют ее на 20 мл смеси ферментов (пектиназ, целлюлаз и гемицеллюлаз) в растворе 9% маннитола. Инкубируют в темноте (25°C, 16–18 ч).
6. Высвобождают протопласты из ткани путем осторожного перемешивания расщепленных кусочков листа в чашке Петри с помощью пастеровской пипетки, длинного пинцета или шпателя. Наклоняют чашку и удаляют большие агрегаты из суспензии протопластов с помощью стерильного пинцета. Пропускают суспензию через стерильное сито с отверстиями 64 мкм в другую чашку Петри.
7. Стерильным шприцем на 60 мл переносят протопласты в центрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой. Центрифугируют при 400g 10 минут, чтобы осадить протопласты.
8. С помощью пастеровской пипетки осторожно ресуспендируют осадок протопластов в MS 9M (среда дополнительно содержит 9% маннитола). Переосаждают протопласты центрифугированием при 400g 5 минут.
9. Дважды отмывают протопласты путем осаждения 400g и ресуспендирования 5 минут в MS 9M.
10. Суспендируют протопласты в 5 мл (или другом подходящем объеме) среды MS 7M (среда дополнительно содержит 7% маннитола) и подсчитывают число жизнеспособных протопластов с помощью камеры Горяева. Она представляет собой предметное стекло с углублением и нанесенной сеткой, позволяющей проводить подсчет количества клеток.
11. Пластиковую чашку Петри заливают 5 мл 0,8-процентной агаризованной

среды MS 7M. Затем на чашку высевают протопласты в 2,5 мл жидкой MS 7M при концентрации около  $1,5 \times 10^5$  живых клеток в 1 мл. Конечная плотность высева составляет  $5 \times 10^4$  клеток в 1 мл.

12. Инкубируют (в темноте, 25°C) и ежедневно наблюдают за протопластами.

### **Трансформация протопластов путем совместного культивирования с агробактериями**

В процессе образования корончатого галла агробактерии способны трансформировать клетки, прилежащие к поврежденной ткани, которые претерпевают клеточные деления в ответ на поранение. Клетки интактного растения, как правило, проявляют максимальный онкогенный ответ на инфекцию *A. tumefaciens* между 1 и 3 днями после поранения. У различных видов эта «компетентная» фаза совпадает с первыми клеточными делениями в ответ на поранение. Раневой ответ можно имитировать в культуре тканей, если превратить покоящиеся мезофильные клетки листа или активно делящиеся клетки суспензионной культуры в протопласты и индуцировать регенерацию клеточной стенки и клеточное деление в соответствующей среде. В определенной фазе становления культуры протопластов клетки компетентны для трансформации *A. tumefaciens*. Технология совместного культивирования предусматривает инкубацию протопластов в присутствии агробактерий в соответствующей жидкой питательной среде и позволяет получать большое число трансформантов в контролируемых условиях. Варьируя условия культивирования, плотность высева и изменяя процедуру селекции, можно получить трансформированные колонии клонального происхождения. Важно иметь в виду, что корончатые галлы – это смесь нетрансформированных и различных типов независимо трансформированных клеток. Следовательно, фенотип галла представляет собой сумму фенотипов всех клеток, обнаруживаемых в опухоли. Однако клеточная популяция трансформантов, полученных с помощью совместного культивирования, однородна, и, таким

образом, маскирующие фенотипы не появляются. Это позволяет проводить селекцию и анализ экспрессии генов без значительных артефактов. Трансформированные колонии можно отбирать путем селекции на среде, содержащей антибиотики (когда используют векторы, имеющие доминантные селективные маркеры, например гены резистентности к канамицину).

#### *Инокуляция клеток, полученных из протопластов, агробактериями*

Клетки считаются компетентными для трансформации, когда в них начинается репликация ДНК. Синтез ДНК во многих системах протопластов начинается одновременно с регенерацией клеточной стенки во время первого деления, но такие клетки, как правило, слишком слабые, чтобы пережить совместное культивирование с агробактериями. Во многих случаях целесообразно инокулировать культуры агробактериями, когда большинство клеток в популяции вступает во второй период синтеза ДНК перед вторым делением. В случае мезофильных протопластов табака, выделенных из тепличных растений, эта стадия наступает через 6–8 дней культивирования.

#### *Методика инокуляции клеток агробактериями*

1. Чтобы увидеть формирование межклеточных пластинок, наблюдают за развитием протопластов, окрашивая клетки тинопалом – красителем, окрашивающим клеточные стенки. Когда более 60% клеток завершат первое деление, культура готова к инокуляции агробактериями.
2. С помощью стерильной пастеровской пипетки добавляют к протопластам две капли культуры штамма *Agrobacterium* из расчета около 100 бактерий на клетку. Обязательно ставят неинокулированный контроль.
3. Обматывают края чашек лентой Nescofilm и инкубируют в темноте при 24–26 °C в течение 36–48 ч).

#### *Наблюдения, отмывание и удаление агробактерий*

Во время совместного культивирования растительных клеток и бактерий, как правило, образуется пленка растительных клеток, связанных с бактериальными агрегатами. Последующие процедуры направлены на осторожное разрушение этих агрегатов, чтобы наиболее эффективно отобрать полученные трансформанты и смыть как можно больше контаминирующих агробактерий.

## Методика

1. Наблюдают за совместным культивированием с помощью инвертированного микроскопа.
2. Разъединяют слипшиеся растительные клетки путем осторожного пипетирования. Переносят клетки из каждой чашки в отдельную центрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой. Осаждают клетки центрифугированием при 400g в течение 5 мин.
3. Ресуспендируют осадок (т.е. повторно переводят клетки из осадка в суспензию) в MS 7M, содержащей 1 мг/мл карбенициллина (или другого соответствующего антибиотика в зависимости от использованного штамма агробактерий), и снова центрифугируют.
4. Окончательно ресуспендируют клетки в 5 мл жидкой MS 7M, содержащей соответствующие антибиотики. Высевают клетки на чашку поверх 5 мл той же самой агаризованной (0,8%) среды и инкубируют.
5. Через 7–10 дней последующего роста клетки должны восстановиться после совместного культивирования, и их переносят на среду MS 3M (среда дополнительно содержит 3% маннитола), содержащую антибиотики, и инкубируют еще в течение недели до начала селекции.

### *Селекция трансформированных колоний*

Колонии трансформированных растительных клеток можно отбирать путем посева на среды, содержащие высокие концентрации антибиотиков. Известно несколько важных моментов, касающихся условий селекции.

Во-первых, микроколонии должны иметь достаточный размер, чтобы их можно было высевать при низких плотностях. При слишком высокой плотности колонии прорастают друг в друга, что затрудняет получение клонального материала, а также создает проблемы из-за перекрестного питания.

Во-вторых, условия селекции должны быть такими, чтобы массовый некроз нетрансформированного материала не ингибировал рост трансформированных колоний. Таким образом, может быть целесообразна

первичная селекция на средах, содержащих минимально пороговые ингибирующие концентрации антибиотиков, в особенности, если протопласты не отличаются высокой жизнеспособностью. Предполагаемые трансформанты можно отобрать и перенести на среды, содержащие оптимальные концентрации селективного агента.

В-третьих, собственная устойчивость колонии растительных клеток к антибиотикам с увеличением размера (возраста) колонии, как правило, повышается.

Приведенные выше соображения в равной степени относятся к выделению трансформантов из клеточных суспензий, совместно культивированных с *A. tumefaciens* и популяций протопластов, трансформированных путем прямого поглощения векторной ДНК. Описанные методы можно применять для селекции трансформированных колоний во всех экспериментах, подразумевающих использование больших популяций малых гомогенных эксплантатов.

#### *Методика*

1. С помощью пастеровской пипетки переносят микроколонии в стерильные центрифужные пробирки и осаждают при 400 g.
2. Отмывают микроколонии культуральной средой (например, MS для табака) и ресуспендируют в 10 мл (или любом другом подходящем объеме) среды.
3. Подсчитывают число колоний в 1 мл с помощью камеры Горяева.
4. Заливают колонии (500 колоний на 1 мл) в 10 мл агаризованной среды для селекции трансформантов (например, для табака используют MS+Km (100 мкг/мл)+Сх (250 мкг /мл) в чашке Петри. Высевают и некоторое количество микроколоний в той же среде, но без селективного агента, например, MS+Сх (250 мкг/мл) для контроля выживаемости.

Для этого готовят необходимое число микроколоний для одной чашки Петри (5000 колоний) в теплой (37°C) центрифужной пробирке. Удаляют среду, заменяют на 8 мл расплавленной селективной среды (40°C), встряхивают круговым движением для перемешивания и немедленно выливают на поверхность чашки Петри.

5. Обматывают края чашки лентой Nescofilm, а затем инкубируют на свету (4000-5000 люкс) при 24–28°C. Культивируют в течение 3–6 недель, наблюдая за ростом резистентных к канамицину колоний, и оценивают частоту трансформации.

#### *Регенерация растений табака из каллуса*

1. Когда трансформированные колонии достигнут диаметра 1 см или более, переносят каждый каллус на среду для регенерации (например, MS+Km для трансформированного каллуса табака) в отдельные сосуды для роста (стандартные пробирки или чашки Петри), чтобы индуцировать побеги.
2. Инкубируют при 24–26°C и освещенности 4000–5000 люкс в течение 2–4 недель и периодически наблюдают регенерацию побегов.
3. Регенерированные побеги можно размножить, укоренить и выращивать до созревания семян.

#### *Примечания*

1. Среда MS содержит соли MS со следующими добавками:

Пиридоксин 9,50 мг/л  
Тиамин 9,90 мг/л  
Никотиновая кислота 4,50 мг/л  
Кинетин 0,25 мг/л  
2,4-Д 2,00 мг/л  
Гидролизат казеина 2000,00 мг/л  
Сахароза 30000,00 мг/л,  
рН среды 5,8

2. Селективные среды, если не указана другая концентрация, содержат Km- 100 мкг/мл; Сх-200 мкг/мл.

3. Среда MS, предназначенная для регенерации побегов, содержит следующие количества фитогормонов:

ИУК 8,00 мг/л; кинетин 2,56 мг/л.

4. Среда MS, предназначенная для культивирования недифференцированного каллуса *N. tabacum*, содержит следующие добавки:

НУК (нафтилуксусная кислота) 2,0 мг/л;

6-БАП (6-бензиламинопурин) 0,5 мг/л.

5. *MS 9M, 7M, 3M (Культивирование протопластов *N. tabacum*).*

К MS добавляют маннитол в требуемом количестве – 9%, 7% или 3% (вес на объем).

6. Все приведенные выше среды на основе MS могут быть агаризованы путем добавления 0,8% агара (8 г/л). Агар, как правило, растворяют и добавляют в среду перед стерилизацией.

### **Трансформация растительных протопластов изолированной векторной ДНК**

Чтобы упростить манипуляции с ДНК и частично решить проблему ограничения круга хозяев, растительные протопласты трансформируют путем непосредственного введения векторной ДНК. Агробактерии вирулентны преимущественно для двудольных растений. Подавляющее большинство однодольных растений агробактерии не инфицируют. Введение нуклеиновых кислот в растительные протопласты не новый метод. Уже в течение многих лет его используют для изучения распространения, репликации и экспрессии вирусов растений. Большинство современных методов введения векторной ДНК в протопласты растений было первоначально разработано для вирусных нуклеиновых кислот и основывалось на аналогичных подходах, используемых при работе с вирусами животных.

Идеальная система трансформации с помощью векторной ДНК должна:

- защищать векторную ДНК от нуклеаз или механической деградации;
  - обеспечивать эффективное введение векторной ДНК в протопласты;
  - не быть цитопатогенной (не вызывать значительного снижения жизнеспособности клеток после введения изолированной ДНК)
  - доставлять вектор в форме, способной к интеграции с ядерным геномом или, если необходимо, к существованию в виде свободного репликона;
  - преодолевать барьер некомпетентности растительных клеток. Клетки компетентны к трансформации агробактериями в S-фазе клеточного цикла.
- Необходимо, чтобы трансформация с помощью изолированной векторной ДНК

возможна была бы на любом этапе развития растительной клетки.

В целом методы трансфекции, т.е. прямого введения изолированной ДНК в протопласты можно разделить на четыре основные группы:

1. Химически стимулированный эндоцитоз (ПЭГ).
2. Электропорация.
3. Микроинъекции.
4. Бомбардировка микрочастицами (биолистика).

### **Трансфекция протопластов с помощью полиэтиленгликоля**

Полиэтиленгликоль представляет собой сильно гидрофильное вещество и способен связывать много свободной воды в растворе. Таким образом, при высоких концентрациях ПЭГ такие макромолекулы, как ДНК, не могут оставаться в растворе и осаждаются. Мембрана протопласта в норме отрицательно заряжена. Благодаря фосфатным группам ДНК тоже имеет отрицательный заряд, и, следовательно, взаимное отталкивание зарядов препятствует взаимодействию между ДНК и протопластами. При очень высоких концентрациях (30–40%) ПЭГ минимизирует взаимное отталкивание зарядов; таким образом, клеточные мембраны могут прийти в тесный контакт с ДНК. Было также показано, что ПЭГ представляет собой и сильный стимулятор эндоцитоза у протопластов растений; при добавлении ПЭГ они способны поглощать большие частицы, например целые хлоропласты, липосомы или бактерии. Таким образом, общий механизм воздействия ПЭГ связан с преципитацией, т.е. осаждением плазмидной ДНК на плазматической мембране и затем стимуляцией ее поглощения путем эндоцитоза.

