



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY

М. Г. Куцев, М. В. Скапцов, И. Е. Ямских
БИОИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ
ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ



**ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ**

УДК 581.19:602.6(07)
ББК 28.540.4я73
К958

Р е ц е н з е н т ы:

А. И. Шмаков, доктор биологических наук, профессор, директор учебно-производственной базы практик «Южно-Сибирский ботанический сад» ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»;

Н. В. Фризен, доктор биологических наук, профессор, зам. директора Ботанического сада Университета Оснабрюк, Германия

Куцев, М. Г.

К958 Биоинженерия растений. Основные методы : учеб. пособие / М. Г. Куцев, М. В. Скапцов, И. Е. Ямских. – Красноярск : Сиб. федер. ун-т, 2020. – 80 с.
ISBN 978-5-7638-4321-7

Изложены теоретические материалы о принципах генетической трансформации, культивирования и использования рекомбинантных растений. Подробно рассмотрены методы выявления последовательностей нуклеиновых кислот с помощью ПЦР с детекцией в реальном времени. Приведены рекомендации к лабораторным работам по дисциплине «Биоинженерия».

Предназначено для магистрантов, обучающихся по направлению 06.04.01 «Биология», профилю подготовки 06.04.01.06 «Геномика и биоинформатика».

Электронный вариант издания см.:
<http://catalog.sfu-kras.ru>

УДК 581.19:602.6(07)
ББК 28.540.4я73

ISBN 978-5-7638-4321-7

© Сибирский федеральный
университет, 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Г л а в а 1. ИСТОРИЯ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ	5
Г л а в а 2. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ	12
Г л а в а 3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	17
Г л а в а 4. ОСНОВЫ ВВЕДЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO</i>	26
Г л а в а 5. ВЫЯВЛЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ.....	32
5.1. Низкоспецифичная детекция результатов ПЦР-РВ с помощью интеркалирующих красителей	34
5.2. ПЦР в реальном времени с использованием специфичных зондов	35
5.3. Специфичные меченые праймеры	46
5.4. Сравнение некоторых методов флуоресцентной детекции	55
Г л а в а 6. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ	58
Лабораторная работа 1. Выделение ДНК из генетически модифицированных растительных образцов	58
Лабораторная работа 2. Амплификация гена CP4 EPSPS.....	59
Лабораторная работа 3. Количественная ПЦР гена CP4 EPSPS	61
Лабораторная работа 4. Клонирование ДНК с помощью набора Quick-ТА (Евроген, Россия)	62
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	68

Глава 1

ИСТОРИЯ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ

Важнейшей задачей молекулярной биологии и генно-инженерной экспериментальной биологии растений является получение видов с новыми заданными свойствами. Одним из перспективных и быстро развивающихся направлений растительного «биофарминга» и генной инженерии является использование трансгенных растений в качестве продуцентов биологически активных веществ и соединений для медицины, сельского хозяйства и различных промышленных технологий. Актуальность создания таких растений обусловлена также непрекращающимся ростом населения и связанным с ним ростом потребностей человека в продуктах питания, так как потребности человека безграничны, а ресурсы, напротив, ограничены. Следует учитывать и возрастающие запросы медицины в получении качественных и дешёвых лекарств, которые с успехом могут быть решены благодаря методам генной инженерии. Примером могут служить работы по трансфекции гена эритропоэтина (стимулятора кроветворения) в клетки сосудистых растений с помощью бактериальной плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*.

Трансформация растений генами, ответственными за синтез клеточных метаболитов, позволяет получать растения со сверхэкспрессией важных биологически активных соединений. С другой стороны, подавление экспрессии генов с использованием антисмысловых и интерферирующих РНК предоставляет возможность получать растения с изменёнными физиолого-биохимическими характеристиками и создавать виды, устойчивые к фитопатогенам.

Вещества, получаемые из трансгенных растений, имеют ряд преимуществ:

- во-первых, они дешёвы и относительно легки в получении, что позволит распространять их в страны с разным уровнем экономического благополучия;
- во-вторых, трансгенные растения могут произрастать на любых типах почв, даже самых неблагоприятных для роста;
- в-третьих, можно достичь максимального продуцирования растительным организмом необходимого вещества.

В биоинженерии важнейшей задачей является подбор подходящего вектора. Вектор – это молекула ДНК или РНК, состоящая из двух компонентов: векторной части (носителя) и клонируемого чужеродного гена. Задача вектора – донести выбранную ДНК в клетку-реципиент. Несмотря на то, что было предложено большое разнообразие векторов на основе растительных вирусов, к настоящему времени ни один из них детально не разработан. Эти векторы характеризуются рядом недостатков, в частности узкой специфичностью в отношении заражаемого растения, ограничениями размера вставки и нестабильностью. Последнее замечание связано с тем, что упомянутые вирусы реплицируются автономно и не интегрируются в ядерный геном растительных клеток.

