

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ДОКЛАД ПО НАУКЕ «О СОСТОЯНИИ И ТЕНДЕНЦИЯХ РАЗВИТИЯ МИРОВОЙ И ОТЕЧЕСТВЕННОЙ НАУКИ ЗА 2010 ГОД», ТОМ 7**ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕНДЕНЦИЙ РАЗВИТИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ И МЕДИЦИНСКИХ НАУК****БИОЛОГИЯ****Генная инженерия в биологии***академик НАН РК Н.А. АЙТХОЖИНА***Анализ современного состояния и тенденций развития мировой науки и научных школ развитых стран**

Развитие генной инженерии является одним из крупнейших достижений молекулярной биологии и молекулярной генетики, которое открыло перед человечеством широкие перспективы. Используемые технологии связаны с целенаправленным созданием новых комбинаций генетического материала и имеют множество приложений в различных отраслях. Поэтому интерес к геномным и генно-инженерным исследованиям в мире высок.

Стремительно расширяющиеся знания о процессах жизнедеятельности позволяют приспособливать эти процессы для практических целей и управлять ими, а также создавать перспективные в практическом отношении новые системы, не существующие в природе.

Возникновение генной инженерии относят к началу семидесятых годов XX столетия, когда в лаборатории Пола Берга из Станфордского университета была получена первая рекомбинантная (гибридная) ДНК (рекДНК) *in vitro*, соединяющая в себе фрагменты ДНК фага лямбда, кишечной палочки и обезьяньего вируса SV40. Десять лет спустя на фармацевтическом рынке появился первый рекомбинантный препарат – человеческий инсулин.

Учёные научились модифицировать гены или создавать совершенно новые, комбинируя гены различных организмов, синтезировать гены по заданным схемам, вводить их в живые организмы и заставлять их работать. Это было началом генетической инженерии.

Импульсом к развитию генной и хромосомной инженерии послужили достижения клеточной биологии по культивированию клеток, тканей и органов. Другим существенным фактором для направленного введения чужих генов в геном растений стало открытие в ряде лабораторий Бельгии, США и ФРГ механизма встройки почвенной бактерией части своего генома в геном растений. Это имело огромное научное значение, поскольку перенос генов позволял преодолевать межвидовые барьеры и передавать отдельные наследственные признаки одних организмов другим. Конструирование нужных генов из различных фрагментов, введение их в реципиентный организм методами генной и клеточной инженерии позволяет управлять наследственностью и жизнедеятельностью животных, растений и микроорганизмов, создавать биологические объекты с новыми полезными для человека свойствами, ранее не наблюдавшимися в природе.

Фундаментом для формирования генной инженерии как науки, стало открытие двойной спирали ДНК и возникновение новой науки – молекулярной биологии, благодаря которой были установлены механизмы репликации, транскрипции ДНК, способности к гибридизации цепей ДНК, секвенирования, процессов негомологичной рекомбинации хромосом, открытие плазмид, идентификация и анализ генов. Были сформулированы основные принципы функционирования нуклеиновых кислот и белков в живом организме и созданы теоретические предпосылки для генной инженерии.

1. Молекулярные механизмы матричного синтеза:

ДНК		ДНК	Репликация
ДНК		РНК	Транскрипция
мРНК		белок	Трансляция

Обмен генами у гомологичных хромосом при
половом процессе

Рекомбинация

2. Кольцевые двусpirальные малые молекулы
ДНК, автономно размножающиеся в
бактериальной клетке и несущие маркерный ген

Плазмиды

3. Ферменты, способные расщеплять ДНК в строго
определенном месте с образованием липких концов
у образуемых фрагментов

Рестриктазы

Генным инженерам был предоставлен ряд ферментов, лишенных видовой специфичности и позволяющих получать в изолированном виде отдельные гены или фрагменты нуклеиновой кислоты, осуществлять *in vitro* синтез фрагментов нуклеиновых кислот, объединять в единое целое полученные фрагменты. Наиболее распространеными в практике генной инженерии ферментами являются:

- рестриктазы, с помощью которых получают фрагменты ДНК,

- полимеразы, синтезирующие ДНК на матрице ДНК или РНК (обратные транскриптазы),

- лигазы, соединяющие фрагменты ДНК,

- ферменты, позволяющие осуществлять изменение структуры концов фрагментов ДНК.

Хорошо известно, что процесс рекомбинации в организме *in vivo* в большинстве случаев происходит между гомологичными молекулами ДНК. Однако оказалось, что *in vitro* притягивание и взаимодействие молекул ДНК возможно, если они будут иметь небольшие комплементарные односпиральные участки из четырех и более нуклеотидов на концах молекул. Такие последовательности получили название липких концов, так как две молекулы ДНК могут соединиться именно этими концами. Таким образом, если в пробирку поместить разные молекулы ДНК с

одинаковыми липкими концами, то рекомбинация будет происходить даже в том случае, если вся структура молекул очень различается. Для сохранения и размножения полученных рекомбинантных молекул их встраивают в специальные конструкции, называемые векторными молекулами ДНК. Типичный вектор включает в себя сайт узнавания определенной рестриктазой целевой ДНК, ген устойчивости к одному из антибиотиков для последующего отбора клеток, получивших рекомбинантный вектор и промотор, обеспечивающий экспрессию целевой ДНК.

Технология рекомбинантных ДНК сделала возможным исправлять дефектные гены и лечить наследственные заболевания. Нормальный ген вводится в соматические клетки прицельно в то место на хромосоме, где находится дефектный ген. Разрабатывается и другой подход, когда введенный ген не заменяет дефектный, а компенсирует его функцию, встраиваясь в хромосому в другом месте.

Таким образом, основными процедурами в генной инженерии считаются (рис. 1):

- рекомбинация *in vitro* ДНК-вектора и ДНК-гена;

- введение рекомбинантной плазмида в клетку;
- молекулярное клонирование.

