Государственный университет управления

Институт государственного и муниципального управления

Специальность государственное и муниципальное управление

Курсовая работа

на тему:

«Достижения генной инженерии и биотехнологии»

Выполнена студенткой

Дата выполнения работы 15.12.2000г.

Руководитель Миронченко В.И.

## План

|  |  |
| --- | --- |
| **Введение** | Стр.2 |
| Строение ДНК | Стр.2 |
| **I Биотехнология** | Стр.4 |
| Возникновение биотехнологии | Стр.4 |
| Специфика биотехнологии  | Стр.4 |
| Разделы биотехнологии | Стр.6 |
| А) Биоэнергетика | Стр.6 |
| Б) Биологизация и экологизация | Стр.6 |
| Практические достижения биотехнологии | Стр.7 |
| **II Генная инженерия** | Стр.7 |
| Генная инженерия | Стр.7 |
| Методы генной инженерии | Стр.8 |
| Генетическая рекомбинация in vitro | Стр.11 |
| Методы введения ДНК в бактериальные клетки | Стр.12 |
| Достижения генной инженерии | Стр.14 |
| Молекулярная геномика | Стр.17 |
| Генная терапия | Стр.19 |
| **Биотехнологические и генно-инженерные компании и их разработки.** | Стр.19 |
| А) Компании США | Стр.19 |
| Б) Компании СССР | Стр.23 |
| В) Компании Западной Европы | Стр.23 |
| Г) Международное сотрудничество | Стр.24 |
| Заключение | Стр.26 |
| Список терминов  | Стр.27 |
| Список литературы | Стр.28 |
| Приложение 1 | Стр.30 |
| Приложение 2 | Стр.31 |

# Введение

В своей работе я раскрываю тему достижений генной инженерии и биотехнологии. Возможности, открываемые генетической инженерией перед че­ловечеством как в области фундаментальной науки, так и во мно­гих других областях, весьма велики и нередко даже революционны. Так, она позволяет осуществлять индустриальное массовое произ­водство нужных белков, значительно облегчает технологические процессы для получения продуктов ферментации — энзимов и аминокислот, в будущем может применяться для улучшения растений и животных, а также для лечения наследственных болезней человека. Таким образом, генная инженерия, будучи одним из магистральных направлений научно-технического прогресса, активно способствует ускорению решения многих задач, таких, как продовольственная, сель­скохозяйственная, энергетическая, экологическая.

Но особенно большие возможности генная инженерияоткрывает перед медици­ной и фармацевтикой, поскольку применениегенной инженерии и гибридомных методов может привести к коренным преобразо­ваниям медицины. Многие болезни, для которых в настоящее время не существует адекватных методов диагностики и лечения (раковые, сердечно-сосудистые, вирусные и паразитные инфекции, нервные и умственные расстройства), с помощью генной инжене­рии и биотехнологии станут доступны и диагностике, и лечению**.** Под влиянием биотехнологии медицина может превратиться из преимущественно эмпирической в фундаментально теоретически обоснованную дисциплину с ясным пониманием происходящих в организме молекулярных и генетических процессов.

# Строение ДНК

Еще в прошлом веке биологи изучили процесс клеточного деления, которому предшествует расхождение хромосом, благодаря чему в каждый сперматозоид и в каждую яйцеклетку попадает половина хромосом из исходной клетки. Тогда уже было показано, что носителями генетической информации являются хромосомы.

С точки зрения химиков хромосомы состоят из белка и дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Белки — сложная группа веществ, состоящая из 20 мономерных звеньев (аминокислот), которые соеди­нены в самых разных комбинациях. В ДНК — всего четыре вида ами­нокислот. Сначала предположили, что ДНК строится сочетанием этих четырех единиц в однообразном порядке. В качестве носителей генетической информации предполагались белки, как более сложные структуры. Только в 40-с годы было установлено, что именно ДНК, несмотря на простоту своей структуры, являются носителями инфор­мации, и, более того, обеспечивают образование своих точных копий для передачи последующим поколениям.

Гены — это участки молекулы ДНК, которая "размножается" путем *комплиментарного пристраивания* друг к другу четырех нуклеотидов (оснований), и при ошибках в этом процессе происходят мутации. Гены управляют синтезом белков, составляю­щих протоплазму, переключаясь время от времени с построения собственных клеток на построение иных молекул. В клетках высших организмов количество ДНК сильно различает­ся, отсюда отличия между организмами и в наборе синтезируемых белков, и в сложности строения организмов.

В начале 50-х годов выяснилось, что химический состав ДНК (а не белков) у од­ного вида почти одинаков, весьма различаясь у разных видов. Любая ДНК состоит из четырех типов нуклеотидов: А, Т, Г, Ц (начальные буквы четырех азотистых оснований— аденин, тимин, гуанин и цитозин), которые присутствуют в ДНК в разных пропорциях у разных видов и имеют близкие пропорции у одного вида. В 1938 г. Уильям Астбери (автор термина *молекулярная биология)* получил вместе со своим сотрудником Флорином Беллом рентгено­граммы ДНК, которые показали, что азотистые основания распола­гаются одно за другим, построенные как пластинки. Вскоре амери­канский биохимик Эрвин Чаргафф (р. 1905) установил, что отно­шения А/Т и Г/Ц приблизительно равны единице. Эти результаты были важны для понимания структуры ДНК.

 Интерес к ДНК как носителю генетической информации резко возрос к началу 50-х го­дов, и структура ДНК была вскоре установлена. Химики понимали, что ДНК собрана из нуклеотидов, каждый из которых имеет фосфатную группу, связанную ковалентно с пяти-углеродным сахаром. Каждый такой сахар связан с одним из четырех азотистых оснований. История открытия структуры ДНК описана американским биохимиком Джеймсом Уотсоном (р.1928) в его книге «Двойная спираль»(1968). Кембридже Уотсон познакомился с Криком, физиком, который переквалифицировался в биохимика. Из общения с химиками Уотсон узнал, что структурные формулы, которыми они пользовались далеки от совершенства. Разобравшись в структуре пуринов (А, Г) и пиримидинов (Т, Ц), Уотсон и Крик решили, что они должны быть тесно связаны между собой. Если это так, то ДНК должна состоять из двух цепей. Цепи должны закручиваться между собой так, чтобы сохранялись определенные углы между группами атомов. Так возникла *двойная спи­раль, в* которой пурины и пиримидины выстроены по типу ступенек лестницы: роль "перекладин" играют основания, "веревок" — сахарофосфатные остовы. Каждая перекладинка образована из двух оснований, присоединенных к двум противоположным цепям, при­чем у одного из оснований одно кольцо, у другого — два. Следовательно, это может быть А и Т или Г и Ц. Поскольку в каждой паре есть одно ос­нование с одним кольцом и одно — с двумя, величина пе­рекладин одинаковая, и остовы цепей находятся на одном расстоянии. Две цепи удерживаются вместе водородными связями между основаниями. Статья Уотсона и Крика, в которой сообщалось о расшифровке структуры ДНК, заняла всего две странички в научном журнале, но она открыла новую эпоху в раскрытии тайны жизни. В первой же публикации (1953) Крик и Уотсон отметили, что такая структура хорошо объясняет и процесс "воспроизводства" этой молекулы. При рассоединении цепей возможно присоединение новых нуклеотидов к каждой из них, тогда около каждой старой возникнет новая цепь, точно ей соответствующая. Так впервые пришли к структуре, кото­рая была способна к самовоспроизведению. Физики Крик и Уилкинс вместе с биохимиком Уотсоном стали лауреатами Нобелевской пре­мии по физиологии и медицине за 1962 год.

Исследования показали, что ДНК может существовать в двух фор­мах: А (при низкой влажности) и В (при высокой). Для обеих форм построили молекулярные модели. Из дифракционных картин воло­кон ДНК информацию получить было достаточно трудно, посколь­ку цепи ДНК расположены вдоль оси волокна беспорядочно, но была подтверждена ее спиральная структура. К настоящему времени иссле­дователи научились синтезировать в необходимом количестве и по­лучать в достаточно чистом виде короткие участки ДНК заданной последовательности.

**Строение рекомбинантной ДНК.**

Гибридная ДНК имеет вид кольца. Она содержит ген (или гены) и вектор. Вектор - это фрагмент ДНК, обеспечивающий размножение гибридной ДНК и синтез конечных продуктов деятельности генетической системы - белков. Большая часть векторов получена на основе фага лямбда, из плазмид, вирусов SV40, полиомы, дрожжей и др. бактерий. Синтез белков происходит в клетке-хозяине. Наиболее часто в качестве клетки-хозяина используют кишечную палочку, однако применяют и др. бактерии, дрожжи, животные или растительные клетки. Система вектор-хозяин не может быть произвольной: вектор подгоняется к клетке-хозяину. Выбор вектора зависит от видовой специфичности и целей исследования. Ключевое значение в конструировании гибридной ДНК несут два фермента. Первый - рестриктаза - рассекает молекулу ДНК на фрагменты по строго определенным местам. И второй - ДНК-лигазы - сшивают фрагменты ДНК в единое целое. Только после выделения таких ферментов создание искусственных генетических структур стало технически выполнимой задачей.

# Биотехнология

## Возникновение биотехнологии

Современная биотехнология — это новое научно-техническое направление, возникшее в 60—70-х годах нашего столетия. Осо­бенно бурно она стала развиваться с середины 70-х годов после первых успехов генно-инженерных экспериментов. Несмотря на столь короткий срок своего существования, биотехнология прив­лекла пристальное внимание как ученых, так и широкой общест­венности. Биотехнология, в сущности, не что иное, как использо­вание культур клеток бактерий, дрожжей, животных или растений, метаболизм и биосинтетические возможности которых обеспечивают выработку специфических ве­ществ. Биотехнология на основе применения знаний и методов биохимии, генетики и химической техники дала возможность получения с помощью легко доступных, возобновляемых ресурсов тех веществ и которые важны для жизни и благосостояния.

В промышленном масштабе подобная биотехнология представляет собой уже биоиндустрию.

Одно из объяснений живого интереса к биотехнологии можно найти прежде всего в том, что именно к этому времени была осоз­нана действительная острота глобальных проблем, вставших перед человечеством: нехватка продовольствия, ограниченность энер­гии и минеральных ресурсов, резкое, почти катастрофическое, ухудшение окружающей среды и, как следствие, ухудшение здо­ровья человека. Стало понятно, что огромный индустриально-про­мышленный комплекс не только не помогает решить эти проблемы, но и еще более усугубляет их. Возникла настоятельная практическая потребность в принципиально новых технологиях и новых способах организации производства. В это же время физико-хими­ческая биология в союзе с генетикой, молекулярной биологией и микробиологией предложили новую технологию, как будто способ­ную помочь в решении этих проблем. Тем более что первые опыты биотехнологического производства дали неплохие результаты и потому позволили строить оптимистические планы на будущее.

## Специфика биотехнологии

Биотехнология - чрезвычайно наукоемкая технология.Так, например, возникшая первой в США фирма «Дженетек» расходует 76 % доходов на исследовательские разработки вместо обычных для других фирм 12 %. Среди общего числа работников НБФ около 35 % составляют доктора наук.[3]

Таким образом, новая биотехнология—это больше научно-техническое новаторское направление, чем производственное, хотя и с довольно большими производственными перспективами. Однако это такое научно-техническое направление, которое само выступает производства, причем такого производства, которое уже не может сделать бук­вально ни одного шага без глубоких фундаментальных и система­тических прикладных научных разработок. Подчеркивая специфику новой технологии, т. е. отличая ее и от сельского хозяйства, и от традиционной промышленности, можно так определить биотехнологию: это технология промышленного применения и эксплуатации естественных и целенаправленно соз­данных живых систем, прежде всего микроорганизмов, в качестве автоматически действующих сил природы для удовлетворения.

