

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

ТРАНСГЕНЕЗ. РАСТЕНИЯ

Лекция 6



Словарь



Экспрессия гена – появление в клетках организма-реципиента биологически активного генного продукта

Кассета экспрессии – фрагмент ДНК, содержащий все необходимые элементы (промотор, терминатор) для экспрессии внедренного в него гена

Причины внедрения в практику генетической инженерии растений



- 1
•Необходимость увеличить продукцию растениеводства
- 2
•Исчерпанность генетического потенциала растений для классической селекции
- 3
•Необходимость быстрого получения новых сортов высокопродуктивных устойчивых растений



ТРАНСГЕНЕЗ РАСТЕНИЯ. Лекция 6

ТЕХНИКА ТРАНСГЕНЕЗА

Этапы получения трансгенных растений (до принятия решения об интродукции)



- Создание и амплификация гДНК
- Выбор и подготовка клеток-реципиентов для трансформации
- Встраивание трансгена в геном клетки-реципиента
- Отбор трансформированных клеток
- Стимуляция регенерации побегов или эмбриогенеза из трансформированных клеток (in vitro)
- Адаптация пробирочных трансгенных растений к условиям теплицы
- Полевые испытания на биобезопасность



ТРАНСГЕНЕЗ РАСТЕНИЯ. Лекция 6

**ЭТАП 1. ПОЛУЧЕНИЕ И АМПЛИФИКАЦИЯ
гДНК (кассета экспрессии+вектор)**

Кассета экспрессии



Промотор + целевой ген (трансген) + терминатор

Промоторы для кассеты экспрессии. Классификация



КОНСТИТУТИВНЫЕ

Обеспечивают экспрессию на протяжении всего срока жизни трансгенного организма

СПЕЦИФИЧНЫЕ

Обеспечивают избирательную активность, например, экспрессию только в клубнях

ИНДУЦИБЕЛЬНЫЕ

Активируются под воздействием определенных факторов (хим. в-в, температуры и др.)

Векторы для переноса и интеграции кассеты экспрессии. Основа



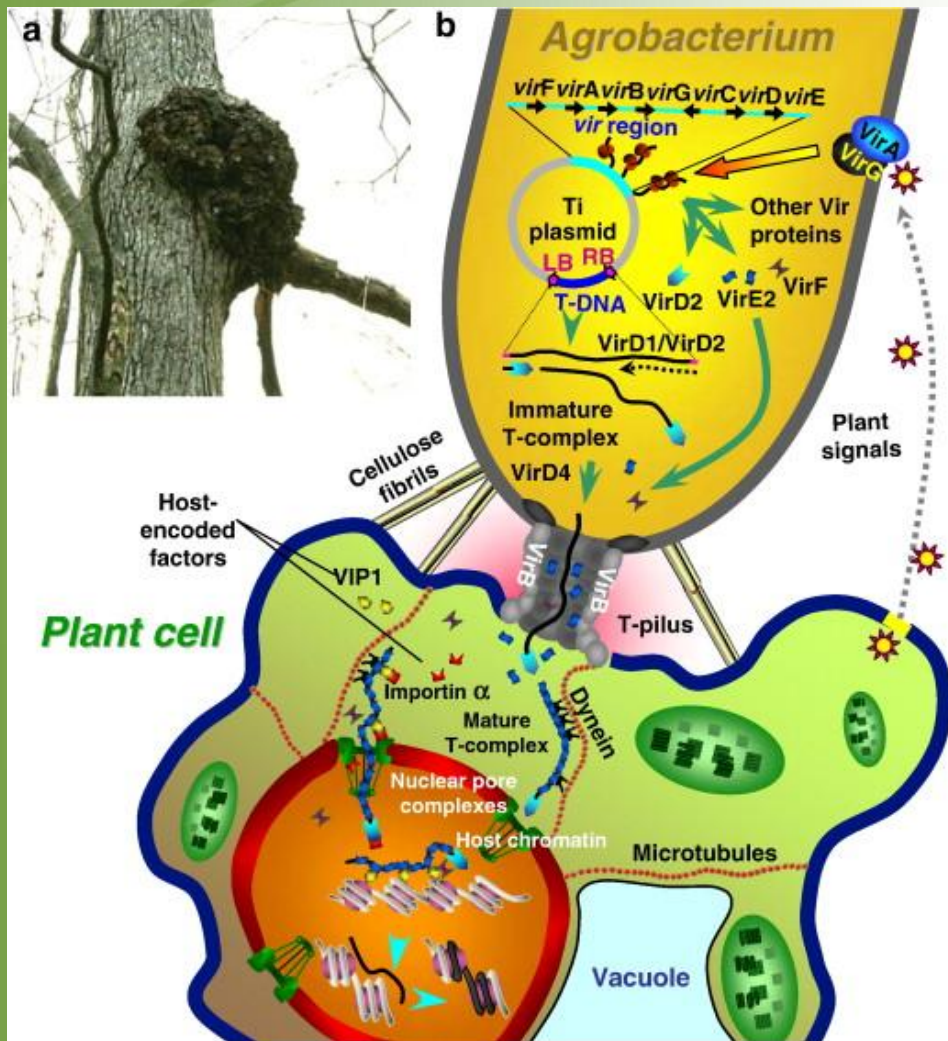
- Ti-ПЛАЗМИДЫ
-
- Ri-ПЛАЗМИДЫ
- ВИРУСЫ



ЭТАП 1.

АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ. Ti- и Ri-плазмиды

1980 г. М. Ван Монтегю и Д. Шелл
открыли явление агробактеральной
трансформации



Марк Ван Монтегю Джефф Шелл



<http://www.sciencephoto.com/>

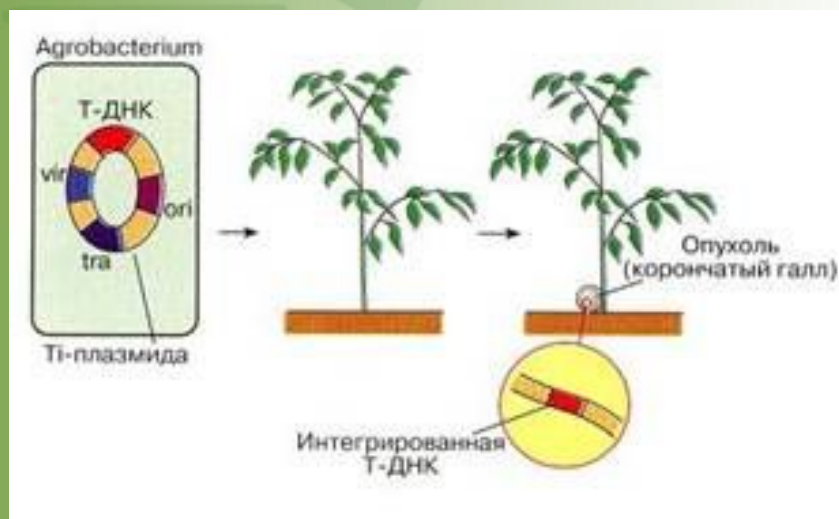
Грамотрицательные аэробы,
почвенные микроорганизмы,
фитопатогены

Ti-плазмиды

tumor-inducing, опухолеобразующие поражают наземную часть растений



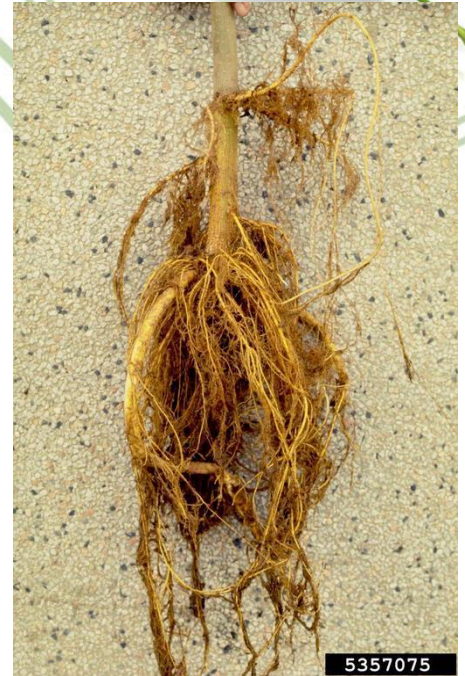
найжены в *Agrobacterium tumefaciens* – вызывающие образование у растений корончатых галлов, поражают, в основном, двудольные растения