Многие другие гидрофильные полимеры с длинной цепью (например, поливиниловый спирт), длинноцепочечные катионы (например, поли- $\alpha$ -орнитин, поли- $\alpha$ -лизин) и высокие концентрации дивалентных ионов (например,  $Zn^{2+}$  и  $Cu^{2+}$ ) тоже используются для стимуляции поглощения ДНК. В отличие от остальных веществ ПЭГ гораздо менее токсичен по отношению к большинству протопластов, и, как правило, можно подобрать такую концентрацию, при которой достигается хороший уровень поглощения ДНК

при незначительном повреждении клеток. Концентрация ПЭГ 6000 в интервале 15–25% и 5 мкг плазмиды на  $10^6$  протопластов могут стимулировать поглощение до 1000 копий плазмиды на протопласт. Существуют некоторые основания считать, что частота трансформации возрастает с концентрацией векторной ДНК. Верхний предел количества ДНК, которое может взаимодействовать с протопластами в присутствии ПЭГ не вызывая заметных повреждений, вероятно, составляет около 50-200 мкг на  $10^6$  протопластов, в зависимости от источника последних. Если используют более высокие, чем 25%, концентрации ПЭГ, то увеличиваются и степень повреждения клеток, и частота их слияния, что затрудняет получение трансформантов. После стимуляции эндоцитоза любая плазида, связанная на внешней стороне протопластов, удаляется с помощью ДНК-азы. Затем из протопластов выделяют суммарную ДНК и оценивают количество встроенного в нее вектора с помощью ДНК-гибридизации по Саузерну (метод описан в разделе III), используя радиоактивно меченую ДНК вектора в качестве пробы. Такие методы, в сочетании с анализом временной экспрессии вектора в обработанных плазмидой клетках позволяют быстро подобрать подходящие условия для трансформирования.

#### *Методика*

Готовят суспензию культуры протопластов. Берут 4 центрифужные пробирки, каждая из которых содержит по  $2 \times 10^6$  протопластов в 1 мл ростовой среды (например, MS 9M), – по одной пробирке для каждой концентрации ПЭГ: 1, 5, 10, 20%; осаждают протопласты при 400g 7 минут и удаляют супернатант. Осадок осторожно суспендируют и оставляют при комнатной температуре на одну минуту. Снова добавляют указанные концентрации ПЭГ. Перемешивают и оставляют на 30 минут при 28°C. Смесь разбавляют средой и осаждают протопласты центрифугированием. Осадок ресуспендируют в 1 мл среды и добавляют ДНКазу – 2 единицы в 10 мкл. Оставляют на 30 минут, а затем осаждают протопласты. Протопласты промывают жидкой средой для инкубации. Подсчитывают число целых протопластов.

## Трансформация растительных клеток путем микроинъекций

Техника микроинъекций, первоначально разработанная в 1970 г. для клеток животных Грассманом и Дьякумакосом, в настоящее время стала методом для введения небольших молекул, макромолекул (ДНК, РНК, белков), органелл и вирусных частиц в самые различные животные клетки. Методика основана на использовании стеклянных микропипеток с диаметром кончика 0,5–10 мкм, с помощью которых осуществляют прямой перенос макромолекул в цитоплазму или в ядро реципиентной клетки. Последние иммобилизуют на твердой подложке, искусственно связывают с субстратом или закрепляют посредством пипетки с присоской. Поскольку микроинъекция ДНК оказалась эффективным методом трансформации животных клеток, различные исследователи пытались разработать подобные методы для трансформации клеток растений. Однако с растительными клетками это долго не удавалось. Успех этих экспериментов был обусловлен главным образом разработкой таких методических подходов, которые позволяют локализовать ядра и ориентировать протопласты таким образом, чтобы чужеродная ДНК могла быть введена непосредственно в ядра протопластов без заметного снижения их выживаемости. Новые приемы способствовали более успешной внутриядерной инъекции и, благодаря этому, воспроизводимой трансформации.

Преимущества и недостатки техники микроинъекций для трансформации растительных клеток.

### *Преимущества:*

- очень высокие частоты трансформации (15–60%); таким образом, метод может быть полезен в тех случаях, когда доступно только небольшое количество клеток, протопластов или органов;
- метод позволяет вводить макромолекулы в цитоплазму или ядро;
- среднее количество инъецированных макромолекул на клетку можно оценить (приблизительно 0,1–1,0 мкл) и контролировать;
- метод допускает наибольшую гибкость в выборе типа и размера молекул или

органелл, используемых в качестве донора (например, ДНК, хромосомы, ядра, органеллы);

- биологический эффект инъецированного материала можно оценить в природном окружении и наблюдать после инъекции;
- методика не требует обязательного удаления клеточной стенки и, таким образом, может использоваться в случае тех видов растений, которые в настоящее время не удается регенерировать из колоний, полученных на основе протопластов. Это основная причина интереса к микроинъекциям.

Вполне вероятно, что в будущем наибольшее внимание будет приковано к микроинъекциям клеток, способных к эмбриогенезу, клеток пыльцы, эмбриогенных суспензионных культур или изолированных семяпочек. Кроме того, мишенью могут стать клетки развивающихся зачатков, побегов или эмбриогенные ткани, изолированные зародыши и т.п.

*Недостатки:*

- метод относительно дорого наладить и для его воспроизведения требуется высококвалифицированный и опытный персонал. Процесс медленный – квалифицированный работник способен инъецировать 20–100 клеток за день;
- для ядерной трансформации чужеродной ДНК обычно введение необходимо осуществлять непосредственно в ядро реципиентной клетки.

А

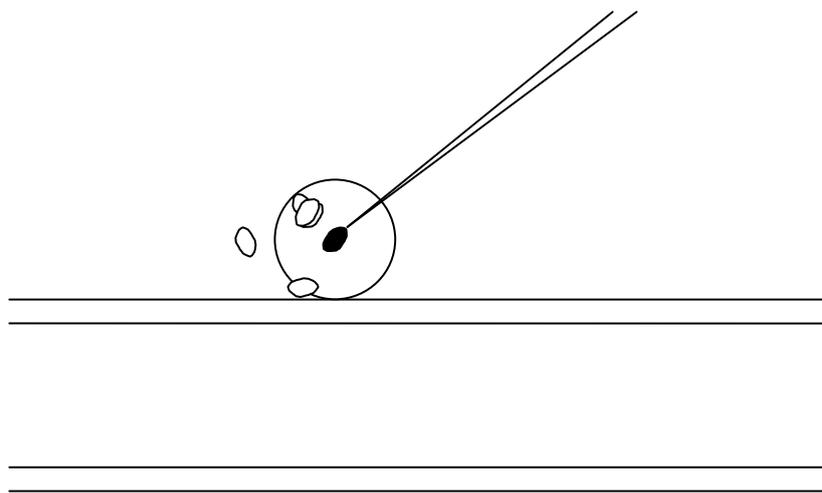


Рис. 6. А. Метод, основанный на использовании поли-L-лизина

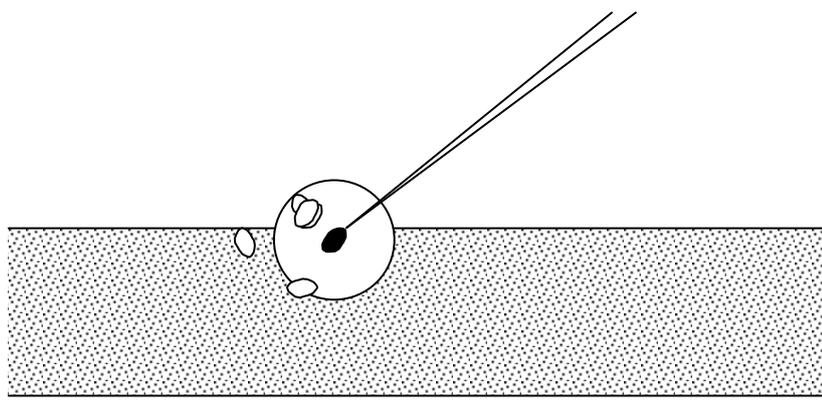


Рис. 6. Б. Агарозный метод

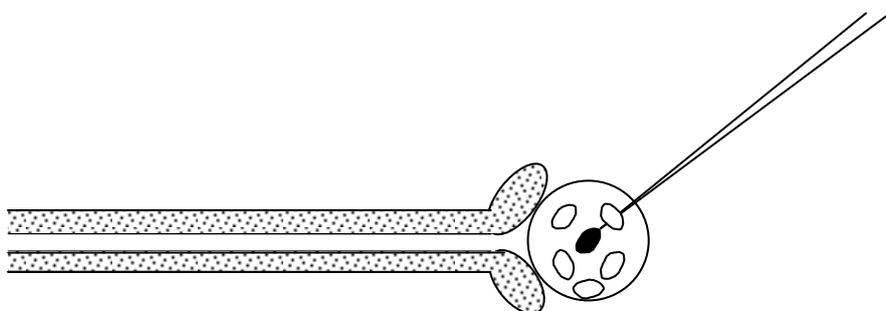


Рис. 6. В. Метод удерживающей пипетки

Введение микропипетки может оказывать повреждающее действие на реципиентные клетки.

Для культивируемых животных клеток, которые уплощены, прикрепляются к твердому субстрату и не имеют клеточной стенки, положение ядра в цитоплазме клетки не составляет проблемы. Это справедливо и в отношении яйцеклеток млекопитающих. При работе с растительными клетками очень трудно проколоть клеточную стенку без забивания кончика иглы. Наличие клеточной стенки и форма растительных клеток затрудняют визуализацию ядра. Если клетка **иммобилизована** в неправильной ориентации, то практически невозможно попасть в ядро, не разрывая вакуоль, что вызывает немедленную гибель клетки. Иммобилизация сама по себе тоже способствует некоторому повреждению протопластов;

- для выращивания микроинъецированных клеток требуются специальные методы культивирования.

Несмотря на описанные выше проблемы, в разработке методов микроинъекций для растительных клеток, особенно протопластов, достигнут большой прогресс. В ранних исследованиях проводили инъекции в цитоплазму протопластов табака при 70-процентной выживаемости. В этих экспериментах использовали клетки двух-, трехдневного возраста, полученные из протопластов, которые сформировали тонкую клеточную стенку и способны прикрепляться к покровному стеклу, покрытому поли-L-лизинем (рис. 6, А). За микроинъекцией наблюдали, вводя флуоресцентный краситель. Однако игла микроинъектора редко попадала в ядро из-за того, что при использовании этого метода иммобилизации протопластов клеток трудно локализовать ядра. Поли-L-лизин часто обладает токсическим действием по отношению к протопластам.

Более поздняя разработка заключается в том, чтобы заплывать протопласты в очень тонкий слой легкоплавкой агарозы. Благодаря данному методу иммобилизации, многие протопласты находятся у поверхности агарозы и только частично окружены ею, так что их нетрудно инъецировать (рис. 6, Б). При этом локализация ядра – непростая задача. Преимущество метода состоит в том, что инъецируемые протопласты (клетки) уже находятся в культуральной

среде, обеспечивающей поддержание их жизнеспособности. Разработан еще один метод, предусматривающий иммобилизацию протопластов с помощью специально предназначенной «удерживающей пипетки» (рис. 6, В). Протопласт можно втянуть или освободить, прикладывая положительное или отрицательное давление к удерживающей пипетке, соединенной со шприцем. Метод допускает манипуляцию протопластами для оптимальной ориентации ядра относительно инъекционной пипетки. Чтобы легко визуализировать ядро иммобилизованных протопластов (клеток) для инъекции чужеродной ДНК, обычно используют инвертированный микроскоп, снабженный дифференциальной интерференционной оптикой (Nomarski). Кроме того, во многих случаях удобно окрашивать ядра ДНК-специфичными флуоресцентными красителями, не снижающими жизнеспособность (Hoechst 33258) и визуализировать протопласты (клетки) с помощью инвертированного микроскопа.

Микроинъекции осуществляют под объективом с 40-кратным увеличением. Микропипетку сначала заполняют раствором для инъекций, а затем направляют в иммобилизованный протопласт (клетку), используя микроманипулятор. После введения микропипетки в ядро соответствующий объем инъецируемого раствора переносится в него путем вдувания или под давлением с помощью шприца, соединенного одним концом с микропипеткой, а другим – с системой регуляции давления. Если клетки иммобилизованы на предметном стекле или в агарозе, то ядра обычно инокулируют после того, как клеткам дали время восстановиться, обычно в конце первого дня после прикрепления или заплывания. Очень удобно иммобилизовать клетки на специальной микроскопической пластинке с нанесенной сеткой. Это позволяет локализовать отдельные клетки в любое время до или после инъекции с помощью видеозаписи. Таким образом, можно следить за их развитием и предпринять соответствующие действия, чтобы обеспечить их рост в культуре.

Если используются удерживающие пипетки, то протопласты следует выделять из жидкой культуры на стадии, когда они компетентны для трансформации, проводить инъекции и затем культивировать в таких условиях,

чтобы их можно было идентифицировать. В большинстве случаев инокулированные протопласты культивируют в виде отдельных клеток на фидерных культурах (рис. 7). Фидерная культура обеспечивает жизнедеятельность инъецированных клеток. Инъецировать можно лишь небольшое количество клеток, а отдельные клетки или малые их количества даже в оптимальной питательной среде не делятся и вскоре погибают. В качестве клеток фидерной культуры используют клетки того же вида, что и для инъекций. Они отделяются от инъецированных нейлоновой марлей, которая допускает обмен химическими веществами между всеми клетками. Таким образом, инъецированные клетки остаются жизнеспособными, размножаются и вскоре достигают такого количества, что могут культивироваться без фидерных клеток. Эффективность посева после инъекции обычно уменьшается на 10-70%, но если используется эффективная техника микрокультивирования, это не представляет большой проблемы, поскольку частоты трансформации очень высоки (в среднем 15–25%). Гибридизация по Саузерну показала, что трансформанты, образующиеся из микроинъецированных клеток, содержат перенесенную ДНК, организованную так же, как при векторном переносе.

