

Н.І. Ніколова

**ПЕРСПЕКТИВИ ТА ПОТЕНЦІЙНА НЕБЕЗПЕКА ПРОДУКТІВ
ГЕННОІНЖЕНЕРНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ**

Науковий керівник: к.б.н., доц. Панченко М.М.
Одеський національний університет ім. І.І.Мечникова
Біологічний ф-т, кафедра мікробіології та вірусології
Шампанський провулок, 2, Одеса, Україна, 65058

Вступ

Мікроорганізми – бактерії, дріжджі і міцеліальні гриби дивовижно досконалі творіння природи. Унікальні властивості мікробної клітини роблять можливим ефективне використання мікроорганізмів в господарській діяльності людини. З давніх часів людство використовувало дріжджі для хлібопечення, виноробства, пивоваріння; бактерії – для отримання кисломолочних продуктів. С початку 40-х років мікроорганізми стають об'єктом генетичних досліджень, а вже в першій половині 70-х років виникає нова експериментальна технологія – генетична інженерія або робота з «рекомбінантною ДНК». Суть цієї технології заключається в воз'єднанні фрагментів ДНК *in vitro*, з наступним введенням нових (рекомбінантних) генетичних структур в живу клітину.

Сьогодні бурхливо розвивається мікробіологічна промисловість. Продуктами цієї промисловості є антибіотики, амінокислоти, нуклеозиди, ферменти, біологічні засоби боротьби з комахами, кормовий білок, вітаміни, етиловий і бутиловий спирти, ацетон, полісахариди, бактерій-азатфіксатори, бактерій-біодеграданти шкідливих речовин. Але для багатьох промислових задач генетична програма клітини повинна бути перебудована таким чином, щоб направити біосинтетичний потенціал клітини на виробництво необхідного продукту, а не на безперервне самовідтворення.

Розробка методології генної інженерії дозволила налагодити мікробіологічне виробництво цінних білків людини і сільськогосподарських тварин, нового покоління вакцин.

Задача створення високопродуктивних штамів набагато спрощується, якщо експериментатор має достатньо знань про шляхи біосинтезу того чи іншого метаболіта і є способи генетичного обміну у досліджуваного мікроорганізма, які дозволяють зібрати в одному штамі всі корисні мутації і мінімізувати шкідливі. Розвиток методології генетичної інженерії, що дає можливість ізолювати і змінити окремі гени, набагато розширили можливості реорганізації геномів [7].

На данному етапі наші знання про організацію генома бактеріальної клітини, яка містить приблизно 5 тис. генів, достатньо повні. Вже вивчені молекулярні механізми реплікації ДНК, транскрипції і трансляції, регуляції активності генів. Тенденцією сьогодення є свідоме конструювання штамів мікроорганізмів із заданими властивостями з використанням фундаментальних даних молекулярної біології, генетики, генної інженерії.

Сучасні методи конструювання рекомбінантних молекул ДНК

Основним принципом генної інженерії є конструювання штучних генетичних структур у вигляді так званих рекомбінантних молекул ДНК [2].

Технологія рекомбінантних ДНК використовує наступні методи:

- специфічне розщеплення ДНК нуклеазами, що прискорює виділення і маніпуляції з окремими генами;
- швидке секвенування всіх нуклеотидів у зазначеному фрагменті ДНК, що дозволяє визначити межі гена і амінокислотну послідовність;
- конструювання рекомбінантної ДНК;
- гібридизація нуклеїнових кислот, що дозволяє виявляти специфічні послідовності РНК або ДНК з більшою точністю і чутливістю, засновану на їх здатності зв'язувати комплементарні послідовності нуклеїнових кислот;
- клонування ДНК: ампліфікація *in vitro* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції або введення фрагмента ДНК в бактеріальну клітину, яка після такої трансформації відтворює цей фрагмент у мільйонах копій;
- введення рекомбінантної ДНК в клітини або організми. Схема такої технології наведена на рис.