Указанные причины заставили учёных сконцентрировать внимание на векторах, сконструированных на основе опухолеродных, так называемых Ti-плазмид, обнаруженных в клетках почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* (Клонирование ДНК..., 1988).

Опухолевое заболевание растений, известное как *корончатый галл*, описал ещё Аристотель. В 1907 году Е. Смит и К. Таундсен показали, что это заболевание вызывает почвенная бактерия *Agrobacterium tumefaciens*, способная приводить к образованию опухолей у некоторых представителей голосеменных и большинства двудольных покрытосеменных растений. В 1940-х годах была выдвинута гипотеза о том, что растительные клетки трансформируются из-за того, что бактерия вводит в них некий агент, индуцирующий опухоль. Клетки корончатых галлов во многих отношениях напоминают раковые клетки животных. Они приобретают способность к неограниченному нерегулируемому росту. Когда клетки корончатых галлов культивируют *in vitro*, они растут в отсутствие специальных гормонов, которые необходимы при культивировании нормальных растительных клеток. Более того, клетки корончатых галлов продолжают сохранять эти свойства (трансформированный фенотип), даже если убить агробактерии антибиотиками. Изучение природы индуктора опухолей *A. tumefaciens* позволило установить в 1974 году, что собственно опухолеродным агентом у этой бактерии является плазида Ti (от англ. *tumor inducing*), размер которой обычно составляет 200–250 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.).

В 1977 году М. Чилтон с коллегами обнаружили, что плазида Ti содержит так называемую T-ДНК (от англ. *transferred DNA*), размер которой в разных плазидах варьирует от 10 до 30 т.п.н.

Новый импульс развитию генетической инженерии растений дала разработка альтернативной стратегии использования *Agrobacterium* для доставки целевых генов в растительные клетки. В 1983 году А. Хоекама и А. де Фреммонд с коллегами независимо друг от друга обнаружили, что T-ДНК и гены *vir* (от англ. *virulence*) могут находиться у агробактерий на

двух разных репликациях (в транс-положении), и при этом происходит эффективный перенос в растения Т-ДНК. А. Хоекама с соавторами назвали основанный на этом подход *бинарной векторной системой*. Плазмиду, содержащую Т-ДНК, называют вектором, а плазмиду, несущую гены *vir*, – помощником (хелпером). Хелперная плазида представляет собой Ti-плазмиду с делецией всей Т-ДНК или её части, т. е. она обеспечивает все функции переноса Т-ДНК, но не содержит последней. Такая Ti-плазида называется «обезоруженной» (Gelvin, 2003).

Следует отметить, что Т-ДНК успешно переносится в клетки растений даже при очень большом размере вставки. Так, в 1992 году А. Миранда с коллегами первыми показали, что при изменении ориентации участка RB Т-ДНК в растения может переноситься полная копия Ti-плазмиды. В 1996 году К. Гамильтон с коллегами, используя бинарную векторную систему, осуществили перенос из *Agrobacterium* в растительные клетки фрагментов хромосомной ДНК человека размером до 150 т.п.н. (Щелкунов, 2004).

Для медицинских целей растения используют на протяжении нескольких тысяч лет, но генетическая инженерия позволила создать новые растения, белковые продукты которых важны для терапии различных заболеваний. Гены терапевтически важных белков человека и животных можно вводить в разные системы экспрессии, каждая из которых имеет свои достоинства и недостатки. Идеальной является система экспрессии, которая наиболее безопасна и обеспечивает продукцию биологически активного продукта по минимальной цене. В системе клеток млекопитающих могут синтезироваться белки человека и животных, в максимальной степени схожие с природными, но культивирование таких клеток дорого и ограничено по масштабу. Бактерии можно производить в большом масштабе, но синтезируемые в них эукариотические белки далеко не всегда имеют правильную третичную структуру. Кроме того, они не могут подвергаться посттрансляционной модификации.

Наработка рекомбинантных белков в растениях имеет ряд потенциальных преимуществ перед другими системами экспрессии чужеродных генов. Растительные системы более дешёвы по сравнению с культивированием в биореакторах (ферментёрах). Все, что требуется для нормальной жизнедеятельности растений, – это минеральные соединения, содержащиеся в почве, вода, энергия солнечного света и углекислый газ.

В растениях возможна посттрансляционная модификация синтезируемых чужеродных полипептидов. Обязательным условием образования функционально активных белков является правильная укладка полипептидной цепи. У млекопитающих за это отвечают, по крайней мере, два шаперона – BiP/GRP78 и GRP94. В высших растениях сигнальные последова-

тельности (например, Lys-Arg-Glu-Leu на С-конце полипептида) направляют белки в эндоплазматический ретикулум, где обнаружены шапероны, гомологичные BiP/GRP78 и GRP94 (McBride, Summerfelt, 1990).