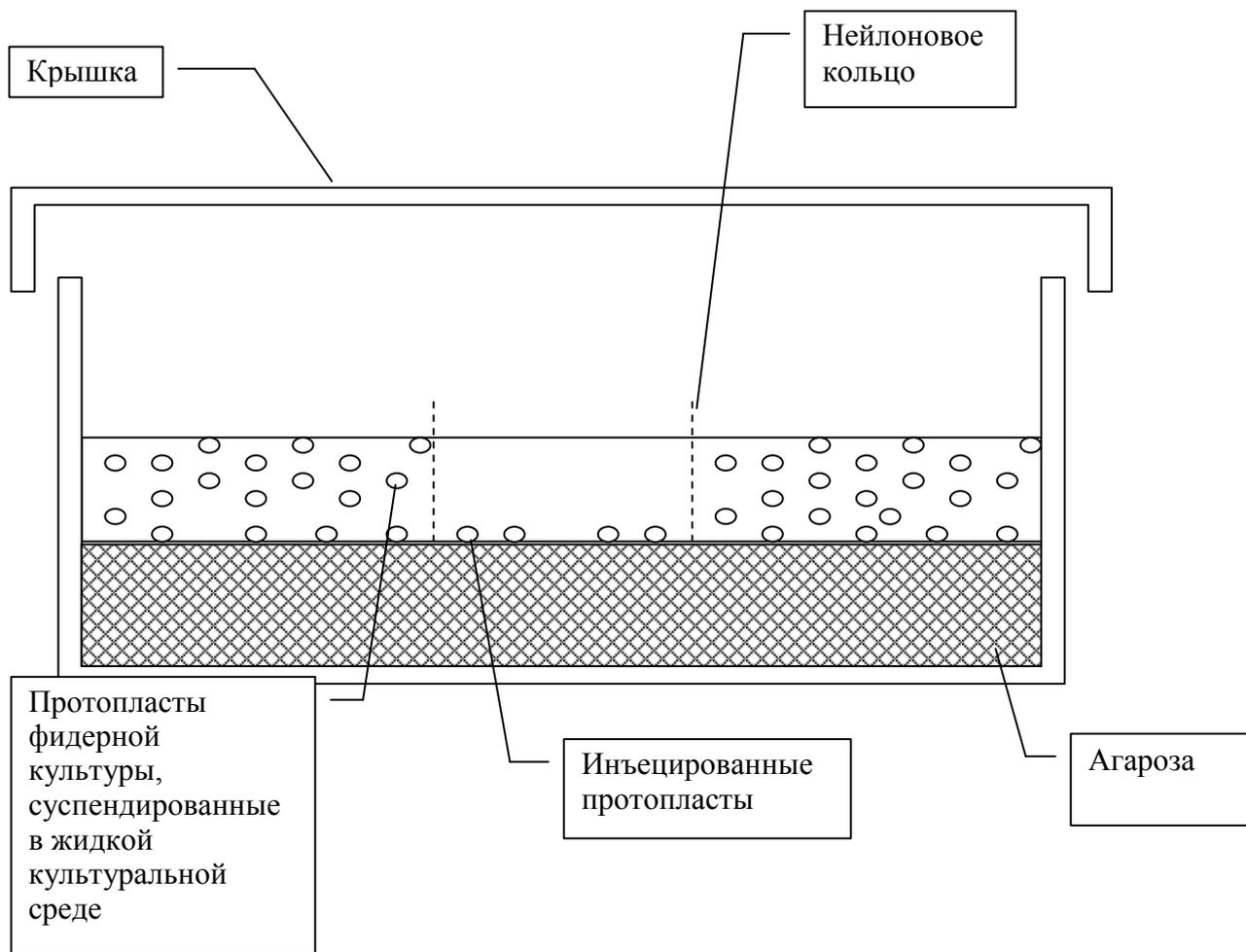


Рис. 7. Метод культивирования клеток после инъекции, который предусматривает отделение их от клеток фидерной культуры нейлоновой марлей

### **Трансформация протопластов с помощью электропорации**

В 1982 г. Нейман с соавторами показали, что частота трансформации клеток мыши экзогенной ДНК значительно увеличивается при воздействии электрических импульсов. Электропорация, как был назван этот процесс, вызывает кратковременное образование пор в плазматической мембране, через которые такие макромолекулы, как ДНК, перемещаются внутрь клетки. Диаметр пор достигает не менее 30 нм и они существуют в течение нескольких минут после импульса. Напряженность поля (градиент напряжения) и длительность импульса (или время спада) – это две основные переменные величины, влияющие на проницаемость клеточных мембран при электропорации. Напряженность поля, необходимая для индукции

электропорации, связана с диаметром клеток.

Для характеристики электрического импульса необходимо задать как амплитуду (напряжение), так и постоянную спада. Постоянная спада – это время, требующееся для снижения напряжения. Электропорирующий импульс создается при разрядке конденсатора в рабочей камере, которая в самодельных и некоторых коммерческих устройствах представляет собой два плоских металлических электрода, помещенных в стерильную пластиковую кювету. Для электропорации протопласты суспендируют между электродами в солевом растворе. Импульс можно вывести на экран осциллографа, типичный импульс показан на рис. 8. В настоящее время есть более совершенные фирменные приборы, например, электропоратор ТА 750, который способен с помощью микропроцессорного устройства задавать импульс практически прямоугольной формы с практически мгновенным спадом. Возможности прибора позволяют легко и точно изменять различные параметры электропорации (напряжение, длительность импульса, число импульсов и время между импульсами). Перенос генов путем электропорации был разработан для протопластов растений. При условии выживания протопластов после обработки электрическими импульсами, число используемых клеток и проблемы, связанные с селекцией трансформированных клеток, идентичны таковым, которые возникают при трансформации протопластов с помощью ПЭГ. Существуют в принципе два различных подхода к применению электропорации. ДНК можно успешно вводить в протопласты, используя либо высоковольтный импульс малой длительности, например, 1,5 кВ в течение 10 мкс, либо низковольтный импульс гораздо большей длительности, например 350 В в течение 54 мс. Последняя процедура более контролируема.

Разработка и последующая оптимизация методики электропорации специально для трансформации протопластов растений была осуществлена с помощью двух различных подходов.

1. Изучение временной экспрессии векторной ДНК в популяции протопластов, подвергшихся электропорации.

2. Стабильная трансформация и селекция трансформированных колоний. В

этом случае необходимо определение частоты возникновения

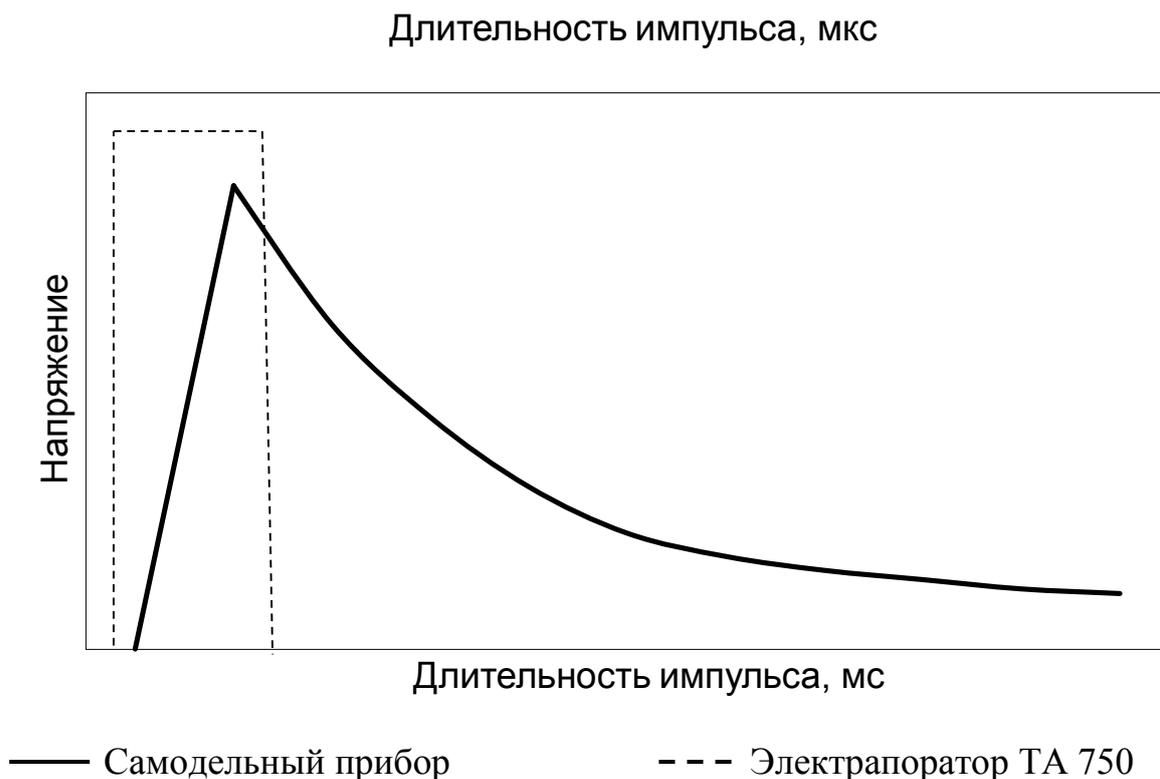


Рис. 8. Кривая импульса на экране осциллографа

стабильно трансформированных колоний, образующихся в результате различных процедур электропорации.

Проведенные исследования позволили определить условия, дающие максимальную экспрессию легко скринируемого продукта индикаторного гена (хлорамфениколацетилтрансферазы, CAT) после электропорации протопластов векторной ДНК. Было показано, что эффективность электропорации, которая измеряется количеством ДНК, поглощенной протопластами, можно количественно связать с активностью CAT. Поэтому оптимизация методики электропорации заключается в том, чтобы подвергать популяцию протопластов различным по напряжению и длительности импульсам, а также использовать серии импульсов, а затем анализировать через соответствующее время активность CAT. Результаты таких экспериментов менее прямые, чем кажется на первый взгляд, поскольку увеличение напряжения и длительности импульса

приводит к пропорциональному увеличению гибели клеток. В результате, величина активности САТ, выявленной в популяции протопластов, недооценивает количество вектора, включенного каждой клеткой. Поэтому эффективность электропорации зависит от того, измеряют ли ее на всей исходной популяции или на тех клетках, которые остаются жизнеспособными после обработки. Установлено, что импульс длительностью 54 мс при 350 В обеспечивает максимальную активность САТ и она достигает пика через 24–48 часов после электропорации.

Методом электрослияния получены межвидовые гибриды у *Nicotiana*: мезофильные протопласты были «слиты» в электрическом поле (200 В). Из общего количества  $9 \times 10^4$  слитых протопластов *Nicotiana* было получено около 100 зеленых гибридных колоний. После 4 месяцев роста в культуре все гибриды формировали побеги, а некоторые формировали также корни.

После короткого времени проведения высоковольтных импульсов растительные протопласты экспрессируют чужеродные гены в функциональные продукты трансляции. Успешная экспрессия в реципиентных клетках при переносе ДНК электропорацией продемонстрирована на примере двух типов промоторов – NOS (нопалинсинтетазного)-промотора Тi-плазмиды *A. tumefaciens*, с которого экспрессировалась САТ-активность, и 35S-промотора вируса CaMV.

Протопласты моркови были подвергнуты электропорации в присутствии плазмиды pNOS САТ в электрическом поле 200–350 В в течение 54 мс. Это привело к экспрессии чужеродной ДНК.

В оптимизированных условиях электропорации перенос генов осуществлен как в протопласты табака, так и в протопласты кукурузы, следовательно, метод применим как по отношению к двудольным, так и по отношению к однодольным растениям. Экспрессия вводимой в протопласты ДНК при электропорации определяется уже через несколько часов, по сравнению с неделями и месяцами, необходимыми для трансформации Тi-плазмидной ДНК в природных условиях. Кроме того, при переносе агробактериями, активность САТ не проявляется у однодольных, а

электропорация позволяет осуществить такой перенос. Стабильная трансформация животных клеток свидетельствует о том, что для интеграции ДНК в хромосому растения необязательно наличие прямых повторов длиной 25 п.н., фланкирующих Т-ДНК или связанных с интеграцией Т-ДНК функций.

Известны другие биологические эффекты электрических полей. Так, минутные электрические токи порядка 1–2 мкА стимулируют дифференциацию побегов из каллусных культур табака, повышая ее в 5 раз. Локализация вновь образованных побегов зависит от направления тока. Аналогичная стимуляция образования корней и побегов наблюдается также у пшеницы. Предполагается, что такой эффект вызван искусственным током, проходящим через растительные клетки. Практическим применением этого метода является быстрая регенерация растений из соматональных вариантов и протопластных культур в экспериментах по генетической трансформации. Соматональные варианты получают путем слияния соматических клеток.

### **Бомбардировка микрочастицами**

Бомбардировка микрочастицами, или биолистика – многообещающий метод введения ДНК в растительные клетки. Золотые или вольфрамовые сферические частицы диаметром 0,4–1,2 мкм покрывают ДНК, осажденной  $\text{CaCl}_2$ , спермидином или полиэтиленгликолем и «выстреливают» ими в клетки из специального «ружья», приводимого в действие газами, образующимися при сгорании пороха, сжатым воздухом или гелием. Частицы разгоняются до скорости 300–600 м/с и пробивают клеточную стенку и мембраны растительной клетки. При этом их плотность такова, что клетки практически не повреждаются.

Попав в клетку, ДНК, покрывающая частицы, интегрируется в растительную ДНК. Метод бомбардировки микрочастицами позволяет трансформировать растения самых разных видов, в том числе однодольные и хвойные, в которые не удается ввести ДНК с помощью *Agrobacterium*.

Бомбардировку микрочастицами можно использовать также для введения чужеродной ДНК в суспензию растительных клеток: культуры клеток,

меристематические ткани, незрелые зародыши и пыльцу широкого круга растений. Кроме того, с помощью этого метода были транспортированы гены в хлоропласты и митохондрии. На поверхность микрочастиц можно осадить плазмидную ДНК, растворенную в буфере. Это позволяет повысить частоту трансформации путем увеличения количества плазмидной ДНК; однако следует иметь в виду, что слишком большие ее количества могут оказаться губительными для клетки.