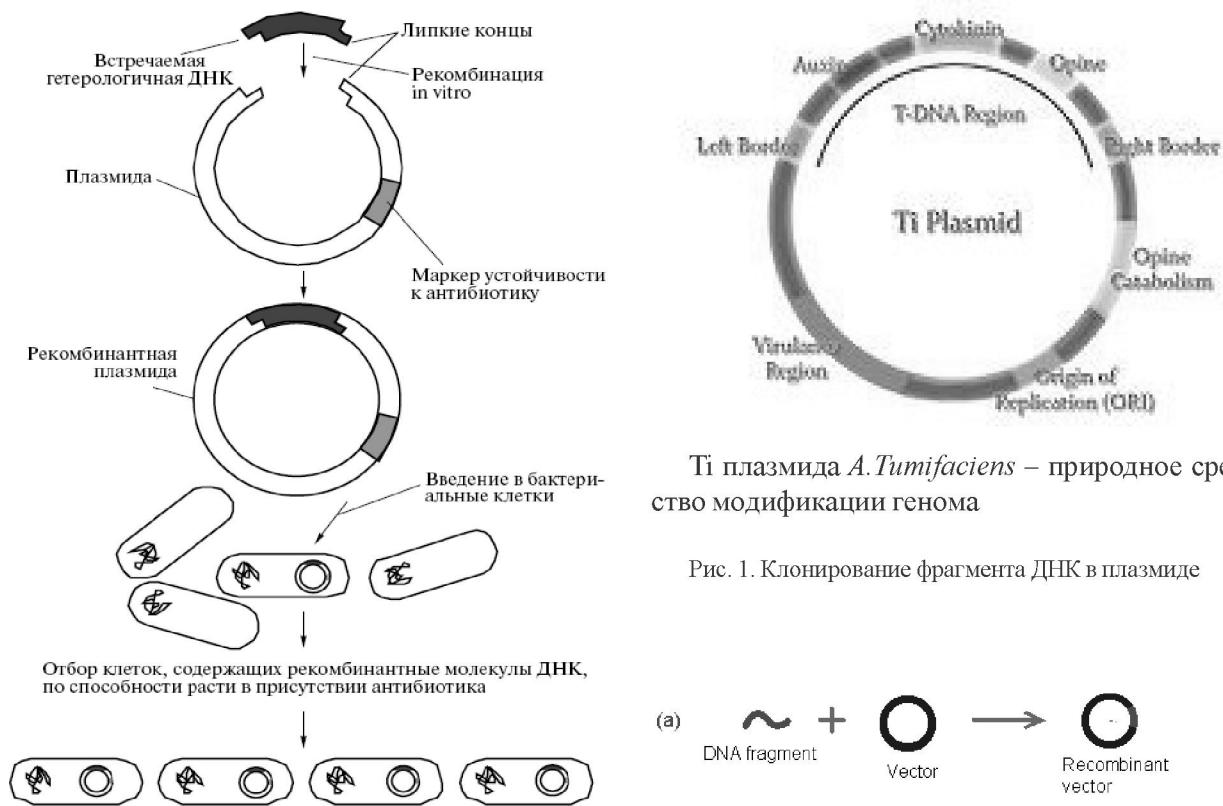


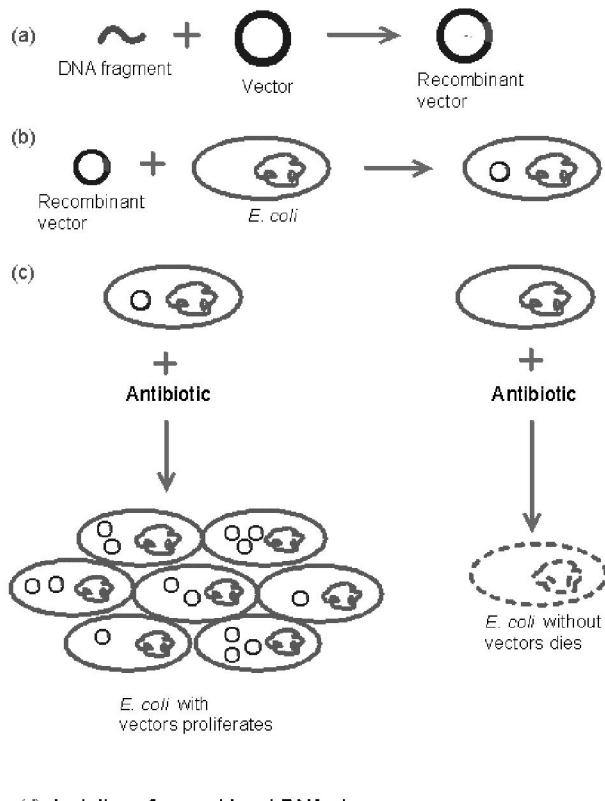
Рис. 1. Клонирование фрагмента ДНК в плазмиде.

Прогресс и успехи генной инженерии зависят от разработки генетических систем и инструментов, позволяющих более эффективно управлять процессом создания новых комбинаций.

Существует несколько путей трансформации генетического материала, например, метод, основанный на природной способности ряда бактерий генетически модифицировать живые организмы (рис. 2). Техника введения генов в бактерии была разработана после того, как Frederick Griffith в 1928 г., работая с типом бактерий *pneumococcus*, обнаружил явление бактериальной трансформации, подтвержденное, описанное и опубликованное в 1944 году американскими учеными-иммунологами Avery O, MacLeod C, McCarty M.

Ti плазмида *A. Tumifaciens* – природное средство модификации генома

Рис. 1. Клонирование фрагмента ДНК в плазмиде

Рис. 2. Основные шаги клонирования ДНК *E. coli* с использованием плазмид как векторов.

- Получение рекомбинантного вектора
- Трансформация вектором *E. coli*
- Амплификация рекомбинантных клеток
- Выделение ДНК рекомбинантных клонов.

Наиболее распространенным способом является вышеописанный способ, известный как «горизонтальный перенос генов», при котором в качестве переносящиков реконструированных генов используются бактериальные плазмиды. Обычно бактериальные плазмиды легко переходят от бактерии к бактерии, но не к растениям. Обнаружение почвенной бактерии *Agrobacterium tumifaciens*, которая «сумела вводить» гены в растения и «заставлять» их синтезировать нужные белки, послужило началом направленной модификации растений. Явление горизонтального переноса сопровождается сильным геномным стрессом – мутагенезом и перестройками, приводящими к реорганизации всего генома. Однако этот способ оказался неэффективным для ряда злаковых растений (пшеница, ячмень, кукуруза), в связи с чем, в 1988 г. был разработан новый метод ввода генов в растительную клетку, названный биобаллистическим (Д. Стэнфорд и Т. Клейн). Суть способа заключается в нанесении молекулы ДНК с нужными генами на микроскопические вольфрамовые или золотые частицы, которые разгоняются в вакуумной камере до определенных скоростей, достаточных для проникновения в клетки растений. Затем следует селекция трансформированных клеток и регенерация трансгенных растений.

Культивируемые в настоящее время трансгенные сорта растений получены, в большинстве случаев, с помощью указанных выше методов.

Необходимо, однако, иметь в виду, что при использовании агробактериального способа в процессе биотехнологических процедур неизвестно, какая клетка-экспланта трансформируется, сколько копий Т-ДНК встроится в геном и в какие хромосомы. При биобаллистическом же способе вероятность встраивания сразу многих копий ДНК-векторов, кусков ДНК выше, чем при работе с агробактериями. Принято считать, что этот метод является менее опасным для человека, чем плазмидный метод трансформации растений.

Арсенал методов трансформации включает также такие подходы, как введение ДНК в протопласти, электропорация клеток, микроинъекции ДНК в клетки, прокалывание клеток путём встраивания их в суспензии микроигл.

Для трансформации животных используют яйцеклетки, в которые плазмиды, созданные на

основе ретровирусов и мобильных элементов, вводят методом микроинъекций.

Развитие генной инженерии, совершенствование ее методов позволили сделать ряд важных открытий в области молекулярной биологии, таких как явление дискретности генов эукариот, сплайсинга, раскрыть механизмы действия и изучить биологическую роль подвижных генов, которые меняют свое место на хромосоме. Именно при перемещении транспозонов часто происходит негомологичная рекомбинация. Были реализованы программы секвенирования геномов многих организмов, в том числе сотен видов бактерий, дрожжей, плазмодия, риса, кукурузы, картофеля, дрозофилы, мыши и др.

Благодаря успешному завершению международного проекта «Геном человека» развиты новые методы, позволяющие автоматизировать большинство процессов, созданы мощные международные банки данных о последовательностях нуклеотидов в ДНК разных организмов (такие, как GenBank/EMBL/DDBJ) и последовательностях аминокислот в белках (PIR/SwissPot). Любой специалист может воспользоваться собранной в банках информацией для исследовательских целей.

Вместе с тем, перед генной инженерией стоит целый ряд нерешенных проблем, над которыми работают крупнейшие лаборатории мира. Одной из самых больших трудностей является введение в геном больших генов или нескольких функциональных генов, что связано с емкостью векторов для трансформации.

Другим сдерживающим фактором является то, что в ряде случаев при получении трансгенных организмов необходимый признак кодируется несколькими генами.

Отдельно стоит проблема, возникающая при экспрессии чужеродного гена. Часто после двух-пяти поколений активно транскрибирующийся ген перестает экспрессироваться из-за метилирования регуляторных последовательностей либо в результате взаимодействия с промотором каких-то белков. Преодолевается это путем получения многократной трансформации и создания различных линий, несущих одинаковую векторную конструкцию с различными местами интеграции в геном растения.

