



Методы, применяемые в современной биотехнологии

By Angela Lozan

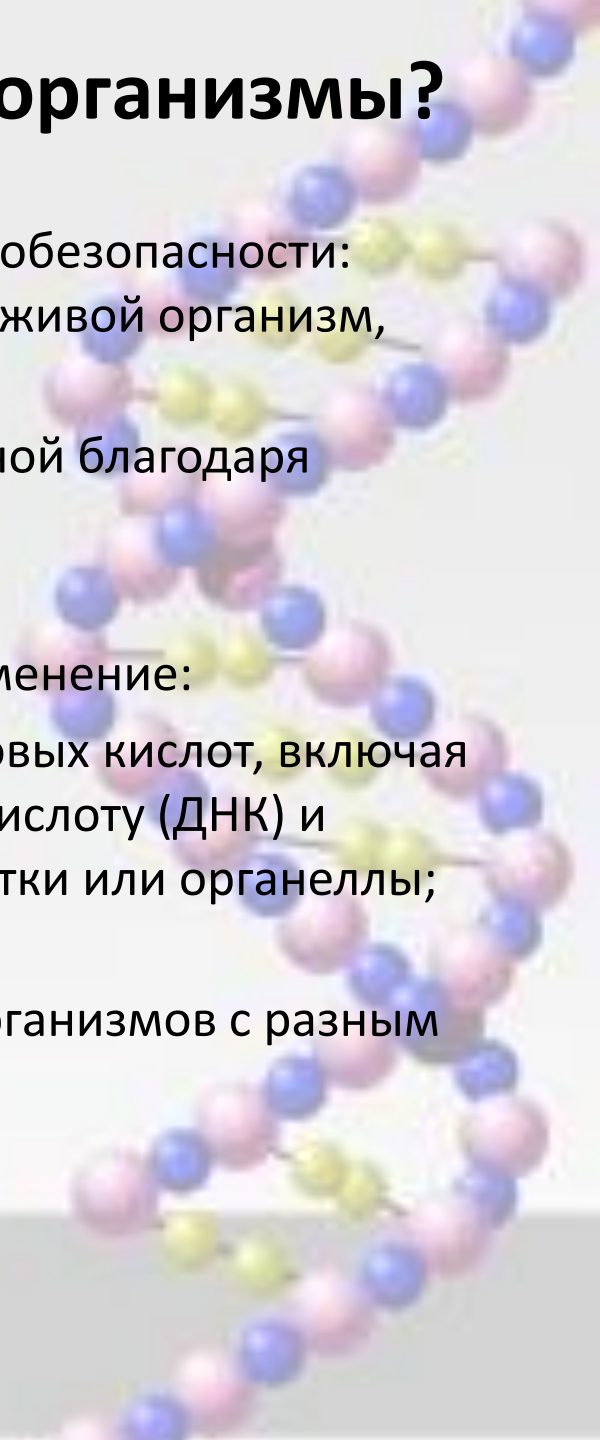
CEE Training course on Risk Assessment of LMOs

Minsk, Belarus, 24-28 September 2018



Что такое живые измененные организмы?

- В соответствии с Картахенским Протоколом по биобезопасности: "**живой измененный организм**" означает любой живой организм, обладающий новой
- комбинацией генетического материала, полученной благодаря использованию современной
- биотехнологии;
 - "**современная биотехнология**" означает применение:
 - i. методов **in vitro** с использованием нуклеиновых кислот, включая рекомбинантную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и **прямую инъекцию** нуклеиновых кислот в клетки или органеллы; *или*
 - ii. методов, основанных на **слиянии клеток** организмов с разным таксономическим статусом