В трансформированных таким способом клетках, идентифицируемых по экспрессии маркерного гена, введенная ДНК зачастую экспрессируется лишь кратковременно. Пока чужеродная ДНК не встроится в геном растения, она с большой вероятностью утрачивается при делении трансформированных клеток. Как интеграция, так и экспрессия чужеродных генов может зависеть от конфигурации вектора, используемого для их введения. Например, частота трансформации повышается, если используется линейная, а не кольцевая ДНК. Кроме того, при бомбардировке микрочастицами высокомолекулярные плазмиды (более 10 т.п.н.) могут фрагментироваться, поэтому уровень экспрессии чужеродных генов окажется ниже, чем в случае плазмид меньшего размера.

Подводя итог изложенному в главе материалу можно заключить, что для трансформирования растительных эксплантатов с помощью агробактерий наиболее эффективной оказалась система двойных векторов. Один вектор – природный, из которого удалены гены опухолеродности, обеспечивает перенос необходимых генов в растительную клетку. Другой – создан экспериментально и включает те гены, которыми трансформируется растение. Недостатком такого метода является то, что агробактерии не вирулентны для большинства однодольных растений, а значит и не могут быть использованы для их трансформации.

Электропорация и химическое стимулирование поглощения плазмиды протопластами используется в том случае, если впоследствии возможно у данного вида получить каллус, способный к регенерации побегов.

Эффективными для трансформации всех видов клеток являются

микроинъекции и бомбардировка микрочастицами. Микроинъекции ДНК в ядро или цитоплазму клетки обеспечивают высокий процент трансформации растительного материала, но метод трудоемкий и позволяет инжецировать небольшое количество клеток. Ограничение метода бомбардировки связано с возможностью фрагментации ДНК, осажденных на микрочастицах, после их «выстреливания» в растительный эксплантат. Поэтому в этом методе лучше использовать ДНК небольших размеров, значительно меньше, чем плазида *Agrobacterium*.

### **Контрольные вопросы:**

1. Что такое вектор? Каким требованиям генной инженерии вектор должен отвечать?
2. Почему вирусы и вириды рассматриваются в качестве потенциальных векторов?
3. Что такое транспозоны и как они используются в генной инженерии?
4. Какова структура природного вектора Ti-плазмиды?
5. Дайте сравнительную характеристику Ti- и Ri-плазмид.
6. Как конструируются векторы для трансформации растений на основе Ti-плазмид?
7. Какие регуляторные последовательности ДНК используются для экспрессии перенесенных в растительную клетку генов?
8. Что такое репортерные гены и для чего они используются в генной инженерии? Приведите примеры репортерных генов.
9. Как можно получить трансформированные растения, не содержащие селективных генов?
10. Раскройте понятие генной инженерии «молчание генов».
11. Как выделяют плазмидную ДНК из бактерий?
12. Какова методика обработки ДНК ферментами рестрикции?
13. Как вводятся рекомбинантные плазмиды в клетки *E. coli* и

*A. tumefaciens*?

14. Как проводится подбор эксплантата для получения трансгенного растения?
15. Зачем в генной инженерии используется трансформирование растительных эксплантатов с помощью онкогенных штаммов *A. tumefaciens* дикого типа?
16. Какие основные способы используются для трансформации больших эксплантатов с помощью неонкогенных T<sub>i</sub>-плазмид?
17. Как разрабатывается система для трансформации больших эксплантатов с помощью *A. tumefaciens*?
18. Как проводится прямая регенерация трансформированных растений из листовых дисков табака?
19. Каким образом размножают трансформированные побеги?
20. В каких случаях и каким образом проводится регенерация трансформированных растений через стадию каллуса? (Раскройте вопрос на примере трансформации эксплантатов проростков льна).
21. Как выделяются протопласты?
22. Изложите основные методические требования к трансформации протопластов путем совместного культивирования с агробактериями.
23. На что следует обратить внимание, проводя селекцию трансформированных колоний растительных клеток?
24. Каковы требования к системе трансформации с помощью изолированной векторной ДНК?
25. Как проводится трансформация протопластов изолированной векторной ДНК с помощью ПЭГ?
26. Каковы преимущества и какие сложности техники микроинъекций для трансформации растительных клеток?
27. Зачем применяется метод культивирования клеток с помощью фидерной культуры? В чем суть этого метода?
28. Что такое электропорация? Как разрабатывался этот метод для

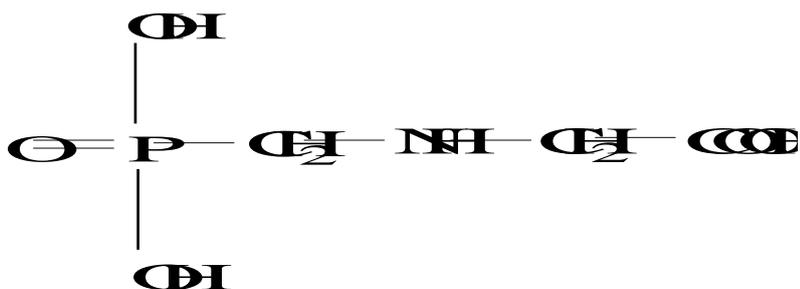
трансформации растительных клеток? Расскажите об известных результатах применения этого метода.

29. Раскройте основные положения трансформации растительных клеток методом бомбардировки микрочастицами.

### Глава 3. ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ТРАНСГЕННОСТИ РАСТЕНИЙ

Одним из несложных, но дающих убедительное доказательство трансгенности растений и, поэтому, широко используемый, является метод гибридизации анализируемой ДНК с радиоактивной ДНК – зондом, присутствие которой необходимо обнаружить в растении. Эти ДНК взаимодействуют комплементарными азотистыми основаниями и, после отмывания не связанной радиоактивной ДНК, можно обнаружить наличие связанного на растительной ДНК радиоактивного зонда с помощью рентгеновской пленки.

Основными методами гибридизации являются методы дот-гибридизации и гибридизации по Саузерну. Рассмотрим использование этих методов на примере исследования растений, которым перенесен agoA ген, обеспечивающий устойчивость к гербициду глифосату. Глифосат или N-(фосфометил)-глицин, сейчас наиболее широко применяемый в мире гербицид.



Эффективно ингибируя синтез ароматических аминокислот у растений и бактерий, глифосат остается в то же время безвредным для животных и

человека. Этот гербицид довольно быстро метаболизируется в природе и поэтому не накапливается в окружающей среде. Эффективность и безвредность глифосата делает его популярным у аграрников.

Ранние работы по изучению действия глифосата продемонстрировали, что ингибирование роста водного растения *Lemna gibba* и бактерии *Rhizobium japonicum* может быть снято при добавлении в питательную среду ароматических аминокислот. Аналогичные результаты наблюдались при работе с *E. coli* и синезеленой водорослью *Chlamydomonas*. Таким образом, было обнаружено, что глифосат ингибирует фермент, общий для биосинтеза всех трех ароматических аминокислот, связывая ключевой фермент этого пути – EPSPS (5-енолпирувилшикимат-3-фосфат-синтаза). В растениях это хлоропластный фермент, который кодируется в ядерном геноме. Он катализирует перенос карбоксивинильной группы фосфоенолпирувата (PEP) к 3-фосфошикимату (S3P) с образованием 5-енолпирувилшикимат-3-фосфата (EPSP) и неорганического фосфата. Глифосат – неконкурентный ингибитор по отношению к PEP.

### Описание эксперимента

Целью эксперимента являлось доказательство трансгенности растений. Образцы сои, сахарной свеклы и пшеницы исследовались на наличие в их геномах мутантного *argoA* гена.

Данный ген был получен в отделе Пирузян (Институт молекулярной генетики, г. Москва) методом направленного мутагенеза. В отличие от *argoA* гена дикого типа он имеет замены в положениях 394 (G на C) и 395 (C на G). Ген кодирует мутантную EPSPS, высокоустойчивую к глифосату. Ген был встроен в вектор pGV941 и передан отделу молекулярной генетики Института физиологии растений и генетики (г. Киев) в штаммах *A. tumefaciens* C58C1 и *E. coli* JM101. Вектор pGV941 имеет бактериальный маркерный ген устойчивости к карбенициллину и растительный маркер, кодирующий неомицин-трансферазу, обеспечивающий устойчивость к канамицину/неомицину. Трансформация растительных клеток сахарной свеклы и сои проводилась с

помощью *A. tumefaciens* C58C1, содержащей вектор pGV941 и делеционный мутант Ti-плазмиды pGV3850, несущий *vir*-область путем совместного культивирования. Для внесения в геном злаков *aroA* гена, рыльца пестиков пшеницы обрабатывали ДНК плазмиды pGV941. Соя и сахарная свекла, регенерированная из трансформированных клеток, а также пшеница, полученная из завязавшихся после обработки рылец семян, исследовались на трансгенность.

Анализ проводился методами дот-гибридизации и гибридизации по Саузерну. Эти методы позволяют выявить наличие комплементарных нуклеотидных последовательностей с помощью меченого зонда. Каждый из них можно разделить на два этапа. Первый связан с иммобилизацией ДНК на твердой фазе (фильтре), второй относится к собственно гибридизации иммобилизированной ДНК с меченым фрагментом. Различие методов состоит в том, что при дот-гибридизации на фильтре иммобилизуется целая геномная ДНК изучаемого растения, а во втором случае – ДНК предварительно рестрицируется и фракционируется в 0,8% агарозном геле, а уже потом переносится на фильтр.

*Схема анализа хромосомной ДНК методом дот-гибридизации:*

1. Выделение хромосомной ДНК растений.
2. Иммобилизация ДНК на нитроцеллюлозном фильтре (НЦФ).
3. Получение меченого фрагмента ДНК:
  - а) выращивание штамма *E. coli* (pGV941);
  - б) выделение плазмиды;
  - в) рестрикция плазмиды, гель-электрофорез;
  - г) элюирование фрагмента (*aroA*) из агарозного геля;
  - д) мечение фрагмента (ник-трансляция).
4. Гибридизация меченого фрагмента с растительной ДНК (зондом).
5. Получение радиоавтографии фильтра на рентгеновской пластинке.

*Схема анализа хромосомной ДНК методом гибридизации по Саузерну.*

1. Выделение хромосомной ДНК растений.
2. Рестрикция растительной ДНК.

3. Фракционирование растительной ДНК в агарозном геле.
4. Перенос электрофореграммы на фильтр и иммобилизация.
5. Получение меченого фрагмента ДНК, содержащего agoA ген.
6. Гибридизация растительной ДНК с ДНК меченого фрагмента.
7. Получение радиоавтографии фильтра на рентгеновской пластинке.

### **Анализ хромосомной ДНК методом дот-гибридизации**

Хромосомную ДНК из растительной ткани выделяли, разрушая ткань в жидком азоте. Измельченную ткань инкубировали в буфере S (состав буфера указан в приложении к разделу) с протеиназой E (1 мг/мл).

#### *Выделение ДНК из сырой растительной ткани*

- 1) Сырую растительную ткань охлаждали в жидком азоте и измельчали. 0,75 г образца растирали в ступке в жидком азоте.
- 2) Холодный порошок переносили в пробирку Эппендорфа, добавляли 3 мл буфера S и инкубировали смесь при 37°C в течении 90 мин.
- 3) Смесь дважды очищали фенолом и однократно – хлороформом.
- 4) Осаждали ДНК изопропанолом, промывали осадок 70% этанолом и растворяли в 150 мкл TE (состав буфера указан в приложении к разделу).
- 5) Полученный раствор ДНК обрабатывали RNКазой, очищали фенолом, хлороформом и концентрировали.

#### *Очистка препарата ДНК*

- 1) К полученному раствору, содержащему растительную ДНК, добавляли RNКазу до концентрации 100 мкг/мл и инкубировали 1 час при 37°C. Дальнейшую очистку проводили фенолом и хлороформом.
- 2) К смеси добавляли равный объем фенола, перемешивали в течение 10 мин.
- 3) Центрифугировали 3 мин при 3000 g. Отбирали верхнюю водную фазу в другую пробирку (ДНК в водной фазе).
- 4) Добавляли равный объем смеси фенол/хлороформ (1/1), перемешивали и повторяли операцию 3.

5) Добавляли равный объем хлороформа, перемешивали и затем снова повторяли операцию 3.

6) К водной фазе добавляли 0,1 объема 5М ацетата аммония и 2,5 объема 96% этанола или 0,6 объема изопропанола, охлажденных во льду. Оставляли смесь в морозильной камере ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) на 1 час.

7) Центрифугировали 5 мин. при 15000 g при комнатной температуре.

10) Сливали надосадочную жидкость и промывали осадок 70% этанолом.

11) Сливали жидкость, высушивали осадок и растворяли его в необходимом объеме буфера TE или дистиллированной воды.

Для проверки качества препаратов, ДНК растворяли в дистиллированной воде и проводили электрофорез. Электрофорез позволяет выявить наличие ДНК, установить ее целостность и определить приблизительно концентрацию. Чем компактнее след ДНК на фореze, тем она целее. Наличие «хвостов» говорит о том, что препарат содержит обрывки ДНК.

#### *Приготовление агарозных гелей и проведение электрофореза*

1) После расчетов порошок агара добавляли в электрофорезный буфер (см. приложение).

2) Нагревали взвесь на кипящей водяной бане до тех пор, пока агар не растворится.

3) Охлаждали раствор до  $50^{\circ}\text{C}$  и добавляли бромистый этидий до концентрации 0,5 мкг/мл.

4) Заливали раствор в рамку для электрофореза. Толщина геля должна быть 4–5 мм.

5) Когда этот расплав затвердевал, гель помещали в электрофорезную кювету.

6) Смешивали пробы ДНК с буфером для нанесения проб и вносили их в лунки.

7) Электрофорез начинали проводить при 20–40 В. Затем, когда ДНК входила в гель, напряжение повышали до 60–90 В.

8) После электрофореза гель фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Затем отбирались необходимые количества ДНК для дот-гибридизации.

ДНК подвергалась денатурации 3 М раствором NaOH. После нейтрализации щелочи 2 М раствором ацетата аммония, денатурированная ДНК наносилась на нитроцеллюлозный фильтр и иммобилизовалась на нем в вакууме при 80°C.