Без точного определения структуры генома, выявления типа и механизмов генетической де-

терминации устойчивости проблема генетической надежности генмодифицированных организмов не может быть успешно решена.

Решение перечисленных задач позволит оценивать генную инженерию как практически безграничный метод создания всевозможных комбинаций наследственных свойств.

В большинстве экспериментов в области генной инженерии используются растения, представляющие наиболее удобный объект для проведения исследований (рис.3). Наиболее предпочтительными для ученых являются модельные растения *Arabidopsis thaliana* и табак.



Рис. 3. Соотношение различных групп растений, используемых в лабораторной фазе исследований ГМО в Европе (Источник: Fraunhofer ISI 2002)

Для получения трансгенных растений применяются заимствованные из микробной генетики системы гомологичной рекомбинации, такие как *Cre-lox* и *Flp-frt*. Помимо интегративных систем экспрессии используются автономно реплицирующиеся векторы. Особый интерес представляют искусственные хромосомы растений, которые теоретически не накладывают никаких ограничений на объём вносимой теоретической информации.

Наряду с генной инженерией получили развитие методы и приемы хромосомной, клеточной и белковой инженерии, предполагающие возможность замещения отдельных хромосом или добавления новых с новыми признаками, а также культивирования, регенерации, размножения и гибридизации клеток и тканей в условиях *in vitro*.

Наиболее популярной областью применения белковой инженерии является изменение катализитических свойств ферментов для разработки «экологически дружественных» промышленных процессов в медицине и пищевой промышленности. Получены белки, способные связываться с вирусами и мутантными генами и обезвреживать их, созданы высокоеффективные вакцины. Традиционные методы заменяются более новыми, привычные технологии становятся более совершенными.

Благодаря бурному развитию молекулярной биологии, молекулярной генетики и генной инженерии открылись заманчивые перспективы для генетического копирования животных, их клонирования, ускоренного выведения новых ценных пород и линий животных. Путем пересадки ядер дифференцированных клеток амфибий в энуклеированные яйцеклетки или ооциты, проведенной J. Gurdon была показана возможность развития взрослых амфибий из реконструированных яйцеклеток. Получены доказательства, что геном дифференцированных клеток способен к репрограммированию и восстановлению totipotentности в цитоплазме яйцеклетки, подобно оплодотворенному яйцу.

Значительный вклад внесен шотландской группой исследователей под руководством I. Wilmut, американскими учеными Keefer, Mathews, First, Campbell et al. Результатом их усилий стало успешное рождение клонированной овцы и развитие эмбрионов коров. Знаменитая овечка Dolly получила развитие из ооцита *M2*, собственное ядро которого было заменено на ядро клетки из культуры эпителиальных клеток молочной железы взрослой лактирующей овцы. Успех I. Wilmut послужил мощным стимулом для развития нового направления в биотехнологии животных. После Dolly были клонированы корова, мышь, свинья и другие млекопитающие, осуществлена генетическая модификация рыб.

Метод рекомбинантных ДНК совместно с методом клонирования животных обеспечивает ученых моделями для изучения заболеваний человека, процессов старения и формирования злокачественных новообразований. Так, путем встраивания в геном свиньи гена *fat-1*, выделенного из генома круглого червя *Caenorhabditis elegans*, создана порода свиней, сало которых содержит повышенное количество Щ3 жирных кислот, предотвращающих развитие сердечно-

сосудистых заболеваний. В перспективе эти приемы могут быть использованы для разработки новых лекарственных средств и оценки эффективности таких методов лечения как генная и клеточная терапия.

Безграничные возможности и широкие перспективы генной инженерии открылись не только в плане познания механизмов функционирования организмов, но также в прикладном аспекте. Благодаря достижениям генной инженерии стремительно растет интерес к биотехнологии, существенно расширяются возможности микробиологического производства, биосинтез становится экономически более выгодным по сравнению с химическим производством.

Современные биотехнологические процессы основаны на методах рекомбинантных ДНК, на использовании иммобилизованных ферментов, клеток или клеточных органелл. В совокупности с методом молекулярного клонирования биотехнология используется для достижения следующих целей:

- производства новых лекарственных препаратов и безопасных вакцин;
- лечения некоторых генетических заболеваний;
- создания биоконтролирующих агентов для сельского хозяйства;
- повышения урожайности и снижение стоимости продукции;
- снижения аллергенности некоторых продуктов;
- улучшения питательных свойств продуктов;
- разработки биодеградирующих пластмасс;
- снижения уровня загрязненности воды и воздуха;
- замедления скорости порчи пищевых продуктов;
- контроля над вирусными заболеваниями.

Особый прогресс достигнут в практической области создания новых продуктов для медицинской промышленности и лечения болезней человека. Среди нескольких сотен генно-инженерных фирм 60% работают над производством лекарственных и диагностических препаратов. Огромная армия высококвалифицированных специалистов занята в исследовательских и промышленных секторах фармацевтической индустрии, и именно в этих областях интерес к геномным и генно-инженерным исследованиям исключительно высок.

В настоящее время выпускается около 25% всех лекарств в мире с применением методов генной инженерии. Среди них в особом ряду сто-

ит получение человеческого инсулина в промышленных масштабах, мировой рынок которого составляет более 400 млн. долларов, а ежегодное потребление около 2500 кг. Основным производителем инсулина является компания Novo Nordisk (Дания).

Мировыми производителями и поставщиками препаратов, полученных с помощью методов генной инженерии и биотехнологии, таких как эритропоэтин-альфа и иммуносупрессант ортоклон ОКТ-3, вакцина против гепатита В, эритропоэтин-бета, ряд терапевтических моноклональных антител, рекомбинантные дезоксинуклеазы, нейроген и др. являются компании Janssen-Cilag (Швейцария/Бельгия), SmithKline Beecham, Hoffmann-La Roche (Швейцария), Аventis (Франция), GlaxoWellcome (Англия), Гедсон Рихтер (Венгрия), Санофи Синтелабо (Франция), Eli Lilly (США), Hoechst Marion Roussel AG (Германия). В Германии фармацевтикой на основе генных технологий занимаются от 80 до 90% всех биотехнологических предприятий страны.

Более 20 фирм Японии, ряд американских, российских лабораторий и компаний участвовали в разработке интерферона и интерлейкина, эффективных препаратов при вирусных заболеваниях и злокачественных новообразованиях (Институт молекулярной вирусологии, г. Новосибирск; Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, г. Москва; ГосНИИ ОЧБ, г. Санкт-Петербург; ООО «Биотех» г. Санкт-Петербург; Институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов г. Москва).

На долю российских производителей приходится около 10% рынка биотехнологической продукции. Кроме перечисленных выше препаратов интерферона и рекомбинантного интерлейкина-1 β получен бактериальный штамм-продуцент фактора некроза опухолей (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова), освоено производство антидиабетических препаратов, иммуномодуляторов и диагностических тест-систем, гематологических и противотуберкулезных препаратов, препаратов для лечения наследственных, мультифакторных заболеваний, для диагностики и лечения особо опасных инфекций, препаратов для диагностики возбудителя прионных инфекций.

Применение современных вакцин на основе генетически модифицированных растений со встроенными фрагментами ДНК патогенных микроорганизмов может стать революционным событием в профилактической медицине. Идею создания трансгенных растительных вакцин высказал в 1992 году американец Х. Мейсон. Были предприняты успешные попытки получения вакцины против гепатита *B* на основе трансгенного табака, в котором синтезировался поверхностный антиген (*HBsAg*) вируса.

Ученые из ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» (наукоград Кольцово, Новосибирская область) в содружестве с сотрудниками Института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск) и Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск) работают над созданием кандидатных вакцин против вируса гепатита *B* человека и вируса иммунодефицита человека на основе трансгенных растений томата.