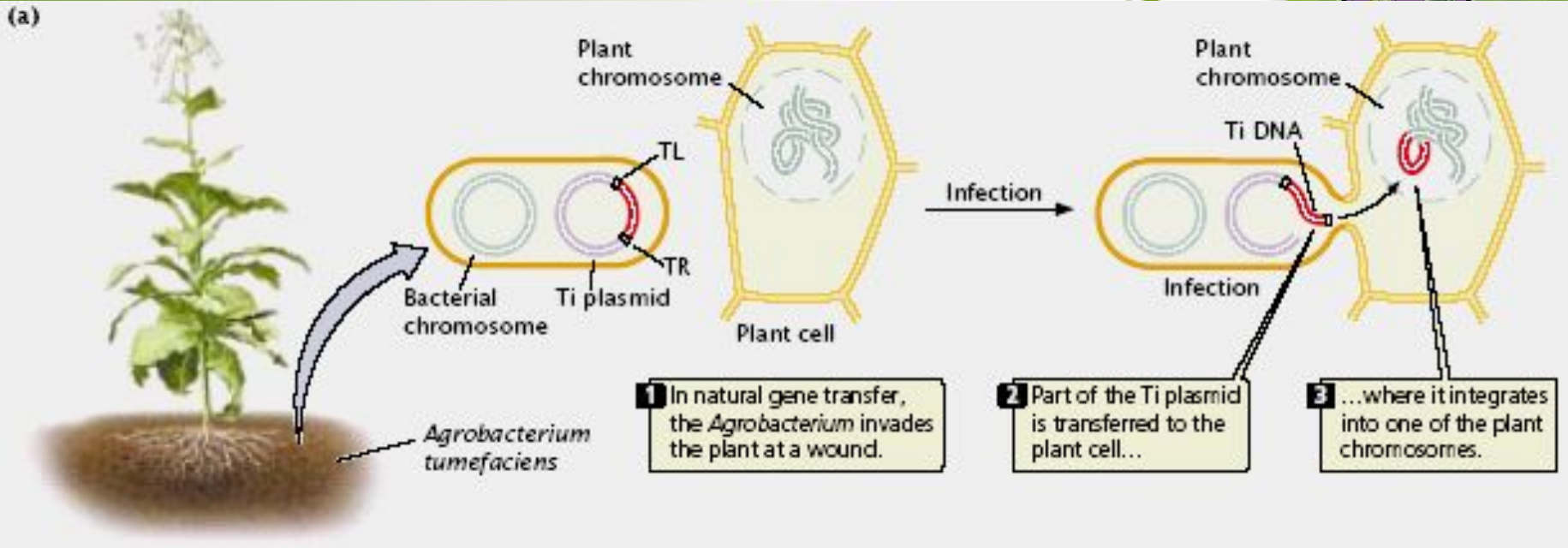
Ri-плазмиды

root-inducing, вызывают образование «бородатого» корня, поражают ризосферу

найжены в *Agrobacterium rhizogenes* способны перемещаться в клетки корней высших растений, встраиваться в их ядерную ДНК и индуцировать избыточное разрастание корней

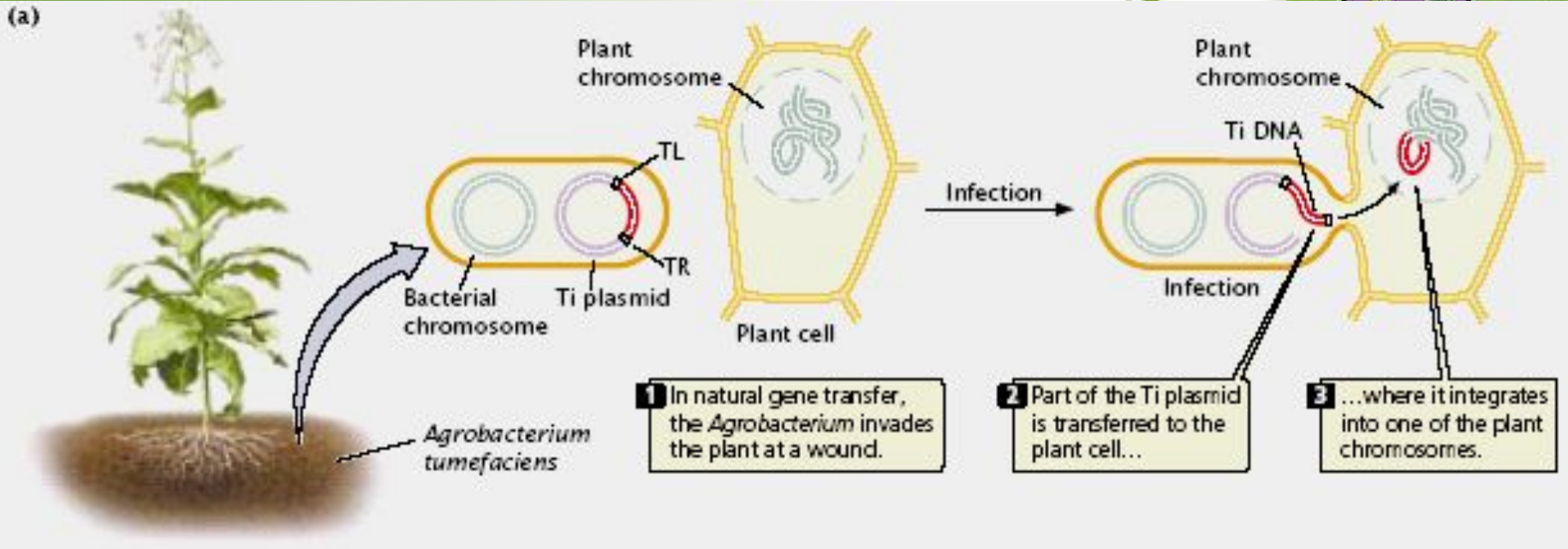


Механизм действия агробактерий



1. При повреждении клетки растения в почву попадают продукты обмена веществ – ацетосирингон и гидроацетосирингон
2. Под их действием в плаزمиде агробактерий активируются гены *vir* (вирулентности), обеспечивающие вырезание Т-ДНК (от англ. transferred, переносимый) из Тi-плазмиды
3. В оболочке бактерии образуется разрыв, через который Т-ДНК переносится в растительную клетку
4. Фланкирующие последовательности встраивают Т-ДНК в геном растительной клетки

Механизм действия агробактерий



5. В геноме растения Т-ДНК запускает синтез ферментов, необходимых для синтеза растительных гормонов: ауксина и цитокининов
6. Гормоны действуют на клетки растения и вызывают местное разрастание тканей
7. Включаются гены *nos* (нопалинсинтетазы), ферменты которых обеспечивают синтез в зараженных клетках опинов, которые Агробактерии используют как источник углеводов и азота

Ti-плазмиды. Структура.



Ауксины

(индол-3-уксусная к-та)
- формирование корней, побегов, индукция соматического эмбриогенеза и пр.

Цитокинины

(кинетин) – » –
- ингибируют образование корней

Опины

(нопалин)
- производные аргинина

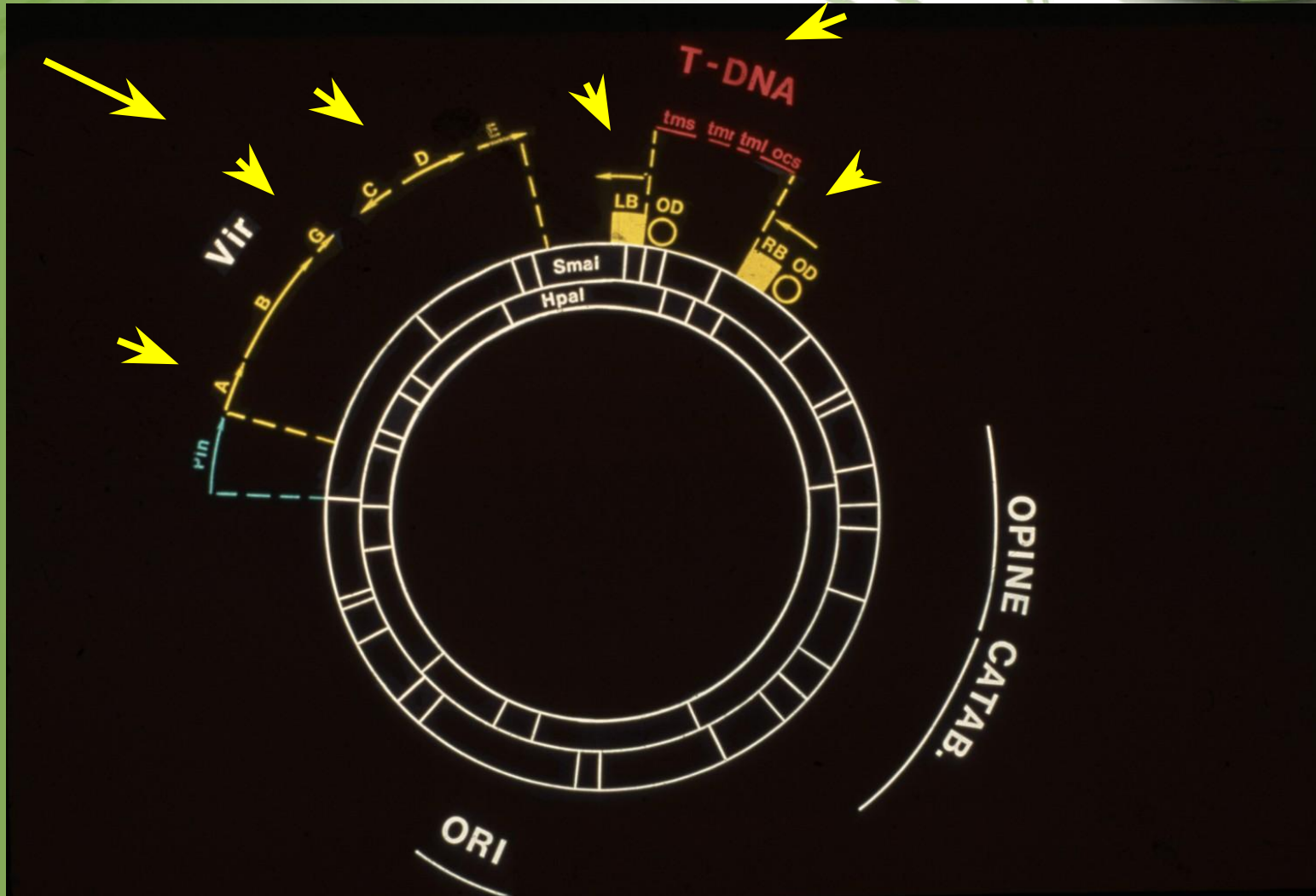
Размер от 200 т.п.н. до 800 т.п.н

Основные элементы:

