

## Генетическая инженерия как инновационный результат векового развития науки

А. П. Царев<sup>1</sup>

*Петрозаводский государственный университет*

### АННОТАЦИЯ

Представлен краткий обзор развития и достижений генетической инженерии в медицине, растениеводстве и животноводстве. Описаны методы получения трансгенных и клонированных растений и животных. Отмечены результаты соматической гибридизации генетически отдаленных организмов. Показаны результаты широкомасштабного клонирования растений и получения «искусственных семян» растений. Обсуждены перспективы и возможные опасности применения методов генетической инженерии при клонировании человека.

**Ключевые слова:** векторы, инновация, искусственные семена, клонирование, соматические гибриды, трансгенез.

### SUMMARY

The brief review of development and achievement genetic engineering in medicine, planting and animal industries is submitted. The methods of reception transgenic and cloned plants and animals are described. The results of somatic hybridization genetically remote organisms are marked. The results large-scale cloning of plants and reception «artificial seeds» of plants are shown. The prospects and possible dangers of application of methods genetic engineering are discussed at cloning of the man.

**Keywords:** artificial seeds, cloning, innovation, somatic hybrids, transgenesis, vectors.

### ВВЕДЕНИЕ

После перерыва в 1900 году законов Г. Менделя, сформулированных им еще в 1865 году, генетика стала бурно развиваться как в теоретическом, так и в практическом направлениях. Усилиями генетиков были открыты закономерности наследования фенотипических признаков, сформулирована хромосомная теория наследственности, разработан Вавиловский закон параллельной изменчивости признаков, доказано, что носителями наследственности являются нуклеиновые кислоты, разработаны теоретические положения повышения продуктивности при производстве антибиотиков, селекции сельскохозяйственных и лесных растений и животных, начаты исследования по изучению популяций организмов. Только краткое перечисление важнейших достижений этой науки заняло бы не одну страницу, написанную петитом.

Одним из важнейших ее инновационных достижений является генетическая инженерия. Термин *генетическая инженерия* появился на рубеже 70-х годов двадцатого века. В то время впервые был выделен *in vitro* «чистый» ген (лактозный оперон кишечной палочки) и химическим путем был синтезирован ген аланиновой тРНК дрожжей.

К этому времени эмбриологи достигли значительных успехов в манипулировании зародышевыми клетками животных. У лягушки удаляли ядро из яйцеклетки и вводили ядро кишечной стенки головастика. При этом получали нормальный взрослый организм. Так впервые неполовым путем было воспроизведено животное. Это достижение позволило клонировать особи, то есть получать их генетически идентичные копии.

Все это позволило заменять определенные дефектные гены полноценными, то есть осуществлять генную терапию. Именно для этого процесса первоначально был введен термин «генетическая инженерия». Однако вскоре стало ясно, что с появлением «чистых» генов открывается перспектива конструирования бактерий с несвойственными им признаками, в том числе и высокоэффективных штаммов промышленных организмов. Поэтому генетической инженерией стали называть комплекс молекулярно-генетических методов, с помощью которых можно осуществлять целенаправленное конструирование организмов путем различных операций над информационными молекулами (В. Н. Рыбчин, 1999).

### ВЕКТОРЫ И ПЛАЗМИДЫ

Особые успехи генетической инженерии связаны с так называемой векторной трансформацией. В основе этого подхода лежит использование векторных молекул, или векторов, в качестве которых применяли плазмиды. *Векторы* – это молекулы ДНК, способные переносить включенные в них гены в клетку, где эти молекулы реплицируются автономно или после интеграции с геномом. *Плазмиды* – это внехромосомные факторы наследственности, генетические элементы, способные стабильно существовать в клетке в автономном, не связанном с хромосомным состоянием. Термин «плазмиды» предложил Дж. Ледерберг и др. в 1952 году. Плазмиду, способную объединяться с хромосомой, называют *эписомой*. К плазмидам относят генетический аппарат клеточных органоидов (митохондрий, пластид), а также группы сцепления, не являющиеся жизненно важными для содержащих их клеток. Наиболее изучены бактериальные плазмиды (фактор фертильности – *F-фактор*), колициногенные (колицины-антибиотики) факторы (*Col-факторы*), факторы устойчивости к лекарственным веществам (*R-фактор*), профаги и многие другие.