Достижения генной инженерии нашли широкое применение и в сельском хозяйстве. Сохраняющаяся тенденция к росту численности населения стимулирует необходимость увеличения производства продовольствия, и в этой связи, применение биотехнологических методов приобретает колossalное значение.

Первые работы по генетической модификации растений начались в 80-е годы прошлого века в США. В начале 90-х первые трансгенные культуры появились на американском рынке и быстро завоевали популярность по дешевизне, быстрому росту, устойчивости к заболеваниям и высокой урожайности. В 2008 году генетически модифицированными сельскохозяйственными культурами в мире было засеяно около 125 млн. га земли, большая доля посевов приходится на США и Канаду. Именно в США находится штаб-квартира известной биотехнологической корпорации «Монсанто» и выращивается 55% всех геномодифицированных культур.

Роль лидеров этих стран обусловлена огромными вложениями государственного и частного

секторов на фундаментальные и прикладные исследования и количеством занятых в НИОКР биотехнологических фирм и крупных промышленных компаний. К примеру, в финансировании фундаментальных и прикладных работ по биотехнологии в США основную роль играет Национальный научный фонд, Министерства: здравоохранения и социального обеспечения, сельского хозяйства, энергетики, химической и пищевой промышленности, обороны, НАСА и др.

В 2009 г. в Китае было выделено дополнительно 3,5 млрд. долл. на последующие 12 лет для продолжения биотехнологических исследований. В этой стране только за последнее время разработано 25 тестов и стандартов оценки безопасности трансгенных культур и предполагается открыть более 40 институтов, проводящих оценку. Ответственность за безвредность ГМ пищевых продуктов возложена на специально созданный Китайский национальный аграрный комитет по безопасности трансгенных растений. Благодаря государственной поддержке и мощной исследовательской базе Китай может занять одно из ведущих мест в мире в области генной инженерии и биотехнологии.

Число стран, занимающихся выращиванием ГМ-культур, выросло с 6 в 1996 г., когда начали выращивать ГМО в коммерческих целях, до 25 в 2008 г. Ожидается, что к 2015 г. не менее 40 стран будут производить ГМО.

Крупными производителями помимо США и Канады являются Германия, Япония, Аргентина и Китай. Европа проявляет осторожность. В ряде стран Европы (Австрия, Франция, Греция, Великобритания, Люксембург) введен мораторий на ввоз ГМО-продуктов. В других странах приняты серьезные меры к маркировке генетически измененного продовольствия.

Сегодня объём рынка ГМ-растений достигает 20 млрд. долл., а к 2020 г. возрастёт до 75 миллиардов. Доходы в сфере биотехнологий в глобальном масштабе составляют 73%, в то время как в Европе эта цифра равняется 20%, Канаде (4%), Азии (3%).



Одной из важных задач генной инженерии в сельском хозяйстве является получение форм растений, устойчивых к вирусам. Ученые из Университета штата Вашингтон удалось добиться этого, вводя в растительные клетки гены белка оболочки вируса табачной мозаики. В настоящее время получены трансгенные растения, способные противостоять воздействию более десятка различных вирусных инфекций.

Еще одна задача связана с защитой растений от насекомых-вредителей. В генно-инженерных лабораториях Бельгии и США были успешно проведены работы по внедрению в растительную клетку картофеля, томатов и хлопчатника генов, отвечающих за синтез инсектицидов бактериального происхождения. С этой целью из бактериальной (*Bacillus thuringiensis*) ДНК выделен ген, кодирующий белок эндотоксина. Этот ген был встроен в состав природных генетических векторов – *Ti*-плазмид, присутствующих в клетках почвенной бактерии *Acrobacterium tumefaciens*. Плазмиды, несущие ген белка-токсина, внедрялись в растительные клетки, а затем ген встраивался в ДНК растений. В дальнейшем были выращены полноценные растения с заданным свойством устойчивости к насекомым-вредителям. Это свидетельство возможностей генной инженерии на фоне классических методов селекции растений.

Однако не следует считать, что генинженерные технологии полностью заменяют традиционные технологии селекции, они лишь дополняют их, позволяя сократить срок создания новых форм организмов с повышенной и высокой устойчивостью в 2-3 раза, ограничить или полностью исключить отрицательные последствия отдаленной гибридизации за счет сцепления эффективных генов с генами отрицательных признаков и таким образом добиться высокой экспрессии эффективных генов.

Основателем работ в области генной инженерии в России, поверившим в перспективность данного направления, стал А. А. Баев. В 1974 г. начаты работы с рекомбинантными молекулами ДНК в Институте молекулярной биологии АН СССР, Институте биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР и ВНИИГенетика Минмедбиопрома. В настоящее время кадры генных инженеров и работы по генной и клеточной инженерии в России сосредоточены в НИИ и центрах РАН, РАМН, МЗ и РАСХН: Институте био-

органической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (генно-инженерные аналоги инсулина человека, рекомбинантный гормон роста человека, рекомбинантный оксигеномодулин, рекомбинантный глюкагон человека, рекомбинантный тимозин, аналоги эндо-генных пептидов в терапии рака, грамицидин С), станции «Биотрон», Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. К. Г. Скрябина РАН, Центре «Биоинженерия» РАН, Институте общей генетики РАН, Институте физиологически активных веществ РАН, Институте цитологии и генетики СО РАН, ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, ВНИИ фитопатологии, Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «ВЕКТОР», ОАО Биохиммаш - Институт прикладной биохимии и машиностроения, научная школа Казанского государственного университета, Трансгенфарм, ЗАО Евроген, ООО Окабиолаб, ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, Тимирязевский биотехцентр и др. Сформировались крупные научные школы в МГУ им. М. В. Ломоносова, Московской сельскохозяйственной академии им. К.А. Тимирязева.

Несмотря на уникальные результаты и достижения генной инженерии, после первых успешных экспериментов с рекомбинацией молекул ДНК появились опасения относительно возможного вреда природе и человечеству. Это обусловлено несколькими причинами: непредсказуемостью места интеграции рекомбинантной ДНК в геном организма-донора и числа встроенных ее копий; слабой изученностью механизмов регуляции и функционирования генома, к примеру, высших растений; плейотропным эффектом встроенного гена, ведущим к неопределенности изменений клеточного метаболизма в ответ на трансформацию, нарушению стабильности генома; наличием во встраиваемом фрагменте ДНК неполных или дефектных копий.

Из-за возможности нежелательных рисков при использовании генно-инженерных технологий был наложен мораторий на работы с рекомбинантными ДНК *in vitro*. Прошло несколько лет, и исследователи убедились, что их опасения преувеличены. После продолжительных дискуссий на Аслилумарской конференции в Калифорнии (1975 г.) ученые пришли к выводу, что потенциальные опасности генной инженерии невелики, так как рекомбинантные штаммы в природных условиях нежиз-

неспособны и их бесконтрольное распространение маловероятно, и мораторий был прерван.

Следует признать, что опасным для развития биоинженерии и биотехнологии является возникновение мощной волны протестного движения, направленного против научных исследований, применения генинженерных технологий и использования генетически модифицированных организмов. Общественное мнение и широкая компания противников ГМО и генной инженерии делают свое дело. Так, в последнее время в России были закрыты десятки лабораторий с генной тематикой, разрушена система испытаний. По мнению директора Центра биоинженерии академика К.Г. Скрябина, использование ГМО стало приоритетом в странах БРИК, кроме России, в которой нет ни одного квадратного метра под посевами ГМО. Россия может потерять свои позиции в области генной инженерии, будут ограничены перспективы развития фармацевтики и медицины. Не следует забывать, что за два предшествующих десятилетия был внесен неоценимый вклад в получение нового поколения эффективных лекарственных препаратов, начиная от противораковых до антидиабетических. Чтобы в полной мере оценить открывшиеся возможности генной инженерии, современное общество должно заново осмыслить прежние представления о формировании и функционировании живых организмов и их генетических основах. В этой связи ученые Украины считают неразумным тратить деньги на широкое обсуждение проблемы безопасности ГМО и их маркировку при существующем недостатке средств на научные исследования в данной области.