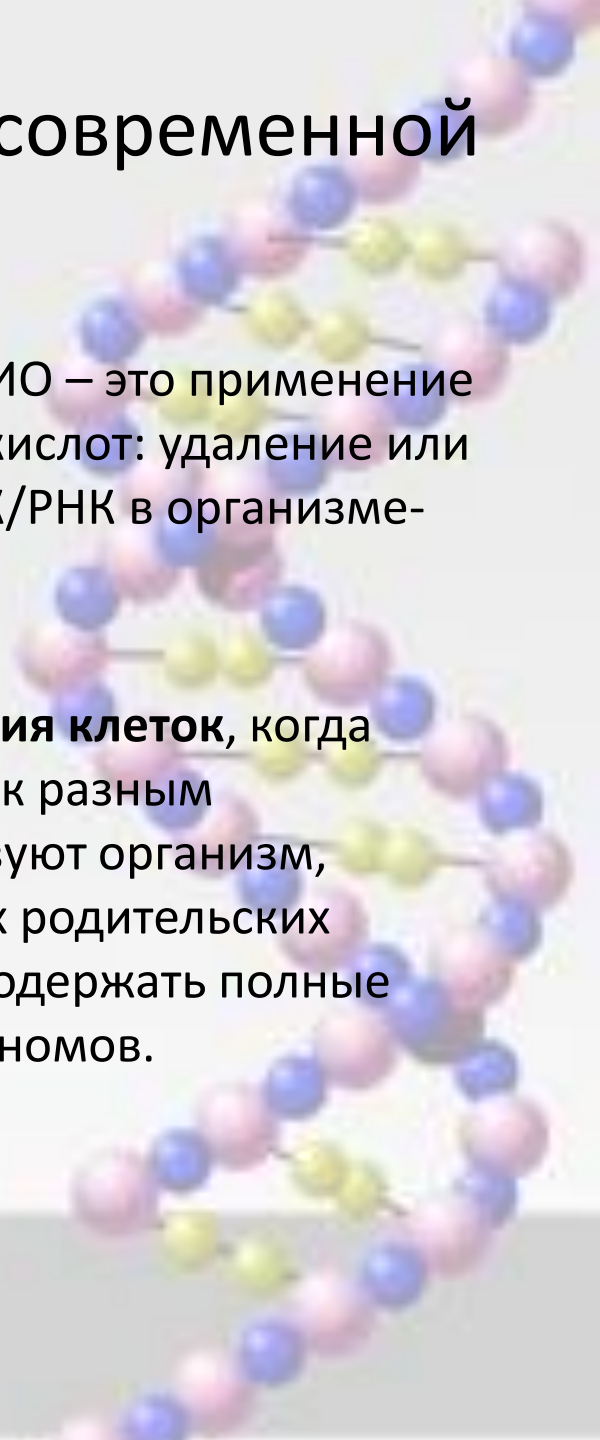
Методы получения ГМО

- Получение **изолированного гена**.
- **Введение гена в вектор** для переноса в организм.
- **Перенос вектора с геном** в модифицируемый организм.
- **Преобразование клеток** организма.
- **Отбор** генетически модифицированных организмов (ГМО) и устранение тех, которые не были успешно модифицированы.



Обзор методов, применяемых в современной биотехнологии

- Наиболее распространенный способ создания ЖИО – это применение методов **in vitro** с использованием нуклеиновых кислот: удаление или модификация гена либо последовательности ДНК/РНК в организме-реципиенте или в родительском организме.
- ЖИО также могут быть произведены путем **слияния клеток**, когда клетки двух различных организмов, относящихся к разным таксономическим семействам, сливаются и образуют организм, содержащий генетическую информацию из обеих родительских клеток. Получившийся в результате ЖИО может содержать полные геномы родительских организмов или части их геномов.



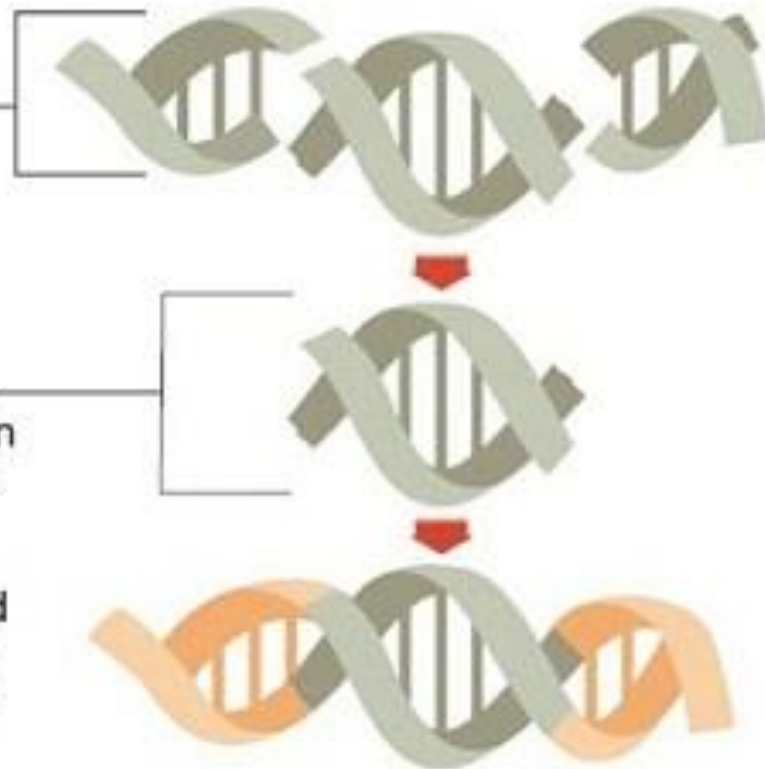
Обзор методов получения ЖМО

Splicing Genes Together

Employing genetic engineering, researchers can take certain genes from a source organism and put them into another plant or animal.

An Example of Genetic Engineering:

- 1** Scientists take *Bacillus thuringiensis*, a commonly occurring soil bacteria...
- 2** ...and use enzymes to remove from it the Bt gene, which produces a protein that turns toxic in the digestive tract of caterpillars.
- 3** The Bt gene is then incorporated into the chromosomes of cotton and corn, killing caterpillars that feed upon these plants.



