

Генетична інженерія. Основні напрямки та галузі використання.

Ген — це елементарна, функціонально неподільна одиниця спадковості, за допомогою якої відбуваються запис, збереження і передача генетичної інформації в поколіннях. Із молекулярної точки зору, ген (цистрон) — це фрагмент ДНК або (у деяких вірусів) РНК, що містить інформацію для синтезу поліпептидного ланцюга; до його складу входять кодуюча послідовність нуклеотидів (екзони), ділянки, розташовані перед кодуючою послідовністю та після неї (лідерна і кінцева ділянки), інсерційні послідовності (інтрони). Ген складається з нуклеотидів, число і послідовність яких кодують інформацію про первинну структуру молекул поліпептиду, білка, певного типу РНК (структурні гени), або здатність до взаємодії з регуляторними білками, завдяки чому контролюється і регулюється діяльність структурних генів (регуляторні гени). Ген середнього розміру складається з 1000—1500 п. н.

Генетичну (генну) інженерію можна визначити як систему штучного конструювання рекомбінантних (гібридних) ДНК і введення їх в живий організм з метою одержання спадкових змін. Іншими словами, сутність генної інженерії складає цілеспрямоване переміщення окремих генів з одного генетичного оточення в інше. У результаті спадкова інформація організму змінюється, йому надаються нові генетичні і, відповідно, біохімічні та фізіологічні властивості, корисні для людини. Одержаний в результаті таких маніпуляцій організм позначається як *трансгенний*.

Класичними методами генетичної інженерії вважають:

- синтез генів поза організмом;
- цілеспрямована перебудова виділених структур;
- виділення із клітин окремих генів, фрагментів хромосом, клітинних ядер, інших органел;
- копіювання та розмноження виділених або синтезованих генів;
- трансгеноз;
- поєднання різних геномів у одній клітині.

Формально народженням генної інженерії як самостійної дисципліни можна вважати грудень 1972 р., коли Поль Борг із співробітниками (США, Стендфорський університет) сповістили про створення першої рекомбінантної молекули ДНК. Ця молекула складалася з фрагментів ДНК вірусу SV-40, бактеріофагу і генів E.coli. Перші експерименти по перенесенню чужорідних генів у рослину датуються 1980р.

Інструменти генної інженерії

Для того, щоб штучним шляхом надати будь-якому організму нові властивості, необхідно ввести у нього новий ген або групу генів, які будуть там працювати і синтезувати свої білки. Гени одержують одним із трьох способів:

- 1) безпосереднім виділенням з природного матеріалу,
- 2) шляхом хімічного синтезу;
- 3) ензиматичний метод.

Як виділеному гену потрапити в клітину і почати там працювати? Для цього використовують *вектори* - плазміди або віруси (бактеріофаги), які здатні переносити в клітину вмонтований в їх ДНК чужий ген, забезпечуючи там його реплікацію та синтез білкових продуктів. Вектор — це молекулярний "віз" для доставки чужорідних генів у різні організми. Вектори мають відповідати таким вимогам:

- містити один або декілька унікальних сайтів рестрикції для вбудовування чужорідної ДНК;
- автономно реплікуватися;
- не мати функцій, що перешкоджають регенерації рослин;
- мати маркери, за якими легко виявляють трансформовані клітини (наприклад, стійкість до антибіотика);
- введення чужорідного гена не повинно порушувати функцій вектора;
- бути невеликими за розмірами.

Плазміди - це невеликі кільцеві молекули ДНК, які присутні у більшості бактерій разом із хромосомною ДНК. Вони здатні до автономної реплікації, тобто несуть гени, що відтворюють власну ДНК, а також мають гени стійкості

до антибіотиків, гени патогенності (здатності бактерій викликати захворювання людей, тварин і рослин). Не випадково, що про плазмиди першими голосно заговорили медики, коли випадково у 1959 році була доведена неефективність деяких антибіотиків при лікуванні інфекційних та інших захворювань. Це явище обумовлюється присутністю генів стійкості до антибіотиків в плазмідах патогенних бактерій. ДНК кільцевих плазмід легко переходить від однієї бактерії до іншої що робить їх генетично несприятливими до ліків. Наприклад, деякі плазмиди можуть виробляти фермент пеніцилазу, яка руйнує пеніцилін і патогенні бактерії залишаються життєздатними.

Сучасні дослідники працюють із штучними плазмідами pBR 322, 324, 325 та ін., які мають невеликі розміри (3-9 тис. нуклеотидних пар). Вони несуть два-три маркерних гени стійкості до антибіотиків, в яких обов'язково міститься сайт рестрикції до певної рестриктази.

Розглянемо схему введення чужорідного гена в плазмиду pBR 322, яка несе гени стійкості до ампіциліну (Ap^r) і тетрацикліну (Tc^r) (рис. 24).