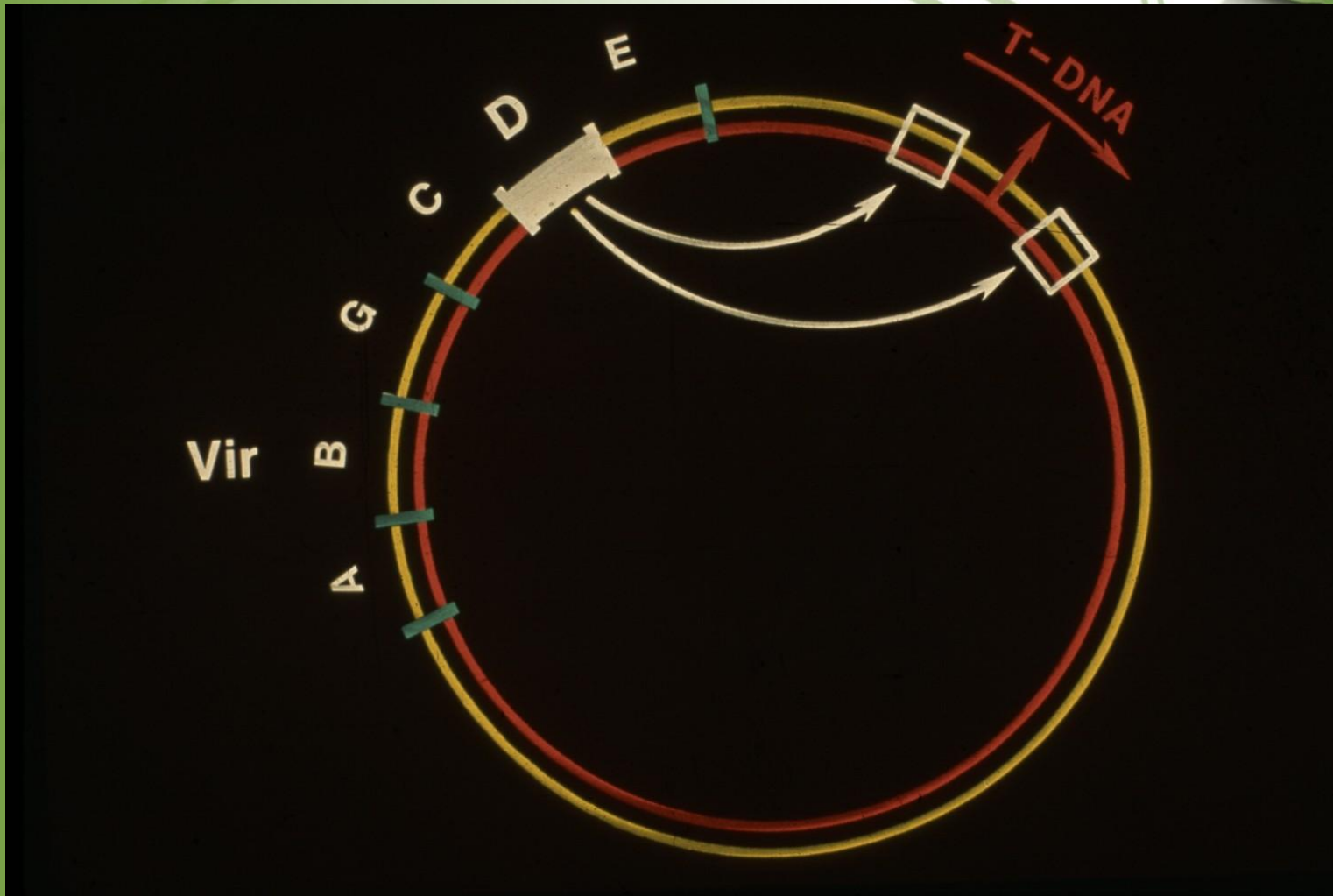
1. Ori-область
2. Vir-область
3. Область Т-ДНК



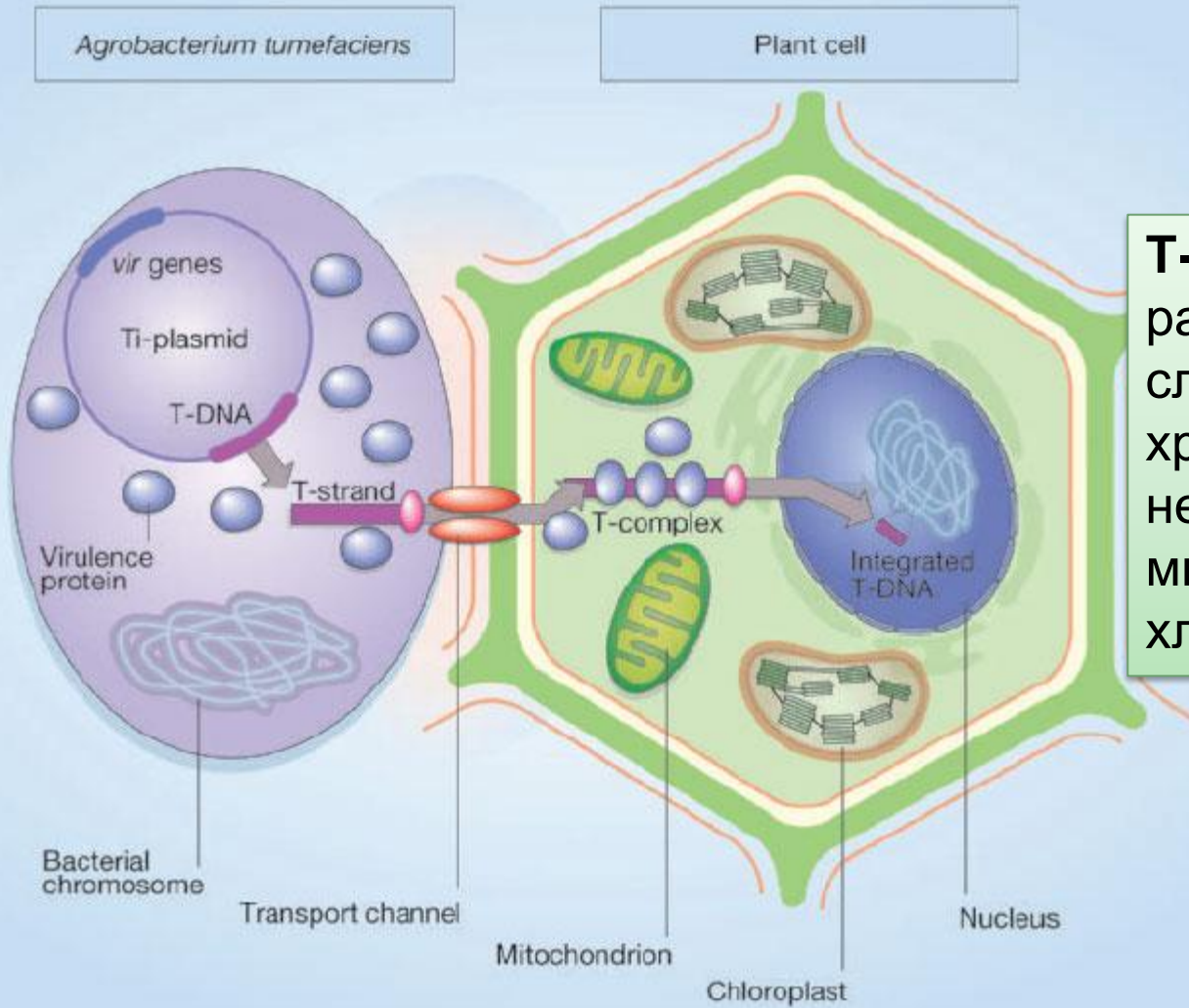
Ti-плазмиды. Механизм действия



Ti-плазмиды. Вырезание T-ДНК.