Возникновение социальных проблем биотехнологии обуслов­лено прежде всего тем, что это новое производство есть одно из важнейших направлений научно-технического прогресса, качест­венно преобразующих содержание научно-технической революции. Есть все основания предполагать, что в недалеком будущем биотехнология превратится в одно из важнейших приоритетных направлений научно-технического прогресса и тем самым может привести к переосмыслению и самих критериев этого прогресса. Это предположение зиждется на том, что глобальные проблемы современности, и в особенности экологическую, продовольствен­ную и энергетическую, очень трудно (если не невозможно) будет решать без самого непосредственного и широкого применения биотехнологии. Важнейшие социальные проблемы возникают также и в связи с тем, что развитие биотехнологии ведет к размы­ванию традиционных границ между сельским хозяйством и про­мышленностью. Более того, возникающая в настоящее время необходимость сначала экологизации, а затем и в более широком смысле биологизации всей производственной и хозяйственной деятельности человечества может привести не только к пере­стройке и даже замене (сначала, конечно, частичной) привычного сельского хозяйства биотехнологией, но и к преобразованию промышленности и техники.[3]

Примечательно, что в сфере биотехнологии целый ряд биологических наук, и прежде всего микробиология, генетика и физико-химическая биология, уже превращаются в непосредственную производительную силу.

Слияние науки и производства, превращение науки в непосредственную произ­водительную силу, а производства в предметно - воплощающую науку как нельзя лучше характеризует это новаторское направление. Видимо, поэтому оно оказывается тем фокусом, который стягивает в себе как проблематику, традиционно относимую к сфере философии и методологии научного познания, так и проб­лемы социально-философского и методологического осмысления практики, производства, промышленности. К. Маркс подчеркивал, что превращение производства в материальную творческую науку становится возможным лишь «по отношению к человеку сложив­шемуся, в голове которого закреплены накопленные обществом знания».[3]

Так, скажем, если Альбер Сассон утверждает, что <развитие биотехнологии и преиму­щества, которые оно сулит, ставит обширный комплекс проблем, которые связаны с эволюцией общего направления биологических исследований»[2], то интуитивно это кажется верным. Однако детального и аргументированного обоснования этого тезиса не просто достичь, и не только в силу еще очень значительной огра­ниченности биотехнологического опыта.

Биотехнология привлекает к себе прежде всего возможностью приспособления естественных, органических технологий живой клетки, ткани, организма, биоценоза и биосферы в целом для нужд человека как таких технологий, которые естественным образом смогут быть встроены в биологический круговорот планеты. Однако это только идея, пока существующая еще в качестве труднодостижимой мечты, поскольку теперь действующая биотехнология — это в большей мере химическая технология, в которой используются фрагменты живого. Тем не менее и в качестве даже идеи-мечты она оказывает заметное благотворное воздействие: именно в русле этой мечты родились и задачи экологизации, и — в более широком плане — биологизации всей производственно-хозяйственной дея­тельности человека на планете.

Еще в начале века крупнейший французский химик П. Бертло считал, что можно создавать идеальную пищу, которая в виде питательных порошков или растворов будет вводиться прямо в желудочно-кишечный тракт или непосредственно в кровь. Эта идея фактически поддерживалась до самого последнего времени (70-е годы), однако теперь ясно, что она никогда не может быть реализована. Как отмечает А. М. Уголев, в последнее время были сделаны крупнейшие открытия, которые влияют на всю стратегию питания. Были «обнаружены неизвестные ранее типы пищеварения (лизосомальное, внутриклеточное и мембранное). А также погло­щения пищевых веществ. Кроме того, установлено, что в отношении мета­болизма человек (и другие высшие животные) «представляет собой не собственно организм, а надорганизм, поскольку он включает в себя целый комплекс микроорганизмов».[3]. Последнее обстоя­тельство особенно интересно тем, что оно привело к формированию представлений об эндоэкологии. т. е. внутренней экологии человека и других многоклеточных организмов, а также к представлению о том, что в процессе эволюции мы сформировались как организмы с определенными природными «технологиями», обойти которые не представляется возможным.

## Разделы биотехнологии

### Биоэнергетика как раздел биотехнологии

 Установление единообразия механизмов энергетических про­цессов во всем живом мире — от микроорганизмов и растений до человека, и вскрытие механизмов преобразования энергии в живых клетках создало предпосылки управления энергетиче­скими процессами отдельных организмов и их сообществ, а также конструирования биоэнергетических установок различных типов, в том числе биологических генераторов тока. Это позволяет гово­рить о превращении биоэнергетики в один из разделов биотехно­логии и в одно из перспективных направлений НТП, интенсивно развиваемое в настоящее время и обещающее эффективное раз­решение энергетической и сырьевой проблем.

Биоэнергетика в широком смысле слова означает совокупную энергетику биологического круговорота биосферы Земли, которая происходит с участием всех населяющих биосферу организмов — микроорганизмов, растений, животных. Восходящая линия биоло­гического круговорота — накопление химической энергии органи­ческих соединений в процессе фотосинтеза — химического про­цесса связывания воды и углекислого газа за счет энергии солнеч­ного излучения с образованием углеводов и других более сложных соединений. На планете за год воспроизводится около 232.5 млрд. тонн сухого органического вещества, что соответствует примерно 6000.10 '2 кдж энергии. Энерговооруженность жизни в ходе эво­люции возрастает. Однако деятельность людей в масштабах биосферы все более оказывается разрушительной, ограничивающей возможности дальнейшего развития биоэнергетики. Происхо­дит не только уничтожение отдельных видов растений и животных, не только нарушение их естественных комплексов — биогеоценозов — разрушается структура биосферы, ее циклическая организация, способность к самоочищению. Но с помощью расширяющегося прогнозно-планового регулирования происходит постепенное превращение биосферы в сферу разума — ноосферу. Все в более расширяющихся масштабах будет осуществляться экологизация и биологизация производственной деятельности людей, т. е. все большее включение этой деятельности в биологи­ческий круговорот биосферы. Соединение в ноосфере двух спосо­бов обеспечения устойчивости систем — энергетического (отбор и сохранение систем с большей энергией) и информационного (отбор более сложных систем, т. е. с большим запасом информа­ции) — приведет к образованию качественно нового состояния биоэнергетики. Наступит эпоха сбалансированной энергетики планеты на возобновляемых энергоресурсах.

### Биологизация и экологизация

 Еще раз подчеркну, что стратегия преобразования и господства над природой в современном мире уже дискредитировала себя. Мы все больше осознаем необходимость гармоничного, совместного развития природы и человечества. Именно поэтому в настоящее время приобретают популярность идеи экологизации и в более широком смысле биологизации всей хозяйственной и производственной деятельности. Думается, что под экологизацией, как начальным этапом биологизации, можно понимать сокращение вредных выбросов производства в окружающую среду, создание малоотходных и безотходных промышленных комплексов с замк­нутым циклом, скажем, по воде или углеводороду и т. п.

Биологизацию же следует, видимо, понимать более широко, как радикальное преобразование производственной деятельности на основе биологических законов биотического круговорота биосферы. Целью подобного преобразования должно быть встраивание всей хозяйственно-производственной деятельности в биотиче­ский круговорот.

Особенно наглядно эта необходимость видна на феномене стратегической беспомощности химической защиты растений. Дело в том, что в настоящее время нет в мире ни одного пестицида, к которому бы не приспособились вредители растений. Более того, теперь отчетливо выявилась закономерность подобного приспо­собления: если в 1917 г. появился один вид насекомых, приспосо­бившихся к ДДТ, то в 1980 г. таких видов стало 432. Применяемые пестициды и гербициды крайне вредны не только для всего живот­ного мира, но и для человека. Точно так же в настоящее время становится понятной и стратегическая бесперспективность приме­нения химических удобрений. В этих условиях совершенно естествен переход к биологической защите растений и биоорганической технологии с минимумом химических удобрений. Решавшую роль в процессе биологизации сельского хозяйства может сыграть биотехнология.

Можно и нужно говорить также и о биологизации техники, промышленного производства и энергетики. Она особенно настоя­тельна не столько с экономической точки зрения, сколько для судеб человечества и сохранения биосферы. Активно развиваю­щаяся биоэнергетика обещает революционные преобразования, поскольку она ориентирована на возобновляемые источники энер­гии и сырья. Нефть, уголь, природный газ и даже уран — это не возобновляемые источники, и, как известно, запасы их на Земле крайне ограниченны.

Биологизация энергетики призвана сыграть решающую роль в процессе освобождения человечества от атомной энергетики, поскольку мы теперь уже можем говорить также и о стратегической бесперспективности атомных электростанций. Дело здесь не только в том, что запасы урана также ограниченны, но главным образом в том, что к настоящему времени в мире скопилось уже много десятков тысяч тонн отработавшего топлива, представляющего грозную опасность для всего живого. Как известно, проблема захоронения отработавшего топлива (его радиоактивность после использования в АЭС многократно возрастает) до сих пор не реше­на. Однако, самая главная опасность состоит в возможности се­рьезных аварий на АЭС.

## Практические достижения биотехнологии

С помощью биотехнологии получено множество продуктов для здравоохранения, сельского хозяйства, продовольственной и хи­мической промышленности. Причем важно то, что многие из них не могли быть получены без применения биотехнологических способов. Особенно большие надежды связываются с попытками использования микроорганизмов и культур клеток для уменьшения загрязнения среды и производства энергии.

Распределение основных продуктов биотехнологии показано в приложении 1.

# Генная инженерия

## Генная инженерия

За последние 10—15 лет были созданы принципиально новые методы манипулирования с нуклеиновыми кисло­тами in vitro, на основе которых зародился и бурно разви­вается новый раздел молекулярной биологии и генетики — генная инженерия. Принципиальное отличие генной инже­нерии от использовавшихся ранее традиционных приемов изменения состоит в том, что она дает возможность конструировать функционально активные генетические структуры in vitro в форме рекомбинантных ДНК. Понятия «генная» и «генетическая» инженерия ча­сто употребляют как синонимы, хотя последнее является более широким и включает манипулирование не только с отдельными генами, но и с более крупными частями генома. Работа по переделке генотипа животных или ра­стений с помощью скрещиваний ограничены пределами вида либо близких в видовом отношении форм. Напротив, генная инженерия, как будет показано ниже, стирает межвидовые барьеры, обеспечивая возможность создания организмов с новыми, в том числе и не встречающимися в природе, комбинациями наследственных свойств. Геннаяинженерия представляет собой совокупность методов, позволяющих не только получать реконбинантные ДНК из фрагментов геномов разных организмов, но и вводить такие рекомбинантные молекулы в клетку, создавая условия для экспрессии в ней введенных, часто совершенно чужеродных генов. Таким образом, в этом случае исследователь оперирует непосредственно с генами, причем их перенос может не зависеть от таксономического родства используемых организмов. Эта особенность генной инже­нерии представляет ее главное отличие от ранее исполь­зовавшихся приемов изменения генотипа.

Первенствующую роль в формировании генной инженерии сыграла генетика микроорганизмов, идеи и методы, разработанные молекулярной генетикой и химией нуклеи­новых кислот. Формальной датой рождения генной инженерии считают 1972 г., когда группа П. Берга в США соз­дала первую рекомбинантиую ДНК in vitro, объединившую в своем составе генетический материал из трех источни­ков: полный геном онкогенного вируса обезьян SV40, часть генома умеренного бактериофага *К и* гены галактозного оперона *Е. coli.* Сконструированная рекомбинантная моле­кула не была исследована на функциональную активность, поскольку у авторов этой работы возникли опасения, что методы генной инженерии могут привести к появлению микроорганизмов, опасных для здоровья человека, напри­мер бактерий *Е. coil,* способных перенести онкогенные вирусы животных в кишечник человека. Разработанные позднее правила работы с рекомбинантными молекулами позволили практически устранить возможность вредных последствий создания рекомбинантных ДНК, объединяю­щих в своем составе гены разного происхождения.