Методы, повсеместно применяемые для генетической модификации растений

После **идентификации интересующего гена** и его **изолирования** из организма-донора он подвергается лабораторным манипуляциям, которые позволяют успешно вводить его в отобранный организм-реципиент.

Один или несколько **интересующих генов**, а также другие нуклеотидные последовательности, необходимые для надлежащего функционирования интересующего гена(ов), могут быть **выстроены** в упорядоченной последовательности в "**кассете для трансформации**"



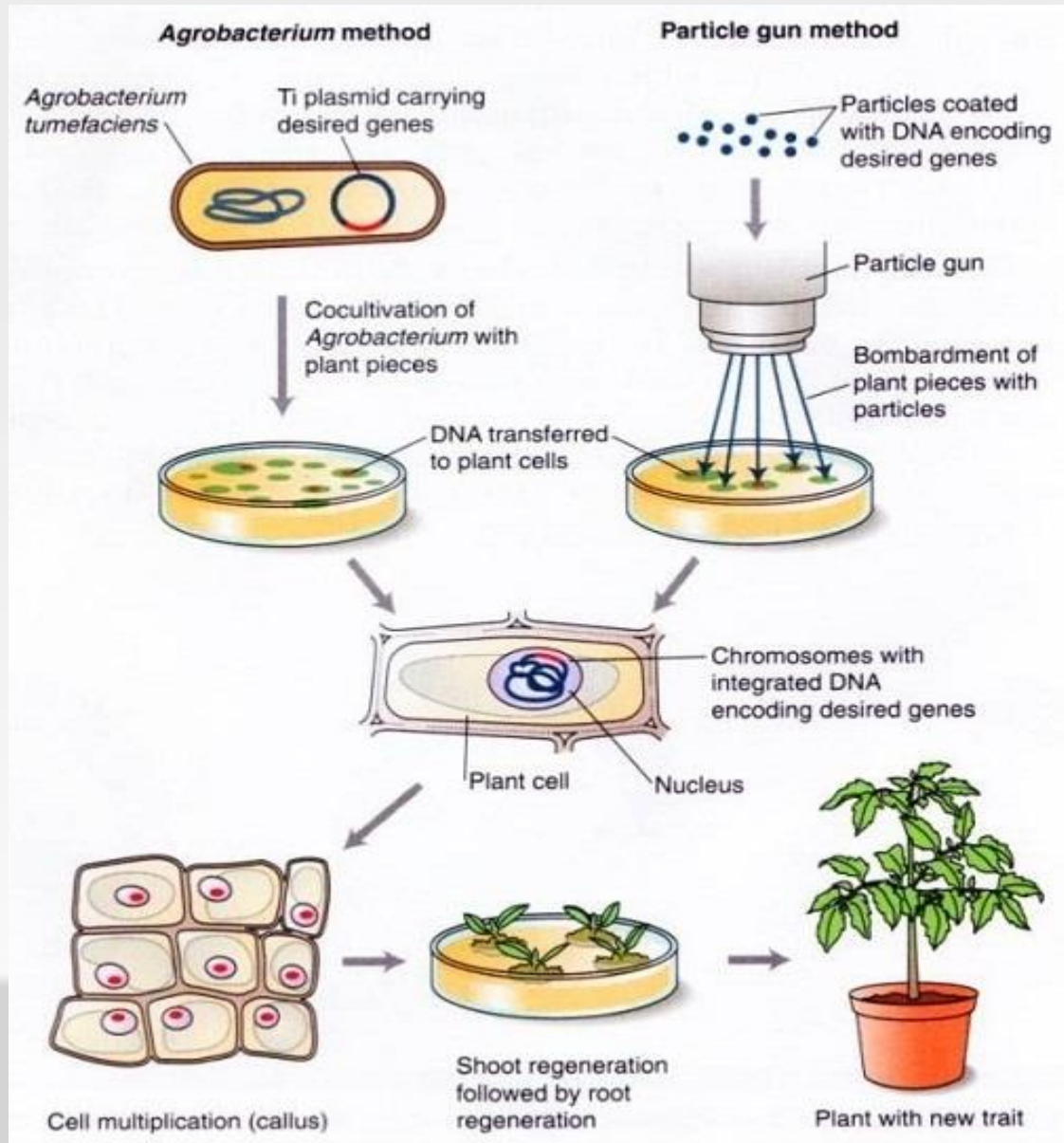
«Трансформационная кассета»

- Кассета для трансформации, как правило, включает "**промоторную последовательность**" и "**терминирующую последовательность**", которые необходимы для обеспечения корректной экспрессии гена в организме-реципиенте.
- В кассету для трансформации нередко вставляется "**маркерный ген**", призванный помочь идентифицировать и/или отобрать клетки или особи, в которые была успешно введена кассета(ы) для трансформации.
- И наконец, кассета для трансформации может быть включена в более крупную молекулу ДНК для использования в качестве **вектора**. Назначение вектора состоит в том, чтобы помочь переносу кассеты для трансформации в организм-реципиент.