Перенос T-ДНК в растительный геном



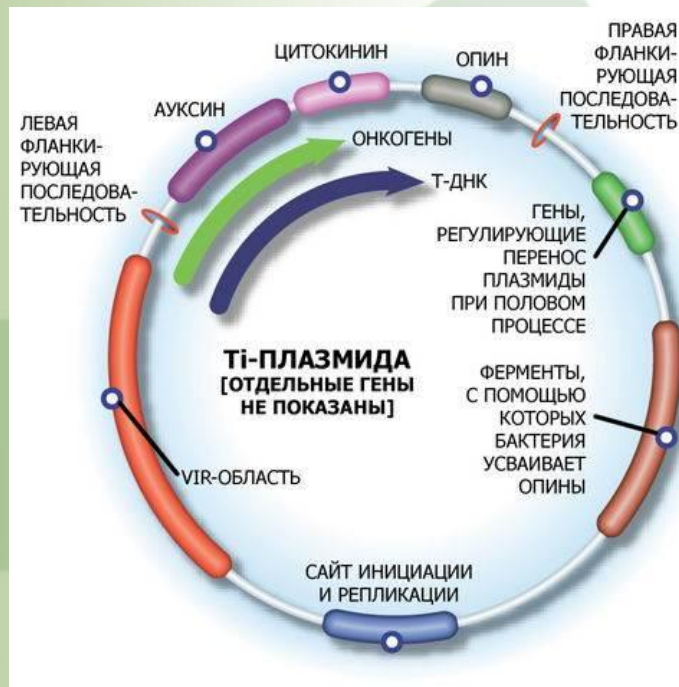
T-ДНК встраиваются в разные, по-видимому случайные, точки хромосом, но никогда не интегрируют с ДНК митохондрий и хлоропластов

Модификация Ti-плазмид для трансгенеза.

Неонкогенная Ti-плазида



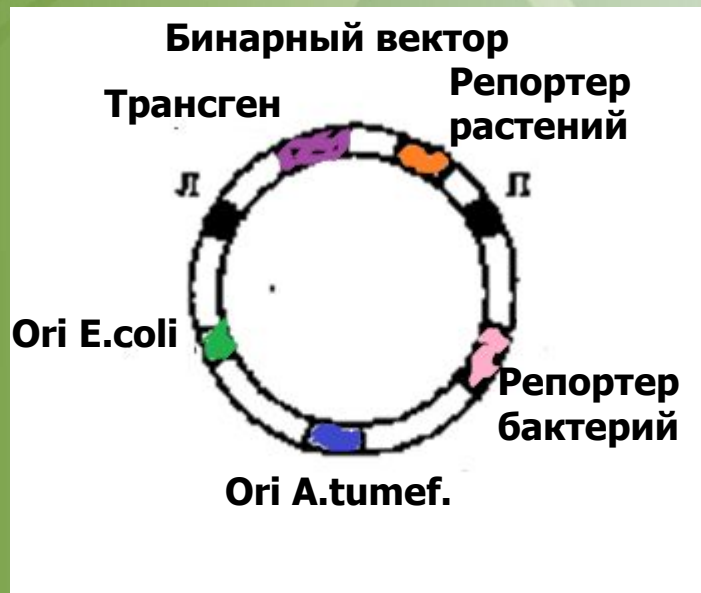
1. удаляется область T-ДНК
2. добавляется сайт инициации репликации (*ori*) плазмиды *Escherichia coli*
3. добавляются маркерные гены



Векторы для генетической трансформации растительных геномов. Бинарные векторы.



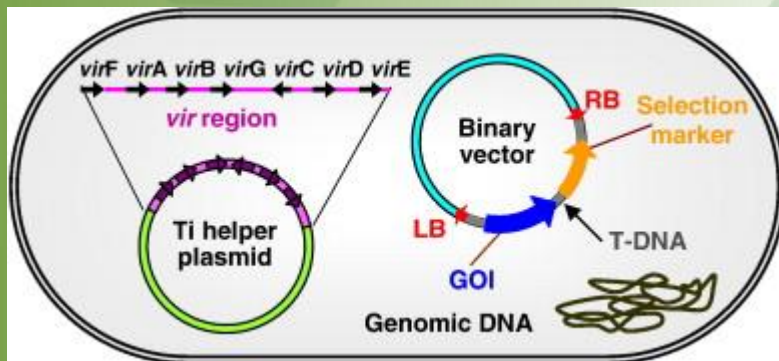
БИНАРНЫЕ



Содержат 2 сайта ori (для *E. coli* и для *A. tumefaciens*), T-ДНК, трансген

Механизм действия:

1. вектор клонируют в *E. Coli*
2. вектор переносят в *A.tumefaciens*, несущую неонкогенную Ti-плазмиду
3. трансгенез