## Методы генной инженерии

Возможность выделения отдельных генов в составе относительно небольших фрагментов ДНК была продемон­стрирована незадолго до возникновения генной инжене­рии в экспериментах in vitro . В 1969 г. Дж. Беквит, Дж. Ша­пиро и другие опубликовали работу по выделению генов лактозного оперона *Е.coli*, основанную на сочетании тра­диционных методов генетики микроорганизмов и физиче­ских методов выделения и гибридизации молекул ДНК.

Отдельные гены с целью их последующего молеку­лярного клонирования в составе рекомбинантных ДНК методами генной инженерии могут быть получены сле­дующими способами:

непосредственным выделением из природных источников;

путем химического синтеза;

3) копированием соответствующей гену и РНК для получе­ния комплиментарной ДНК-вой реплики (к ДНК).

Первый метод широко использовался на раннем этапе развития генной инженерии. Тотальную ДНК из разных источников подвергали деградации различными рестриктазами, сшивали с векторными молекулами, вводили в реципиентные клетки и отбирали клоны с гибридными молекулами, включавшими требуемый ген, по появлению соответствующих маркеров донора (например, устойчи­вости к определенному антибиотику) либо с помощью специальных иммунологических и гибридизационных ме­тодов. Этот метод не утратил своего значения и успешно применяется, например для создания банка генов.

Искусственный синтез гена впервые осуществлен хи­мическим путем в 1969 г. группой Кораны с сотрудниками. Химическому синтезу генов существенно способство­вало совершенствование методов изучения первичной структуры белков или других продуктов, кодируемых син­тезируемым геном, а также методов определения первич­ной структуры (секвенирования) нуклеиновых кислот. Секвенирование ДНК игра­ет большую роль не только в работах по химическому синтезу генов, но и при изучении их функции, их регуля­торных последовательностей, а также целых генетических систем, например мобильных диспергированных генов у эукариот.

Анализ первичной структуры ДНК, т. е. установление последовательности нуклеотидных остатков в ее молекуле, в настоящее время основан на двух методах — методе химической деградации (А. Максам и В. Гилберт, 1977) и методе полимеразного копирования с использованием терминирующих аналогов нуклеотидов (Ф. Сэнгер, 1977).

В практике генной инженерии широко распространен и третий метод искусственного получения генов, основан­ный на их ферментативном синтезе с помощью механизма обратной транскрипции. Этот механизм связан с актив­ностью РНК-зависимой ДНК-полимеразы или обратной транскриптазы — фермента, впервые обнаруженного при исследовании репликации РНК онкогенных вирусов. Фермент способен строить ДНК-копии на разных РНК, включая синтетические полирибонуклеотиды. С по­мощью обратной транскриптазы, называемой иногда ревертазой, можно синтезировать практически любой ин­дивидуальный ген в присутствии соответствующих иРНК, методы выделении которых достаточно разработаны. В 70-е годы появились методы выделения в чистом виде фрагментов ДНК с помощью электрофореза. В руки ученых попали "молекуляр­ные ножницы". Транспортным средством переноса генетической ин­формации в клетку стал вирус. Явление трансдукции — переноса ге­нов из одной клетки в другую с помощью вирусов изучали еще с 50-х годов. Но вирус не должен был сразу уничтожать всю клетку, поэтому не все вирусы подходили для этой роли. Известно, что бак­териальные клетки могут обмениваться генетическим материалом при помощи плазмид (небольших частиц с фрагментами ДНК). Поэтому введение нужного гена в плазмиду позволяет в дальнейшем перенес­ти этот ген в бактерию (это еще один из механизмов транспорта в генной инженерии). Появилась возможность изучать распределение нуклеотидов в оп­ределенном гене или получать нужный белок. Для этого создается рекомбинантная ДНК, которая возникает, когда ДНК одного орга­низма внедряется в клетки другого. В качестве последнего использу­ются клетки организма, который размножается много быстрее пер­вого, например, бактерии. Так, в 80-е годы были разработаны интерфероны ~ белки, способные подавлять размножение вирусов. Были выбраны наиболее подходящие для переноса гены и мобиль­ные участки ДНК. Например, культурным растениям вводят гены, повышающие их иммунитет и устойчивость.

В 1983г. Барбара Мак-клинток при изучении генетики кукурузы обнаружила в ее геноме один "подвижный" ген, отвечающий за цвет початка. Независимо от нес подвижные гены были открыты методами молекулярной генетики советским ученым Г. П. Георгисвым. В 1981 г. процесс выделения генов и получения из них различных цепей был автоматизирован***.***

При всем разнообразии методов основная схема любой генно-инженерной работы остается неизменной. Она включает:

обработку кольцевой векторной моле­кулы рестриктазой с образованием линейной формы ДНК;

сплавление ее с фрагментом чужеродной ДНК, веду­щее к формированию гибридной структуры;

 введение гибрида в клетку реципиента;

 отбор клонов транс­формированных клеток на селективных средах;

 до­казательство присутствия рекомбинантной ДНК в этих клонах путем ее выделения из клеток, обработки соот­ветствующими рестриктазами и анализа образовавшихся фрагментов методом электрофореза в агарозном геле.

Известно несколько методов объединения фрагментов ДНК из разных источников, позволяющих включить кло­нируемую донорную ДНК в состав вектора. Одинизних основан на соединении фраг­ментов, каждый из которых несет идентичные «хлипкие» концы, полученные под действием одной и той же рестриктазы. При другом методе, ферментативном, используется возможность соединения двухцепочных концов фраг­ментов ДНК с помощью ДНК-лигазы. Для повышения эффективности лигазы к концам сшиваемых фрагментов ДНК химически присоединяют комплиментарные однонитивые олигонуклеотиды, например поли-А и поли-Т, создавая тем самым искусственные «липкие» концы.

Методы введения рекомбинантных молекул в клетки зависят от особенностей самих клеток и используемых векторов. В тех случаях, когда векторами служат плазмиды, рекомбинантные ДНК вводят в реципиентные бак­терии путем трансформации. Разработаны и методы транс­формации клеток животных, а также протопластов расте­ний. Для защиты экзогенного клеточного материала, вво­димого в клетки млекопитающих или в протопласты растений, используют липосомы — сферические тельца, обо­лочка которых состоит из фосфолипидов. В составе липосом в клетки высших эукариот введены крупные вирусные РНК. Во всех случаях липосомы надежно защищали молекулы нуклеиновых кислот от разрушения нуклеазами.

Один из путей передачи генетической информации в культуре клеток человека, животных и растений — *гибридизация соматических клеток,* разработанная Б. Эфрусси и Г. Барски (1960). Эффективность этого метода значительно повысилась после того, как было обнаружено, что частицы инактивированного вируса парагриппа типа Сендай увеличивают частоту слияния клеток из самых разных источников. Показана возможность передачи генов из изолированных хромосом китайского хомячка в клетки соединительной ткани мыши. Описаны гибриды клеток человека и мыши, из которых часть хромосом человека удаляется, а часть остается функционально активной. Для введения ДНК в различные культуры клеток млеко­питающих или развивающиеся эмбрионы используют метод микро инъекций ДНК в ядро с помощью микро­манипулятора. Развитие методов микрохирургии клеток позволило заменять ядра оплодотворенных яйцеклеток на ядра из соматических клеток и в результате получать абсолютно идентичные организмы. Создание гибридов высших растений в обход полового скрещивания возможно путем слияния протопластов и соматической гибридизации растительных клеток, в результате чего в ряде случаев появляются целые гибридные растения. Все эти методы могут быть использованы для конструирования новых форм микроорганизмов, животных и растений путем введе­ния и стабильного наследования в них рекомбинантных ДНК, несущих, гены, детерминирующие желаемые признаки.[4]

Следует, однако, отметить, что, несмотря на очевидные успехи подобных работ по созданию микроорганизмов, синтезирующих ряд важных продуктов эукариотического происхождения, проблема экспрессии чужеродных генов у прокариот имеет ряд ограничений. Некоторые из них связаны с тем, что при сверхпродукции полезных для человека и не нужных клетке соединений, кодируемых гибридной плазмидой, усиливается неустойчивость самих гибридов и вероятность элиминации из них встроенных генов. Стабильность гибридных ДНК снижается и с уве­личением размеров вставки в вектор. Поэтому разраба­тываются методы, направленные на сохранение целостнос­ти гибридной структуры. Использование регулируемых промоторов предохраняет клетку от чрезмерной для нее метаболической активности, связанной с избыточной про­дукцией чужеродного белка. Вместе с тем проблема ста­бильности гибридных молекул окончательно не решена. Ограничения возможностей конструирования микроорга­низмов — гиперпродуцентов ценных препаратов — рас­пространяются на случаи клонирования и экспрессии лю­бых генов как про -, так и эукариотического происхожде­ния.

Наряду с этим существуют и ограничения, специфи­чески связанные с выражением эукариотических генов в прокариотах.

Первое из них определяется тем, что эукариотические промоторы могут не распознаваться бакте­риальной РНК - полимеразой.

Второе заключается в том, что и РНК транскрибирующаяся с эукариотических генов, не содержит последовательности Шайн—Далгарно, необ­ходимой для ее связывания с рибосомами.

В-третьих, такая иРНК может содержать интроны, которые следует вырезать.

Наконец, эукариотические белки часто стано­вятся субстратами для бактериальных протеаз, опознаю­щих такие белки как чужеродные.[4].

Первые два ограничения преодолеваются за счет создания векторов, несущих соб­ственные промоторы и последовательность Шайн—Дал­гарно, третье можно обойти путем использо­вания кДНК либо химически синтезированных генов. Протеазная активность реципиентных бактерий подавляется мутациями.

Преодоление всех этих ограничений открывает даль­нейшие перспективы использования методов генной инже­нерии при создании микроорганизмов — продуцентов гор­монов, вакцин, антисывороток и ферментов, представляю­щих интерес для медицины, ветеринарии, сельского хо­зяйства и микробиологической промышленности.

## Генетическая рекомбинация in vitro

Генетическая рекомбинация заключается в обмене генами между двумя хромосомами. По определению, данному Понтекорво в 1958 г., рекомбинация—это любой процесс, способный привести к возникновению клеток или организмов с двумя или более наследственными детерми­нантами, по которым их родители различались между собой и которые соединены новым способом. Такая рекомбинация обязательно происходит у млекопитающих при образовании половых клеток. В ходе мейоза гомологичные хромосомы обмениваются генами; именно эти обмены позволяют объяснить перетасовку наследственных признаков в ряду поколений. У вирусов и бактерий генетическая рекомбинация проис­ходит реже, чем у животных. Обмен генетическим матери­алом, за которым следует рекомбинация, происходит между организмами одного и того же или близких видов. Все живые организмы обладают рестрикционными эндонуклеазами, которые узнают чужеродную ДНК, проник­шую в организм, и расщепляют ее, таким образом сводя на нет генетическую рекомбинацию между эволюционно удаленными геномами.

Обмен генами, равно как и введение в клетку гена, принадлежащего другому виду, можно осуществить по­средством генетической рекомбинации in vitro*.* Этот подход был разработан на бактериях, в частности на кишечной палочке, в клетки которой вводили гены животных и человека и добивались их репликации.

Метод рекомбинации in vitro заключается в выделении ДНК из разных видов, получении гибридных молекул ДНК и введении рекомбинантных молекул в живые клетки с тем, чтобы добиться проявления нового признака, например синтеза специфического белка.