Многие плазмиды представляют собой кольцевые двухцепочные молекулы ДНК. Они широко распространены в живых клетках (в том числе и высших организмов) и интенсивно используются в генной инженерии в качестве основных компонентов разно-

<sup>1</sup> Автор – профессор кафедры лесного хозяйства.  
© Царев А. П., 2010

образных молекулярных переносчиков чужеродной ДНК.

В 70-е годы выяснилось, что причиной опухолеобразования являются так называемые *Ti-плазмиды* (*Ti-tumor inducing*, англ., индуцирующая опухоль). Они были обнаружены в клетках некоторых штаммов *A. tumefaciens*. *Ti-плазмиды* – это кольцевые молекулы ДНК (размером 50–80 мкм с молекулярной массой около  $1,3 \times 10^8$  Дальтон и длиной от 140 до 250 тыс. пар нуклеотидов). Эти плазмиды проникают из бактерий в клетки растения, и часть ДНК *Ti-плазмиды*, так называемая T-ДНК вызывает:

- 1) образование опухоли,
- 2) гиперпродукцию фитогормонов: цитокининов и индолилуксусной кислоты (ауксина),
- 3) синтез ряда производных аминокислот, объединяемых под общим названием *опины*.

Опухоль возникает вследствие нарушения баланса фитогормонов, от которого зависит нормальный морфогенез растения. Опинины, выделяемые клетками опухоли, бактерия использует в качестве источников углерода и азота, причем только в том случае, когда *A. tumefaciens* содержит *Ti-плазмиду*, заразившую клетки растения (С. Г. Инге-Вечтомов, 2009).

В настоящее время выделены и проклонированы несколько десятков генов высших растений, в том числе гены, контролирующие запасные белки: сои, ячменя, гороха, кукурузы, а также некоторые гены, контролирующие активность ферментов. На базе *Ti-плазмид* были созданы векторы, способные интегрироваться в растительные хромосомы. Это дало возможность вводить в клетки растений чужеродные гены и получать из единственной клетки сформировавшееся растение. Такие организмы, в которых чужеродные гены обнаруживаются во всех его клетках, включая половые, называются *трансгенными*. Они обладают свойством передавать приданные им новые признаки своему потомству. В последние десятилетия трансгенные организмы были получены не только у растений, но и у животных организмов.

### ТРАНСГЕНЕЗ И ЕГО ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Трансгенез (в некоторых публикациях трансгеноз) – это процесс внесения в геном хозяина новой для него конструкции (трансгена).

Первыми чужеродными генами, введенными в начале 80-х годов в высшие растения, были гены устойчивости к антибиотикам из *E. coli*. В клетки подсолнечника с помощью *Ti-плазмид* был передан ген фазеолина бобов. Фазеолин – это гликопротеин, составляющий до 50 % запасного белка бобов. Будущее растение названо санбин [санбин = *sunflower* (подсолнечник) + *bean* (бобы)]. Получены растения табака, которые светятся в темноте благодаря экспрессии в них гена люциферазы светлячка. В Центральном НИИ лесной генетики и селекции (г. Воронеж) с конца 80-х годов начаты первые опыты по генетической инженерии с лесными древесными растениями. Однако в послед-

ние годы эти исследования, к сожалению, были прекращены.

В целом же получение трансгенных растений идет по нарастающей тенденции. Они уже вышли за пределы лабораторий. В 1994 году впервые на рынке появились томаты, которые остаются твердыми многие недели после их сбора. Прошли полевые испытания устойчивые к гербицидам растения: табак, хлопок, картофель, помидоры, кукуруза, свекла, рапс, салат-латук и др.