Головним інструментом для здійснення генно-інженерних операцій є природні ферменти, які каталізують реакції деградації та синтезу нуклеїнових кислот. Особливе місце серед них належить рестриктивним ендонуклеазам (рестриктазам), що здійснюють специфічне розрізання молекули ДНК усередині певних елементів послідовності нуклеотидів [4].

Отже, для виділення фрагментів ДНК широко використовують рестриктази. Для їх позначення використовуються скорочені назви мікроорганізмів – продуцентів. Як приклад розглянемо *EcoRI* – ендонуклеази, виділену з *E. Coli*. Подібно багатьом іншим рестриктазам, цей фермент розщеплює ДНК по паліндромній послідовності, тобто короткому сегменту ДНК, в якому обидві ланцюги при зчитуванні в напрямку 5'→3' мають однакову послідовність. Для *EcoRI* це послідовність 5'-GAATTC-3'. Гомодимер *EcoRI* розщеплює фосфодієфірні зв'язки обох ланцюгів між G і A. Це призводить до утворення комплементарних «липких» кінців (AATT), які утримуються разом за рахунок спарювання підстав. Їх, однак, можна

легко відокремити один від одного шляхом невеликого нагрівання. При охолодженні липкі кінці гібридизуються знову в правильній орієнтації. Місця розщеплення можна з'єднати за допомогою ДНК-лігази [4].

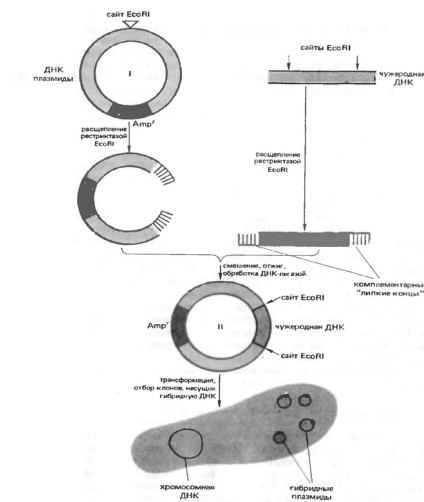


Рис. Схема типового дослідження по генній інженерії; Amp^r – стійкість до ампіциліну – генетичний маркер плазмиди [за Єгоровим, 1988] [1]

Зшивка фрагментів може бути здійснена трьома способами, в залежності від того які кінці мають фрагменти зшиваючи ДНК: зшивання за «тупими» кінцями (коннекторний метод), зшивання за однойменними липкими кінцями (рестриктазно-лігазний метод) – це як раз той варіант, що наведений в прикладі, і зшивання фрагментів з різнойменними липкими кінцями.

Наступний етап – перенос рекомбінантної плазмиди в бактерію. Такий процес включення чужерідної ДНК в бактеріальну клітину носить назву трансформація.

Трансформація бактеріальних клітин рекомбінантною плазмідною здійснюється зазвичай у розчині $CaCl_2$ або шляхом електропорації. В обох випадках підвищується проникність клітинної стінки й рекомбінантна плазміда потрапляє всередину. Враховуючи, що рекомбінантні ДНК проникають лише в частину оброблених клітин, трансформовані бактерії необхідно відділити від нетрансформованих [7]. Для цього використовують метод селективних середовищ. Бактерії висівають на поживне середовище з антибіотиком. Нетрансформовані бактерії гинуть, а трансформовані, що отримали разом з рекомбінантною ДНК стійкість

до певного антибіотику, розмножуються і утворюють колонії із багатьох тисяч нащадків – клонів. Клоновані плазмиди виділяють із бактеріальної культури, а обробка їх тією самою рестриктазою, що була використана при виготовленні рекомбінантної молекули, дозволяє вирізати з вектора клонований фрагмент ДНК.

Генні технології в мікробіології: реальна користь і потенційний ризик»

В XVIII ст. вірили, що благо відбудеться від просвітництва, в XIX – що від пару та електрики, в XX – від атомної енергії, в XXI – від генної інженерії [6].