Выделение генов, которые представляют собой сегмен­ты ДНК, осуществляется на основе биохимических мето­дов; сложность выделения зависит от величины генома. В то время как определенный ген вируса выделить относи­тельно просто, для гена человека это очень сложная задача. Поэтому исследователи прибегают к косвенному методу, основанному на выделении информационной РНК (мРНК). В клетках животных транскрипция мРНК на ДНК осуществляется в клеточном ядре; молекулы мРНК переносят информацию из ядра в цитоплазму, где она используется при трансляции белков, аминокислотные последовательности которых закодированы в последова­тельностях нуклеотидов мРНК

(т. е. в конечном счете в ДНК). В клетках бактерий (прокариот), которые не имеют ядра, транскрипция и трансляция происходят одновремен­но и сопряжены; мРНК связана с рибосомами, в которых осуществляется соединение аминокислот с образованием белков. Рибосомы играют ключевую роль в трансляции и в клетках животных.

Наряду с информацией о структуре белков (записанной с помощью генетического кода) молекула ДНК содержит ряд регуляторных сигналов, записанных в виде специфи­ческих нуклеотидных последовательностей. Эти сигналы служат точками начала транскрипции или трансляции, другие (в частности, между генами) указывают точки прекращения считывания генетической информации. Гене­тический код, по-видимому, универсален для всех живых организмов, иными словами, данная последовательность ДНК обязательно кодирует один и тот же белок в клетках разных организмов, тогда как регуляторные сигналы в клетках животных и в бактериальных клетках не одинако­вы. В клетках животных информация о структуре белка может кодироваться не одним непрерывным участком ДНК, а несколькими сегментами, разделенными участка­ми ДНК, носящими название нитронов. Информационная РНК, которая транскрибируется с ДНК, подвергается расщеплению, в ходе которого все интроны удаляются из ее последовательности, а остальные остающиеся фрагмен­ты, или экзоны, сшиваются вместе с образованием моле­кулы мРНК, которая обладает последовательностью, ко­дирующей последовательность аминокислот белка, а так­же содержит ругуляторные сигналы, необходимые для начала и прекращения процесса трансляции.

Для экспрессии в бактериальной клетке генаиз клеткиживотного необходимо, чтобы в клетку была введена молекула ДНК с последовательностью нуклеотидов, коди­рующей белок, из которой интроны уже удалены; иными словами, нужна молекула ДНК, синтезированная на соот­ветствующей мРНК обратной транскриптазой. Более того, регуляторные сигналы должны быть похожи на таковые бактериальной клетки. Наконец, для получения нужного белка в достаточных количествах бывают необходимы дополнительные изменения бактериальной клетки.[2]

## Методы введения ДНК в бактериальные клетки

Для введения ДНК (генов) в клетки бактерий исполь­зуются два метода. Первый основан на применении плазмиды в качестве вектора.

В начале 1950-х гг., вскоре после открытия Ледербергом процесса конъюгации Escherichia coli*,* было установ­лено, что типы «спаривания» клеток бактерий обусловле­ны генетически и что генетическая информация перено­сится из клеток мужского типа в клетки женского типа, или реципиентные клетки. Способность служить донорными клетками (или фактор плодовитости F) передавалась при конъюгации значительно чаще, чем любой другой генетический признак. F-фактор передавался также неза­висимо от любого другого известного гена донорной клетки. Ледерберг подметил, что F-фактор напоминает внехромосомные генетические элементы, имеющиеся в цитоплазме высших организмов. Это наблюдение позволи­ло ему в 1952 г. присвоить подобным внехромосомным генетическим системам общее название—плазмиды.

В 1953 г. Хэйс, который в то время работал в больнице Хаммерсмита в Лондоне, установил, что в определенных условиях F-фактор может оказаться сцепленным с генети­ческими маркерами и индуцировать последовательный их перенос в ходе конъюгации. F-фактор присоединяется к бактериальной хромосоме в специфическом участке (сайте); именно в этой точке хромосома разрывается при конъюгации и начинается ее перенос в реципиентную клетку. F-фактор способен также отделяться от хромосо­мы, захватывая подчас небольшие фрагменты хромосомы; поэтому его можно рассматривать как виехромосомный элемент, который иногда интегрирует в хромосому.

Жакоб и Вольман, сотрудники Института Пастера в Париже, отметили сходство в поведении F-фактора, уме­ренного бактериофага X, и другой плазмиды—Со1Е1 (которая кодирует колицин—белок, убивающий клетки *Е. coli )*. Для обозначения генетического элемента, который может реплицироваться либо в свободном состоянии, либо соединившись с бактериальной хромосомой, они предло­жили новый термин—«эписома».

В 1959 г. в Японии при исследовании больных бактери­альной дизентерией, которые не поддавались лечению обычно эффективными антибиотиками, было сделано за­мечательное открытие. В клетках патогенных бактерий *(Shigella dysenteriae)* были найдены гены, придававшие им устойчивость одновременно к нескольким антибиотикам; такая устойчивость передавалась другим кишечным бакте­риям во многом подобно тому, как передается F-фактор. Эти факторы устойчивости (называемые R-факторами) обладали сходством с F-фактором; так, они были способ­ны индуцировать передачу самих себя от клетки к клетке при конъюгации. Позже удалось показать, что некоторые из них содержат последовательности нуклеотидов, близ­кие к таковым F-фактора.

В начале 1960-х гг. Новик обнаружил подобные факто­ры устойчивости у стафилококков; они содержали ген, кодирующий фермент пенициллин-β-лактамазу, или пенициллиназу; последняя расщепляет пенициллин и таким образом обеспечивает устойчивость к этому антибиотику. R-факторы стафилококков, по-видимому, не способны обеспечивать передачу самих себя посредством конъюга­ции и переносятся лишь пассивно в процессе трансдукции, т. е. при их встраивании в ДНК бактериофага. Это открытие указывало на наличие нескольких R-факторов в клетках кишечных бактерий.

К середине 1960-х гг. стало очевидным, что большин­ство R-факторов кишечных бактерий и стафилококков (как и плазмида Со1Е1) отличаются от F-фактора и фага λ тем, что остаются внехромосомными элементами;их обратимого встраивания в хромосому клетки не происхо­дит. В строгом смысле они не соответствовали определе­нию эписомы. В 1963 г. Новик предложил пользоваться предпочтительно термином «плазмида», как более общим, а не «эписома». В настоящее время термин «плазмида» является общепринятым.

Плазмиды найдены почти у всех видов бактерий. Штамм, содержащий плазмиду, способен давать начало вариантам, у которых плазмида утрачена; в подобных случаях плазмида теряется окончательно, клетка не спо­собна ее регенерировать и может только получить ее из другой бактериальной клетки.

Плазмиды представляют собой кольцевые молекулы ДНК, по размеру соответствующие 1—3% генома бакте­риальной клетки, однако даже столь малая часть наслед­ственного аппарата кодирует важные генетические призна­ки, которые обычно сама бактериальная хромосома не кодирует. Например, они содержат информацию, необхо­димую для конъюгации бактериальных клеток, ими обус­ловлен ряд заболеваний растений и животных. Они позво­ляют клеткам использовать многие сложные соединения в качестве источников питания и обеспечивают устойчи­вость к разнообразным токсичным агентам, особенно к антибиотикам. Плазмиды стафилококков несут гены устойчивости к пенициллину, соединениям ртути и ряду тяжелых металлов, вызывающих летальный эффект (со­лям сурьмы, висмута, кадмия и свинца, ионам арсената и арсенита). Гены устойчивости к тяжелым металлам обна­ружены также в составе R-плазмид *Е. соli*. Наличием плазмид обусловлены также некоторые заболевания с выраженной диарреей, стафилококковый импедиго, створаживание молока и превращение его в сыр молочно­кислыми бактериями, а также разнообразные биохимиче­ские реакции, характерные для бактерий рода *Pseudomonas..*  Плазмиды могут управлять синтезом инсектицида в клетках Bacillus thuringiensis [2]. Использование плазмид в качестве векторов для введения чужеродных генов в бактериальные клетки начиная с 1975 г. послужило толчком для интенсивных исследований их структуры и характера репликации.

Количество плазмид в клетке может колебаться от одной до более сотни; в целом чем крупнее плазмида, тем меньше количество ее копий в клетке. Обычно репликация плазмиды регулируется независимо от репликации хромо­сомы. Поскольку плазмиды могут различаться по количеству копий водной и той же клетке, количество копий ; должно определяться регуляторной системой, присущей самой плазмиде. Такая система была описана в 1972 г. датчанином Нордстрёмом из Университета Оденсе для плазмиды R1 *Е. со1i;* сходные регуляторные системы были найдены у плазмид стафилококков. Количество копий плазмиды R1 зависит, по-видимому, от белка или белков, которые подавляют ее репликацию. Сегмент ДНК длиной не более двух тысяч пар нуклеотидов управляет реплика­цией плазмиды, которая более чем в 50 раз его крупнее.

Долгое время считалось, что генетическая конституция всех клеток данного вида одинакова и не изменяется в течение длительного времени, однако, как оказалось, значительная часть генетических признаков, причем не только у бактерий, но и у высших организмов, нестабильна (эти признаки имеются в одних клетках или штаммах и отсутствуют в других,, клетки могут терять их и приобре­тать вновь) и мобильна (способна переноситься между клетками или перемещаться в одной и той же клетке из одного локуса в другой). Такая нестабильность объясняетcя тем, что эти признаки определяются плазмидами и тугими атипичными генетическими системами.

При конъюгации бактериальных клеток может проис­ходить обмен плазмидами между бактериями, принадлежащими к разным видам и даже родам, которые не способны обмениваться генами, находящимися в хромосомах. Наконец, такой обмен может приводить к переносу генов, находящихся в плазмиде, из одного вида в другой при совместном росте и конкуренции, в результате чего реципиентные клетки приобретают способность выживать за счет донорных клеток. Эти свойства показывают, что плазмиды способны к выживанию независимо от судьбы содержащих их клеток, они не только не снижают общей приспособленности клетки, но, напротив, снабжают ее дополнительными адаптивными функциями. В самом деле, плазмиды обладают способностью включать в себя новые гены, а уже содержащиеся в них гены «перетасовывают» так, что это, с одной стороны, не влияет на эффектив­ность репликации самих плазмид, а с другой—наделяет клетку резервуаром генетической информации, которую она использует по мере надобности.

Второй метод, которым исследователи пользуются для введения гена в бактериальные клетки, основан на приме­нении бактериофага в качестве вектора. Ген встраивают в геном вируса (который содержит 10—50 генов), и он реплицируется вместе с генами вируса при размножении последнего в бактериальной клетке.[2]

## Достижения генной инженерии.

Группа Кораны синтезировала ген аланиновой тРНК дрожжей, структура которого к тому времени была пол­ностью расшифрована. Этот ген длиной 77 п. н. не содер­жал регуляторных последовательностей и поэтому не обла­дал функциональной активностью. Позднее та же группа авторов синтезировала первый функционально активный ген — ген супрессорной тирозиновой тРНК *Е. coli* длиной около 200 п. н.

 Генная инженерия открыла путь для производства продуктов белковой природы путем введения в клетки микроорганизмов искусственно синтезированных коди­рующих их генов, где они могут экспрессироваться в составе гибридных молекул. Первой удачной попыткой такого рода стала работа К. Итакуры и Г. Бойера с соавторами (1977) по экспрессии в *Е. coil* химически синтезированного гена, кодирующего гормон млекопитаю­щих — соматостатин. Ген соматостатина был получен на основе сведений о первичном строении этого пептидного гормона, состоящего всего из 14 аминокислот. Исполь­зованный в этой работе подход оказался весьма перспек­тивным для получения и многих других пептидных гормонов.