Эти и другие проблемы поднимались на заседании Научно-экспертного совета при председателе Совета Федерации России, проходившего в Институте биологии развития РАН (апрель 2010г.). Спикер СФ Сергей Миронов напомнил, что генная инженерия приветствуется во всем мире, ее достижения просто фантастичны, подчеркнув при этом, что вопросы влияния на организм человека ГМО остаются открытыми, также как и проблема их контроля. По инициативе Общенациональной Ассоциации генетической безопасности России было направлено обращение к

руководителю рабочей группы по созданию инновационного центра в Сколково с предложением о развитии в рамках развития Кремневой долины проекта «Безопасные генетические технологии», который предусматривает разработку системы мер, позволяющих избежать возможных негативных последствий влияния ГМО.

Рассуждения о вреде современных биотехнологий вызваны недопустимо малым числом исследований в мире по влиянию ГМО на здоровье человека, животных и окружающую среду. Проведение широкомасштабных научных экспериментов позволило бы снять существующее напряжение в мировом сообществе. Для этого необходимы длительные токсикологические исследования, исследования по определению генотоксичности, проведение геномного и протеомного анализа, оценки аллергенности на модельных системах и многое другое, что является дополнительным фактором, доказывающим безопасность или вред ГМО. В конечном счете, окончательные выводы и оценка отдаленных последствий применения генно-инженерных продуктов и методов должны делаться учеными и специалистами в сфере генной инженерии и биотехнологии. Насколько сегодняшние прогнозы в отношении развития этих отраслей правильны и оправданы – покажет время.

В 1992г. на Конференции ООН по окружающей среде и развитию (КОСР) была подписана Конвенция о биологическом разнообразии (Риоде-Жанейро), а 29 января 2000г. в Монреале окончательно доработан и принят протокол, известный как Картахенский протокол по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии. На 1 августа 2007г. Картахенский протокол признали 142 страны мира.

В заключение следует еще раз отметить, что успехи генной инженерии и развитие биотехнологической отрасли в огромной степени зависят от позиции государства к проблемам. Из-за значительной правительственный поддержки наиболее благоприятные условия имеют на сегодняшний день США и Япония. Программы этих стран подразумевают кроме огромных вложений на исследовательские расходы также и налоговые льготы в области биотехнологий.

Анализ современного состояния и тенденций развития отечественной науки и научных школ Республики Казахстан

В Институте молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина впервые в Казахстане были развиты новые приоритетные направления по исследованию генома человека и растений, молекулярной и клеточной иммунологии, генной и клеточной инженерии растений.

В Институте проводится изучение структурно-функциональной организации генома человека и растений с целью создания методов молекулярной диагностики сердечно-сосудистых, нейродегенеративных заболеваний и ряда наследуемых заболеваний человека, а также создания новых растений сельскохозяйственных культур, устойчивых к заболеваниям и стрессовым факторам окружающей среды (вирусы, засоление почвы).

В области фундаментальных и прикладных исследований получены следующие важные результаты:

1. При изучении молекулярных механизмов возникновения и развития наследственных и генопосредованных заболеваний человека выявлены нарушения и их местоположение в отдельных генах человека (полиморфизмы, инсерции и делеции), разработаны методы генодиагностики сердечно-сосудистых, аутоиммунных и онкологических заболеваний, ведется поиск радиоиндцированных соматических мутаций среди персонала урановой промышленности Республики Казахстан, проверяются на модельных системах и таким образом закладываются основы генотерапии заболеваний.

2. На основе изучения экспрессии генов защитного ответа пшеницы было проведено клонирование функционально-значимых участков этих генов и созданы генетические конструкции для ранней диагностики поражений растений фитопатогенами; проанализированы профили экспрессии патоген-индуцированных генов; выявлены молекулярные маркеры устойчивости пшеницы к фитопатогенам; проводится геномная паспортизация пшениц казахстанской селекции.

В рамках НТП «Научно-техническое обеспечение государственного регулирования оборота генетически модифицированных объектов в Республике Казахстан» на 2009-2011 годы» осущес-

твлена идентификация генов устойчивости казахстанских сортов пшеницы к бурой ржавчине с использованием молекулярно-генетических маркеров. Создана клонотека локусов *Lr10* и *Lr21* пшеницы на основе коммерческого набора pENTER D/TOPO Cloning Kit (Invitrogen) с использованием праймеров *Lr10-F+CACC+K* и *Lr21-F+CACC*. В результате секвенирования установлены 5 клонов, имеющих вставки с генами устойчивости (рис. 4).

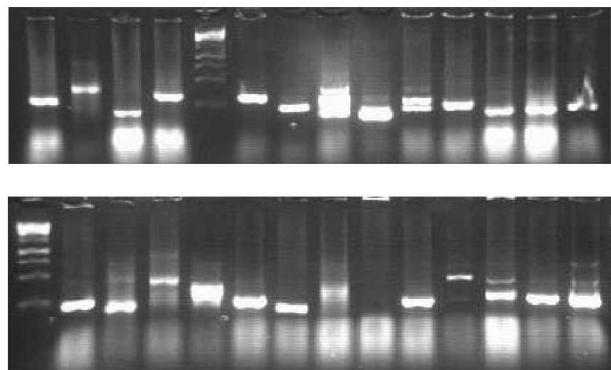


Рис. 4. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР плазмидной ДНК с праймерами М13.

Сравнительный анализ полученных данных с последовательностями, хранящимися в мировой базе данных GeneBank, свидетельствует о высокой гомологии исследованных фрагментов с генами *Lr10* и *Lr21*, ответственными за устойчивость к листовой ржавчине (в среднем 96,5%).

3. Проведены эксперименты по переносу чужеродных генов в клетки высших растений в условиях космоса, что позволяет расширить фундаментальные знания в области генной инженерии и отработать методы по отбору стрессоустойчивых линий растений. Впервые было предложено проведение прямой трансформации зерновок пшеницы чужеродной ДНК в условиях микрогравитации. С этой целью совместно со специалистами РКК «Энергия» была разработана и изготовлена уникальная установка, с успехом использующаяся на борту МКС. На основе методов космической биотехнологии и клеточной инженерии созданы два сорта картофеля «Тохтар» и «Орбита» с высокой степенью устойчивости к абиотическим условиям среды.

4. Впервые в Казахстане внедрена технология повышения устойчивости растений к вирусам на основе антисмыловых РНК. Созданы и переданы для полевых испытаний в Институт овощного и картофельного хозяйства НПЦ ЗР МСХ РК трансгенные линии картофеля, полностью устойчивые к *Y-вирусу*, уносящему более 50 процентов урожая этой культуры. При этом другие свойства трансгенных линий картофеля не изменяются.