Загально відомо, що мікроорганізми синтезують ряд цінних речовин. Сьогодні, завдяки направленим генетичним маніпуляціям, вдається не тільки збільшити продуктивність біосинтеза, але й отримати речовини, хімічне виробництво яких раніше було неможливим. ГММ використовуються в процесі отримання молочнокислої, м'ясної продукції. Харчові добавки, амінокислоти, вітаміни, ароматизатори, ферменти – ось далеко не повний перелік речовин, які отримують за допомогою генетично модифікованих мікроорганізмів. За допомогою ГМ-мікроорганізмів отримано наступні продукти харчування та їх компоненти:

- бактеріальні харчові ферменти;
- гриби і дріжджі, які використовуються в виноробстві і при виробництві сирів;
- дріжджі для хлібопекарської та пивоварної промисловості;
- сири, пиво, молочна продукція, копчені ковбаси.

Трансгенні бактерії вирощують в біореакторах для отримання таких продуктів: інсуліну, гормону росту, вакцин та ін.

Успіхи генетичної інженерії призвели до того, що більш ніж 100 білків людини можуть зберігати свою видоспецифічність. В якості продуцентів рекомбінантних білків людини частіше використовуються: *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Дуже широко трансгенні мікроби використовуються в медицині. В першу чергу таким шляхом отримують антибіотики. Сьогодні відомо більше 6000 видів антибіотиків, більше 100 з яких використовуються в медичній практиці.

Методи генної інженерії активно використовуються для розробки штамів-деструкторів, здатних швидко розкласти масивні скупчення нафтопродуктів, ксенобіотиків.

На сьогоднішній день, наводяться декілька аспектів використання трансгенних мікробів, що дають реальну користь.

Трансгенні мікроорганізми як інструмент для аналізу еукаріотних геномів

Експерти Федерації європейських мікробіологічних суспільств (ФЄМС) вважають, що саме клонування еукаріотних генів в мікробах і є той самий принциповий метод, що зробив революцію в біології. Фрагменти геномів тварин і рослин клонують саме в мікроорганізмах. Для цього в якості векторів використовують штучно створені плазмиди, бактеріофаги, косміди. Для реалізації проекту «Геном людини» сьогодні використовують штучні хромосоми пекарських дріжджів, які мають точки початку реплікації, центромери і теломери. Такі хромосоми спроможні нести приєднані до них фрагменти ДНК довжиною в декілька мільйонів пар нуклеотидів [5].

Взагалі, всі досягнення молекулярної біології були (і будуть) неможливими без трансгенних мікробів.

Генні технології в боротьбі з інфекціями

Патогенні мікроби здатні до еволюції і адаптації – можуть виживати і шкодити, не дивлячись на нові методи боротьби з ними. Вони можуть, наприклад, стати резистентними до вакцин і антибіотиків, можуть призводити до виникнення нових інфекційних захворювань. Але саме генні технології прискорять розшифровку молекулярних механізмів на рівні «мікроб – хазяїн», а це дозволить розробляти все нові і нові вакцини. «Яскравий приклад обґрунтованості таких сподівань», - пишуть експерти ФЄМС, - це деякі успіхи в боротьбі з вірусом, який «розумніший за людину» - ВІЛ-1», тобто з вірусом СНІДу.

Розробка вакцин

В цій галузі, за даними ФЄМС, генні технології розвиваються в двох основних напрямках. Перше – покращення вже існуючих вакцин. Вакцини повинні стати більш ефективними, працювати в менших дозах, не давати побічних ефектів і вводитися перорально. Ідеал – це так звана комбінована вакцина: одразу декілька вакцин в одній пероральній дозі, що має замінити десяток різних вакцин, що вводяться шляхом ін'єкції [8].

Другий напрямок – генні технології отримання вакцин проти тих захворювань, при яких сам метод вакцинації ще не використовувався. Це СНІД, малярія, навіть виразкова хвороба шлунка і деякі інші.