В различных лабораториях в СССР и за рубежом были созданы штаммы *Е. coli,* синтезирующие в составе гибрид­ных белков гормон роста человека (соматотропин), пептидные гормоны — брадикинин и ангиотензин, нейропептид лей-энкефалин и др.

Ген гормона роста человека длиной 584 п. н.— наиболее длинный из искусственно синтезированных в настоящее время. Он был встроен в плазмиду, реплицирующуюся в *Е. coli* под контролем промотора триптофанового оперона. Трансформированные полученной химерной плазмидой клетки *Е. coli* продуци­ровали при индукции промотора около 3 млн. молекул гормона роста человека в расчете на клетку. Этот полипептид, как было установлено в экспериментах на крысах с удаленным гипофизом, по функциям оказался полностью идентичен гормону роста человека.

В 1976 г. Гилберт и Максам в Гарвардском университете, а также Сэнгер разработали быстрый метод химического анализа ДНК; появилась реальная возможность опреде­лять последовательность до 1000 нуклеотидов в неделю силами одного исследователя. В 1982—1985гг. стало возможно создать прибор для автоматического анализа нуклеиновых кислот (а значит, генов). Анализ ДНК позволяет дедуцировать, основываясь на генетическом коде, аминокислотные последовательности белков, синтез которых находится под контролем соответствующих ге­нов. С помощью созданного в результате совершенствова­ния анализа белков микроанализатора Худа— Ханкепиллера (Калифорнийский технологический инсти­тут, 1980) за день удается определять последовательность из 100—200 аминокислот, причем для этого требуется всего 10 нг белка (1 нг=10 -9 г)2 [2].

Еще один важнейший этап—это синтез биополимеров по установленной структуре. Первые коммерческие приборы, производящие автоматизированный синтез полипептидов, были разработаны на основе исследований Меррифилда в 1963 г. Они используются в исследовательских лаборато­риях и в фармацевтической промышленности.

Метод химического синтеза генов обеспечил также возможность получения штаммов бактерий продуцентов инсулина человека, важного лечебного препарата для больных диабетом. «Ген инсулина синтезировали в вида более 40 в основном шестичленных олигонуклеотидов, которые затем объединяли в единую структуру с помощью ДНК-лигаэы. Полученные двух цепочечные полинуклеотиды длиной 271 и 286 пар оснований были встроены в плазмидные векторы. Туда же были встроены и регуляторные участки ДНК, обеспечивающие экспрессию гиб­ридных молекул. Клонированные гены кодировали синтез проинсулина, который путем несложной химической обработки можно превратить в активный инсулин, вклю­чающий две полипептидные цепи А и В из 21 и 30 аминокислотных остатков, соединенных между собой сульфгидрильными связями»[4].

Таким способом получены и клонированы гены, коди­рующие глобины человека, животных и птиц, белок хруста­лика глаза быка, яичный белок, фиброин шелка, проду­цируемый тутовым шелкопрядом, и др. Этот же принцип был применен для получения, клонирования и экспрессии генов интерферона человека в бактериях. Интерферон — ценный лекарственный препарат, широко используемый для борьбы с вирусными инфекциями и лечения ряда других заболеваний, включая злокачественные опухоли. Интерферон вырабатывается в клетках животных и че­ловека, но обладает выраженной видоспецифичностью. Ю. А. Овчинников и В. Г. Дебабов с сотрудниками по­лучили микроорганизмы, эффективно синтезирующие интерфероны человека. Этим исследователям удалось сконструировать рекомбинантные плазмиды, обуславли­вающие синтез интерферона человека в *Е. coli* (рис. 16.2). Очищенный из клеток бактерий интерферон по своим физико-химическим и биологическим свойствам оказался близок интерферону, находящемуся в крови доноров. За счет введения в векторную плазмиду сигнальных после­довательностей, инициирующих синтез иРНК и белка, удалось получить бактерии, способные синтезировать до 5 мг интерферона а расчете на 1 л суспензии бактерий. Это в 5000 раз больше, чем содержится в 1 л крови доноров. Замена *Е. coli на* микробы некоторых других видов позво­ляет еще больше увеличить производительность такой «фабрики интерферона».

В 1980 г. Итакура создал первый синтезатор генов. Вскоре после этого компания «Био-Лоджикалс» (Торонто) выпустила прибор, сконструированный Огилви в Универ­ситете МакГилла в Монреале; прибор был способен в течение 6 ч синтезировать 12-членный олигонуклеотид с заданной последовательностью. В 1981 г. Худ, изобрета­тель белкового микроанализатора, создал другой автомат, выпускаемый фирмой «Генетик инстраментс».

Компания «Био-Лоджикалс» намеревалась до конца 1982 г. выпустить две модели синтезаторов олигонуклео­тидов—одну полуавтоматическую, а вторую в комплексе с компьютером. В 1982 г. цена этих приборов на американ­ском рынке составляла 36000—39500 долл.[2].

К открытиям связанным с достижениями генной инженерии нужно прибавить то, что огромный генетический «чертеж» многоклеточного существа просчитан полностью. Я думаю это можно назвать достижением века.

 После восьми лет работы многих исследовательских групп удалось точно определить 97 миллионов пар нуклеотидов и их местонахождение в спирали ДНК, хранящей полную наследственную информацию микроскопического червячка **Сaenorhabditis elegans** длиной около миллиметра Хотя это очень маленький червь, скорее червячок, с него без всякого преувеличения начинается новая эра в биологии. Геном этой нематоды состоит из 97 миллионов пар нуклеотидов ДНК, округленно 0,1 миллиарда пар. Геном человека, согласно большинству оценок, - 3 миллиарда нуклеотидных пар. Разница в 30 раз. Однако именно эта работа, о которой идет речь, окончательно убедила даже самых закоренелых скептиков, что расшифровка строения всего генома человека не только возможна, но и достижима в ближайшие годы.

В лабораториях мира полным ходом идет расшифровка генома человека. Эта международная программа была начата в 1989 году, тогда же благодаря инициативе и энергии выдающегося биолога, ныне покойного академика А. А. Баева, к программе подключилась и Россия. В феврале этого года в Черноголовке под Москвой прошла конференция "Геном человека-99", посвященная десятилетию начала этих работ и памяти их инициатора, руководившего российской частью программы первые пять лет. Сейчас в разных странах мира, в лабораториях, разделивших между собой "фронт работ" (всего надо прочитать около трех миллиардов пар нуклеотидов), ежедневно расшифровывается более миллиона нуклеотидных пар, причем темп работ все ускоряется.[6]

Расшифровка, или, как говорят биологи, секвенирование, генома C. elegans была осуществлена по совместному проекту двумя исследовательскими группами: из Центра геномного секвенирования Вашингтонского университета (США) и Сенгеровского центра (Кембридж, Англия). В журнале "Science" от 11 декабря 1998 года опубликована серия статей, подробно рассказывающая об этой поистине грандиозной работе.

Естественно, расшифровать геном таких гигантских размеров, как у названной нематоды (напомню: 97 миллионов пар нуклеотидов ДНК), невозможно без огромной подготовительной работы. Ее в основном завершили к 1989 году. Прежде всего была построена физическая карта всего генома нематоды. Физическая карта представляет собой небольшие участки ДНК известной структуры (маркеры), расположенные на определенных расстояниях один от другого.

И вот с 1990 года началось само секвенирование. Его темп составлял в 1992 году 1 миллион пар нуклеотидов в год. Если бы такой темп сохранился, на расшифровку всего генома понадобилось бы почти 100 лет! Ускорить работы удалось простейшим способом - число исследователей в каждом центре возросло примерно до 100. По мере того, как раскрывалась нуклеотидная последовательность ДНК

C. elegans, пришлось расстаться с двумя заблуждениями. Во-первых, оказалось, что генов у нее не 15 тысяч, как предполагали вначале, а 19099. Во-вторых, надежда на то, что гены сосредоточены в середине хромосом, а к концам сильно редеют, оправдалась лишь отчасти, гены распределены вдоль хромосом относительно равномерно, хотя в центральной части их все-таки больше.

Если у дрожжей функция половины генов в геноме неизвестна (так называемые молчащие гены), то у червя эта доля еще больше: из 19 тысяч генов 12 тысяч остаются пока загадочными.

Значение секвенирования генома нематоды, конечно, выходит далеко за рамки того, что можно назвать полигоном для расшифровки генома человека. C. elegans - первый многоклеточный организм, геном которого раскрыт практически полностью. Можно напомнить: два года назад был расшифрован первый геном эукариотического организма - дрожжей, то есть организма, клетки которого содержат оформленные ядра. (К эукариотам относятся все высшие животные и растения, а также одноклеточные и многоклеточные водоросли, грибы и простейшие. Дрожжи, согласно биологической систематике, относятся к одноклеточным грибам.) Иначе говоря, за два года был пройден путь от генома одноклеточного до генома многоклеточного организма.

Программа "Геном человека", как уже говорилось, - программа общечеловеческая. Каждая лаборатория, в какой бы стране она ни находилась, вносит в нее посильный вклад. И как только кому-то удается раскрыть структуру нового гена, эта информация немедленно поступает в Международный банк данных, доступный каждому исследователю. В России по этой программе работают около 100 исследовательских групп.[6]

# Молекулярная геномика.

Особо мне хотелось бы отметить изменения в медицине происходящие за счет достижений генной инженерии. Наступающий ХХI век многие провозглашают веком генетики. Современную генетику, изучающую химические механизмы наследственности, называют молекулярной геномикой.Сегодня молекулярная геномика - приоритетное направление научных исследований. Она влияет на развитие науки в целом и здравоохранения и медицины в частности. Молекулярная геномика создала предпосылки решения таких ключевых вопросов современной науки, как происхождение человека (филогенез), возникновение рас и наций, пути их расселения по планете (этногенез), развитие организма из одной единственной клетки (онтогенез), проблема клонирования млекопитающих и человека."Генетизация" общества происходит буквально на наших глазах. А это, в свою очередь, не может не привести к качественным изменениям и в медицинской науке: в ней наступает эпоха молекулярноймедицины.Молекулярная медицина это - диагностика, лечение и профилактика наследственных и ненаследственных болезней на генном уровне.

Уже в подходе к постановке диагноза молекулярная медицина принципиально отличается от обычной. Главный вопрос традиционной медицины: "Чем вы болеете?", а молекулярной: "Чем вы можете заболеть при вашем геноме?". То есть молекулярная медицина выявляет генетическую предрасположенность человека к различным болезням.

Следующая отличительная черта молекулярной медицины - лечение заболеваний (как наследственной, так и ненаследственной природы) проводится на генном уровне. В качестве лекарственного препарата выступают гены (точнее - специальные генетические конструкции). Генная терапия не просто устраняет определенные симптомы заболевания, а корректирует функции клеток и организма в целом. Её терапевтический эффект может достигаться различными путями: замена "больного" гена на "здоровый", направленная коррекция структуры и, соответственно, функции "больного" гена, частичное или полное подавление "больного" гена.

И, наконец, еще один важный принцип молекулярной медицины: любое медикаментозное лечение должно подбираться строго индивидуально, учитывая особенности генома больного. Этим занимается недавно возникшая наука - фармакогенетика.

Уже сегодня практическое применение молекулярной медицины весьма разнообразно. Это - и молекулярная диагностика наследственных заболеваний на любой стадии развития организма, в том числе и до рождения (пренатальная диагностика), и определение генов предрасположенности к некоторым распространенным болезням, и геномная "дактилоскопия" - точная идентификация личности на основе анализа особенностей структуры его генома (именно этот метод был с успехом применен при генетическом анализе останков царской семьи).