Векторы для генетической трансформации растительных геномов. Коинтегративные

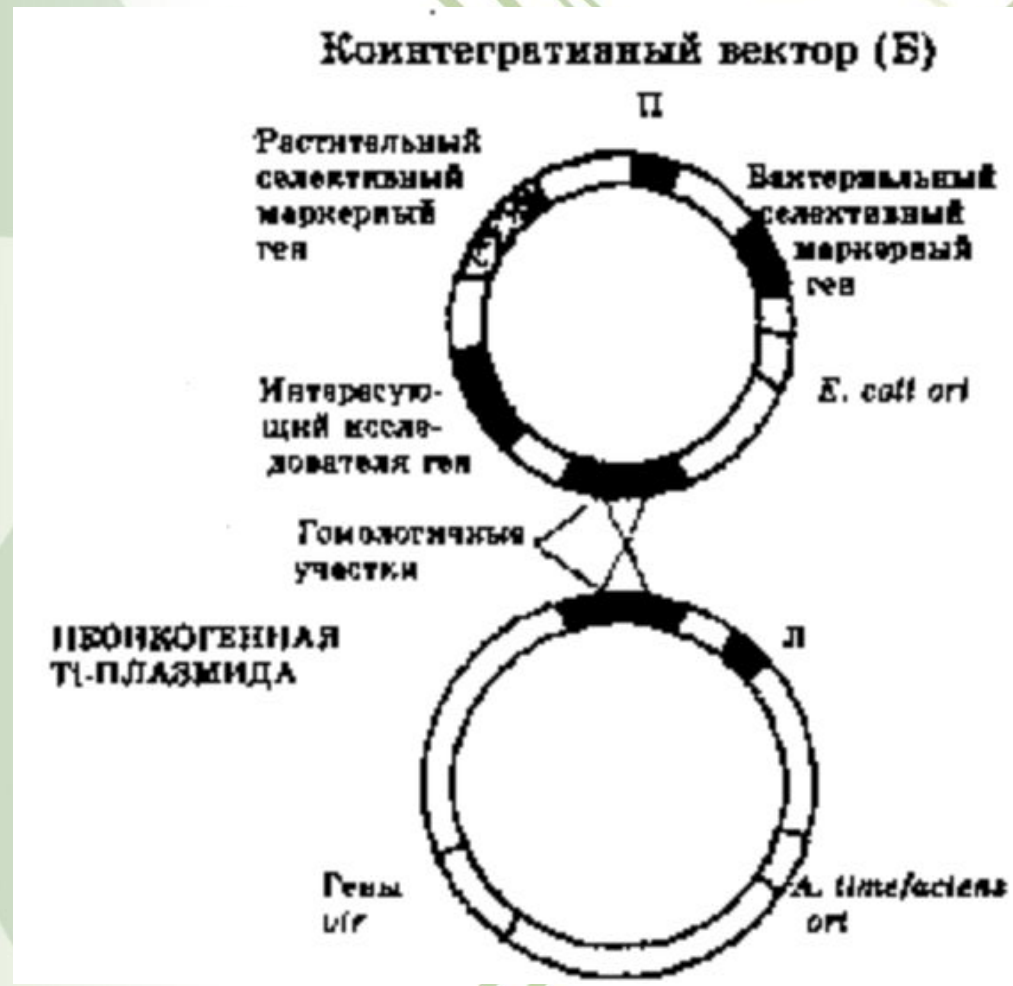


http://www.znaytovar.ru/s/Tehnologii_sozdaniya_gmrasteni.html

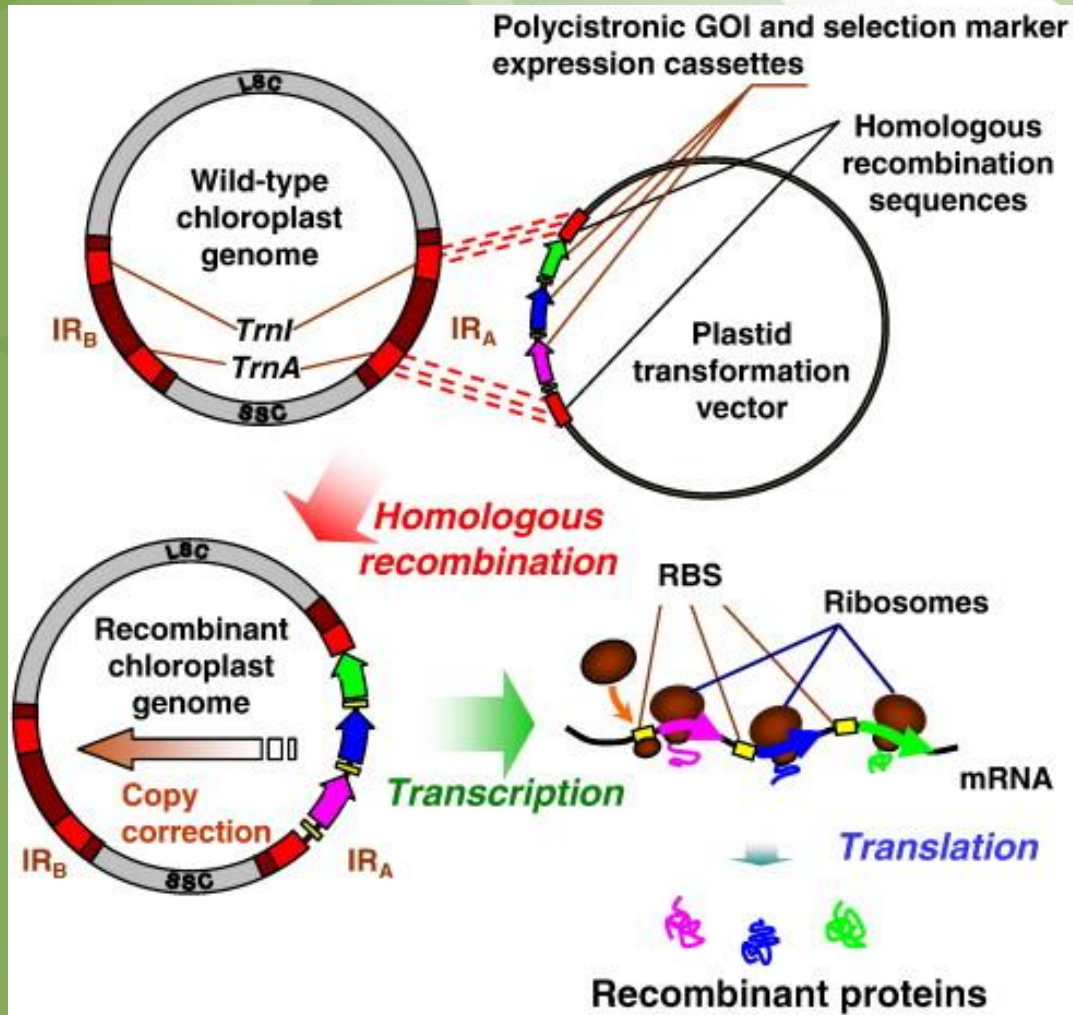
КОИНТЕГРАТИВНЫЕ

Содержат *ori E. coli*, Т-ДНК, фрагмент гомологичный Т-ДНК неонкогенной Ti-плазмиды
Механизм действия:

1. вектор клонируют в *E.coli*
2. в Т-ДНК встраивают трансген и клонируют в *E.coli*
3. вектор переносят в *A.tumefaciens* с неонкогенной Ti-плазмидой
4. образуется рекомбинантная плазмида
5. трансгенез



Векторы для генетической трансформации растительных геномов. Коинтегративные

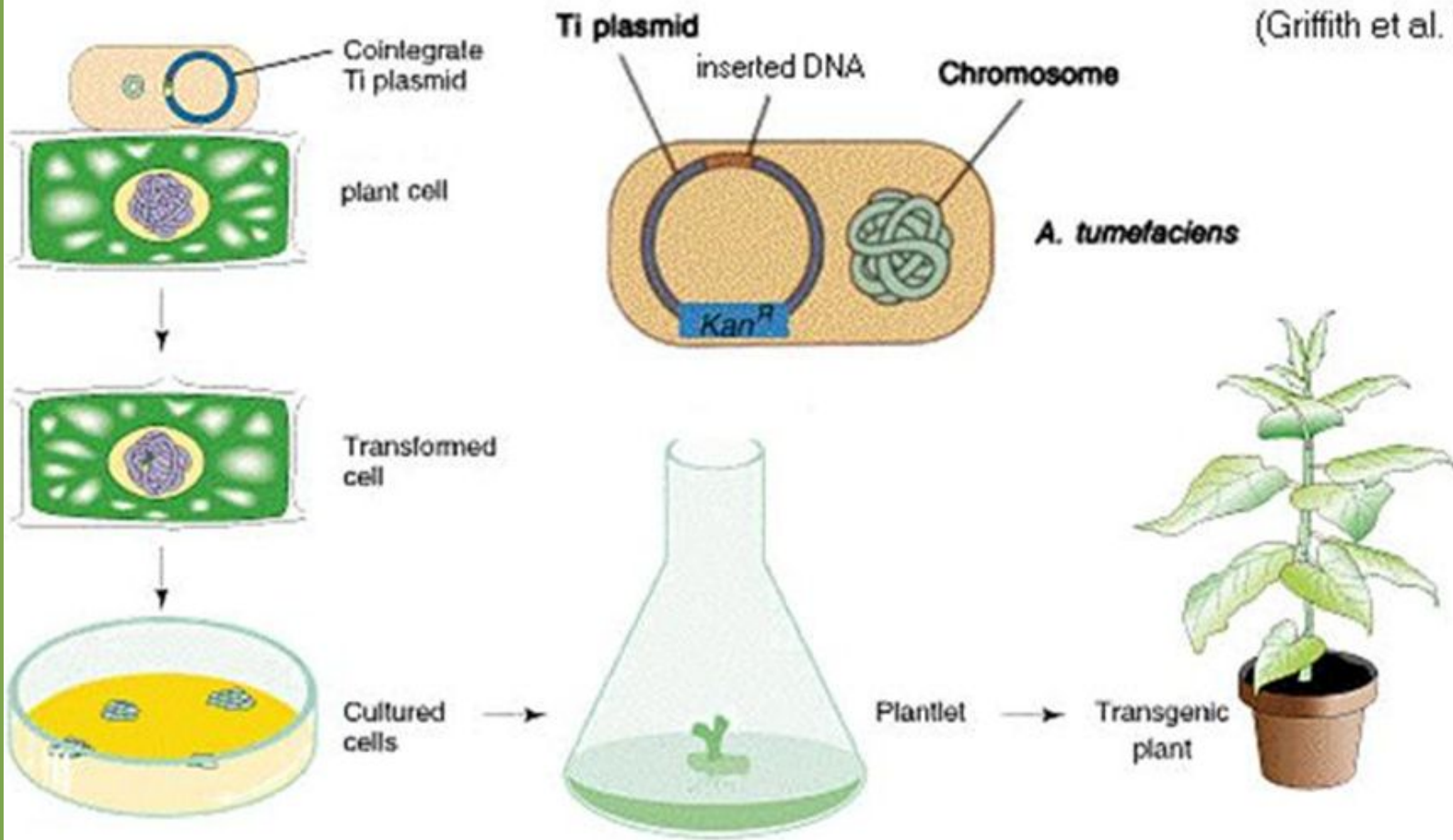


Использование агробактерий в трансгенезе растений

недостаток системы агробактерий – это неспособность трансформировать злаковые



(Griffith et al. 1996)





ЭТАП 1.

ОПОСРЕДОВАННЫЙ ДНК ПЕРЕНОС ГЕНОВ. DMGT- векторы

DMGT-векторы (DNA-mediated gene transfer)



Вектор
pCaMV CAT

- Челночный, может реплицироваться в клетках *E. coli* и клетках растений
- Несет промотор вируса мозаики цветной капусты (*CaMV*), контролирующий репортерный ген *E. Coli* хлорамфениколаце тилтрансферазы (*cat*)

Вектор
pMON200

- Клонировующий вектор
- Несет промотор гена нопалинсинтетазы (*nos*) *A. tumefaciens*, репортерный ген *E. Coli* неомицинфосфотрансферазы (*npt*)

DMGT-векторы (DNA-mediated gene transfer)

Вектор pGV3850

- Коинтегративный вектор
- Несет промотор вируса мозаики цветной капусты (*CaMV*) и селективный маркерный ген *npt II* под промотором гена нопалинсинтетазы (*nos*)

Вектор
pBin 19

- Бинарный, клонирующий вектор
- Несет промотор гена нопалинсинтетазы (*nos*)



Вектор pBin 19 (11777 п.н.)