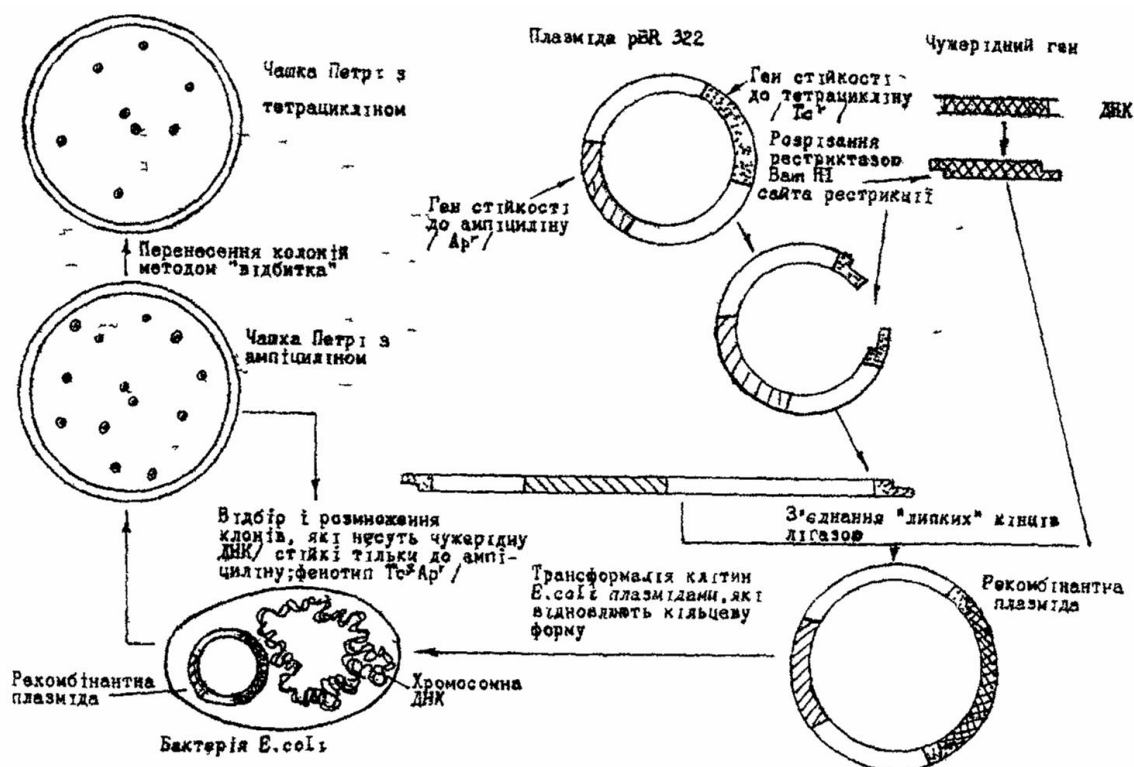


Рис. 24. Інтеграція чужорідного гена в плазмиду pBR 322 і відбір клону-носія чужорідної ДНК

ДНК плазмиди-вектора і чужорідна ДНК обробляються однією рестрикта-

зою (наприклад, *Bat H1*). При цьому в сайті гена стійкості до тетрацикліну плазмиди утворюється розрив, і кільцева молекула стає лінійною. Чужорідна ДНК нарізається на фрагменти за допомогою цієї самої рестриктази *Bat H1*. Потім обидва препарати розрізаної ДНК обробляються лігазою, і фрагменти з'єднуються своїми "липкими" кінцями. Об'єднання гена і вектора утворює рекомбінантну плазмиду (рекомбінантну ДНК), що являє собою штучну генетичну програму.

Потім починається *трансформація* - рекомбінантну ДНК вводять в бактеріальні клітини *E.coli*, які попередньо обробляють іонами Ca^{2+} для того, щоб зробити клітини проникними для ДНК. Трансформовані бактерії висівають на середовище з ампіциліном і тетрацикліном, а також на середовище тільки з ампіциліном. Клітини, що містять гібридну плазмиду, ростуть на агарі з ампіциліном, але не ростуть на середовищі з тетрацикліном, тому що ген стійкості до тетрацикліну пошкоджений вставкою чужорідного гена. Селективний ріст дозволяє відбирати клітини з рекомбінантними плазмідами.

Надалі починається *молекулярне клонування*, тобто одержання нащадків рекомбінантної ДНК. Клонований фрагмент ДНК може бути необмежено розмножений в процесі клітинних поділів трансформантів. Так, деяким плазмідам, притаманна важлива особливість, якщо на клітини, які містять такий вектор, подіяти антибіотиком хлорфеніколом, то число копій плазмиди в них збільшується до декількох тисяч. При цьому збільшується доза клонованого гена, що дозволяє отримувати вмонтований в плазмиду ген (або продукт цього гена) у дуже великих кількостях (Баєв О.О., 1985).

Напрямки використання генно-інженерних досліджень у рослинництві

Стійкість проти гербіцидів

Стійкість проти шкідників

Стійкість проти вірусів і віроїдів

Стійкість проти грибних патогенів

Підвищення загальної продуктивності рослин

Поліпшення якості рослинної продукції

Зміна вмісту вуглеводів

Поліпшення зберігання

Стійкість проти бактеріозів

Стійкість проти абіотичних стресових чинників

Зміна забарвлення

Отримання чоловічостерильних форм.