Мікроби як інструмент для соматичної генної терапії

Мета такої терапії в наступному: дефектний ген замінюють на ген нормальний, точніше – донорський. Вектором слугує генетично модифікований мікроорганізм чи вірус. Він сконструйований так, що

експресує донорський ген в клітинах пацієнта, але сам розмножуватися нездатний, тому інфікувати інших не може.

Пов'язані з цим методом проблеми більш за все хвилюють суспільство. Але треба пам'ятати: генна терапія заснована на принципі введення нових генів не в статеві клітини, а в соматичні. І ці гени будуть працювати в окремій людині, передати їх нащадкам він не зможе, навіть, якщо й забажає.

Рекомбінантні мікроорганізми – джерела напрацювання різних речовин

За останні роки генні технології не тільки значно покращили традиційні, природні штами-продуценти, але й створили принципіально нові. Наприклад, у грибного штама – продуцента антибіотика цефалоспоріна збільшили кількість генів, що кодують, експандазу, активність якої задає швидкість синтезу цефалоспоріна. В кінці-кінців вироблення антибіотика збільшилося на 15-40% порівняно з вихідним штамом. Список нових трансгенних мікробів-продуцентів росте інтенсивно. Це рекомбінантні продуценти гормонів людини і тварини, білкових факторів крові, інтерферонів, інтерлейкінів. Швидко зростає мікробіологічне виробництво рекомбінантних ферментів для харчової промисловості, виробництво амінокислот, вітамінів. Але промислове культивування високопродуктивних трансгенних мікробів дає ще і екологічний ефект. Так, перехід від природних продуцентів протеаз до їх транс генним суперпродуцентів призвели до зниження екологічної вартості данного виробництва на 40-80%. За рахунок чого? Знизилися витрати на поживні середовища, використання води і енергії, зменшилося утворення стіків. Як бачимо, ефект не тільки екологічний, але й економічний. Тобто – дохід.

Рекомбінантні мікроби в виробництві їжі

Робота, особливо на Заході, з генетичного покращення властивостей мікробів, які традиційно використовуються в виробництві хліба, сироварінні, молочній промисловості, пивоварінні, виноробстві, йде дуже напружено. Цілі такої роботи: збільшення стійкості виробничих штамів до фагів, підвищення їх конкурентної здатності по відношенню до шкідливих бактерій і покращення якості продукту. Три нових трансгенних штама вже отримали «добро» на промислове використання: це – пекарські дріжджі, що ефективно ферментують мальтозу, і два штами пивних дріжджів, які несуть ген амілази (із грибка *Aspergillus niger*), які дають пиво з низьким вмістом вуглеводів і не утримують декстринів [3].

Трансгенні мікроорганізми в сільському господарстві

ГММ можуть принести велику користь при взаємодії з с/г рослинами і тваринами, з їх патогенними вірусами і мікробами; з шкідливими

комахами, з ґрунтом. Ось приклади. Можна модифікувати ті чи інші рослини, зробити їх більш стійкими проти інфекційних хвороб, вносячи в них гени, які блокують розвиток вірусних чи грибкових захворювань. Так, в Китаї стійкі до вірусів табак, томати і солодкий перець вирощують вже на великих площах.

Що стосується трансгенних вірусів, то з ними можна не тільки боротися, але й використовувати в корисних цілях, наприклад, запрограмувати на синтез будь-якого чужерідного рослині білку. Для цього в геном непатогенного віруса вбудовують відповідний ген – наприклад, кодуєчий ентомопатогенний токсин із *Bacillus thuringiensis*, який синтезуючись в листях, вражає шкідливих комах. Американські фермери вирощують такий табак, який є отруйним для шкідливих комах, з 1995 р.

Наскільки ймовірно виникнення і наступне розповсюдження нових інфекційних мікроорганізмів

Це дійсно одне з найбільш тривожних побоювань: чи не призведе широке впровадження в практику генних технологій до появи невідомих епідеміологам хвороб?