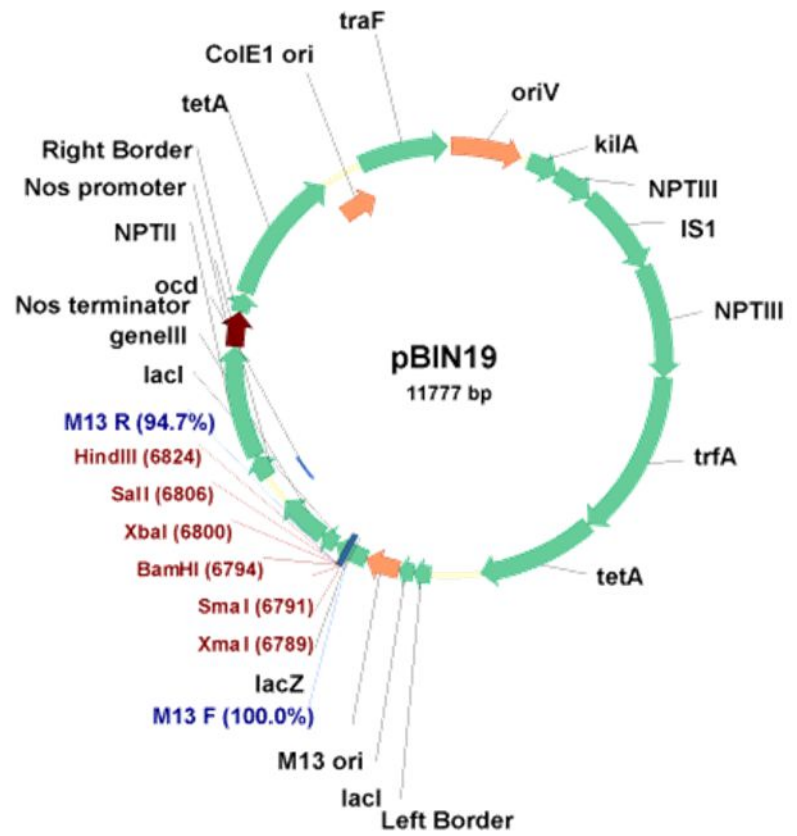
M13 R primer: AGG AAA CAG CTA TGA CCA T

M13F primer: TGT AAA ACG ACG GCC AGT

LB и RB – левая и правая границы

ColE1 ori – плаزمида с в геном колицина E1

OriV – участок инициации репликации E.coli





ТРАНСГЕНЕЗ РАСТЕНИЯ. Лекция 6

ЭТАП 2. ВЫБОР И ПОДГОТОВКА РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК-РЕЦИПИЕНТОВ ДЛЯ ТРАНСГЕНЕЗА

Словарь



Тотипотентность – свойство клеток реализовать генетическую информацию ядра, обеспечивающую их дифференцировку, а также развитие до целого организма

Каллус – травматическая меристема, состоит из дедифференцированных, делящихся клеток

Суспензионная культура – культура соматических клеток, растущих в жидкой среде (глубинное культивирование)

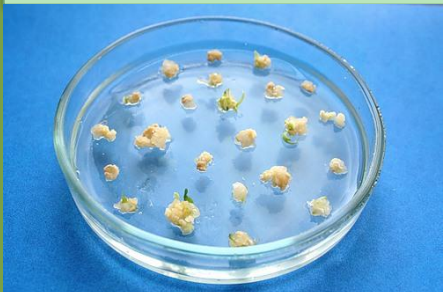
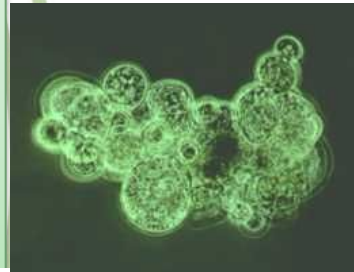
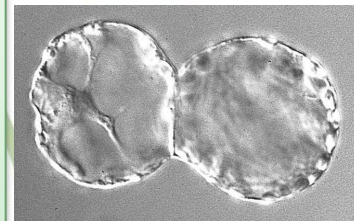
Протопласт – содержимое растительной клетки, лишённое клеточной стенки

Меристемы – образовательные ткани, состоят из интенсивно делящихся клеток

При трансформации растений трансген может быть внесен:



1. в целые растения
2. в клетки каллусной либо суспензионной культуры
3. в интактные растительные клетки способные к вторичной регенерации
4. в хлоропласты
5. в протопласты
6. в зародыши





ТРАНСГЕНЕЗ РАСТЕНИЯ. Лекция 6

ЭТАП 3. ВСТРАИВАНИЕ ТРАНСГЕНА В ГЕНОМ РАСТЕНИЯ (В КЛЕТКУ-РЕЦИПИЕНТ)

Способы внесения трансгена в клетки растений



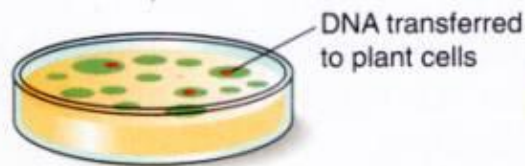
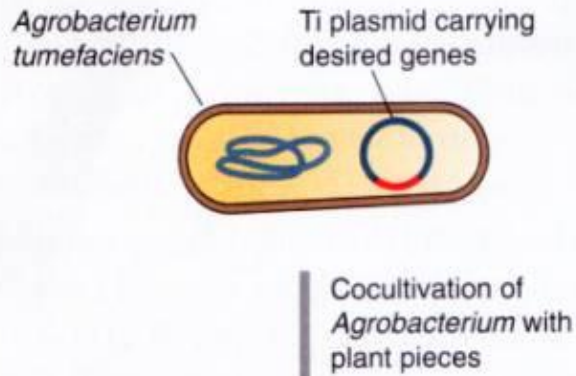
Прямые методы

Электропорация
Микроинъекция
Биобалистика
Со-культивирование
Инокуляция

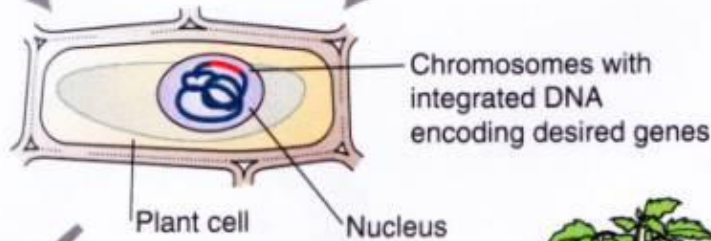
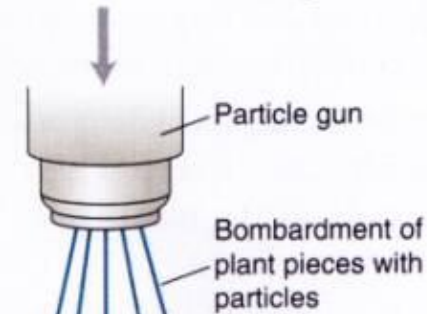
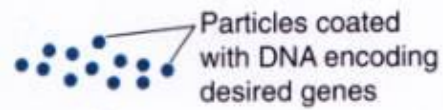
Опосредованные методы

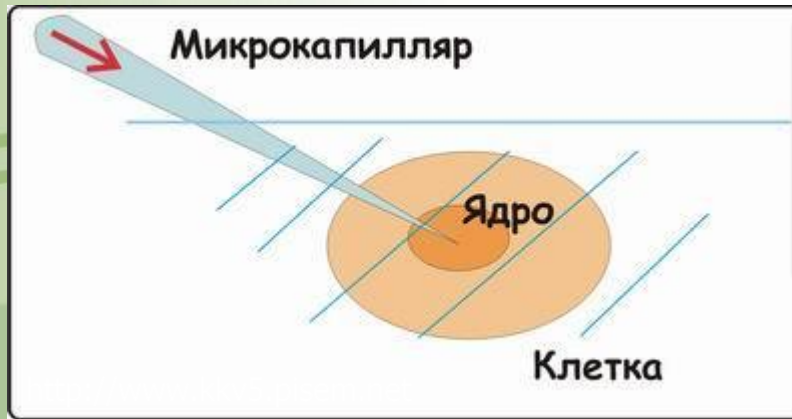
При помощи векторов:
Ti-плазмиды
Ri-плазмиды
Вирусы