Процесс трансформации

- Кассеты трансформации интегрированы в геном организма-реципиента посредством процесса, известного как **трансформация**. Это может быть выполнено с помощью различных методов, таких как инфекция с использованием *Agrobacterium*, бомбардировка частицами или микроинъекция.
- Затем **отбирают трансформированные** клетки, например, с помощью маркерного гена и регенерируют их в ЖМО.
- Следующим этапом является дальнейший **отбор модифицированных организмов**, которые содержат желаемый трансген(ы) или модификацию, или проявляют желаемые характеристики. Благодаря отбору многие экспериментальные ЖМО отбрасываются, и лишь несколько **событий** могут выйти на этап коммерциализации.

Генетическая модификация растений



STEP 1: Identify a trait of interest

Agricultural Need



Search appropriate environment



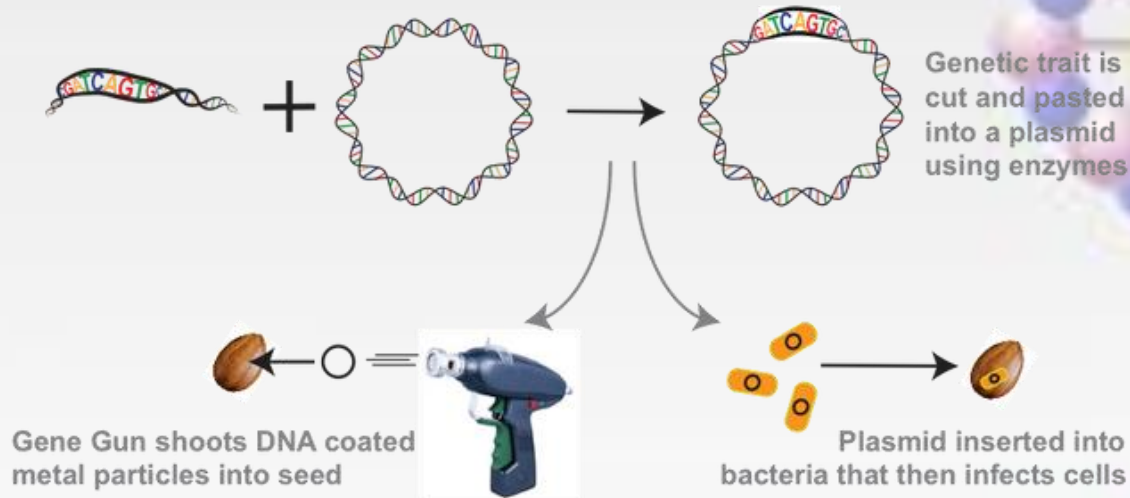
Screen list of chosen plants

STEP 2: Isolate the genetic trait of interest

Comparative analysis of genomes to identify trait



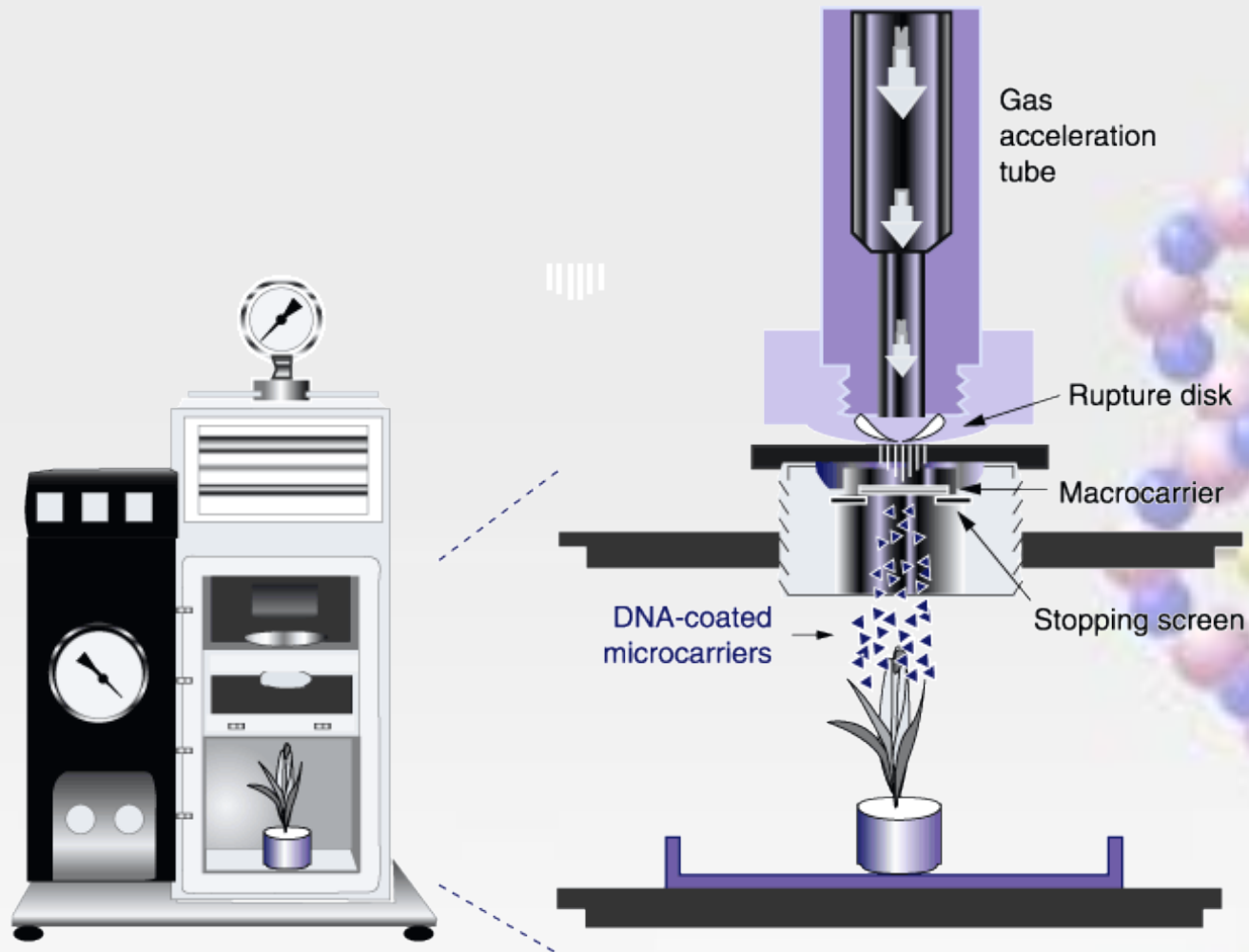
STEP 3: Inset the desired trait into the new genome