У спеціалістів основні побоювання пов'язані з трансгенними мікробами, по-перше, якщо їх коли-небудь випустити в природу, потім їх вже не спіймаєш. По-друге, в світі мікробів розповсюджений обмін генами між мікроорганізмами різних видів. По-третє, екологічні взаємодії між мікробами, а також між мікробами та іншими організмами, вивчені дуже мало. В четвертих, в науці відомі лиш від 1 до 10% всіх насправді існуючих природних мікробів. Про останніх ніхто нічого не знає. Тому прогнозувати наслідки інтродукції трансгенних мікробів в природні екосистеми важко. Тимпаче, що вони будуть там еволюціонувати і обмінюватися генами з природними організмами. Саме тому в природі проведено тільки 10 польових експериментів трансгенних мікробів.

Взагалі, припускається, що трансгенні мікроорганізми, створені без врахування їх ймовірних екологічних характеристик і не пройшовши тривалої спільної еволюції з природними організмами, «вирвавшись з пробірки на волю», зможуть безконтрольно і необмежено розмножуватися, що приведе:

- до витіснення природних організмів з міст їх природнього проживання;
- до наступної ланцюгової реакції «падаючого доміно» порушення екологічної рівноваги;
- до зменшення біорізноманіття;
- до активації спочиваючих, раніше невідомих патогенних мікроорганізмів;

- до виникнення епідемій раніше невідомих хвороб людини, тварин, рослин;
- до «втечі» чужорідних генів з трансгенних організмів;
- до хаотичного переносу генів в біосфері і до появи монстрів, що знищують все [8].

Експерти ФЄМС, констатують, що широкомасштабна генетична інженерія мікроорганізмів, яка продовжується десь 20 років, до цього часу не дала жодного прикладу таких жахливих наслідків. Більше того, виявилось, що рекомбінантні мікроорганізми, як правило, менш вірулентні, ніж їх вихідні форми. Ген вірулентності, внесений в сам по собі в невірулентний мікроб, вірулентним цей мікроб не зробить, бо вірулентність визначається кількома генами. І дійсно, ген холерного токсину, якщо його просто ввести в кишкову паличку, не робить її вірулентною.

В цілому не схоже, щоб перенесення декількох генів з одного мікроба в інший, що має іншу еволюційну історію, призвело до підвищення патогенності. А ось підвищити стійкість патогенна до антибіотиків можна легко. І це не є добре! Але подібне пов'язане не лише з застосуванням генних технологій – існує приклади спонтанного підвищення стійкості патогенних мікробів. Трапляється це як через спонтанні мутації в патогенних мікробах, так і в результаті переносу генів. Наприклад, пневмококи стали стійкими до пеніциліну, бо набули ген стійкості до цього антибіотика в результаті природного генетичного переносу, а потім в ново набутій ДНК сталися мутації і перетворення

Ще один варіант ризику для людини може бути пов'язаний з трансгенними рослинами, в листях яких через генну модифікацію синтезуються білки оболонки певних вірусів. Якщо така рослина буде інфікована іншим вірусом, то не виключено, що в результаті отримаємо новий вірус, з новими епідеміологічними властивостями. Експерти вважають, що таким ризиком можна знехтувати; рослини часто інфіковані одночасно різними вірусами і виникнення нових вірусних хвороб при цьому не спостерігається.

Неконтролює розповсюдження рекомбінантних мікроорганізмів в навколишньому середовищі

Про те як ґрунтові мікроби розмножуються, розповсюджуються і зберігаються в екологічних нішах, відомо мало. Дізнатися про це важко: ґрунтові штами не мають генетичних маркерів, тобто легко впізнаваних ознак, що є зручними для слідування за їх долею. Але генні технології допоможуть вирішити ці проблеми: мікроби можна помітити спеціальним «маячком» - маркерним геном, який не змінює властивостей мікробів і дозволяє за ним слідувати. Завдяки цьому підходу було з'ясовано, що

рекомбінантні мікроби, внесені в ґрунт, поведуться також як і вихідні, не модифіковані штами. Відомо декілька випадків, коли в середовище випадково потрапляла велика кількість трансгенних мікроорганізмів. Декілька сотень літрів культуральної рідини з трансгенними дріжджами вилились з ферментатора; протягом декількох днів після аварії ще можна були знайти живі клітини, але потім – ні.