В геноме человека насчитывается 35-50 тысяч различных генов, изменения в некоторых из них приводят к нескольким тысячам наследственных болезней. Гены практически всех наиболее частых (около 320) и сравнительно редких (около 170) наследственных болезней уже известны. Методы их обнаружения достаточно просты и универсальны и поэтому широко применяются в медицине.

Сейчас у нас в стране можно определить около 40 наиболее тяжелых наследственных болезней. Молекулярная диагностика генов наследственных болезней проводится в НИИ акушерства и гинекологии в Санкт-Петербурге, в Научном центре медицинской генетики и Институте неврологии РАМН в Москве, в Институте биохимии и генетики научного центра РАН в Уфе, в Институте медицинской генетики в Томске и в Медико-генетическом центре в Новосибирске.

Методы молекулярной диагностики позволяют выявить не только гены наследственных болезней, но и гены предрасположенности к тому или иному заболеванию. Гены предрасположенности - объект исследования многих научных групп по всей России. Так, в Санкт-Петербурге на кафедре медицинской генетики Педиатрической академии активно изучаются гены предрасположенности к тромбофилии, варикозному расширению вен, сердечно-сосудистым заболеваниям, диабету, атеросклерозу; в Институте экспериментальной медицины РАМН исследуются гены гиперхолестеринемии, приводящие к атеросклерозу и хроническим заболеваниям легких и печени, а в НИИ онкологии имени профессора Н. Н. Петрова - гены предрасположенности к опухолям легких и молочной железы. Работы по этой тематике проводятся в Москве: во Всероссийском кардиологическом центре РАМН, в Институте молекулярной генетики РАН и во Всероссийском онкологическом центре РАМН, а также в Томске - в Институте медицинской генетики.

Молекулярная геномика уже применяется в Европе и Соединенных Штатах для решения разнообразных задач медицины и медицинской генетики. Например, в Великобритании созданы информационные центры, и каждый, позвонивший туда, может получить консультацию по любым вопросам, касающимся своей наследственности и генетической предрасположенности к различным заболеваниям. Во Франции создана и используется на практике компьютерная экспертная система Сезам (SESAM - Systeme Expert Specialisee aux Analyses Medicales) для определения склонности человека к различным заболеваниям. Она включает собственно экспертную систему оценки риска возникновения заболевания, основанную на многочисленных лабораторных (иммунологических, биохимических, серологических и генетических) тестах (более 80), программу для обучения врачей основам молекулярной медицины, медицинское консультирование по результатам лабораторных тестов и популярный справочник для населения. Программа прекрасно зарекомендовала себя во Франции, и хочется верить, что российские медики в недалеком будущем тоже смогут ее использовать.[5]

## Генная терапия.

В настоящее время в мире около 400 проектов по генной терапии находятся на различных стадиях клинических испытаний: 261 из них проходит первую стадию (оценка токсичности), 133 - вторую (испытание на небольшой группе тяжелобольных пациентов) и только 3 проекта (два по лечению рака мозга и один по гемофилии) - на заключительной третьей стадии (масштабные клинические испытания). Пока генная терапия применяется в основном в онкологии (более 60% проектов). Примерно по 15% приходится на генную терапию инфекционных (СПИД, гепатит В, туберкулез) и моно генных заболеваний (муковисцидоз, семейная гиперхолестеринемия, мукополисахаридозы, гемофилия А и др.). Методы генной терапии позволяют лечить различные генетические патологии в период внутриутробного развития. Введенный ген или генная конструкция попадает во множество интенсивно делящихся клеток, предотвращая начало развития заболевания. После такой терапии нет необходимости искусственного прерывания беременности - ребенок рождается здоровым. Но тем не менее вопрос о ее целесообразности поднимается все чаще и чаще - теоретически существует опасность внедрения искусственных генных конструкций в геном половых клеток, что может привести к "засорению" генофонда.

Генная терапия успешно применяется для лечения не только наследственных, но и значительно более распространенных мультифакториальных болезней (диабет, остеопороз, ревматоидный артрит, различные опухоли). Для лечения таких заболеваний применяется не одна, а сразу много генетических конструкций, исправляющих дефекты различных стадий течения патологического процесса.

К сожалению, из всех проектов по генной терапии, утвержденных Американским и Европейским комитетами по генной терапии, нет ни одного проекта из России или стран СНГ. Тем не менее научные работы в этой области ведутся и в России. В Институте акушерства и гинекологии имени Д. О. Отта РАМН разрабатываются новые подходы к генной терапии таких тяжелых наследственных заболеваний, как мышечная дистрофия Дюшенна и муковисцидоз. Работы по генной терапии также проводятся в научных учреждениях Москвы (Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, Институт молекулярной генетики РАН, Институт медицинской химии РАМН, Научный центр медицинской генетики РАМН) и Новосибирска.[5]

# Биотехнологические и генно-инженерные компании и их разработки.

## Компании США

С 1978 г. федеральное правительство США поддержи­вает различные биотехнологические исследования, особен­но связанные с рекомбинантными ДНК. Национальный институт здоровья заключил 365 контрактов по исследова­ниям в этой области на общую сумму 42 млн. долл. 19 университетов трех регионов—Гарварда, Станфорда и Великих озер (где находится Висконсинский универси­тет)—проводят фундаментальные исследования, связан­ные с развитием биотехнологии. В 1975—1980 гг. в 25 компаний, занимающихся генной инженерией, было вложено свыше 266 млн. долл. Компании использовали патенты и результаты исследований, выполненных в университетах США. По данным нью-йоркской фирмы «Эберстадт и Кº» и Бюро налогообложения промышлен­ной деятельности, в конце 1979 г. в стране насчитывалось не более 14 компаний по генной инженерии. На 20 января 1982 г. таких фирм было уже 145. (См. приложение 2)

В большинстве случаев биотехнологические компании появлялись при объединении одного-двух исследователей с предприимчивым предпринимателем, готовым рискнуть. Ученые вкладывали в этот союз свои идеи и опыт, предприниматель—необходимые средства. На следующем этапе в финансирование компаний включались промыш­ленные группы, при этом происходил убыстряющийся рост числа все более авторитетных вкладчиков. Наконец, наступал момент, когда акции компаний начинали котиро­ваться на бирже. В случае фирмы «Генентек» это про­изошло на пятый год существовании компании, «Цетус» — на десятый.

Особых успехов в применении и разработке техноло­гий, связанных с рекомбинантными ДНК, достигли четыре фирмы: «Цетус», «Генентек», «Генекс» и «Биоген».

Старейшая из них—«Цетус» была основана в Беркли (шт. Калифорния) Д. А. Глазером, Нобелевским лауре­атом в области физики, и биохимиком Кейпом. Они ставили перед собой задачу отобрать наиболее продуктив­ные микроорганизмы для промышленного применения.

Первоначально были использованы традиционные методы генетической селекции, затем ведущую роль в деятельно­сти компании заняли методы генной инженерии. Научную работу компании по данной проблематике возглавил гене­тик Дж. Ледерберг. В области органической химии фирма «Цетус» сосредоточила усилия на разработке методов превращения этилена и пропилена в окиси и гликоли с использованием иммобилизованных ферментов и клеток. Созданные фирмой технологии с применением биокатали­заторов были дешевле, тогда как традиционные процессы на основе металлических катализаторов требовали высо­ких температур и давлений. Для промышлен­ного получения указанных веществ совместно с корпора­цией «Стандарт ойл» было запланировано создание опыт­ного производства. «Цетус» разрабатывает также техноло­гию производства высококачественных смазочных матери­алов, получаемых из нефти с помощью микроорганизмов и призванных заменить жир кашалота. Стоимость таких веществ составляет сотни миллионов долларов. Пользуясь методами генной инженерии, компания разработает осо­бые смолы для извлечения остатков нефти из истоща­ющихся скважин. Совместно с «Нэшнл дистеллерс» «Це­тус» разработала непрерывный процесс конверсии сахара в этиловый спирт. Для этого отобран выведенный иссле­дователями фирмы высокопродуктивный штамм дрожжей. Помимо перечисленных направлений фирма «Цетус» зани­мается синтезом фармацевтических веществ, таких, как интерферон, фактор свертывания крови VIII и белки одноклеточных организмов. Фирма располагает очень большой лабораторией, работающей в условиях высокой степени биологической безопасности.

В 1980 г. пакет акций компании «Цетус» оценивался в 100 млн. долл. 61% акций принадлежал фирмам «Стандарт ойл Калифорния», «Стандарт ойл Индиана» и «Нэншл дистиллерс», владельцами 39% акций были основатели «Цетус» и примерно 200 мелких вкладчиков. К тому времени фирма насчитывала 250 сотрудников, из них 35 имели докторскую степень.

Компания «Генентек» также находится в Калифорнии, в прибрежной зоне Сан-Франциско. Ее основали Свонсон (президент и главный администратор) и Бойер (профессор биохимии университета в Сан-Франциско, который стал вице-президентом). Первоначальный капитал компании со­ставлял 1 млн. долл. К 1980 г. в ней уже работало 70 специалистов, 30 из них со степенью доктора. По контрактам с компанией работает примерно такое же число консультантов. Внушительные успехи, достигнутые в синтезе соматостатина, инсулина, гормона роста челове­ка и интерферона, во многом объясняются успешным сотрудничеством с выдающимися университетскими уче­ными и тем, что исследователи являются одновременно акционерами компании

По свидетельству газеты «Уолл-стрит джорнал», пер­вый день появления на бирже акций компании «Генентек» можно было назвать одним из наиболее впечатляющих дебютов современного делового мира. Компания выпустила 1 млн. акций стоимостью 20—30 долл., но ажиотаж вокруг них был столь велик, что исходная продажная цена составила 35 долл. В октябре 1980 г. были выпущены еще 100 000 акций. Общий капитал компа­нии составил 36 млн. долл. Во время бурного первого дня продажи более половины акций были отданы первоначаль­ными покупателями по 80 долл. за акцию; затем сто­имость акций опустилась до 71 долл. Поскольку компания владеет 7,5 млн. акций, ее капитал оценивали более чем в 500 млн. долл. (по осторожным оценкам, 180—300 млн. долл.).

Два основателя компании имеют по 1 млн. акций каждый (15%). Наиболее крупный акционер, фирма «Лаб-ризол, инк.» (Кливленд), приобрела 1,5 млн. акций всего по 10 долл. за штуку (24%). На долю фирмы «Клейнер и Перкинс» приходится почти 1 млн. акций (14%), а «Уил-мингтон секьюритис, инк.» обладает менее чем 500000 ак­ций (6,2%). Остальные акции распределены между науч­ным персоналом и директоратом компании «Генентек».

По данным, представленным в пресс-релизах компании в августе 1980 г., прибыль за первую половину текущего года составила 3,8 млн. долл. по сравнению с 3,4 млн. долл. за тот же период в 1979 г. Большую часть прибыли обеспечили исследовательские контракты с фирмой «Эли Лилли», шведской компанией «Каби витрум» и француз­ской «Хофман—Ла Рош». Контракты предусматривали разработку технологии получения коммерческого инсули­на, гормона роста человека и интерферона соответствен­но. По заявлению представителей «Генентек», во второй половине 1980 г. прибыль от контрактов должна была составить 2,7 млн. долл.

В апреле 1982 г. фирма «Корнинг гласе» (шт. Нью-Йорк) заявила о покупке в течение двух лет 571 000 акций (по цене 35 долл. за штуку) фирмы «Генентек» на сумму 20 млн. долл. Эта сумма составляет примерно 6% всего капитала «Генентек». Новые вложения послужили толчком к созда­нию дочерней компании «Гененкор, инк.», которая специа­лизировалась на разработке, получении и продаже ферментов, иммобилизованных на инертных носителях для исполь­зования в пищевой промышленности. «Корнинг гласе» передала новой компании фирму «Энзим дивижн», приобре­тенную у американской фирмы «Ром и Хаас» в 1981 г.