STEP 4: Growing the GMO

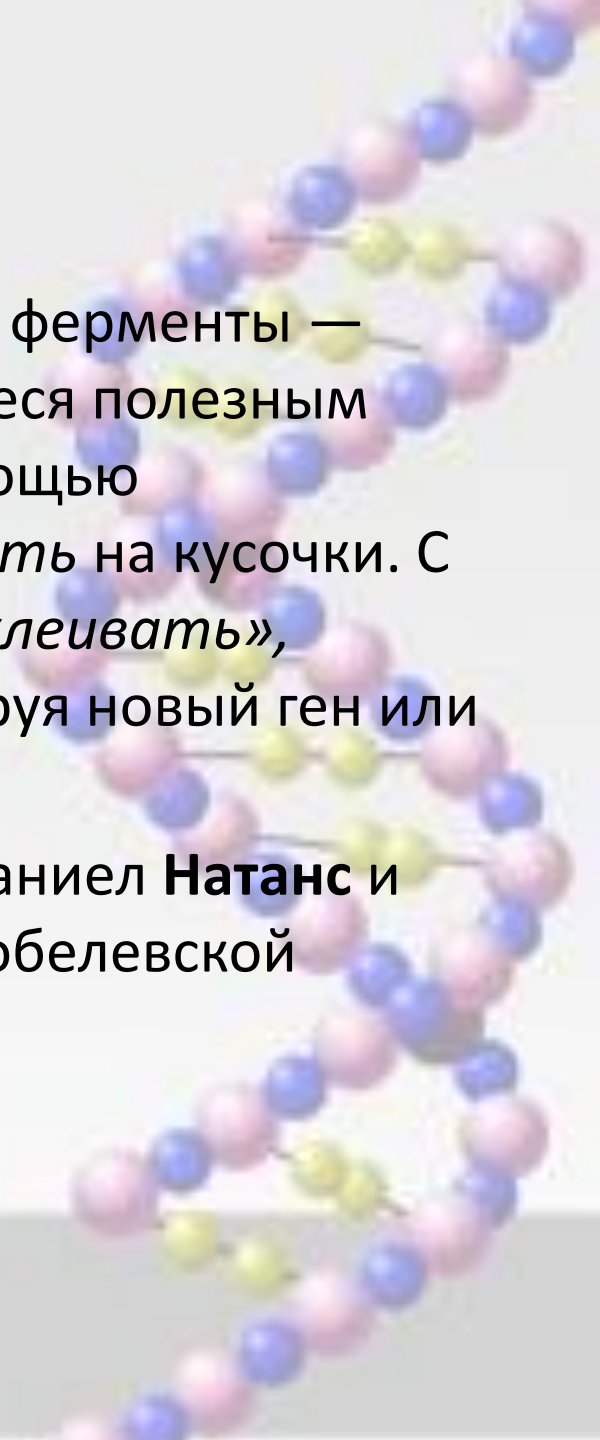


Carefully controlled growth chambers are monitored to ensure that the new GMO grows and replicates. Ultimate growth conditions are determined at this stage.