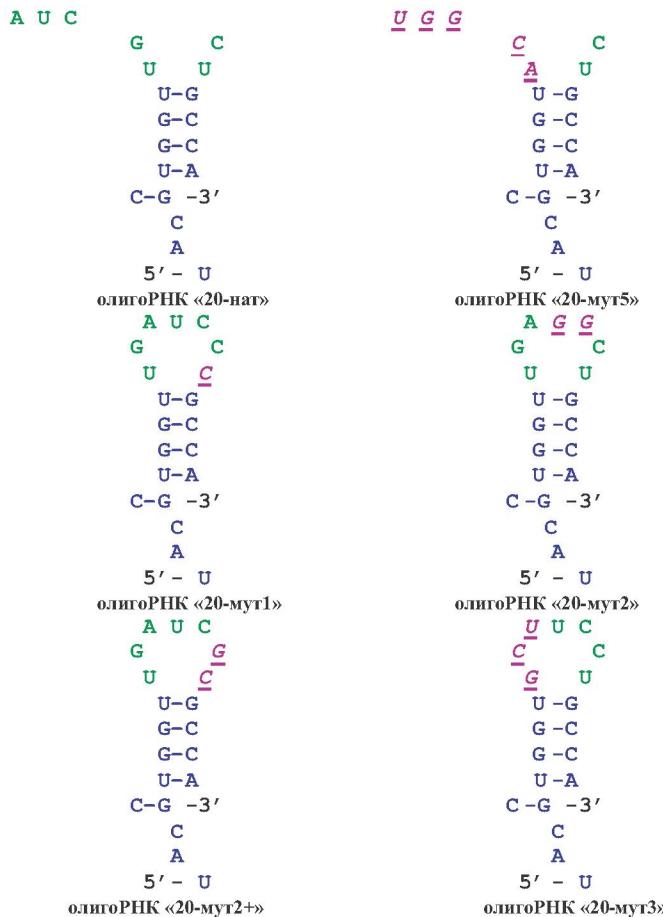
5. Получены генетические конструкции, способные значительно усиливать синтез белка трансгенными растениями, используемыми для биотехнологического производства рекомбинант-

ных продуктов медицинского, пищевого или сельскохозяйственного назначения.

Проведен компьютерный анализ комплементарного взаимодействия между олигоРНК и 18 pРНК зародышей яровой пшеницы (табл. 1). Получены рекомбинантные ДНК-конструкции, несущие под контролем промотора фага *T7* 5'-концевые фрагменты 18S pРНК с различными мутациями. Осуществлена *in vitro* транскрипция этих конструкций и проведено тестирование в бесклеточной системе трансляции из зародышей пшеницы эффекта от добавления 5'-концевых фрагментов 18S pРНК с различными мутациями.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности различных олигоРНК
(замененные нуклеотиды отмечены курсивом и подчеркиванием)

Аббревиатура	Первичная структура олигоРНК	Наименование олигоРНК
H	(5') UACCU <u>GGGU</u> UGA <u>UCCU</u> GCCAG (3')	«20-нат»
m1	(5') UACCU <u>GGGU</u> UGA <u>UCCG</u> GCCAG (3')	«20-мут1»
m2	(5') UACCU <u>GGGU</u> UGA <u>GGCU</u> GCCAG (3')	«20-мут2»
m2+	(5') UACCU <u>GGGU</u> UGA <u>UUCG</u> GCCAG (3')	«20-мут2+»
m3	(5') UACCU <u>GGGU</u> <u>GCU</u> UCCUGCCAG (3')	«20-мут3»
m5	(5') UACCU <u>GGGU</u> ACU <u>GGG</u> CUGCCAG (3')	«20-мут5»



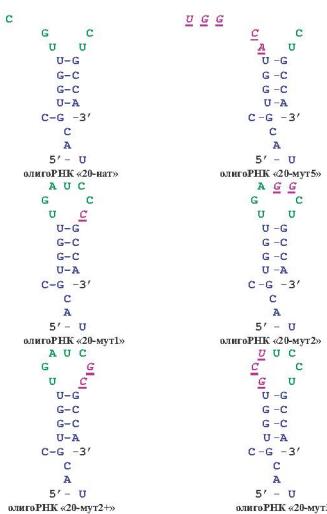


Рис. 5. Вторичные структуры нативного и мутированных вариантов олигоРНК (замененные нуклеотиды в петле отмечены курсивом и подчеркиванием)

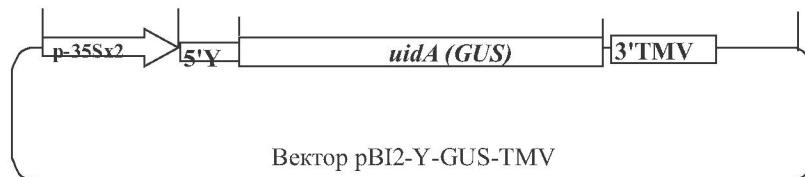


Рис. 5. Схематичное изображение вектора pBI2-Y-EEV-TMV

6. На основе бинарной плазмида *pBI221* построены рекомбинантные кассеты регуляторных элементов для экспрессии в клетках растений (рис.5). Сконструирована рекомбинантная ДНК-кассета, состоящая из транскрипционных (удвоенный 35S промотор, *nos*-терминатор) и трансляционных (5'- и 3'-концевые энхансеры) регуляторных элементов для повышенной экспрессии полезных генов в клетках растений.

Вектор *pBI2-Y-GUS-TMV* содержит в своем составе кассету следующих функциональных сегментов: двойной промотор вируса мозаики цветной капусты (*CaMV*) [*p-35Sx2*]; 5'-НТП Y-вируса картофеля [5'Y], ген [*uidA*]; 3'-НТП вируса табачной мозаики [3'TMV]; терминатор транскрипции гена нопалин синтетазы [*t-nos*].

7. Проводится работа по получению трансгенных растений, устойчивых к повышенной концентрации NaCl и дефициту воды для отбора исходных линий и дальнейшей селекции растений на соле- и засухоустойчивость. С целью изучения направленной регуляции экспрессии проведено клонирование в агробактериальный вектор гена ячменя *HvNhx2*, кодирующего вакуолярный Na+/H+-антитортер, а также кДНК гена *AtDREB1A*, кодирующего транскрипционный фактор. Эти гены были клонированы в генно-инженерных кон-

струкциях – с энхансером «5'-НТП гРНК Y-BK», синтетическим энхансером «3xARC» и без энхансера. Полученные конструкции исследованы в транзиентной системе экспрессии из листовых дисков табака *Nicotiana tabacum* и показано наличие экспрессии целевых белков в клетках табака. Далее получены ГМ-растения табака, несущие трансгенные вставки «5'PVY-HvNhx2» и «*HvNhx2*». В настоящее время проводится работа по получению ГМ-растений картофеля сорта «Тамаша», несущих в качестве трансгенной вставки «5'PVY-HvNhx2» и «*HvNhx2*».

Впервые в Казахстане разработана технология регенерации растений рапса, которая оптимизирована для проведения стабильной генетической трансформации и получения ГМ-растений. Ведется работа по трансформации растений рапса четырех сортов с помощью агробактерий, несущих трансгены *uidA* и *AtDREB1A* под контролем 35S-промотора и *nos*-терминатора.

Поиск и разработка новых трансляционных энхансеров, которые могли бы превзойти по своей активности уже известные аналоги, продолжаются.

8. Разработана уникальная технология получения липосом растительного происхождения на основе фосфатидилинозитола, закрепленная патентом США, предназначенных для использова-

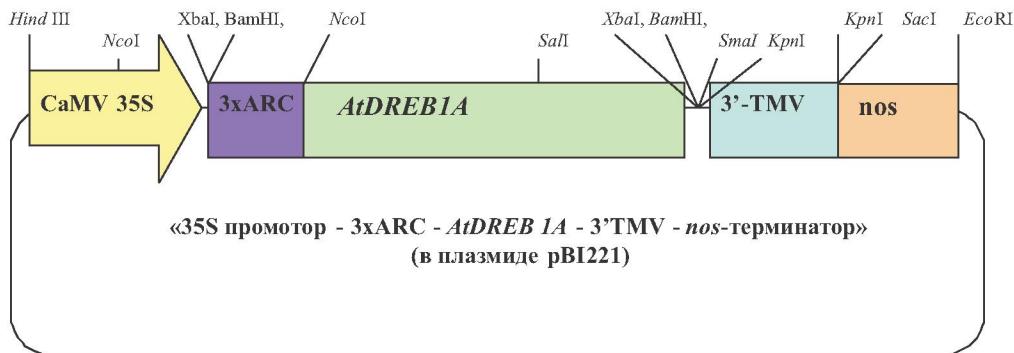


Рис. 6. Схематичное изображение рекомбинантных ДНК, полученных на разных стадиях клонирования кассеты [35S-промотор – 3xARC – *AtDREB 1A* – 3'-ТМВ – *nos*-терминатор].