Однако остаются вопросы их экологической устойчивости и влияния на окружающую среду, а в некоторых случаях и на их потребителей. Эти проблемы время от времени ставятся в повестку дня и разрабатываются специальные мероприятия по изучению и предотвращению возможных вредных последствий от выведения и использования трансгенных растений. Однако для объективных оценок потребуются многие годы скрупулезных научных исследований.

Кроме работ по созданию и исследованию трансгенных растений проводятся аналогичные работы с животными. Цели при этом ставились разные: от изучения самой возможности создания трансгенных животных до животных, с нужными человеку свойствами или имеющих определенные возможности для создания необходимых биопрепаратов. Объем рынка трансгенных животных оценивается в миллиарды долларов (В. И. Глазко, Г. В. Глазко, 2008).

Одной из проблем является создание животных с пониженным содержанием лактозы. Большая часть взрослых людей неспособна переваривать молочный сахар – лактозу, поэтому требуются животные с низким содержанием лактозы в молоке. Во Франции была создана трансгенная мышь, в молоке которой содержание лактозы снизилось на 50 %, в то время как содержание других веществ (жира, белков, минеральных компонентов) не отличалось от контроля. Проводятся также опыты по увеличению скорости роста и массы у свиней и мышей.

В США (Gerald Schatten с сотрудниками из Орегона) был получен трансгенный ребенок обезьяны из породы резус, что считается весьма символическим, поскольку обезьяны, как и человек, относятся к приматам (M. D. Lemonick, 2001). В данном эксперименте в геном обезьяны был введен ген свечения медузы и получен детеныш со светящейся шерстью. Новорожденный малыш назван Энди (ANDi – перевертыш от *inserted DNA* – введенная ДНК).

Схема процесса заключалась в следующем:

1. Используя рекомбинантные ДНК технологии, ученые ввели ген медузы в поврежденный вирус.
2. Затем они инфицировали 224 яйцеклетки обезьян вирусом, надеясь, что при этом ген медузы будет включен в их ДНК.
3. Яйцеклетки были экстракорпорально оплодотворены в экспериментальных пробирках, в результате чего было получено 126 эмбрионов.

4. 40 наиболее здоровых эмбрионов были имплантированы 20 сурrogатным матерям, у которых получилось 5 успешных беременностей.
5. В конце эксперимента только три детеныша родились живыми, и только один, Энди, нес введенный ген во всех клетках его тела (рис. 1).

Выведению Энди предшествовала история 20-летних исследований по получению трансгенных животных других видов:

1980 – Первая генетически модифицированная мышь, созданная путем введения нового гена в клетки костного мозга, а затем внедрения этих клеток в живое животное.

1986 – Рождение первых трансгенных овец, которые несли человеческий ген свертывания крови.

1990 – Рождение Геня, первого трансгенного поросенка, чья ДНК включала ген несвертываемости белка человека.

1990 – Первый трансгенный бык; бык Герман имел введенный ген лактоферина человека.

1991 – Первые трансгенные дойные коровы, которые несли ген лактоферина человека.

2001 – Объявлено о первом генетически модифицированном примате, трансгенном резусе обезьяны, названной Энди.

Наряду с выведением трансгенных животных предпринимаются попытки лечения трудноизлечимых болезней путем генной терапии. Возможно, что этот путь будет перспективным для лечения болезней нарушения иммунной системы, Альцгеймера, врожденной слепоты и др.

### КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ И КЛОНИРОВАНИЕ

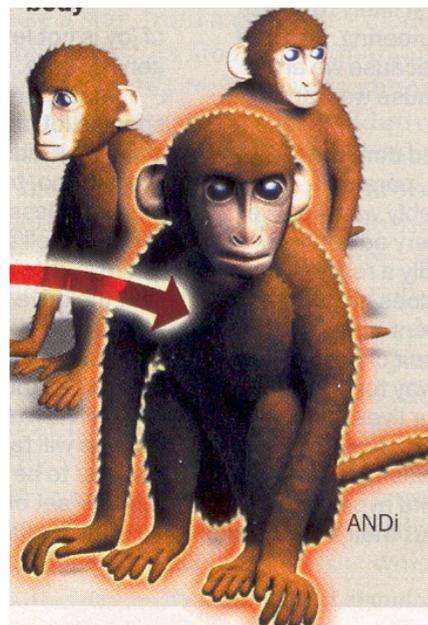
Одним из продуктивных направлений генетической инженерии применительно к растениям стала *клеточная инженерия* растений. Она основана на так называемой *тотипотентности* клеток, что означает сохранение их способности к делению и передифференцировке даже в зрелом состоянии.

Эта способность и проявляется при культивировании растительной ткани в среде, содержащей необходимые питательные вещества и факторы роста (фитогормоны – ауксины и цитокинины). Клетки ткани дедифференцируются и начинают делиться, образуя однородную массу, так называемый *каллус*.

Внутри каллуса формируются побеги, затем корни. Если концентрация ауксинов в среде существенно больше, чем цитокининов, то формируются только корни.

Если соотношение концентраций обратное, образуются только побеги. Культивировать можно не только ткани, но и отдельные клетки и даже изолированные протопласты.

Схема регенерации растений из изолированных клеток или протопластов показана на рисунке 2.



А



Б

Рис. 1. Трансгенная обезьяна Энди: А – с братьями; Б – собственной персоной (по М. D. Lemonick, 2001)

Этот метод используется в растениеводстве для размножения редких ценных или исчезающих форм. В лесном хозяйстве он используется для размножения также трудно черенкующихся лесных древесных пород.

У нас он используется в основном в научных организациях. За рубежом такие работы поставлены на поток. Культивирование производится в фитотронах. При этом выделяют фермерский масштаб (0.1–1 млн микрорастений в год) и промышленный масштаб (более 1 млн микрорастений в год) (К. А. Шестибратов, 2008).

С помощью клонального микроразмножения получают также так называемые *искусственные семена*, полученные неполовым путем (рис. 3).

Но если клонирование растений было известно давно, то клонирование млекопитающих вызвало в конце двадцатого века настоящий фурор. Стоит только вспомнить информацию о получении в 1997 году в

Шотландии овечки Долли путем клонирования. Она, правда, прожила недолго (до 2003 г.), но успела родить 6 потомков (рис. 4).