Agrobacterium method



Particle gun method





МИКРОИНЪЕЦИЯ - генетическую конструкцию инъецируют в клетку

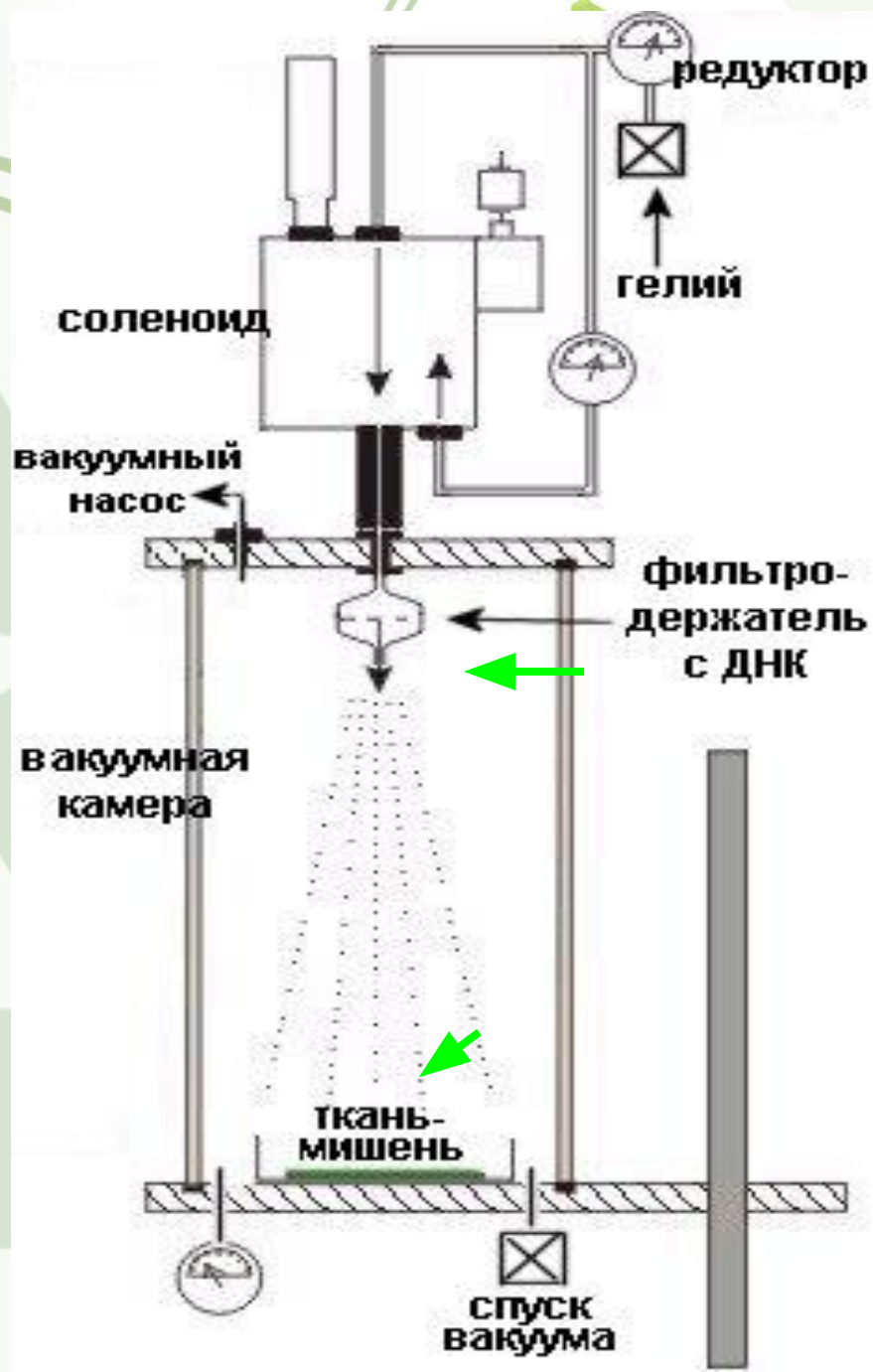


БИОБАЛЛИСТИКА - на нее частички вольфрама, платины или золота, диаметром от 0,1 до 3,5 мкм, напыляется векторная ДНК, содержащая трансген. «Заряды» из пушки, пробивая мембраны, входят в цитоплазму и ядра клеток.

ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ - клеточные мембраны, становясь проницаемой для экзогенных молекул ДНК под действием импульсов высокого напряжения, за счет формирования временных пор, через которые способны проходить экзогенные молекулы

БИОБАЛИСТИКА

Общий вид и схема установки для биобаллистической доставки генов в клетки растений. Particle Inflow Gun,
(John Finer, Philip Vain et al. 1992)



Перенос трансгенов в растения



via Agrobacterium

Прямой перенос генов

Целое растение

Инfiltrация

Культивируемые *in vitro* клетки, компетентные к регенерации

**Инfiltrация
микроинъекция
со-культивирование**

Меристемы
стеблевых апексов

Биобаллистика

микроинъекция
со-культивирование

Зародыши

Биобаллистика

микроинъекция
со-культивирование

Протопласты

**при помощи ПЭГ
электропорация
микроинъекция
при помощи липосом**

Культивируемые *in vitro* клетки, компетентные к регенерации

**Биобаллистика
электропорация
при помощи лазера**

Метод	Эффективность применения и перспективы использования
Использование Ti-плазмид	Высокоэффективная система. Применима не для всех видов растений
Бомбардировка микрочастицами	Высокоэффективная система. Может использоваться для широкого круга растений и тканей
Использование векторов на основе вирусов	Неэффективный способ доставки ДНК в растительные клетки
Микроинъекции	Применение ограничивается тем, что инъекция одновременно может быть сделана только в одну клетку
Электропорация	Применение возможно для введения генов в протопласты
Слияние липосом	— « —
Прямое введение генов в протопласты	— « —



ТРАНСГЕНЕЗ РАСТЕНИЯ. Лекция 6

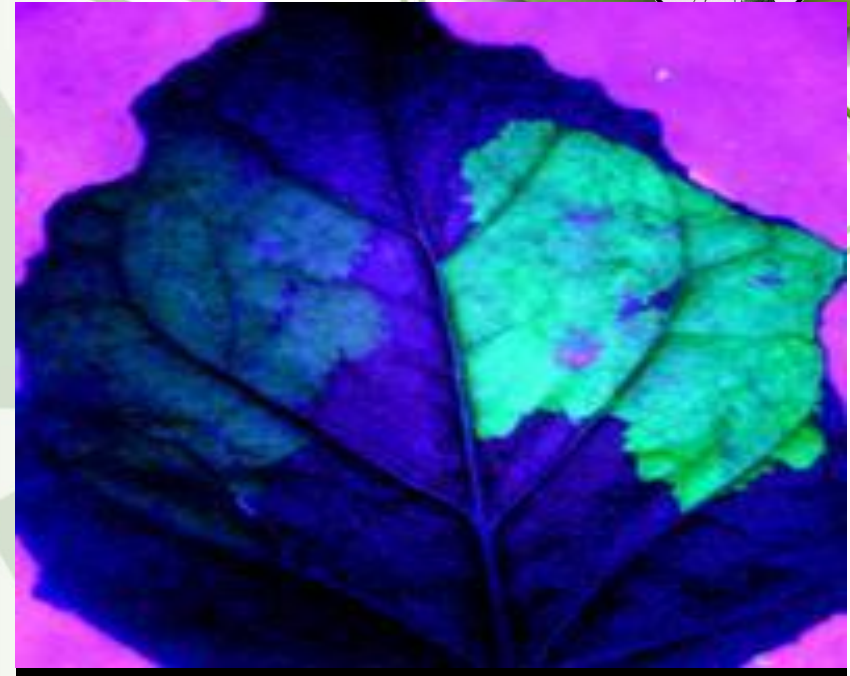
ЭТАП 4. ОТБОР ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК, РАСТЕНИЙ

Ti-плазмиды. Механизм действия



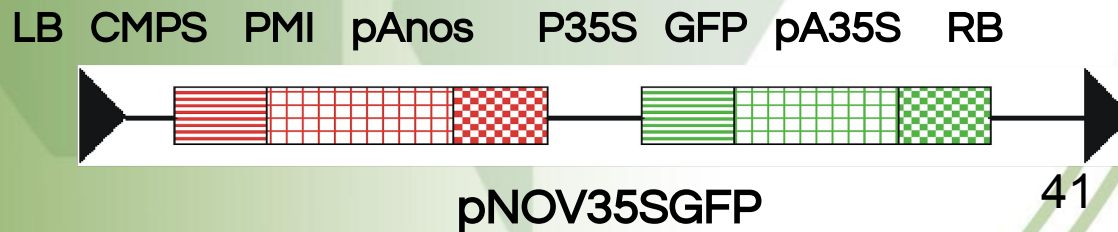
- 1
 - бактериальные гены устойчивости к антибиотикам
- 2
 - гены устойчивости к гербицидам
- 3
 - ген изомеразы фосфат-6-маннозы (*pti*)
- 4
 - ген β -глюкуронидазы
- ген зеленого флуоресцирующего белка (*GFP*)