Группа «Корнинг гласе», связанная со стекольной промышленностью с момента, ее создания в конце прошло­го века, с 1965 г. начала специализироваться в области биотехнологии. Ее отделение «Корнинг биосистемз» про­изводит ферменты и микроорганизмы, иммобилизованные на стекле или пористой керамике. Продукция фирмы заняла важное место в пищевой и сельскохозяйственной промышленности, особенно в переработке молочной сыво­ротки—побочного продукта сыроварения: В декабре 1981 г. для получения из сыворотки белков и выращива­ния пекарских дрожжей в США была создана фирма «Натрисёрч К°». Для тех же целей в январе 1982 г. произошло объединение «Спешиалист дайри ингредиент К°» и «Милк маркетинг боард». Фирма «Корнинг гласе» совместно с французской «Юньон лэтьер Норманд» плани­ровала создать объединенный филиал во Франции для промышленной переработки сыворотки.

В 1977 г. биохимик Глик и промышленник Джонстон в Роквилле, вблизи г. Бетесда (шт. Мэриленд), основали компанию «Генекс» примерно с 30 исследователями. Науч­ную деятельность компании возглавил Д. Джексон из Мичиганского университета. Компания специализирова­лась на биохимическом получении промежуточных метаболитов. По оценкам, ее актив в 1980 г. превышал 10 млн. долл. Чуть больше трети акций принадлежало основателям и сотрудникам «Генекс», остальные две трети—промышленным фирмам, финансирующим де­ятельность компании («Инновен», созданной совместно фирмами «Монсанто» и «Эмерсон электрик», 25% акций и «Копперс» 30% акций).

Основатели «Биоген» зарегистрировали свою компа­нию ,в Люксембурге, а штаб-квартиру перенесли в Женеву. Инициатива исходила от Д. Адамса из «Интернэшнл никел К°», которой принадлежат 24% капитала «Биоген». Инве­стиции фармацевтической фирмы «Шеринг-Плау» в «Био­ген» составляют 16%. Среди других пайщиков— «Монсанто» и «Дженерал метрополитен». Научную группу в компании составляют в основном европейские ученые. Среди них следует упомянуть Вейсманна из Цюрихского университета, Мюррея из Эдинбургского университета и Хартли из Королевского колледжа в Лондоне. Американ­ские ученые представлены Гилбертом из Гарвардского университета и Шарпом из Массачусетского технологиче­ского института. Штат научных сотрудников компании насчитывает 50 человек. Фонды «Биоген» в 1980 г. исчис­лялись 50 млн. долл. В октябре 1981 г. компания получила дополнительную финансовую поддержку в 20 млн. долл. от банков и страховых компаний, преимущественно ан­глийских. Первая продукция «Биоген» появилась в 1983 г.:

лейкоцитарный интерферон человека, синтезируемый бак­териями, полученными методами генной инженерии, был выпущен в Цюрихе фирмой «Шеринг-Плау». Клинические испытания препарата проводились в Нидерландах. Мюррей успешно клонировал ген поверхностного антигена вируса гепатита В, что явилось важным этапом в создании вакцины против этой болезни. Вакцина была проверена на животных. Фирма «Биоген» договорилась об окончатель­ном ее выпуске на рынок с японской фармацевтической компанией «Грин кросс корп.» (Осака). Проводились также испытания вакцины против ящура. «Биоген», ранее при сбыте своей продукции полагавшаяся на поддержку солидных компаний-производителей, с 1983 г. разрабаты­вает другие методы организации этой деятельности.

В октябре 1981 г. от компании отпочковалась дочерняя фирма, «Биоген, инк.», расположившаяся по соседству с Массачусетским технологическим институтом. Президен­том стал Гилберт, Нобелевский лауреат 1980 г. и профес­сор Гарвардского университета. Он сотрудничал с компа­нией «Биоген» с момента ее учреждения в 1978 г., будучи главой научного совета, а с середины 1979 г. сопредседа­телем Совета директоров. В конце 1982 г. была создана группа из 17 специалистов; ее деятельность была связана с различными биохимическими инженерными процессами, главным образом с разработкой бактериальных методов получения этанола и других веществ. Проводились также исследования области Н-2 генома мыши, в которой сосре­доточены детерминанты основного комплекса гистосовместимости. Соответствующая область генома человека НЬА также явилась предметом изучения специалистов с дальней целью получения веществ, влияющих на дифференцировку тканей. Этой группой ученых численностью в 20 человек руководил Флавел, английский специалист в области клонирования генов, до начала 1982 г. работавший в Национальном институте медицинских исследований в Лондоне.

Наряду с упомянутыми четырьмя компаниями в Кали­форнии, а также в районах Бостона, Бетесды и Нью-Йорка создан целый ряд биотехнологических фирм (см. табл. 2). Кроме того, многие фармацевтические фирмы овладели методами генной инженерии. Исследовательские программы фирмы «Эли Лилли» связаны с ферментацией, сельским хозяйством и медициной. «Пфицер» и «Хоф-ман—Ла Рош» активно работали над созданием интерферона, конкурируя в этом с «Биоген». Фирма «Апджон» сосредоточила свои усилия на улучшении методов броже­ния и производства антибиотиков. Одному из специали­стов фирмы, Фрейзеру, удалось клонировать ген овальбумина цыпленка в кишечной палочке и получить его экспрессию в этом микроорганизме. Лаборатории «Г. Д. Сёрл» вели исследования в области генной инжене­рии в исследовательском центре в Хай Уайкоме (Англия). Исследователи фирмы добились синтеза гемагглютинина вируса гриппа в бактериальных клетках. Компания «Дю­пон де Немур» с 1979 г. проводит исследовательскую программу, связанную с генетикой, включая развитие методов рекомбинантных ДНК. В 1980 г. группа из 10 ученых этой крупнейшей химической компании работала над созданием биотехнологических способов получения белков, фармацевтических средств и других органических соединений.

Фонды генно-инженерных компаний «Цетус», «Генен-тек», «Генекс» и «Биоген» в 1980 г. превышали 400 млн. долл., что гарантировало коммерческую и про­мышленную значимость проводимых ими работ в глазах вкладчиков. Будущее и успешная деятельность этих фирм зависели от роста числа патентов не меньше, чем от разработки крупномасштабных производств и продвиже­ния на рынок собственной продукции. Конкуренция меж­ду фирмами в этой сфере стала еще более жесткой особенно после того, как рекомендации Национальных институтов здоровья, относящиеся к безопасности генно-инженерных исследований, смягчились[2].

## Компании СССР

В СССР широкое развитие исследований в различ­ных сферах биологии относится к началу 1960-х гг., когда был создан ряд институтов: Институт молекулярной био­логии; Институт биоорганической химии им. М. Шемякина (1959); Центр биологических исследований АН СССР в Пущино-на-Оке (расположенный в 100 км к югу от Москвы); новые институты на Урале, в Сибири; институ­ты Академий наук союзных республик; институты фили­алов АН СССР в Казани, Махачкале и Мурманске. Все они сыграли важную роль в усилении научно-исследовательской активности [44]. По инициативе АН СССР создана микробиологическая промышленность, про­изводящая белки одноклеточных организмов, витамины и другие вещества.

После Постановления от 21 мая 1974 г. привлечение больших финансовых и людских ресурсов обеспечило развитие биологии и молекулярной генетики, а также ихприложений в сельском хозяйстве, медицине и промыш­ленности. Исследования, осуществляемые методами ген­ной инженерии, в основном были сосредоточены на производстве гормонов (инсулина), интерферона и моноклональных антител. Важность дальнейшего развития био­технологии была подчеркнута в Генеральном плане эконо­мического и социального развития СССР на 1981—1985 гг. и до 1990 г., который был принят на XXVI съезде КПСС*.*

В июле 1981 г. ЦК КПСС и Совет Министров СССР возложили на Академию наук СССР, Государственный комитет СССР по науке и технике, Госплан и правитель­ства союзных республик задания, связанные с применени­ем биотехнологии в сельском хозяйстве, промышленности и медицине. Развитие фундаментальных исследований поручено АН СССР и заинтересованным министерствам.

В Институте физиологии растений АН СССР им. К. А. Тимирязева и на предприятиях Главмикробиопрома СССР для увеличения производства биологически актив­ных веществ использовали культуры клеток женьшеня и других лекарственных растений. Методы культивирования растительных клеток применяли также для улучшения свойств сельскохозяйственных растений[2].

## Западная Европа

В Западной Европе в 1981 г. насчитывалось около 200 научных коллективов, занятых в 1000 с лишним генно-инженерных проектах. Деятельность 170 компаний в основном или частично связана с биотехнологией. Однако только 20 фирм использовали в своей деятельности наибо­лее современные методы, такие, как генная инженерия, иммобилизованные ферменты и культуры клеток.

В ФРГ имеются старые традиции, связанные с фермен­тационными процессами: производством вина, пива, ацетоно-бутаноловым брожением. Важные мероприятия пра­вительства в начале 1970-х гг. послужили решающим толчком к развитию биотехнологии. Биотехнологическая Программа, сформулированная в 1974 г. и действующая по сей день, посвящена удовлетворению пищевых потребно­стей, решению проблем очистки окружающей среды, улучшению медицинской диагностики и терапии. Кроме того, в программу входят разработка новых источников сырья, увеличение объема прикладных исследований и развитие методов, связанных с биотехнологией.

Общество по изучению биотехнологии, основанное в середине 1960-х гг. фондом концерна «Фольксваген» и впоследствии поддержанное правительством, представляет собой национальный институт, где в основном проводятся фундаментальные исследования. Одновременно сотрудни­ки этого заведения занимаются и прикладными разработ­ками, которые призваны способствовать сближению науки и промышленности. Институт расположен в Брауншвейге, вблизи Ганновера; к концу 1980 г. в нем работали 79 ученых, 101 технический сотрудник и 23 специалиста с докторской степенью. Деятельность института связана преимущественно с генной инженерией и биореакторами. Исследования микробного разложения целлюлозы и работы по получению метана проводятся в Иссле­довательском центре «Юлих» неподалеку от Центра атом­ных исследований.

В 1974—1981 гг. в биотехнологическую программу ФРГ вложено 267 млн. марок, что в десять раз превышает инвестиции в Англии и во Франции. Государственные субсидии, составлявшие в 1982 г. 65,9 млн. марок, в последующие годы были значительно увеличены. Основ­ное внимание по-прежнему сосредоточено на микробиоло­гических исследованиях, в которые вложено 40% всех средств. В первую очередь это относится к работам по совершенствованию техники культивирования, созданию коллекции штаммов и к генной инженерии.[2].

В Великобритании в конце 1960-х гг. в исследования по ферментной технологии было вложено 500 000 ф.ст, что позволило разработать ряд промышленных процессов с иммобилизованными ферментами. Наибольшую важность из них имели получение фруктозы и деацилирование бензилпенициллина. Поскольку для ферментативных реак­ций помимо самих ферментов необходимы кофакторы, предпочтительно иммобилизировать целые клетки. По мнению ученых университетского колледжа в Лондоне, биотехнологическая промышленность должна ориентиро­ваться на выпуск продукции, обладающей высокой приба­вочной стоимостью, цены на которую мало подвержены рыночным колебаниям (тогда как промышленная перегон­ка сахара в спирт зависит от рыночных цен на сахар, а получение белка одноклеточных организмов определяется ценами на конкурирующую с ним сою).

Работы по генной инженерии, в основном по клонированию генов, проводятся Национальным институтом меди­цинских исследований в Милл-Хилле, вблизи Лондона, и в ряде других лабораторий Медицинского исследовательско­го совета, например в Хиллз-Роуде (Кембридж). Ученые в Милл-Хилле исследуют Н-2 область генома мыши, кото­рая кодирует антигены, определяющие совместимость тканей, а также глобиновые гены[2].