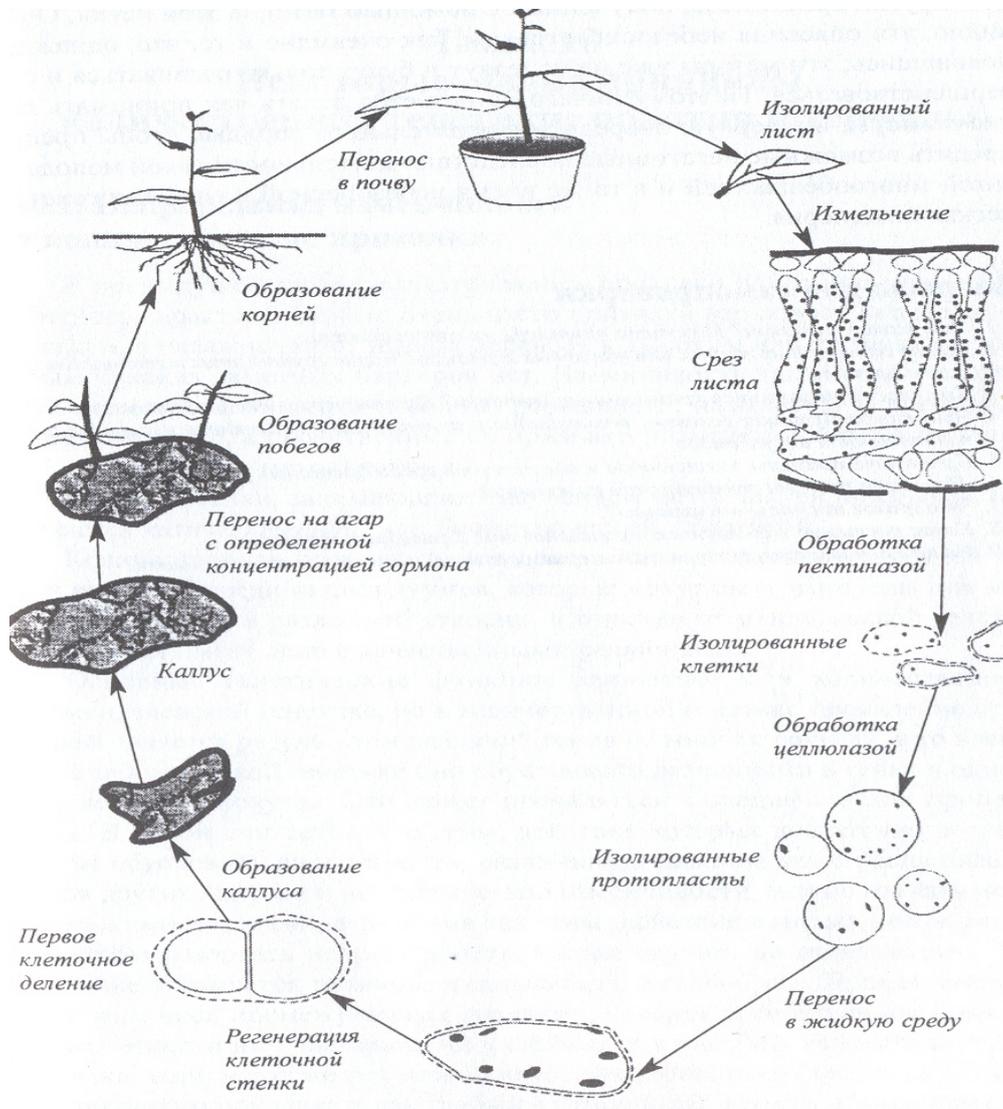


Рис. 2. Схема регенерации растений из изолированных клеток или протопластов (В. Н. Рыбчин, 1999)

После обнаружения факта рождения овцы Долли клонирование животных стали производить во многих странах. Так, на Украине в 1999 году было выведено клоновым путем три телочки (Дева, Домна и Дюня). Каждая из них родила по несколько телят обычным половым путем.



Рис. 3. Искусственные семена. Основные этапы: 1 – получение растительного материала (соматических эмбрионов); 2 – инкапсуляция; 3 – проращивание (К. А. Шестибратов, 2008)



Рис. 4. Овца Долли и ее сын Бонни (журнал «Вокруг света», октябрь 2006)

В 2000 году были предприняты попытки клонировать мамонта, пролежавшего тысячелетия в вечной мерзлоте (Япония), тасманского тигра, вымершего в 1936 году (Австралия), и примата (США). Из-за низкого качества исходного репродуктивного материала попытки не увенчались успехом. В этом же году в Японии клонирован бык, который прожил несколько лет. В 2001 году в США клонирован кот Дитто, а год спустя две кошки. В 2004 году в Южной Корее клонировали человека. До рождения младенца дело не дошло, но из 100-клеточного эмбриона извлекли стволовые клетки (Аргументы и факты. 2007. № 19).

В научной литературе сообщается о получении клонов козы, кролика, коров, овец, шимпанзе и других животных (В. И. Глазко, Г. В. Глазко, 2008, Press releases..., 2009).

Предполагается, что будут продолжаться попытки клонировать человека (N. Gibbs, 2001).