Важной особенностью растений по сравнению с культурами клеток млекопитающих и трансгенными животными является то, что в них не могут развиваться такие патогены человека и животных, как вирусы, прионы и др., что обеспечивает гораздо бóльшую безопасность генно-инженерных продуктов, выделенных из растений. Примеры растений-продуцентов терапевтически важных белков человека приведены в табл. 1.

Таблица 1

**Примеры продукции трансгенными растениями белков человека
для возможного терапевтического применения**

Заболевания, синдромы	Растение-реципиент	Белки	Уровень экспрессии	Год опубликования
Анемия	Табак	Эритропоэтин	< 0,01 % СРБ ¹	1997
Передозировка наркотиков	Арабидопсис	Энкефалины	0,10 % белка семян	1997
Цирроз печени, ожоги, хирургические травмы	Табак	Сывороточный альбумин	0,02 % СРБ	1997
Кровопотеря	Табак	α -, β -глобин	0,05 % белка семян	1997
Гиперкоагуляция	Табак	Протеин С	< 0,01% СРБ	1999
	Рапс	Гирудин (ингибитор тромбина)	0,30 % белка семян	1999
Гепатиты А и В	Рис, репа	α -интерферон	Нет данных	1999
	Табак	β -интерферон	< 0,01 % СВ ²	
Нарушение синтеза коллагена	Табак	Гомотримерный коллаген	< 0,01 % СВ	1999
Нейтропения	Табак	Гранулоцит-макрофаг колониестимулирующий фактор	Нет данных	2000
Недостаток гормона роста	Табак	Соматотропин	< 0,01 % СРБ	2000
Пузырный фиброз, заболевания печени, кровотечения	Рис	α -1-антитрипсин	Нет данных	2000

Примечание: ¹ СРБ – суммарный растворимый белок.

² СВ – сырой вес.

Технологии сбора и обработки растений в больших масштабах уже существуют, что значительно упрощает и удешевляет работу с посевами

трансгенных растений. Белки, продуцируемые в семенах, клубнях, плодах, обладают значительной стабильностью и могут сохраняться в них без выделения длительное время.

Значительную долю в стоимость рекомбинантных белков медицинского назначения вносит их очистка. При синтезе некоторых белков в зерне риса, пшеницы, плодах томата, бананов и др. возможно их введение в организм алиментарным путем (с пищей) без предварительной очистки, что значительно снизит стоимость таких препаратов.

Метод получения моноклональных антител в гибридах разработали Г. Кохлер и К. Милстейн в 1975 году. Вследствие своей высокой специфичности для широкого спектра антигенов антитела и их фрагменты нашли широкое применение как для диагностических целей, так и в терапии различных заболеваний. Учитывая потенциальные преимущества генно-инженерной системы растений, заманчиво было бы клетки млекопитающих при производстве антител заменить на растительные.

А. Хиатт с коллегами в 1989 году первыми создали трансгенные растения табака, продуцирующие функционально активные моноклональные антитела IgG1. Для этого ДНК-копии матричных РНК, выделенных из мышинной гибридомы 6D4 и кодирующих легкую (каппа) и тяжелую (гамма) цепи иммуноглобулина IgG1, встроили в агробактериальный бинарный экспрессирующий вектор. Полученные для каждой цепи иммуноглобулина гибридные конструкции перенесли в клетки табака. На селективной среде отобрали трансгенные растения и охарактеризовали продукцию соответствующих целевых белков. Трансформанты, продуцирующие индивидуальные цепи иммуноглобулина, скрестили и получили потомство, экспрессирующее одновременно обе цепи. В таких растениях цепи обоих типов объединялись и образовывали функционально активные молекулы, специфично связывающиеся с соответствующими антигенами. Функциональные антитела в растениях табака накапливались в количестве, достигающем 1,3 % суммарного белка листьев. Экспериментально было установлено, что для сборки молекулы иммуноглобулина необходима секреция обеих цепей, т. е. каждая цепь должна синтезироваться в виде пребелка, на N-конце которого находится сигнальный пептид.

В дальнейшем в ряде лабораторий были получены трансгенные растения, которые продуцировали различные полноразмерные иммуноглобулины, либо так называемые одноцепочные переменные фрагменты (single-chain variable fragment, *scFv*) иммуноглобулинов, представляющие собой переменные области тяжелой и легкой цепей, соединенные линкерным пептидом.

Различия в гликозилировании белков, синтезированных в клетках растений и млекопитающих, – главная проблема при использовании их