Встраивание гена

- Чтобы **встроить ген в вектор**, используют ферменты — ***рестриктазы и лигазы***, также являющиеся полезным инструментом генной инженерии. С помощью *рестриктаз* ген и вектор можно *разрезать* на кусочки. С помощью *лигаз* такие кусочки можно «*склеивать*», соединять в иной комбинации, конструируя новый ген или заключая его в вектор.
- За открытие рестриктаз Вернер **Арбер**, Даниел **Натанс** и Хамилтон **Смит** также были удостоены Нобелевской премии (1978 г.).



Бактериальная трансформация

- Техника введения **генов в бактерии** была разработана после того, как Фредерик **Гриффит** открыл явление **бактериальной трансформации**. В основе этого явления лежит половой процесс, который у бактерий сопровождается обменом небольшими фрагментами нехромосомной ДНК, плазмидами. Плазмидные технологии легли в основу введения искусственных генов в бактериальные клетки.



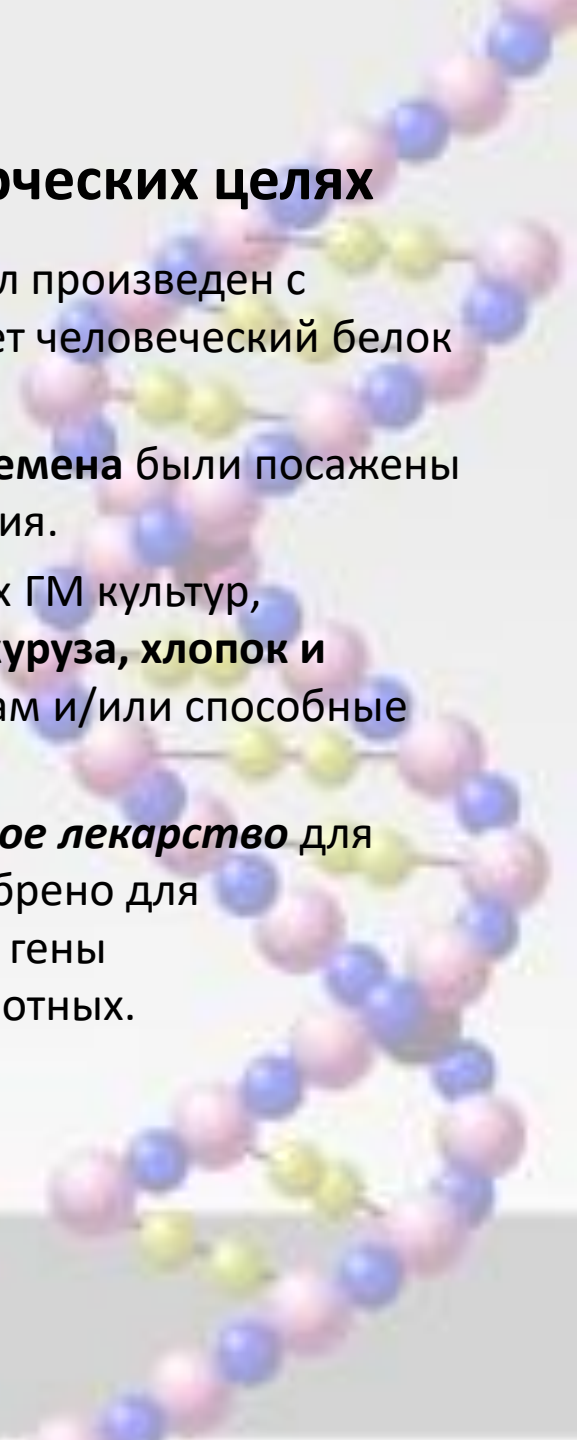
Слияние ЖМО-клеток /LMOs- *cell fusion*

ЖМО можно продуцировать *путем слияния клеток*, когда слитые клетки из двух разных организмов, которые **не относятся** к одному и тому же таксономическому семейству, сливаются с образованием организма, содержащего генетическую информацию из обеих родительских клеток. В результате ЖМО может содержать полные геномы родительских организмов или части их геномов.

Слияние клеток может быть применено к *бактериальным, грибным, растительным или животным клеткам*, используя различные методы для стимулирования слияния.