*Иммобилизация ДНК на фильтре для дот-гибридизации*

- 1) В пробирку Эппендорфа вносили 10 мкл ДНК (0,5 мкг).
- 2) Добавляли 1 мкл 3 М NaOH и оставляли на 20–30 мин. при комнатной температуре.
- 3) Нейтрализовали щелочь добавлением 10 мкл охлажденного 2 М раствора ацетата аммония.
- 4) На плексиглазовую пластинку клали стопку фильтровальной бумаги, вырезанной по размеру нитроцеллюлозного фильтра (НЦФ) (рис. 9).
- 5) Накладывали ватман 3ММ на стопку фильтровальной бумаги, а затем клали НЦФ. Сверху помещали плексиглазовую пластинку с отверстиями ( $d=1\text{мм}$ ) для нанесения проб и закрепляли все зажимами.
- 6) Пробы наносили на НЦФ через отверстия, отмечая, какое отверстие соответствует той или иной пробе. На каждом фильтре должны присутствовать положительный и отрицательный контроли. В качестве положительного контроля на фильтр наносили денатурированный фрагмент ДНК, содержащий agoA ген, а отрицательным контролем служило ДНК не содержащее искомого гена.
- 7) НЦФ подсушивали на воздухе и помещали в вакуум при 80°C на 1–2 часа.

Далее следовала гибридизация иммобилизованной ДНК с меченым фрагментом искомой ДНК, этот фрагмент называют зондом. Фильтр с иммобилизованной ДНК можно хранить под вакуумом при комнатной температуре длительное время. Параллельно с первым этапом данного метода (иммобилизация ДНК) необходимо было получить ДНК agoA гена для мечения и для использования его в качестве положительного контроля и зонда.

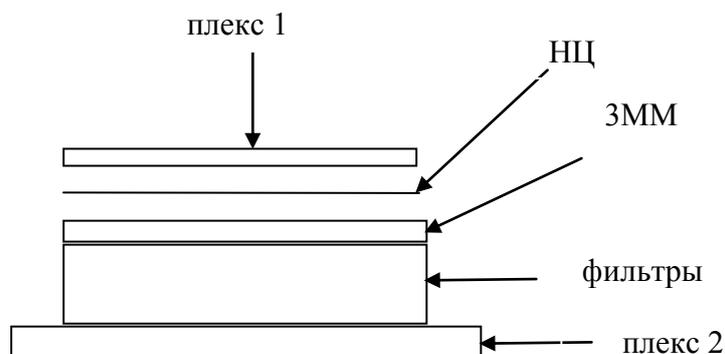


Рис. 9. Иммобилизация ДНК на нитроцеллюлозном фильтре

Для этого наращивали штамм *E. coli* JM 101 на жидкой питательной среде LB (состав среды указан в приложении к разделу), содержащей 50 мкг\мл карбеницилина. Выделяли плазмиду.

#### *Выращивание и сбор бактерий*

Засевали 500 мл среды LB, содержащей соответствующий селективный антибиотик, колонией бактерий. Инкубировали в течение ночи при 37°C и интенсивном встряхивании. Собирали бактериальные клетки ночной культуры центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин при 4°C. Надосадочную жидкость отбрасывали. Ресуспендировали осадок в небольшом объеме охлажденного во льду буфера STE (состав буфера указан в приложении к разделу) и промывали клетки в 100 мл этого же буфера. Осаждали клетки центрифугированием.

#### *Выделение плазмиды*

1) Ресуспендировали осадок бактерий, полученный из 500 мл культуры в 40 мл STE. Переводили суспензию в 4 центрифужные пробирки на 10 мл.

2) Добавляли по 1 мл свежеприготовленного раствора лизоцима (20 мг/мл в 10 мМ трис HCl буфере, pH 8,0).

3) Помещали пробирки в кипящую воду на 1,5–2 мин.

- 4) Охлаждали пробирки, поместив на лед на 5 мин.
- 5) Центрифугировали содержимое при 15000 g в течение 30 мин. при 4°C.
- 6) Очищали плазмиду РНК-азой, фенолом и хлороформом.

Выделенная плазида была подвергнута рестрикционному анализу с использованием эндонуклеазы Bam H I .

#### *Расщепление ДНК рестриктазой*

- 1) Добавляли воду к ДНК в стерильной пробирке Эппендорфа до объема 18 мкл и перемешивали.
- 2) Добавляли 2 мкл трис HCl буфера pH 7,5.
- 3) Вносили в раствор одну единицу рестриктазы Bam H1.
- 4) Инкубировали смесь 1 час при 37°C.
- 5) Проводили разделение фрагментов ДНК гель-электрофорезом.

При электрофорезе в первой лунке наносится ДНК фага лямбда, гидролизованная рестриктазой Hind 3. Размеры фрагментов ДНК лямбда известны и поэтому их используют в качестве маркеров при электрофорезе. Шестая полоса фракционированной ДНК фага лямбда соответствует фрагменту размером 2 т.п.н., по которому можно ориентироваться, определяя на электрофореграмме фрагмент, содержащий agoA ген (1,7 т.п.н.). Вначале проводят пробную рестрикцию и электрофорез.

Убедившись, что пробная рестрикция прошла удачно, проводят такую же рестрикцию, но с бо'льшим количеством плазмиды. Гидролизованную эндонуклеазой BamH I плазмиду фракционируют на 10 дорожках в агарозном геле. Участки геля, содержащие agoA ген, вырезают при ультрафиолетовом свете и элюируют ДНК методом фильтрования центрифугированием.

#### *Элюирование фрагментов ДНК путем фильтрования центрифугированием*

- 1) Вырезали рестрикционный фрагмент из 0,8% агарозного геля в как можно меньшем объеме.
- 2) Собирали фильтрующее устройство:

- a) отрезали нижнюю коническую часть пробирки Эппендорфа на 1,5 мл и протыкали в дне тонкой иглой отверстие;
- b) вкладывали внутрь фильтровальную бумагу и смачивали ее трис HCl pH 7,5 + 0,1% додецилсульфата натрия.
- 3) Помещали фрагмент геля в фильтрующее устройство и вставляли его в другую пробирку Эппендорфа без крышки.
- 4) Центрифугировали 10 мин. при 12000g.
- 5) Полученный фильтрат ДНК очищали фенолом и хлороформом.

Элюированный фрагмент, содержащий agoA ген, был помечен с помощью ник-трансляции радиоактивным фосфором  $^{32}\text{P}$ . Метод ник-трансляции включает две ферментативные реакции:

- 1) Образование у ДНК с помощью ДНКазы I случайно распределенных разрывов (ников).

- 2) Процессирование ников ДНК-полимеразой I в присутствии меченных нуклеозид-5'-трифосфатов. Продукт ник-трансляции – радиоактивно меченная двунитевая ДНК. Далее следует гибридизация иммобилизованной ДНК с меченым фрагментом – искомой ДНК, этот фрагмент называют зондом.

#### *Гибридизация иммобилизованной ДНК с меченым фрагментом*

- 1) НЦФ с иммобилизованной ДНК помещали в полиэтиленовый пакет и добавляли 2 мл гибридизационного буфера (см. приложение к разделу).
- 2) Пакет запаивали, стараясь, чтобы внутри не оставалось воздуха, и помещали в термостат на 6 часов при 68°C.
- 3) Фильтр вытаскивали и подсушивали при комнатной температуре.
- 4) В 1 мл гибридизационного буфера добавляли 50мкл меченой ДНК и кипятили смесь 10 мин. После кипячения смесь охлаждали во льду.
- 5) Далее фильтр, смоченный в гибридизационном буфере, помещали в чистый полиэтиленовый пакет, заливали смесь с денатурированной меткой, запаивали и оставляли на сутки при 68°C.
- 6) Доставали фильтр и отмывали его от не связанной метки в 0,5 л 0,3 M NaCl + 0,15M Na-цитрат с 0,5% додецилсульфатом натрия при 68°C.

Фильтр сушили при комнатной температуре и заряжали в кассету с

рентгеновской пластинкой для получения радиоавтографии фильтра.

Методом дот-гибридизации были проанализированы 70 растений пшеницы, 9 – сахарной свеклы и 10 – сои. Среди них положительный ответ был отмечен у 4 образцов сои, 4 образцов сахарной свеклы и трех – пшеницы. При гибридизации возможно неспецифическое связывание зонда, поэтому наличие трансформированного гена часто можно определить по силе ответа, то есть по интенсивности радиоактивности образцов растительной ДНК после гибридизации. Изучение трансгенных растений методом дот-гибридизации по своей сути является предварительным анализом. Этот метод удобен тем, что он позволяет довольно быстро изучить большое количество образцов растительной ткани. Растения, давшие в эксперименте положительный радиоавтографический ответ, считаются предположительно трансгенными, так как возможно неспецифическое связывание радиоактивного зонда. Для доказательства их трансгенности анализируют методом гибридизации по Саузерну.

### **Анализ растительной ДНК по Саузерну**

Саузерн-блоттинг позволяет не только обнаружить наличие комплементарных последовательностей, но и определить размеры гибридизовавшихся фрагментов ДНК. Это достигается за счет того, что гибридизации предшествует рестрикция анализируемых ДНК, и фракционирование полученной смеси фрагментов в агарозном геле.

Очищенную хромосомную ДНК исследуемых растений гидролизовали эндонуклеазой BamH I, то есть тем же ферментом, каким был вырезан фрагмент, содержащий agoA ген, из плазмиды pGV941. Таким образом, если растение трансгенное, то в результате рестрикции его геномной ДНК получают смесь фрагментов, один из которых будет содержать agoA ген. Рестрицированную ДНК фракционировали в 0,8% агарозном геле. В одной из лунок в качестве маркера (положительный контроль) вносился ДНК agoA гена. После электрофореза гель был обработан раствором 0,5 М NaOH и 1,5 М NaCl с целью денатурации ДНК, а затем – раствором 1 М трисHCl буфера и 1,5 М

NaCl. Следующий этап – Саузерн-перенос. Разделенные электрофорезом фрагменты ДНК переносятся под действием капиллярных сил на фильтр, при этом относительное положение фрагментов должно оставаться неизменным (рис. 10).

*Иммобилизация ДНК на фильтре после электрофореза*

- 1) Обрабатывали гель в течение часа при постоянном встряхивании и комнатной температуре в растворе: 1,5 М NaCl; 0,5 М NaOH. Затем обрабатывали гель в растворе: 1М трисHCl буфера pH 7,5; 1,5М NaCl.
- 2) Вырезанный кусок ватмана 3 ММ помещали на стеклянную подставку так, чтобы боковые стороны ватмана опускались в углубления с 10-кратной концентрацией SSC (см. приложение к разделу).

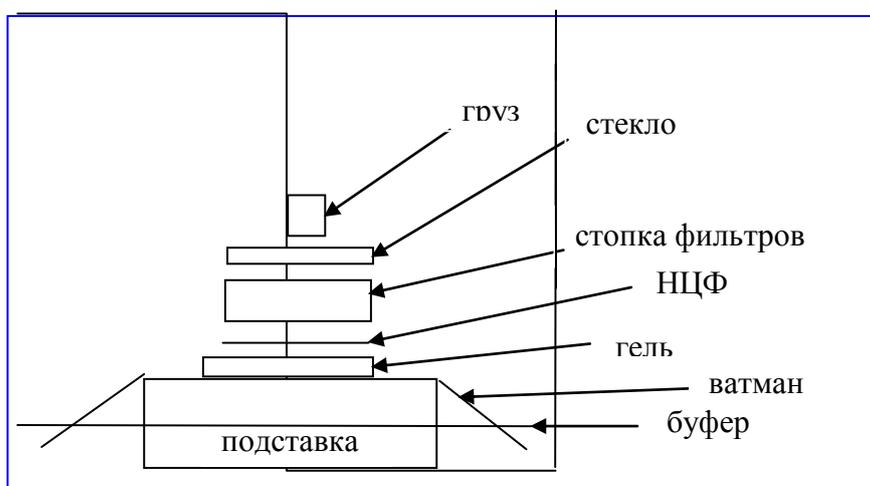


Рис. 10. Перенос ДНК с геля на нитроцеллюлозный фильтр

- 3) На ватман помещали гель, избегая образования пузырьков между ними.
- 4) Вырезанный чуть больше размера геля НЦФ смачивали в 2-кратном SSC (2–3 мин) и накладывали на гель.
- 5) Сверху помещали смоченный в 2-кратном SSC ватман 3ММ, а затем стопку фильтровальной бумаги высотой 5–8 см.
- 6) Наверх клали плоское стекло и ставили на него груз весом 500г.
- 7) Оставляли для переноса ДНК на фильтр (НЦФ) на 24 часа.
- 8) НЦФ переносили в 6-кратный SSC и промывали 5 мин. при комнатной

температуре.

9) Сушили НЦФ на фильтровальной бумаге при комнатной температуре.

10) Помещали НЦФ между двумя полосками фильтровальной бумаги и оставляли на 2 часа в вакууме при 80°C. Если НЦФ не сразу будет использоваться, его можно оставить в вакууме при комнатной температуре на достаточно длительное время.

Перенесенную ДНК иммобилизовали на фильтре и проводили гибридизацию с меченым фрагментом. Получив радиоавтографию на рентгеновской пластинке по наличию полос, находящихся на одном уровне с маркером и их радиоактивности, определяли наличие перенесенного гена в ДНК растений.

В результате гибридизации по Саузерну было установлено, что все растения, давшие положительный ответ при дот-гибридации (4 образца сои, 4 образца сахарной свеклы и 3 образца пшеницы) оказались действительно трансгенными растениями.

### *Приложение к главе 3*

#### Среды

Среда LB (Lutia-Bertani).