## Международное сотрудничество

Международное и региональное сотрудничество иг­рает важную роль в определении нужного направления развития биотехнологии, обеспечивая выбор технологий, наиболее пригодных для социальных и экономических условий менее привилегированных стран. Производство биогаза, биоэнергии, дешевых и надежных вакцин—вот области, где можно в короткий срок получить верную выгоду и которые будут служить развитию высококаче­ственных исследований. Кроме того, в этих областях возможно широкое распространение исследований и тех­нологий, развитие которых в настоящее время ограничено всего несколькими странами.

Примером региональной кооперации в биотехнологии может служить Центрально-Американский институт про­мышленных исследований (ICAITI). Этот институт, распо­ложенный в столице Гватемалы, был создан в 1955 г. для содействия промышленному развитию региона, который в состоянии обеспечить самостоятельное развитие биопромышленности: сельскохозяйственная промышленность производит большие количества побочных продуктов и отходов, имеются площади, доступные для интенсивного сельского хозяйства, климатические условия благоприят­ствуют такой интенсификации. Исследования и разработ­ки по биологической инженерии начались в ICAITI в 1970 г.; был создан биотехнологический отдел, объединив­ший инженеров-химиков, микробиологов и биохимиков. Отдел является штаб-квартирой Международного центра по исследованию микробных ресурсов (MIRCEN) этого региона, субсидируемого ЮНЕСКО.

Исследовательские проекты института посвящены двум основным видам сельскохозяйственной промышленности региона: переработке кофейных зерен и получению сахара и его производных. В 1981 г. в Центральной Америке производилось 10,6% от общего тоннажа кофе в мире и 2,1% сахара; эти два товара являются важнейшими видами сельскохозяйственного экспорта.

При влажной переработке кофе-бобов липкая оболочка бобов удаляется в процессе естественного брожения в твердой среде в аэробных или анаэробных условиях пектиновыми ферментами самих плодов или микрофлоры, растущей на плодах. Делались попытки использовать мякоть кофейных бобов, слизь, окружа­ющую их зерна, соки и сточные воды от различных процессов переработки кофе для производства биогаза и биомассы. В лаборатории и на опытной промышленной установке проводились опыты с культурами филаментозных грибов [2].

В лаборатории разработан процесс непрерывного про­изводства спирта из соков тропических фруктов и после­дующего полунепрерывного производства уксусной кисло­ты; затем этот процесс был перенесен в промышленные условия. При помощи дрожжевых ферментов, иммобили­зованных на полиуретановой губке, осуществлено произ­водство фруктозных сиропов из сахарного тростника.

Стремясь обеспечить перенос технологий из развитых стран в развивающиеся, ООН запланировала создание Международного центра генной инженерии и биотехноло­гии [2]. На совещании в Вене в феврале 1981 г. под эгидой Организации промышленного развития ООН (UNIDO) группа экспертов по генной инженерии рекомендовала создать комиссию для изучения мнения государств-членов и специалистов относительно организации такого центра, а также его роли и функций.

Комиссия пришла к заключению, что такой центр должен служить интересам как развитых, так и развива­ющихся стран, которые могут внести весомый вклад в развитие генной инженерии и биотехнологии для повыше­ния благосостояния населения. Кроме того, проведение исследовательских работ и внедрение их результатов будут служить превосходной школой для ученых, присланных в центр развивающимися странами. Комиссия экспертов рекомендовала и области исследований, вклю­чая добычу нефти из истощающихся скважин, использо­вание энергии биомассы, усовершенствование методов ферментации, разработку более эффективных вакцин для человека и домашних животных, выделение или синтез лекарств против тропических болезней, селекцию сортов растений с полезными сельскохозяйственными свойствами и перенос генов азот фиксации в растения. Центр должен состоять из пяти отделов: трех исследовательских (моле­кулярной биологии и биохимии; микробиологии и молеку­лярной генетики; биотехнологии), отдела биоинформатики и отдела общих услуг.

Затем структуру центра обсудили делегаты из развива­ющихся стран. Они пришли к выводу, что помимо распространения адекватных технологий центр должен играть важную роль в качестве базы для обучения специалистов. Его задачей должно также быть решение проблем, общих для менее развитых стран. При центре необходимо создать координационную и информационную сеть.

По данным UNIDO, этот проект встретил теплый прием в развивающихся странах. Вместе с тем ряд руководителей исследовательских работ в этих странах указали, что, прежде чем принимать решение о строитель­стве такого центра, ООН должна укрепить национальные инфраструктуры, особенно в области образования [2].

Нужно также отметить, что на протяжении многих лет программы ФАО, ВОЗ и ЮНЕСКО содействовали разви­тию и расширению международного сотрудничества в прикладной микробиологии и технологии.

Так, в 1962 г. ЮНЕСКО субсидировало создание Меж­дународной организации исследования клетки (ICRO), а в 1972 г. совместно с этой организацией и Программой окружающей среды ООН (UNEP) основало международ­ную программу, призванную охранять генетическое богат­ство микробных ресурсов и сделать их доступными для развивающихся стран. В 1975 г. начала создаваться сеть международных центров по исследованию микробных ресурсов (MIRCEN) со следующими целями: интеграция и сотрудничество между лабораториями, ответственными за управление; распределение и использование микробных ресурсов; сохранение микроорганизмов; разработка новых видов местной и недорогой технологии; приложение микробиологии в сель­ских районах; обучение персонала и распространение информации, связанной с общей и прикладной микробио­логией.

Первым шагом на пути к развитию сети MIRCEN было создание в Брисбене (Австралия) Международного центра данных о микроорганизмах, который обладает огромной коллекцией микробных штаммов и мировым указателем коллекций культур микроорганизмов. В системе MIRCEN имеются и другие центры: в Бангкоке—для Юго-Восточной Азии, в Найроби—для Африки, в Порто-Алегро (Бразилия)—для Южной Америки, в Гватемале— для Центральной Америки, в Каире—для арабских стран. М1КСЕМ на Гавайях посвятил свою работу главным образом азот фиксации у тропических бобовых, а центр в Стокгольме специализируется на разработке медицинских диагностических наборов.

ЮНЕСКО также помогает государствам-членам в фор­мулировании исследовательской политики и в создании проектов по прикладной микробиологии и биотехнологии, в которых основное внимание сосредоточено на обучении специалистов и повышении уровня компетентности, необ­ходимого для выбора наиболее адекватной технологии.

# Заключение

В заключение хочу сказать, что широкое использование микроорганизмов не может не порождать новых взаимоотношений с живой природой, что вполне естественно ведет к желанию осмыс­лить сами эти взаимоотношения и соотнести их со сложившимися представлениями, с одной стороны, о роли живой природы в жизне­деятельности человека, а с другой — о роли человека в биотиче­ском круговороте биосферы. Имеющийся пока не слишком богатый опыт развития биотехноло­гии все-таки содержит в себе много непривычного и вместе с тем многообещающего для возможной оптимизации человеческой жиз­недеятельности. А остро вставшая перед Homo sapiens проблема самосохранения вынуждает его к лихорадочным поискам возмож­ных вариантов стратегии своей жизнедеятельности. Этому привлечению природы, причем именно мира микроорганизмов, и положила начало новая биотехнология.

Можно, видимо, сказать, что биотехнология в совокупности с другими научными направлениями открывает новую эру взаимодействия человека с ок­ружающей средой и особенно с живым веществом биосферы.

 «Явившись прямым результатом научных разработок, биотех­нология оказывается непосредственным единением науки и про­изводства, еще одной ступенькой к единству познания и действования, еще одним шагом, приближающим человека к преодолению внешней и к постижению внутренней целесообразности».[3]

И все-таки только небольшим шагом. Поскольку, как метко заметил Б. Шоу, наука всегда ошибается. Она никогда не разре­шает какой-то проблемы, не создав еще десять новых. Оценивая с этой позиции биотехнологию и весь комплекс наук, ее порож­дающих и обеспечивающих, можно видеть, что и здесь вряд ли мы сможем достичь желанной цели: биотехнология и экологизированная традиционная промышленность слишком отягощены бре­менем предшествующего. Она сама оказывается всего лишь круп­ной индустрией, соединением технических и биологических элемен­тов и, естественно, наследует отрицательные свойства уже суще­ствующего индустриально-промышленного комплекса. Их действи­тельное преодоление и решение проблемы человека предполагают выход человечества на новые, более совершенные ступени социокультурного развития, основанного на новых способах познания и действования.

Поэтому весьма существенное значение приобретает проблема выбора стратегии взаимодействия человека и природы: или это самонадеянное управление природой или же сознательное и целенаправленное приспособление всей жизнедеятель­ной деятельности, к существующему биотическому круговороту биосферы [3].

В результате интенсивного развития методов генетической инженерии получены клоны множества генов рибосомальной, транспортной и 5S РНК , гистонов, глобина мыши, кролика, человека, коллагена, овальбумина, инсулина человека и др. пептидных гормонов, интерферона человека и прочее. Это позволило создавать штаммы бактерий, производящих многие биологически активные вещества, используемые в медицине, сельском хозяйстве и микробиологической промышленности.

На основе генетической инженерии возникла отрасль фармацевтической промышленности, названная «индустрией ДНК». Это одна из современных ветвей биотехнологии.

Для лечебного применения допущен инсулин человека (хумулин), полученный посредством рекДНК. Кроме того, на основе многочисленных мутантов по отдельным генам, получаемых при их изучении, созданы высокоэффективные тест-системы для выявления генетической активности факторов среды, в том числе для выявления канцерогенных соединений.

# Список терминов

Генетическая инженерия - это раздел молекулярной генетики, связанный с целенаправленным созданием новых комбинаций генетического материала

ДНК(дезоксирибонуклеиновая кислота) – молекула наследственности, которая содержит весь набор генов организма

Ген —материальный носитель наследственной информации

Геном – совокупность генов, содержащихся в одинарном наборе хромосом данной растительной или животной клетки

Нуклеотиды - азотистые основания: аденин, тимин, гуанин и цитозин

Штамм – термин для обозначения серии культуры микробов.

Эукариоты – все организмы, клетки которых содержат ядро, отделенное оболочкой от цитоплазмы

Прокариоты – организмы, лишенные оформленного ядра (вирусы, бактерии, сине-зеленые водоросли)

Клонирование – получение генетически идентичных особей из одной клетки

Трансдукция - перенос ге­нов из одной клетки в другую с помощью вирусов

Синтез – соединение различных элементов объекта в единое целое (систему)

Трансляция – синтез белка на робосомах

Плазмиды - небольшие частицы с фрагментами ДНК

Рекомбинация - это любой процесс, способный привести к возникновению клеток или организмов с двумя или более наследственными детерми­нантами, по которым их родители различались между собой и которые соединены новым способом

Биосфера – область распространения жизни на Земле. Включает нижнюю часть атмосферы, гидросферу и литосферу, населенные живыми организмами

Биоэнергетика - совокупная энергетика биологического круговорота биосферы Земли

Биологизация - радикальное преобразование производственной деятельности на основе биологических законов биотического круговорота биосферы

Экологизация - начальный этап биологизации

# Список литературы

1. Карпенков С.Х. Концепции современного естествознания. М.: Юнити, 1997.
2. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. М.: Мир, 1987
3. Карпинская Р.С. Биология в познании человека. М.: Наука, 1989
4. Алиханян С.И. Общая генетика. М.: Высшая школа, 1985
5. «Наука и жизнь», №9/2000
6. «Наука и жизнь», №3/1999
7. Дубнищева Т. Я. Концепции современного естествознания. Новосибирск: ЮКЗА,1997