Alternative selection system based on the phosphomannose isomerase gene

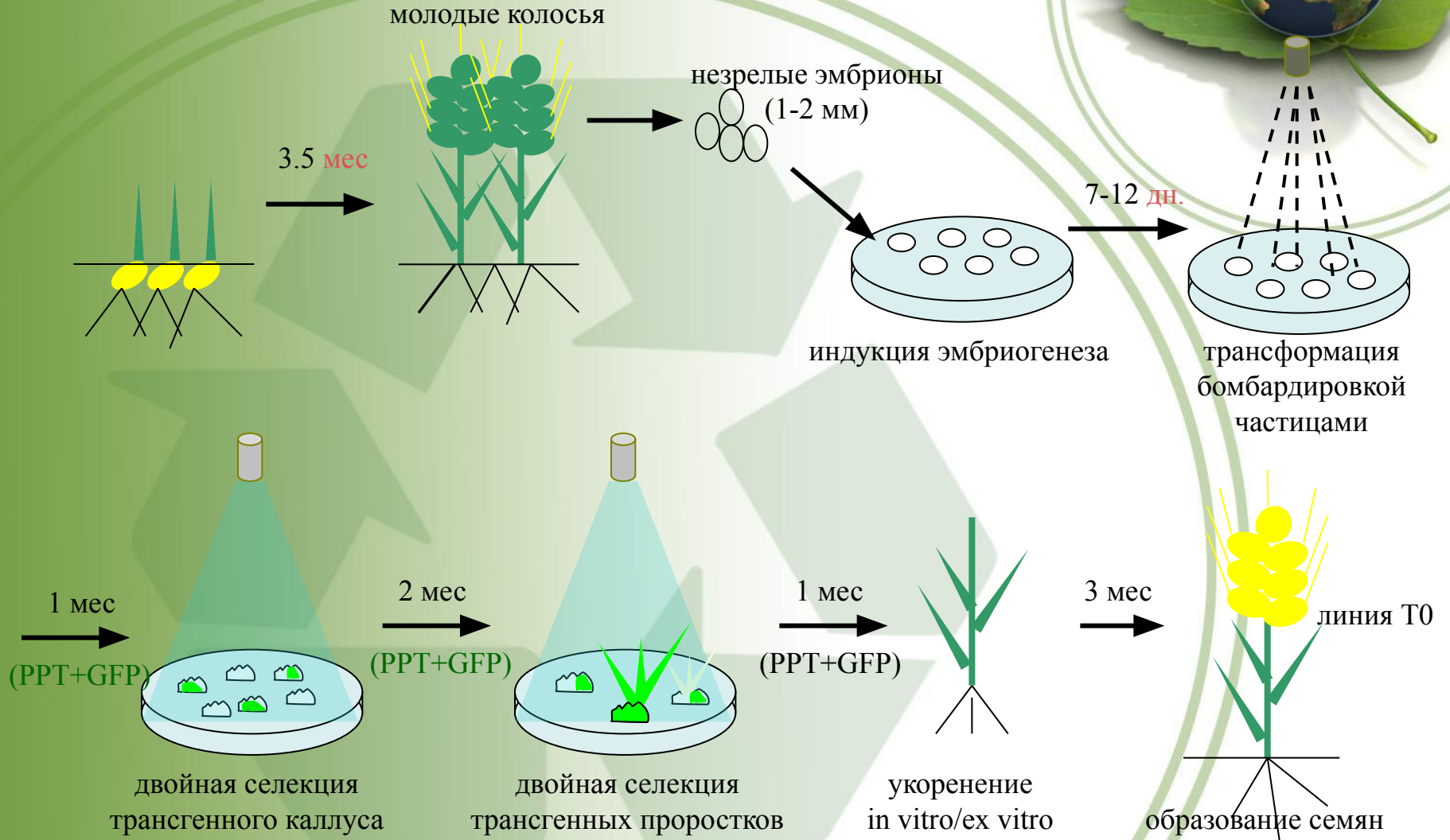


Rooting of transgenic plum on media with 10g/l mannose (right control)

GFP expression in transgenic plum shoots



Протокол трансформации пшеницы: сочетание селекции на фосфинотрицине (PPT) с визуальной селекцией по экспрессии гена *gfp*









ТРАНСГЕНЕЗ РАСТЕНИЯ. Лекция 6

ВНЕДРЕНИЕ В ПРАКТИКУ



Предмет биотехнологии растений



Генетическая трансформация растений – позволяет создавать растения:

а) устойчивые к биотическим и абиотическим стрессам

б) с улучшенными технологическими и питательными свойствами

в) производящие вакцины, полимеры (пластик и каучук), топливо и смазочные материалы



контроль



трансгенное

Устойчивость трансгенного табака с геном *bt* к личинкам непарного шелкопряда

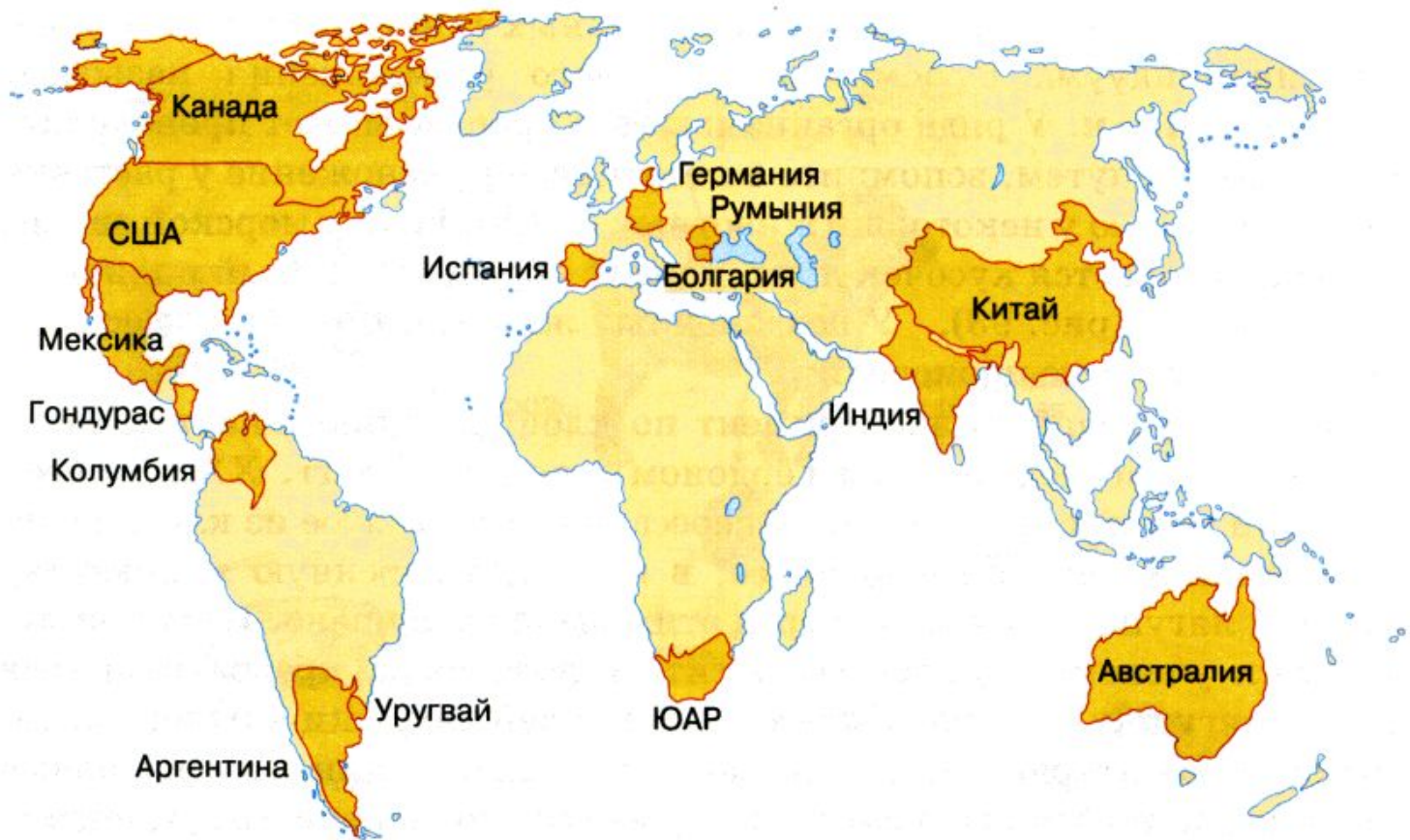




контроль
клон 1

клон 2





Площади посевов
трансгенных культур

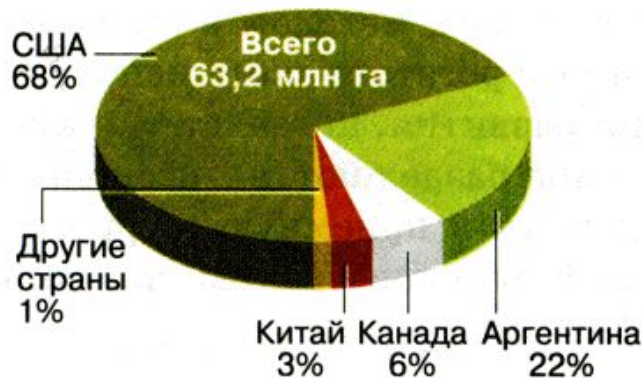


Рис. 92. Страны, выращивающие трансгенные растения.

Практически всю площадь посевов трансгенных культур занимают генетически модифицированные сорта четырех растений: сои (62%), кукурузы (24%), хлопчатника (9%) и рапса (4%). Уже созданы сорта трансгенного картофеля, помидоров, риса, табака, свеклы и других культур