На 1 л: Бакто-пептон	10г
Дрожжевой экстракт	5 г
NaCl	10г

Довести pH до 7,5 с помощью NaOH

#### Буферы, используемые для электрофореза

ТАЕ (трис-ацетатный)	ТЕЕ (трис-боратный)
0,04 М трис-ацетат	0,89 М трис-борат
0,02 М ЭДТА	0,89 М борная кислота

#### Буфер для нанесения проб

(6-кратный буфер)

0,25% бромфеноловый синий

0,25% ксилолцианол

30% глицерин в H<sub>2</sub>O

### Буферы, используемые при расщеплении ДНК рестриктазами

Буфер средней ионной силы (для Bam H 1)

NaCl	50 мМ
Трис HCl pH 7,5	10 мМ
MgCl <sub>2</sub>	10 мМ
Дитиотрейтол	1 мМ

### Буфер, используемый для гибридизации ДНК

NaCl	0,15 М
Na-цитрат	0,15М
поливинилпирролидон	0,2%
фикола	0,2%
бычий альбумин	0,2%
додецилсульфат натрия	0,1%

### Смеси для очистки препаратов ДНК

Фенол, уравновешенный буфером TE, содержащий 0,1% оксихолина и 0,2% меркаптоэтанола.

«Хлороформ» – смесь хлороформа и изоамилового спирта 24/1.

### Другие буферы и растворы, используемые в работе

Буфер TE (pH 8,0)	Буфер STE (pH 8,0)
10 мМ трисHCl	0,1 мМ NaCl
1 мМ ЭДТА	10 мМ трис HCl
	1 мМ ЭДТА
Буфер S (pH 8,5)	
100 мМ трис HCl	Буфер для элюции (pH 7,5)
100 мМ NaCl	50 мМ трис HCl
50 мМ ЭДТА	0,1% додецилсульфат натрия
2% SD	

1-кратный раствор Денхардта (DS)

0,02 % поливинилпирролидон

0,15 мМ NaCl

SSC (1-кратный)

0,015 мМ Na-цитрат

0,02 % фикола

#### Ферменты

Проназа E (20 мг/мл в H<sub>2</sub>O)

Лизоцим (20 мг/мл в 10 мМ трисHCl pH 8,0)

РНКаза (20 мг/мл в H<sub>2</sub>O)

Рестриктаза BamH I

Рестриктаза Hind 3

Таким образом, дот-гибридизация является методом предварительного анализа растительной ДНК. Метод позволяет проанализировать большое количество объектов и выявить предположительно трансгенные растения, поскольку в гибридизации участвует целиком вся растительная ДНК и возможно неспецифическое связывание отдельных ее участков с зондом. Предположительно трансгенные растения исследуются путем гибридизации их ДНК с зондом по Саузерну. Перед гибридизацией, растительная ДНК подвергается рестрикции тем же ферментом, который вырезает искомым ген из плазмиды. Если этот ген присутствует в растительной ДНК, то он тоже вырезается и, после электрофореза, будет отдельная его фракция. При гибридизации, эта фракция свяжется с радиоактивной меткой – зондом, что и будет убедительным доказательством трансгенности растений.

#### **Контрольные вопросы:**

1. Как проводится анализ ДНК методом дот-гибридизации?
2. Какова схема анализа ДНК методом гибридизации по Саузерну?
3. Как выделить и очистить ДНК из растительной ткани?
4. Каким образом проводится выращивание бактерий и выделение из них

плазмидной ДНК?

5. В чем состоит метод элюирования макромолекул из геля путем фильтрования центрифугированием?
6. Как проводится гибридизация иммобилизованной на нитроцеллюлозном фильтре ДНК с радиоактивной ДНК – зондом?
7. Как перенести ДНК после электрофореза с пластины геля на нитроцеллюлозный фильтр?

#### **Глава 4. ДОСТИЖЕНИЯ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ В РЕШЕНИИ ПРАКТИЧЕСКИХ ВОПРОСОВ**

##### *Основные направления биотехнологических исследований*

Исходно разработка методов трансгеноза у сельскохозяйственных растений обосновывалась необходимостью конструкции новых геномов, обеспечивающих более высокую продуктивность, качество продукции и устойчивость к неблагоприятным воздействиям.

В современных ДНК-технологиях выделяется пять основных направлений:

1. ДНК-технологии для управления потоком генетического материала. Осуществляется селекция с помощью молекулярно-генетических маркеров; в этих целях проводится картирование, маркирование главных генов количественных признаков; сохранение биоразнообразия, разработка генетически обоснованных программ разведения и подбора родительских форм с учетом данных экологической генетики.
2. ДНК-технологии в диагностике генетических заболеваний. Изучение генетических механизмов развития и предупреждения различных заболеваний (онкопатологий, устойчивости к канцерогенезу, различных моно- и полигенных

генетически детерминированных заболеваний, генной терапии при использовании трансгенных соматических клеток).

3. ДНК-технологии для создания новых форм растений в целях получения "биореакторов" (продуцентов биополимеров, аминокислот, антител, других важных для человека соединений), а также для повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды, повышения урожая и качества продукции.

4. Биотехнологии для направленного размножения желательных генотипов растений – получение клонов.

5. ДНК-технологии фундаментальных исследований структурно-функциональной организации генетического материала, межгенных взаимодействий (создание генных конструкций с включением структурно-функциональных элементов и анализ влияния их регуляторных эффектов на экспрессию различных генов).

### **Выведение растений, устойчивых к насекомым – вредителям**

При возделывании сельскохозяйственных растений хорошо было бы иметь сорта устойчивые к вредящим урожаю насекомым и получить такие сорта можно с помощью генной инженерии. В одном случае использован ген инсектицидного протоксина. В других – гены растительных белков типа ингибиторы амилазы или протеаз. Протоксин – белок из бактерий (*B. thuringiensis*). Сверху распылять его раствор неэффективно, так как многие насекомые питаются внутренними тканями растения. Нужны трансгенные растения. Однако гены протоксина *сгу А (а)*; *сгу А (в)*; *сгу А (с)*; не экспрессируются в растениях. Чтобы добиться экспрессии в растениях ген уменьшили, оставив N-концевую часть. Количество синтезируемого токсина увеличилось, и растения получили некоторую защиту. Была поставлена задача, найти минимальный размер N-концевой части без потери токсичности. Оказалось, что у разных видов бактерий протоксин консервативен с N-конца, а с C-конца – гомология только 45%. Оказалось, что инсектицидная активность обеспечивается 646 N-концевыми аминокислотами (из 1156 аминокислот всей

молекулы). Такой укороченный ген синтезировался в растении и давал некоторую защиту, но не полную, и в разной степени у разных растений. Для повышения степени защиты растения стали менять участки молекулы протоксина, которые могли ограничивать его синтез в растении. Получили слабо модифицированные молекулы, что увеличило синтез протоксина в 10 раз. Далее получили сильно модифицированные молекулы (гомология с молекулами дикого типа составляет 78,9%). Такие гены растения обеспечивали в 100 раз больший синтез протоксина. Далее ген, ответственный за синтез протоксина поставили под контроль промотора малой субъединицы РБФК и внедрили в хлоропластную ДНК. Это давало следующие преимущества. Протоксина стало 1% от общего содержания белка растительной ткани. Ген в хлоропластах находился во многих копиях (хлоропластов много) и передавался по материнской линии, поэтому с пылью не разносился и не попадал на другие растения.

Получены трансгенные томаты, табак, картофель, рис, кукуруза, яблоня, люцерна, орех, тополь. Картофель разрешено использовать в коммерческих целях. Для снижения селекционного давления ген поставлен под промотор PR-I (pathogenesis-relates), который индуцируется любым патогеном или салициловой кислотой. Таким образом, ген можно включать на короткое время. Протоксин не может быть эффективен против всех насекомых – вредителей. Насекомые в эволюции приспособляются к условиям среды. Поэтому одного протоксина для защиты растений мало. Некоторые растения синтезируют ингибиторы протеинкиназ, например, ингибитор трипсина синтезирует вишня китайская. Теплокровным – ингибитор не токсичен. Ген перенесен в рис, картофель. Устойчивость к насекомым-вредителям повысилась в 5 раз. Протоксин в процессе приготовления пищи инактивируется. Для повышения эффективности вводят 2 гена, которые обеспечивают синтез протоксина и другого вещества, защищающего от насекомых, например ингибитор трипсина в малых количествах. При таких комбинациях эффективность защиты повышается в 20 раз по сравнению с защитой одного протоксина.

Большой ущерб зерновкам приносит долгоносик лучистый питающийся

семенами. Если в рацион личинок этих насекомых включить фасоль (*Phaseolus vulgaris*), то рост насекомых замедляется. Это связано с присутствием в семенах фасоли ингибитора амилаз. Ген ингибитора амилаз выделен из фасоли, помещен под семяспецифичный промотор и использован для трансформации гороха. Это обеспечило защиту семян гороха от поедания долгоносиком лучистым. Причем эффект оказался пропорциональным количеству ингибитора, синтезированного горохом.

### Устойчивость к вирусам

Природный иммунитет растений к вирусным болезням состоит в блокировании проникновения, предотвращении распространения по растению вируса либо в подавлении симптомов болезни.

Для иммунизации использовали гены белков оболочки вируса, а также антисмысловые гены. Если растение синтезирует белок оболочки вируса, то способность вируса проникать в растение и распространяться в нем снижается. Механизм ингибирования размножения вируса в присутствии генов белка оболочки в растительной клетке точно не установлен, однако ясно, что противовирусное действие начинает проявляться на ранних стадиях репликации вируса так, что вирусы не образуются. С помощью этого подхода были получены устойчивые к различным вирусам многие культуры: табак, картофель, помидор, рис. Абсолютной устойчивости достичь не удается, но уровень устойчивости высок.

Молекула РНК, комплементарная транскрипту (мРНК) нормального гена, называется антисмысловой, а сама РНК, участвующая в трансляции, – смысловой. Антисмысловая молекула образует **дуплекс** со смысловой РНК, который не активен и быстро деградирует. Сравнивали два подхода: вводили в растения табака гены белка оболочки вируса мозаики огурца (CuMV) в двух ориентациях: «смысловой» и «антисмысловой». А затем определяли чувствительность трансгенных растений к вирусной инфекции. В растениях, синтезирующих белок, **оболочки CuMV вирусные частицы не накапливались**. А растения, содержащие антисмысловую РНК, были устойчивы к низким

концентрациям вируса. Был сделан вывод, что антисмысловые РНК – копии генов вирусных белков оболочки обеспечивают гораздо худшую защиту трансгенных растений от вирусной инфекции, чем смысловые копии генов белков оболочки вируса. Растения подвержены воздействию не одного вируса, поэтому их трансформируют не по одному гену. Так, растения тыквы, которые синтезировали все три белка оболочки CuMV, были устойчивы всем семи протестированным каулимовирусам.

Кроме иммунизации защита может осуществляться белками, которые синтезирует растение. Например, у Патолаки американской обнаружено 3 противовирусных белка PAP1 (синтезируется весной в листьях), PAP2 (синтезируется в листьях летом), PAP S (синтезируется в семенах). Если немного белка нанести на другое растение, то оно тоже станет устойчиво к нескольким вирусам. Ген PAP1 ввели в растения табака и картофеля. Если растения синтезировали белков более 10 нг на 1 мг суммарного белка, то они были чахлыми и бесплодными, а если 1–5 нг на 1 мг белка – имели нормальный внешний вид и были фертильными. Белок обеспечивал меньшее число повреждений на растении. Поскольку противовирусное действие PAP проявляется при относительно небольших его концентрациях, можно попытаться создать трансгенные растения, синтезирующие этот белок в малом количестве и параллельно использовать другие виды защиты.

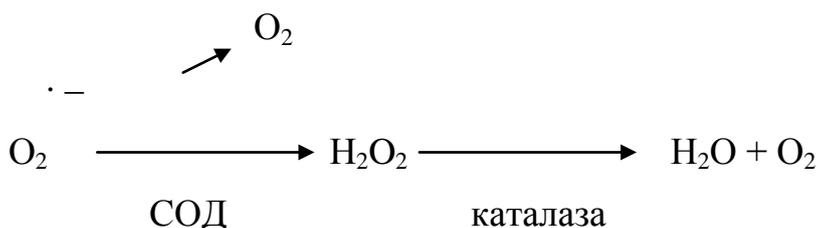
### **Растения, устойчивые к грибам и бактериям**

В юго-восточной Азии рисоводству грибы наносят ущерб более чем на 5 млрд долларов в год. Борьба ведется опрыскиванием химическими веществами, которые накапливаются в окружающей среде. Поэтому актуально обеспечить биологическую защиту растений. В ответ на проникновение патогена растение синтезирует PR-белки, один из которых (тауматин) – небольшой, очень сладкий белок. Другие растения синтезируют хитиназу, а также ингибиторы ферментов.

Для защиты от грибных болезней с помощью генноинженерных методов в рис ввели ген, обеспечивающий синтез белка лизоцима бактериофага T-4. Растения приобрели высокую устойчивость к бактериальным болезням.

## Растения, устойчивые к неблагоприятным климатическим условиям среды

Суппероксидный кислород. Важное значение в развитии стресса имеет накопление окислительных радикалов. Опасным радикалом является суппероксидный кислород. Фермент суппероксиддисмутаза (СОД) – нейтрализует и превращает суппероксидный кислород в перекись водорода, которая разрушается пероксидазой или каталазой. У растений есть несколько изоформ суппероксиддисмутазы.