Примеры ЖИО, используемых в коммерческих целях

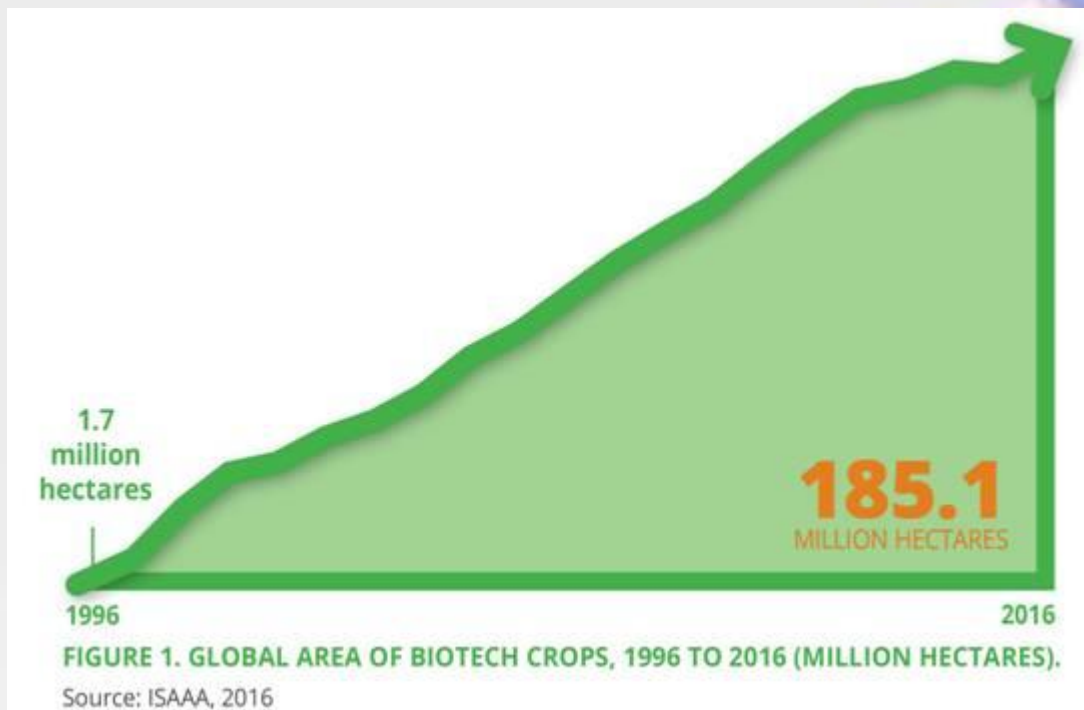
- В **1978** году первый коммерциализированный ЖМО был произведен с созданием штамма **Escherichia coli**, который продуцирует человеческий белок - **инсулин**.
- В **1996** году первые генетически **модифицированные семена** были посажены в Соединенных Штатах для коммерческого использования.
- В настоящее время к числу наиболее распространенных ГМ культур, используемых в коммерческих целях, относятся **soя, кукуруза, хлопок и рапсовое семя**, проявляющие устойчивость к гербицидам и/или способные производить пестицидные протеины.
- В **2009** году **коза**, которая производит **антикоагулянтное лекарство** для людей, была первым животным ЖМ, которое было одобрено для коммерческого производства. **Рыба-зебра**, содержащая гены флуоресцентного белка. **ЖМ-вакцины** для людей и животных.



В **2016 году** 21-й год коммерциализации биотехнологических культур, **185,1 млн. Гектаров** биотехнологических культур был посажен примерно 18 миллионами фермеров в **26 странах**.

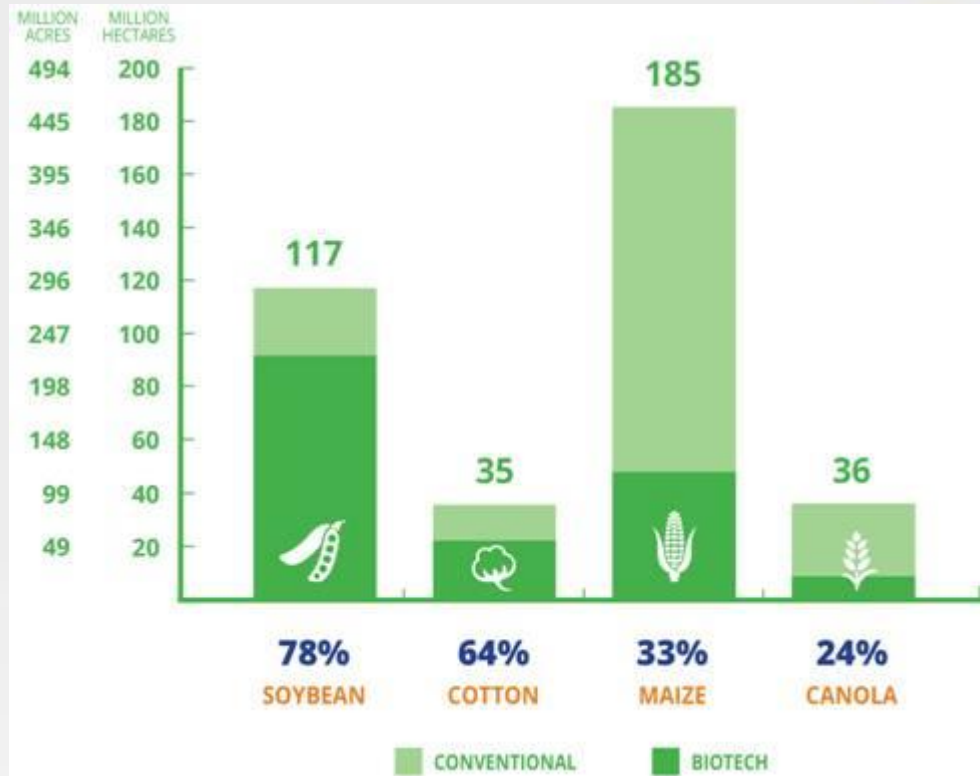
Начиная с первоначальной посадки **1,7 млн. Гектаров в 1996 году**, когда первый биотехнологический урожай был коммерциализирован, 185,1 млн. Гектаров, высаженных в 2016 году, указывает на увеличение в 110 раз (табл. 1).