Это может быть произведено следующим путем:

1. Врачи извлекают до 15 яйцеклеток из 40 женщин-доноров, которым ввели лекарства, повышающие фертильность. Всего извлекается 400 яйцеклеток.
2. От мужчины – кандидата на клонирование – берут клетки.
3. Ядра из каждой яйцеклетки отсасываются тонкой иглой. Затем свободные от ДНК яйца и клетки донора помещают друг возле друга и воздействуют электрическим разрядом, который вызывает их соединение. Некоторые из перестроенных яйцеклеток делятся и формируют эмбрионы.
4. Затем эмбрионы имплантируют полусотне суррогатных матерей. Поскольку эмбрионы при имплантации часто гибнут, то каждой матери вводят их несколько экземпляров сразу. От этих 50 суррогатных матерей рассчитывают получить 9–10 беременностей. Из них большинство, скорее всего, будет с неудачной беременностью, и только отдельные живые дети могут быть нормальными. А, может быть, и нет (как полагает N. Gibbs, 2001).

В целом клонирование животных и отдельных органов человека будет использоваться в первую очередь в медицинских целях. Сплав современных биотехнологий и генетики обещает существенный прорыв в неизведанное, что позволит значительно улучшить здоровье и жизнь человечества.

#### СОМАТИЧЕСКАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ

Разработка и применение способов получения и слияния протопластов растительных клеток, а также регенерация у них клеточной стенки в сочетании с методами культивирования и дифференцировки клеток *in vitro* позволили конструировать рекомбинанты, минуя половой процесс, то есть создавать *соматические гибриды*. Это позволяет объединять протопласты отдаленных видов растений, между которыми половая гибридизация невозможна.

Первые успехи в получении соматических гибридов растений данным методом были достигнуты в середине 60-х годов двадцатого века. Вначале были выделены межвидовые гибриды (табака, моркови, петунии и дурмана). Затем удалось получить и межродовые соматические гибриды (картофель  $\times$  томат, дурман  $\times$  белладонна). Дальнейшие исследования в направлении соматической гибридизации и повышения стабильности выведенных организмов обещают значительный экономический эффект.

Соматические гибриды животных используются также для картирования генов в хромосомах.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Масштабы работ по генетической инженерии к настоящему времени приобрели такой размах, что это вызывает обеспокоенность экологических и некоторых политических организаций в отношении возможных негативных последствий не только собственно трансгенных растений, но и других организмов, полученных с помощью методов этой науки.

Очевидно, что эти опасения небезосновательны, как очевидно и то, что, однажды появившись, эти методы уже не исчезнут и будут только развиваться и совершенствоваться. Поэтому ничего не остается делать, как принимать какие-то меры и в первую очередь законодательного порядка по недопущению возможных негативных последствий результатов такой молодой, такой многообещающей и в то же время небезопасной науки как генетическая инженерия.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Глазко В. И. Толковый словарь терминов по общей и молекулярной биологии, общей и прикладной генетике, селекции, ДНК-технологии и биоинформатике: В 2 т. / В. И. Глазко, Г. В. Глазко. М.: Изд-во «Медкнига», 2008.
2. Инге-Вечтомов С. Г. Экологическая генетика и теория эволюции / С. Г. Инге-Вечтомов // Информационный вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. № 2. С. 362–371.
3. Рыбчин В. Н. Основы генетической инженерии / В. Н. Рыбчин. СПб.: Изд-во СПб ГТУ, 1999. 522 с.
4. Шестибратов К. А. Мировой опыт и достижения технологий клонального микроразмножения и генетической трансформации: Доклад на научно-производственной конференции «Генетика и селекция лесных древесных пород». Пушкино, 2008.
5. Gibbs N. Renegade scientists say they are ready to start applying the technology of cloning to human beings. Can they really do it, and how scary would that be? / N. Gibbs // Time. 2001. 19 february. P. 33–43.
6. Lemonick M. D. Monkey business / M. D. Lemonick // Time. 2001. 22 January. P. 50–52.
7. Press releases of Welcome Trust Sanger Institute: 2-nd November 2009 // [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Info/Index](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index)