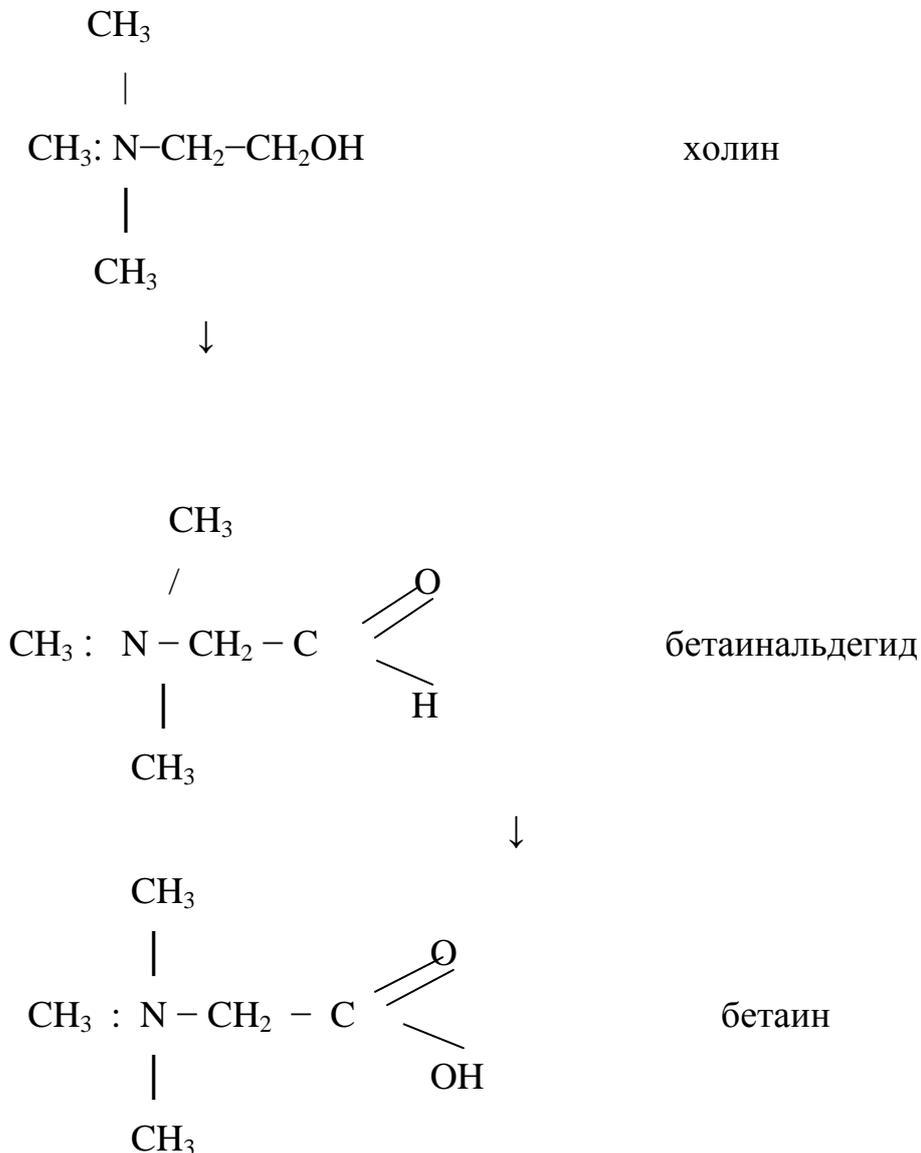


Так, выделено Cu/Zn-содержащую суппероксиддисмутазу – из хлоропластов, и Mn-содержащий фермент из митохондрий. Обнаружена Fe-содержащая суппероксиддисмутаза.

У трансгенных растений табака ген синтеза Cu/Zn-содержащей суппероксиддисмутазы поставили под контроль 35 S промотора и такие растения были устойчивы к яркому свету, в условиях, при которых обычные растения погибали. Повышенное содержание этого фермента способствует сохранению срезанных цветов. При транспортировке, цветы завядают от радикалов кислорода. Но, чтобы получить такие трансгенные цветы, нужен промотор специфичный для цветов.

Солевой стресс. Защитой растений от солевого стресса является синтез осмопротекторов (сахаров, спиртов, пролина). Одним из наиболее эффективных осмопротекторов является бетаин. Рис, картофель, томаты – не способны

накапливать бетаин. У *E. coli* один фермент холинэстераза обеспечивает превращение холина в бетаин.

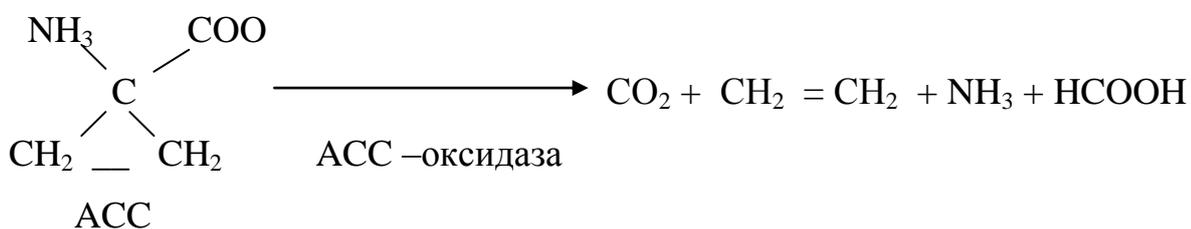
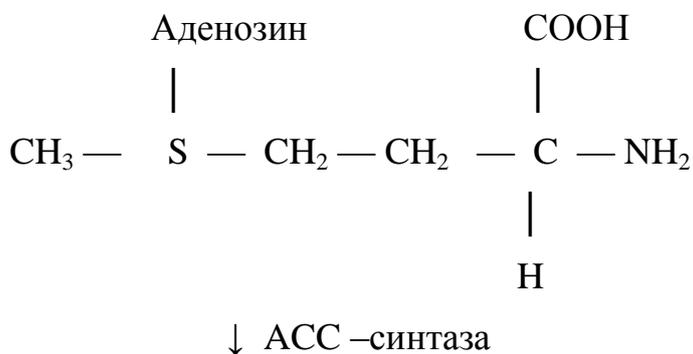


Табаку перенесли ген фермента под 35-S промотор. Растения стали на 80% более устойчивые к солевому стрессу и выживали при 300 мМ NaCl.

### Созревание плодов

При транспортировке может происходить преждевременное созревание плодов. Активируется целлюлаза, полигалактуронидаза. Для задержки этих процессов вводили гены антисмысловой РНК этих ферментов у томатов.

Снизили активность ферментов почти в 2 раза. Такие генетически трансформированные томаты известны как FLAVR SAVR они считаются столь же безопасные как и обычные. Этилен ответственен за активацию многих генов, связанных со старением.



Он синтезируется из S-аденозилметионина с образованием промежуточного продукта 1-аминоциклопропан – 1 карбоновой кислоты (ACC). Созданы трансгенные растения синтезирующие антисмысловые РНК ACC-оксидазы и ACC-синтазы. Уровень этилена у этих растений снизился, плоды хранятся дольше.

Обнаружено множество почвенных бактерий разрушающих ACC. Ген ACC-дезаминазы помещали в растения томатов под контроль 35-S промотора. Такие трансгенные растения тоже синтезировали меньше этилена и имели более длительный срок хранения плодов. Большинство работ проведено на томатах, но есть работы и на других растениях, например – дыне.

### Изменение пищевой ценности растений

Генноинженерные методы позволяют создать сорта с новыми пищевыми признаками, которые невозможно привить иными методами.

Аминокислоты. Пищевая ценность запасных белков часто невелика,

поскольку в них отсутствуют те или иные аминокислоты (обычно лизин или метионин). Трансгенным растениям перенесли ген фазеолина из фасоли, который содержит разнообразный аминокислотный состав. Кроме того, *in vitro* изменяют аминокислотную последовательность с С-конца. С-конец вариабельный и укладка белка не нарушается при его модификации. Чтобы увеличить содержание лизина в семенах была нарушена регуляция его биосинтеза. Лизин синтезируется из аспартата в несколько этапов. Первый этап состоит в фосфорилировании аспартата аспартаткиназой (АК) с образованием β-аспартилфосфата. Далее происходит конденсация аспарагинового β-полуальдегида с пировиноградной кислотой, катализируемая синтазой дигидропиколиновой кислоты (DNDPS). Регуляция АК и DNDPS осуществляется с помощью лизина по принципу обратной связи, которую нужно разорвать. Для этого использовали гены АК и DNDPS *E. coli* не чувствительные к ингибированию лизином. К каждому гену пришили транзит-пептид, транспортирующий белки в хлоропласты, снабдили каждый из генов семяспецифичным промотором и ввели в растения канолы и сои. В семенах трансгенных растений содержалось в 100 раз больше свободного лизина, чем в семенах обычных растений. Возможно, этот подход удастся использовать для получения высоколизиновой кукурузы. Сейчас, когда кукуруза используется в качестве корма для скота, в нее добавляют муку из трансгенной высоколизиновой сои.

Липиды. Более 75% всех масличных составляют соя, пальма, рапс и подсолнечник. В состав жирных кислот входят: пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая и линоленовая. Состав можно менять с помощью генной инженерии. Можно менять количество двойных связей, длину углеводородных цепочек.

Вкус. Вкус плодов зависит прежде всего от содержания сахаров и кислот. В плоде африканского растения *Dioscorephilum* содержится белок ионелин в 100 000 раз более сладкий чем сахароза. Это двухцепочный димер. А цепь состоит из 45 аминокислот, Б – из 50. Цепи связаны слабыми не ковалентными связями и это ограничивает его применение в качестве подсластителя,

поскольку при нагреве или действии кислот цепи диссоциируют и белок теряет вкусовые качества. Задача создания трансгенных растений усложняется тем, что кодируется белок двумя генами. Чтобы решить проблему был химически синтезирован ген, кодирующий А и В-цепи как один полипептид. Получены подслащенные плоды помидор.

### **Растения как биореакторы**

Растения дают много биомассы, а выращивать их не составляет большого труда. Для выращивания сельскохозяйственных растений не нужно больших средств, в отличие от бактерий, которые культивируют в биореакторах (при этом необходимы дорогостоящие оборудование, квалифицированный персонал). Поэтому можно создать трансгенные растения, синтезирующие коммерчески ценные вещества.

Антитела. Трансгенные растения стабильны, тогда как бактерии трансформируются плазмидами, которые могут утрачиваться при масштабном культивировании. Процессинг, укладка эукариотических белков в бактериях затруднены. Можно создать условия, при которых чужеродные белки будут синтезироваться в семенах и их структура будет сохраняться длительное время.

Полимеры. Крупномасштабный бактериальный синтез поли- $\beta$ -гидроксibuтирата – полимера, из которого получают пластик, подверженный биодegradации, обходится дорого. В бактериях он синтезируется из ацетил-СоА в три стадии, катализируемые тремя ферментами, гены которых входят в один оперон. Растения не способны процессировать транскрипт с более чем одним геном с одного оперона. Поэтому каждый ген был клонирован в отдельности и введен в хлоропластную ДНК. В цитоплазме полимер синтезировался в небольшом количестве, при этом большинство растений были чахлыми. В хлоропластах же может накапливаться другой полимер – крахмал. Все гены поставлены под 35-S промоторы и получили сигнальные последовательности малой субъединицы РБФК. Растения, содержащие все три гена получили скрещиванием.

В зрелых листьях растений экспрессировались все три гена и синтезировалось более 1 мг поли- $\beta$ -гидроксипутирата на 1 грамм сырой ткани листа. Эта работа – первый важный шаг в использовании трансгенных растений для получения биополимеров.

### Изменение окраски цветов

С помощью традиционных методов селекции были выведены тысячи сортов, различающихся цветом и формой цветов. Однако такая селекция ограничивается наличием исходного генетического материала. Например, у петунии традиционной селекцией нельзя было получить растения с цветами кирпичного цвета. Их цвет обуславливается антоцианами, которые синтезируются из фенилаланина и отличаются боковыми радикалами. Производные дельфинидина имеют синий цвет, цианидина – красный, а пеларгонидин окрашен в кирпично-красный цвет. После трансформации петунии геном дигидрофлавонол-4-редуктазы кукурузы получили цветы кирпично-красного цвета. Этот необычный для петунии цвет обусловлен синтезом в трансгенном растении пеларгонидин-3-глюкозида из дигидрокепферола.

Примерно 70% объема индустрии цветов приходится на розы, гвоздики, тюльпаны, хризантемы. Получение растений с новой необычной окраской цветов дает большой экономический эффект. Так, были выведены трансгенные хризантемы, несущие смысловые и антисмысловые ДНК халконсинтазы. Ученые исходили из того, что и смысловые и антисмысловые ДНК будут подавлять экспрессию гена халконсинтазы в трансгенных растениях. Смысловая супрессия, состоит в том, что в присутствии дополнительной копии эндогенного гена подавляется накопление соответствующей мРНК. Молекулярные основы этого явления пока не изучены. Антисмысловая же РНК халконсинтазы блокирует трансляцию эндогенной халконсинтазной мРНК. Смысловые и антисмысловые конструкции под контролем 35-S промотора были встроены в бинарный вектор на основе T<sub>i</sub>-

плазмид и введены в клетки растений. Трансгенные растения имели белые цветы.

### **Изменение внешнего вида плодов**

Изменение цвета собранных плодов овощей и фруктов создает проблемы при их реализации. Один из способов – пищевые добавки, но они часто являются токсичными для человека. За образование окрашенных пятен на плодах ответственна полифенолоксидаза (ПФО). Предположение о том, что ингибирование ПФО поможет решить проблему, было доказано на картофеле с переносом смысловой и антисмысловой ДНК гена под клубнеспецифичными промоторами. Трансформированные сорта были устойчивы к черной пятнистости. Причем результат выше, чем тот который достигли скрещиванием. Это относится к трансформантам антисмысловой ДНК, которая полностью не подавляла синтез ПФО. Те же растения, которые несли смысловые копии под контролем 35S, синтезировали ПФО в большем количестве, чем контрольные и были пятнистыми.

### **Растения, устойчивые к гербицидам**

На производство более чем 100 гербицидов расходуется 10 млрд. долларов в год, при этом теряется до 10% урожая. Необходимы устойчивые к гербицидам растения.

Добиться устойчивости к гербициду можно несколькими путями:

- обеспечить синтез белка, чувствительного к гербициду в таком количестве, чтобы его хватило на выполнение присущих ему функций не смотря на инактивацию части этого белка гербицидом;
- уменьшить чувствительность белка к гербициду;
- обеспечить инактивацию гербицида в ходе метаболизма.