ния в современной фармакологии в качестве микропереносчиков лекарств. Предварительные доклинические испытания показали высокую эффективность новых потенциальных лекарственных микроносителей.

Учеными Института микробиологии и вирусологии разрабатывается технология приготовления субъединичных вакцин из различных вирусов, получены новые иммуностимуляторы и антивирусные препараты на основе компонентов растительного происхождения.

Национальный центр биотехнологии является головной организацией трех программ в области генной инженерии и биотехнологии на 2009-2011 годы: «Разработка и внедрение в селекционную практику молекулярно-генетических и биоинженерных методов ускоренного создания новых высокоурожайных сортов сельскохозяйственных культур для дальнейшего укрепления продовольственной безопасности страны», «Научно-техническое обеспечение государственного регулирования оборота генетически модифицированных объектов в Республике Казахстан», «Разработка и использование генно-инженерных и клеточных технологий в медицине, сельском хозяйстве, охране окружающей среды, пищевой и перерабатывающей промышленности».

В области медицины получены микрокапсулированные формы вакцины против кори и паротита, новая вакцина от гриппа, вируса гепатита, разработаны генетические тесты для оценки риска развития наследственных и приобретенных заболеваний.

Актуальные исследования проводятся в НИИ проблем биологической безопасности Комитета науки МОН РК. Помимо мониторинговых исследований гриппа птиц на территории Республики Казахстан и разработки стратегии борьбы с ним, изучаются иммунобиологические свойства возбудителей гриппа птиц, их секвенирование и генетическое картирование, создается банк геновизолятов возбудителя болезни (совместно с вирусологами Института микробиологии и вирусологии). Большим достижением ученых Института является создание инактивированной ветеринарной вакцины против гриппа птиц «Казахстан-15», успешно прошедшая производственные комиссионные испытания. На основе моноклональных антител разработаны иммуноферментные тест-системы для диагностики ящура, бешенства, сибирской язвы и лептоспироза.

Реализация новых проектов и задач в области молекулярной и клеточной биологии, генной инженерии трансферта технологий позволит нашей стране разработать и внедрить новую продукцию для здравоохранения, сельского хозяйства, охраны окружающей среды, пищевой и перерабатывающей промышленности.

Выводы и рекомендации

Чтобы получить преимущество в мировом сообществе, ведущие страны уделяют огромное внимание развитию науки и технологий, регулируя свою стратегию и политику в научной и технологической сфере.

В Казахстане должны быть четко сформулированы программы научно-технического развития, ориентированные на государственные интересы, разработаны механизмы их реализации, значительно повышенны государственные субсидии на науку и технологии в целом.

Несмотря на то, что в республике выполняются проекты по созданию новых вакцин и медицинских препаратов и созданию трансгенных растений, в целом, они не оказывают существенного влияния на решение задач, стоящих перед биоинженерной наукой и демонстрируют определенное отставание республики в этой области.

Масштабы исследований, их интенсивность, оснащение и эффективность в Казахстане отстают от западных, что связано со слабой финансовой поддержкой, неразвитой сетью исследовательских лабораторий, слабой координацией и низкой востребованностью результатов прикладных научных исследований, что связано со слабым инвестиционным климатом в данной области.

Неверно полагать, что внедрение современных геномных технологий является слишком дорогим удовольствием для страны. Напротив, необходимо активно развивать это направление, усиливать инновационную составляющую, овладевать новыми методами. Как упоминалось выше, несмотря на очевидную выгоду и эффективность применения методов генной инженерии и биотехнологий в сельском хозяйстве и здравоохранении, в обществе сохраняются опасения перед возможными нежелательными для человека последствиями генноинженерных экспериментов. Это вызвано как недостаточной осведомленностью общества, так и несовершенством или отсутствием соответствующей нормативной базы. В 2005г. был опубликован отчет ВОЗ «Современная пищевая биотехнология, здоровье и развитие человека», в котором дан анализ результатов влияния потребления ГМО на здоровье человека. Отчет содержал фактические доказательства того, что использование разрешенных трансгенных культур может значительно повысить количество урожая, качество и разнообразие продуктов, и это способствует улучшению состояния здоровья и питания населения, повышению стандартов здоровья и жизненного уровня.

Во многих странах мира вопросы организации и обеспечения безопасности работ с рекомбинант-

ными ДНК находятся под пристальным вниманием государственных служб, ученых и общества.

В республике отсутствуют процедуры лицензирования и контроля. В отличие от России и стран ЕС, в Казахстане применение ГМ технологий, производство и применение ГМ продуктов строго не регламентированы.

Несмотря на то, что в 2007г. в Казахстане принят новый Экологический кодекс, устанавливающий порядок осуществления генно-инженерной деятельности, в нем отсутствует детализация правил и регламентов.

Даже при наличии достаточного финансирования и создания современной материально-технической базы в ближайшие годы будет ощущаться недостаток высококвалифицированных кадров в области генной инженерии.

Чтобы обеспечить реальный прорыв в Казахстане генной инженерии и биотехнологии как стратегически важных для страны научных направлений, совместными усилиями Национального центра биотехнологии Республики Казахстан и Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина инициирована научно-техническая программа, направленная на формирование системы контроля, регулирования и производства генетически модифицированных объектов в Республике Казахстан. Программа предусматривает разработку нормативно-правовой базы, создание межотраслевой системы сбора, хранения и молекулярно-генетического анализа ГМО, ввозимых в Казахстан, изучение молекулярных основ создания ГМО и регуляции экспрессии генов, кадровое обеспечение.

Предусматривается строительство крупной ветеринарной лаборатории по исследованию генетически модифицированных организмов (ГМО), соответствующей международным стандартам и требованиям, ввод в эксплуатацию планируется осуществить в 2012 году.

В последние годы стало уделяться больше внимания развитию и совершенствованию законодательной и нормативно-правовой базы, регулирующей генно-инженерную деятельность. Правительством Республики Казахстан утвержден порядок оборота генетически модифицированных объектов и соответствующие правила проведения работ по научно обоснованному подтверждению их безопасности. Разработан и готовится

для вынесения на обсуждение проект закона «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности», что позволит определить механизм взаимоотношений в сфере природопользования, охраны окружающей среды и обеспечения экологической безопасности, возникающие при осуществлении генно-инженерной деятельности. Также разрабатывается технический регламент «Требования к безопасности пищевой продукции, полученной из генно-модифицированных (трансгенных) растений и животных». Перечисленные мероприятия позволят решить ряд важных задач в области снижения рисков заболевания животных и человека, осуществить модернизацию и укрепление системы контроля качества и оценки рисков безопасности продуктов и сырья, возникающих с использованием ГМО.