В колишній східній Німеччині, на фабриці що випускала альфа-амілазу з рекомбінантного штаму *Bacillus subtilis*, траплялися витічки трансгенних бактерій (через повітря і стічні води) [5]. Через два роки після закриття фабрики перевірили наявність трансгенів, знайти нічого не вдалось. В цілому як стверджують експерти ФЄМС, мікроби, що були занесені в певні екосистеми, зможуть в них вижити, якщо добре до них застосовані і мають переваги в конкуренції з природними мікробами. За висновком ФЄМС: за 20 років широкого використання генних технологій ще не зареєстровано жодного випадку, щоб в оточуючому середовищі трапилося шкідливе або небезпечне розповсюдження рекомбінантних мікроорганізмів.

ГММ як біологічна зброя

За конвенцією 1974 року про біологічну війну, схвалена більшістю країн, направлена на запобігання використанню патогенів в якості біологічної зброї, забороняє подібні дослідження і розробки в галузі наступальних озброєнь, але дозволяє їх використання в оборонних цілях. На данному етапі міжнародне суспільство намагається розробити і ввести в практику процедури перевірки виконання Конвенції. На думку експертів ФЄМС чисто воєнне значення біологічної зброї мінімальне: важко передбачити як воно буде діяти в польових умовах. Тобто для створення якогось нового виду біологічної зброї необхідні серйозні і інтенсивні польові дослідження, а їх у відкритому суспільстві провести неможливо. Отже використання генних технологій не збільшить небезпеки раптового розв'язання біологічної війни. Але вченими необхідно усвідомлювати існування потенційних небезпек, пов'язаних з використанням генних технологій в воєнних цілях і сприяти розвитку міжнародного контролю над біологічною зброєю.

Отже, при використанні генних технологій користь від них сильно перевищить ризик негативних наслідків; технології конструювання рекомбінантних ДНК внесуть вагомий вклад в охорону здоров'я, в розвиток стійкого сільського господарства, в виробництві їжі, в очищенні оточуючого середовища. І ще що важливого, можливий ризик негативних наслідків необхідно визначати окремо в кожному конкретному випадку. Всі передбачувані негативні соціальні наслідки повинні бути визначені, а згодом нейтралізовані.

Список літератури

1. Биотехнология: Учебн. Пособие для вузов. В 8 кн./Под ред. *Н.С.Егорова, В.Д.Самуилова*. Кн.2. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов/*В.Г.Дебабов, В.А.Лившиц*. - М.: Высш. шк., 1988.- 208 с.: ил.
2. *Варфаламеев С. Д., Колюжный С. В.* Биотехнология: генетические основы, микробиологические процессы. - М.:, 2002. - 245 с.
3. *Воробьева Л. И., Таглина О. В.* Генетические основы селекции растений и животных. - Харьков: «Колорит», 2006, 158 с.
4. Генетика : Підручник / *А.В. Сиволоб, С.Р. Рушковський, С.С. Кир'яченко* та ін.; за ред. *А.В.Сиволоба*. - К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2008. - 320 с.
5. *Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А.* Основы биотехнологии. - М.: Academia, 2003. - 343 с.
6. *Лещинская И.Б.* Современная промышленная микробиология. Соросовский образовательный журнал. 2000, Т. 6, № 4, С. 14-18.
7. Современная микробиология. Прокариоты.: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ./Под ред. *Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля*. - М.: Мир, 2005. - 656 с.: ил., 16 с. цв. ил. - (Лучший зарубежный учебник).
8. *Тоцький В. М.* Генетика: Підручник/ 3-тє вид., випр. та доп. - Одеса: Австропринт, 2008. - 712 с.