Таким образом, биотехнологические культуры считаются наиболее быстро используемыми культурами сельскохозяйственных культур в истории современного сельского хозяйства.



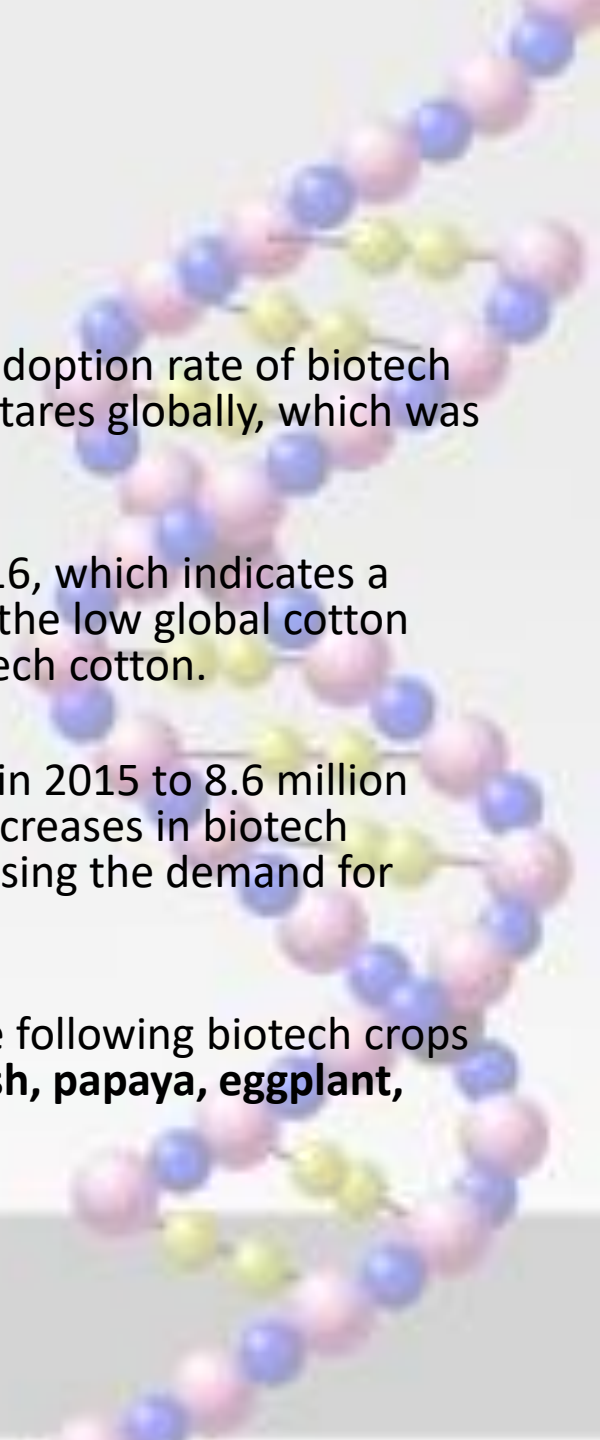
Global Adoption of Biotech Soybean, Maize, Cotton, and Canola

The most planted biotech crops in 2016 were soybean, maize, cotton, and canola. Although there was only 1% increase in the planting of biotech soybean, it maintained its high adoption rate of 50% of the global biotech crops or 91.4 million hectares. This area is 78% of the total soybean production worldwide .



Biotech crops

- A significant increase of 13% was recorded for the global adoption rate of biotech maize from 2015. Biotech maize occupied 60.6 million hectares globally, which was 64% of the global maize production in 2016.
- **Biotech cotton** was planted to 22.3 million hectares in 2016, which indicates a decrease by 7% from 2015. This reduction is attributed to the low global cotton prices, which also affected the global planting of non-biotech cotton.
- **Biotech canola** increased by 1% from 8.5 million hectares in 2015 to 8.6 million hectares in 2016. This raise is attributed to the marginal increases in biotech canola plantings in the USA, Canada, and Australia, addressing the demand for edible oil.
- Aside from soybean, maize, cotton, canola, and alfalfa, the following biotech crops were also planted in different countries: **sugar beet, squash, papaya, eggplant, and potato.**



The Global Value of Biotech Crops

- According to Cropnosis, the global market value of biotech crops in **2016 was US\$15.8 billion**. This value indicates that there was a **3% increase** in the global market value of biotech crops from 2015, which was US\$15.3 billion. This value represents 22% of the US\$73.5 billion global crop protection market in 2016, and 35% of the US\$45 billion global commercial seed market. The estimated global farmgate revenues of the harvested commercial “end product” (the biotech grain and other harvested products) are more than ten times greater than the value of the biotech seed alone.