ИСТОЧНИКИ ИНФОРМАЦИИ

1. Доклад академика К.Г. Скрябина «Фундаментальная и прикладная биотехнология. Ответ на вызов XXI века. / Вестник Российской Академии наук. – 2009. - Т. 79. - № 3. - С. 242-245.
2. An overview of general features of risk assessments of genetically modified crops. *Craig W., Tepfer M., Degrassi G., Ripandelli D.* Euphytica. 2008. 164, № 3, P. 853–880.
3. Agricultural biosecurity. *Waage J.K., Mumford J.D. Phil. Trans. Roy. Soc. London. Ser. B.* 2008. 363, № 1492, P. 863–876.
4. Жиганова Л.П. Современные тенденции развития биотехнологии в сельском хозяйстве США: [применение биотехнологических методов в мировом сельском хозяйстве в трансгенезе растений и животных] /США, Канада. Экономика-политика-культура. – 2008. - № 4. – С. 99-114.
5. *S. Abud, P.I.M. de Souza, G.R. Viana, E. Leonardez, C.T. Moreira, F.G. Faleiro, J.N. Junior, P.M.F.O. Monteiro, E.L. Rech and F.J.L. Aragao.* Gene flow from transgenic to nontransgenic soybean plants in the Cerrado region of Brazil. / Genet. Mol. Res. - June 30. – 2007. - 6 (2): 445-452.
6. *Angeles Jimenez-Marin, Noemi Yubero, Gloria Esteso, Angela Moreno, Juana Martin de las Mulas, Luis Morera, Diego Llanes, Manuel Barbancho and Juan J. Garrido.* Molecular characterization and expression analysis of the gene coding for the porcine β_3 integrin subunit (CD61). / Gene. - 2008. - Vol. 408. - Issues 1-2. - P. 9-17.
7. *Hamid Reza Karbalaei-Heidari, Abed-Ali Ziae, Mohammad Ali Amoozegar, Yuri Cheburkin and Nediljko Budisa.* Molecular cloning and sequence analysis of a novel zinc-metalloprotease gene from the *Salinivibrio* sp. strain AF-2004 and its extracellular expression in *E. coli*. / Gene. - 2008. - Vol. 408. - Issues 1-2. - P. 196-203.
8. http://www.nauka.kz/biol_med/razd4/bioind_USA_EURO.php
9. ISAAA Brief 39-2008: Executive Summary. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2008, The First Thirteen Years, 1996 to 2008. І International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications.
10. The State of Food Insecurity in the World 2008: High food prices and food security – threats and opportunities. – 2008, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy.
11. The Benefits of Biotechnology: Scientific Assessments of Agricultural Biotechnology's Role in a Safer, Healthier World. І United Soybean Board, 2009.
12. Уильям Ф. Энгдаль. Семена разрушения. Тайная подоплека генетических манипуляций. І Издательство: Нестор-История, 2009 г., 320 стр.
13. *Warwick, A. Legere, M.-J. Simard and T. James.* Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy *Brassica rapa* population. І Molecular Ecology (2008), 17(5):1387-1395.
14. *A. Баранов.* К доктрине биологической безопасности России // ЭКОС. 2008. № 1. С. 27–39.
15. <http://www.gmo.ru/sections/32>
16. Гельфанд М. С. Гены и эволюция / Вестник Российской Академии наук. - 2009. - Т. 78. - № 5. - С. 411-418
17. *Richardson, Aaron O. and Jeffrey D. Palmer.* Horizontal Gene Transfer in Plants. / Journal of Experimental Botany. 2007. – 58. P. 1–9
18. <http://www.gmo.ru/news/105>
19. *Марков А.В.* Горизонтальный перенос генов и эволюция / Доклад в Институте Общей Генетики/ 13 ноября 2008
20. *Алексей Сутурин.* Конкуренция с эволюцией. / Российская газета. Спецвыпуск «Экономика-Экология». - № 5247 (168). – 30 июля 2010.
21. *Wilson B.A.* Global biosecurity in a complex, dynamic world / Complexity. 2008. – 14. № 1. P. 71–88. (в журнале «Химическая и биологическая безопасность. – 2008. - № 5-6).
22. *Craig W., Tepfer M., Degrassi G., Ripandelli D.* An overview of general features of risk assessments of genetically modified crops. / Euphytica. - 2008. – 164. - № 3, P. 853–880.
23. *Zhao B., Poh C.L.* Insights into environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics. / Proteomics. - 2008. – 8. - № 4. - P. 874–881.
24. <http://www.dw-world.de/dw/article/0,,5582496,00.html>
25. <http://www.ras.ru/news/shownews.aspx?id=717495ca-82b6-4904-a552-951d0f70fbe0>
26. Шевелуха В.С. Доклад «Биотехнологии и биобезопасность в агропромышленном производстве» на пленарном заседании секции «Биотехнология в сельском хозяйстве» Второго Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (12 ноября 2003г.)
27. *Avery, Oswald T., Colin M. MacLeod, and Maclyn McCarty.* Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. / Journal of Experimental Medicine 79, 2 (February 1, 1944): 137—158.
28. <http://projects.edtech.sandi.net/miramesa/DNAproject/griffith.html>
29. *Salentijn, Elma; Pereira, Andy; Angenent, Gerco; Linden, C.; Krens, Frans; Smulders, Marinus; Vosman, Ben.* Plant translational genomics: from model species to crops. Molecular Breeding. 2007. Vol. 20, 1. 1-13.

30. *Vincent W. Coljee, Heather L. Murray, William F. Donahue & Kevin A. Jarrell.* Seamless gene engineering using RNA- and DNA-overhang cloning. / Nature Biotechnology. - 2000. 18, 789-791.
31. *Yan Zhuang and Keith L. Adams.* Extensive Allelic Variation in Gene Expression in Populus F₁ Hybrids// Genetics. - 2007; 177: 1987-1996.
32. *Игнатьев И., Тромбицкий И., Лозан А.* Генетически модифицированные организмы и обеспечение биологической безопасности. / Бендеры: Экспресс, 2007.
33. *James VA, Avart C, Worland B, Snape JW and Vain P.* The relationship between homozygous and hemizygous transgene expression levels over generations in populations of transgenic rice plants. / Theor Appl Genet. - 2002. - 104. P. 553-561.
34. *Мирошниченко Д., Филиппов М., Долгов С., Харченко П.* Генетическая трансформация российских сортов пшеницы. (iab.ac.ru/groups/GeneEng/wheat)
35. *Rui Rong, Małgorzata M. Słupska, Ju-Huei Chiang and Jeffrey H. Miller.* Engineering large fragment insertions into the chromosome of *Escherichia coli*. / Gene. - 2004. - Vol. 336. - Issue 1. - P. 73-80.
36. *E M De Robertis and J B Gurdon.* Gene activation in somatic nuclei after injection into amphibian oocytes. / Proc Natl Acad Sci. USA. - 1977. - 74(6): 2470-2474.
37. *J.B. Gurdon.* From Nuclear Transfer to Nuclear Reprogramming: The Reversal of Cell Differentiation. / Annual Review of Cell and Developmental Biology. - 2006. - Vol. 22: 1-22.
38. *Koh Iba.* Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of Gene Engineering for Temperature Tolerance. / Annual Review of Plant Biology. - 2002. - Vol. 53: 225-245.
39. *Paul M. Hasegawa and Ray A. Bressan; Jian-Kang Zhu and Hans J. Bohnert.* Plant cellular and molecular responses to high salinity. / Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. - 2000. - Vol. 51: 463-499.
40. *Zhao Xin, Zhan LiPing, Liu GuiFeng.* Development in gene engineering of poplar resistant breeding. / Journal of Northeast Forestry University. - 2004. - Vol. 32. - 6. - P. 76-78, 102.
41. *Shen, Wei; Huang, Yue; Tang, Yi; Liu, De-Pei; Liang, Chih-Chuan.* A General Method to Modify BACs to Generate Large Recombinant DNA Fragments. / Molecular Biotechnology. - 2005. - Vol. 31. - 3. - P. 181-186(6).
42. *Zhu X, Li T, Dang Y, Feng Y, Huang P.* A Novel *in vitro* Transcription Method for Producing siRNAs Without Specific Sequence Requirements. / Molecular Biotechnology. - 2005. Vol. 31. - 3. P. 187-192.