Первые два подхода были использованы при получении растений устойчивых к глифосату, гербициду, о котором шла речь в главе 3. Исследования генома *E. coli* позволили обнаружить и выделить *aroA* ген, кодирующий фермент 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат-синтазу (EPSPS),

который ингибируется глифосатом. *agoA* ген вводили в высококопийную плазмиду *E. coli*. Бактериальные клетки, вследствие этого, сверхпродуцировали фермент EPSPS и показали 8-кратное повышение устойчивости к глифосату. Затем, путем селекции на повышенных концентрациях глифосата, были выделены несколько клеточных культур растений, устойчивых к глифосату. У глифосат-устойчивых клеток *Petunia hybrida* наблюдалась сверхпродукция EPSPS, как результат амплификации *agoA* гена. Молекулярная основа глифосатной устойчивости была также исследована в клеточной линии *Corydalis sempervirens*, которая показывала 30-кратное увеличение EPSPS-активности. Несмотря на 10-кратное повышение концентрации мРНК, анализ ДНК по Саузерну не показал подобного повышения копий гена. Вероятно, повышение количества мРНК является результатом повышения активности транскрипции гена и/или увеличения стабильности самой мРНК.

Был получен высокий уровень экспрессии EPSPS в трансгенных растениях петунии благодаря тому, что *agoA* ген был поставлен под контроль 35S промотора вируса мозаики цветной капусты. Экспрессия химерного гена приводила к 20-кратному повышению продукции EPSPS, благодаря чему трансгенные клетки росли в присутствии глифосата в концентрации, летальной для клеток дикого типа. Трансгенная петуния, регенерированная из этих клеток, была устойчива к гербициду в концентрации 0,9 кг/га.

Обработанные гербицидом растения, сверхпродуцирующие EPSPS, росли до созревания, но скорость их роста была меньше по сравнению с необработанными. По-видимому, степень сверхпродукции фермента не достаточна, чтобы сообщить адекватную устойчивость в меристематических тканях растения, где глифосат накапливается и оказывает угнетающее действие. Эта проблема может быть разрешена экспрессией мутантных генов.

Продолжая работу над этой проблемой, исследователи выделили глифосатустойчивый мутант *Salmonella typhimurium* с точечной мутацией в *agoA* гене, которая выражается в замещении пролина в положении 101 серином. Кроме найденных в природе, были созданы мутанты искусственным путем. Используя нитрозогуанидин индуцирующий мутагенез, Пирувян получила

несколько штаммов *E. coli* с мутацией в *aroA* гене и продуцирующих EPSPS нечувствительную к глифосату.

Трансгенные растения были устойчивы к глифосату, но при обработке гербицидом их рост снижался по сравнению с необработанными растениями, поэтому культуры не имели сельскохозяйственного применения. Ингибирование роста, вероятно, происходило вследствие цитоплазматической локализации фермента. Биосинтез ароматических аминокислот и локализация ферментов этого пути, включая EPSPS, имеет место в хлоропластах. Фермент, синтезированный в цитоплазме, должен быть перенесен в хлоропласты, но бактериальная EPSPS не транспортируется в хлоропласты.

Анализ гена EPSPS и зрелого фермента показал, что EPSPS синтезируется сначала в виде предшественника, имеющего транзитный пептид (72 аминокислоты). *In vitro* было продемонстрировано, что пре-EPSPS (55 кД) быстро поглощается хлоропластами при участии мембранного белка и подвергается процессингу, который приводит к образованию зрелого фермента (444 аминокислоты, 48 кД). Транзитный пептид необходим для переноса предшественника в хлоропласты.

Было показано, что транзитный пептид EPSPS петунии, совмещенный с EPSPS *E. coli*, может эффективно доставлять бактериальный фермент в хлоропласты, благодаря чему, трансгенные растения приобретают высокий уровень устойчивости к глифосату. Такие растения мало отличались по темпам развития от контрольных.

Инактивацию гербицида путем его метаболизации можно продемонстрировать на примере обезвреживания бромокинила.

Для инактивации бромокинила был использован бактериальный ген нитрилазы. В растение табака был встроен ген нитрилазы, под контролем промотора малой субъединицы РБФК. Растения синтезировали нитрилазу, которая в ходе метаболизма инактивировала бромокинил.

Вводя в геном растений ценные гены и обеспечивая их экспрессию, можно относительно быстро создавать новые сорта растений. Уже получены трансгенные растения, устойчивые к неблагоприятным условиям окружающей

среды, к насекомым-вредителям, вирусам, гербицидам, окислительному и солевому стрессам. Выведены культуры с необычной окраской цветков, растения, имеющие более высокую пищевую ценность, растения с измененным вкусом плодов. Некоторые растения удалось модифицировать так, что они стали своеобразными фабриками по крупномасштабному синтезу ценных белков, биополимеров. Многочисленные трансгенные растения с измененными свойствами и повышенной пищевой ценностью прошли успешную проверку в лабораторных, а некоторые из них – в полевых условиях. К настоящему времени на рынок поступило лишь небольшое число генетически модифицированных растений, однако можно с уверенностью сказать, что в будущем они займут на нем достойное место.

#### **Контрольные вопросы:**

1. Каким образом с помощью методов генной инженерии обеспечивают устойчивость растений к насекомым – вредителям?
2. Как повысить устойчивость растений к вирусам?
3. На чем основано повышение устойчивости растений к грибам и бактериям?
4. Как повысить устойчивость растений к неблагоприятным климатическим условиям среды?
5. Можно ли изменить скорость созревания плодов? Если да, то как?
6. Какие успехи достигнуты в генной инженерии по улучшению пищевой ценности растений?
7. Как можно продлить сохранение плодами товарного вида после сбора урожая?
8. Какие успехи достигнуты генной инженерией в использовании растений как биореакторов?
9. Каким образом с помощью методов генной инженерии можно вывести цветы необычной окраски?
10. Раскройте основные методы генной инженерии, позволяющие

получить растения, устойчивые к гербицидам.

## ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Агглютинация 10  
Агрегация 13  
Адгезия 12  
Амфидиплоид 29  
Антисмысловая РНК 123  
Ацетосирингон 46  
Ассоциация растительных клеток и микроорганизмов 30  
Бекроссирование 27  
Бинарные векторы 50  
Биолистика (бомбардировка микрочастицами) 101  
Бромистый этидий 56  
Вариантные линии 18  
Вектор 36  
Генетическая комлементация 22  
Генетическая рекомбинация 22  
Генофор 25  
Гибридизация по Саузерну (Саузерн-блоттинг) 107-108, 114  
Гибридологический анализ 23  
Глифосат 105  
Глюкуронидаза 53  
Дот-гибридизация 107-108  
Дуплекс 123  
Зонд 107, 114  
Изозимы (изоферменты) 27  
Иммобилизация 93  
Инвертированные концевые повторы 40  
Инокуляция 63  
Каллус 10  
Карбенициллин 67  
Канамицин 52  
Каулимовирусы (CaMV) 37-39  
Клеточная инженерия 7  
Клеточные варианты 18  
Клон 17  
Контаминация 84  
Компетентная клетка 59  
Комплементация 22  
Конъюгация у бактерий 47  
Котрансформация 56  
Криптические хромосомные перестройки 18  
Лигирование 49  
Межалельная комплементация 18  
Микроинъекция 91  
«Молчание» генов 55  
Мутаген 17  
Неомицинофосфотрансфераза 68  
Ник-трансляция 113  
Ночная культура бактерий 70  
Нуклеопласты 14  
Онкогены 48, 49  
Парасексуальная гибридизация 8  
Пассаж 62  
Плазмаген 26  
Плазмида (Ti- и Ri-) 44-48  
Пролиферация 45  
Промотор 50  
Протоклон 14  
Протоксин 121  
Процессинг 129  
Рекомбинантная ДНК 35  
Репликон 48  
Репортерные гены 52, 53  
Рестриктаза (рестрикционная эндонуклеаза) 40, 57  
Рестрикция 40  
Селективный ген (маркер) 52, 57  
Селективная элиминация 22  
Скрининг 66  
Соматические варианты 101  
Соматический кроссинговер 15  
Субпротопласты 11  
Транспозаза 54  
Транспозиция 39  
Транспозон 38  
Трансфекция 89  
Транзитный пептид 134  
Трансформация 34  
Фидерная культура 96  
Физиологическая комлементация 22

Фланкирующие ДНК 48  
Фюзоген 10  
Химерность 23, 79  
Цефотаксим 67  
Цитогенетическое изучение гибридов 18  
Цитопласты 14  
Цитохалазин В 14  
Эксплантат 61  
Электропорация 96  
Элюирование центрифугированием 112  
Эмбриогенез 62  
Эндонуклеаза 41  
Энхансер 51  
Эпигенетическое изменение 18  
Соп-гены 44  
ORI-область плазмиды 44  
Vir-область плазмиды 43, 44

## ЛИТЕРАТУРА

1. Божков А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А. И. Божков. – Х. : Изд-во Федорко М. Ю, 2008. – 363 с.
2. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство : [пер. с англ.] / [под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта]. – М. : Мир, 1991. – 408 с.
3. Глеба Ю. Ю. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений / Ю. Ю. Глеба, К. М. Сытник. – К. : Наук. думка, 1987. – 104 с.
4. Глик Н. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение : учебн. / Н. Глик, В. Бернанд ; [пер. с англ. Пастернак Н. Е., Баскакова Ю. М.] – М. : Мир, 2002. – 589 с. (Лучший зарубежный учебник).
5. Кучук Н. В. Генетическая инженерия высших растений. / Н. В. Кучук/ – К. : Наукова думка, 2002. – 150 с.
6. Нестабильность генома и эпигенетическое наследование эукариот / [Котлова Т. Ю., Волянский А. Ю., Кучма И. Ю. и др.]. – Х. : Око, 2007. – 288 с.
7. Пирузян Э. С. Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений / Э. С. Пирузян. – М. : Наука, 1988. – 304 с..
8. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон ; [пер. с англ. ; под ред. В. Г. Дебабова]. – М. : Мир, 1987. – 411 с.
9. Сельскохозяйственная биотехнология : учеб. / [В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, С. В. Дегтярев и др.] ; под ред. В. С. Шевелухи. – М. : Высш. школа, 1998. – 416 с.
10. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция / В. А. Сидоров. – К. : Наук. думка, 1990. – 280 с.
11. Современные проблемы генетики, биотехнологии и селекции растений : сб. тезис. междунар. конф. молодых ученых. – Х. : Ин-т растениеводства им. В. Я. Юрьева, 2001. – 312 с.
12. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия / С. Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2004. – 496 с.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Глава 1. Клеточная инженерия	5
Культура изолированных протопластов и конструирование растительной клетки	7
Слияние субпротопластов	11
Модификация клеток при поглощении протопластами изолированных клеточных органелл	12
Генетическая изменчивость растительных клеток в связи с манипуляциями <i>in vitro</i>	13
Селекция мутантов	14
Сохранение вариантных клеточных линий	18
Селекция продуктов гибридизации	19
Методы анализа гибридов	20
Судьба родительских геномов после гибридизации	22
Межсемейственные гибриды клеток высших растений	24
Использование соматической гибридизации близкородственных видов	26
Искусственные ассоциации с микроорганизмами	27
Глава 2. Трансформация растений с использованием векторов	35
Векторы генной инженерии растений	36
Плазмиды агробактерий как векторы для трансформации	47
Препаративное выделение плазмид из <i>E. coli</i> в больших объемах	54
Введение чужеродных генов в хлоропластную ДНК	55
Обработка ДНК ферментами рестрикции и лигирование	57
Введение рекомбинантных плазмид в бактериальные клетки	58
Основные методы трансформации растительных клеток с помощью агробактериальных векторов	59
Трансформация с помощью онкогенных штаммов дикого типа <i>A.</i>	62

<i>tumefaciens</i> и <i>A. rhizogenes</i>	
Трансформация больших гетерогенных эксплантатов с помощью неонкогенных Ti-плазмидных векторов	64
Прямая регенерация трансформированных растений: трансформация листовых дисков табака	66
Поддержание и размножение трансформированных побегов	70
Регенерация трансформированных растений через стадию каллуса: трансформация эксплантатов проростков льна	71
Получение стерильных проростков льна и регенерация из эксплантатов побегов льна	73
Трансформация гипокотилей, регенерация из трансформированного каллуса, селекция, размножение и укоренение трансформированных побегов	75
Выделение мезофильных протопластов табака	78
Трансформация протопластов путем совместного культивирования с агробактериями	81
Трансформация растительных протопластов изолированной векторной ДНК	86
Трансфекция протопластов с помощью полиэтиленгликоля	87
Трансформация растительных клеток путем микроинъекций	89
Трансформация протопластов с помощью электропорации	94
Бомбардировка микрочастицами	99
Глава 3. Доказательство трансгенности растений	104
Описание эксперимента	105
Анализ хромосомной ДНК методом дот-гибридизации	107
Анализ растительной ДНК по Саузерну	113
Глава 4. Достижения генной инженерии в решении практических вопросов	119
Выведение растений, устойчивых к насекомым-вредителям	120
Устойчивость к вирусам	122

Растения, устойчивые к грибам и бактериям	123
Растения, устойчивые к неблагоприятным климатическим условиям среды	124
Созревание плодов	125
Изменение пищевой ценности растений	126
Растения как биореакторы	128
Изменение окраски цветов	129
Изменение внешнего вида плодов	130
Растения, устойчивые к гербицидам	130
Предметный указатель	135
Литература	137

Навчальне видання

**ТИМОШЕНКО** Володимир Федорович  
**ЖМУРКО** Василь Васильович  
**ТИМОШЕНКО** В'ячеслав Володимирович

**ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ РОСЛИН**

(Рос. мовою)

Відповідальний за випуск В. Ю. Джамеев  
Коректор Л. Є. Стешенко

Формат . Умов. друк. арк. 8.  
Тираж 1000 пр. Зам №229/10

Видавець і виготовлювач  
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК №3367 від 13.01.2009

---

610077, Харків, пл. Свободи, 4  
Видавництво ХНУ імені В. Н. Каразіна  
Тел. 705-24-32