

Биотехнология и генетическая инженерия

Биотехнология – совокупность методов естественных и инженерных наук, использующих свойства биологических систем различного уровня организации в технологических процессах.

Генетической инженерией называют прикладную молекулярную и клеточную генетику, разрабатывающую приемы экспериментального вмешательства, позволяющие по заранее намеченному плану перестраивать геном организмов, изменяя содержащуюся в нем наследственную (генетическую) информацию.

В понятие генетической инженерии не включают перестройку геномов обычными генетическими методами, т.е. искусственным вызыванием мутаций и получением рекомбинаций путем скрещивания.

Разделы биотехнологии:

Генетическая инженерия – технологии основаны на получении гибридных молекул ДНК и введении их в клетки бактерий, растений и животных.

Клеточная инженерия – технологии основаны на возможности выращивания тканей и клеток *in vitro*, слиянии соматических клеток или их протопластов.

Биологическая инженерия – технологии основаны на изучении биологических особенностей клеток и внедрении компьютерных методов контроля технологических режимов, позволяющих максимально реализовывать полезные свойства клеток.

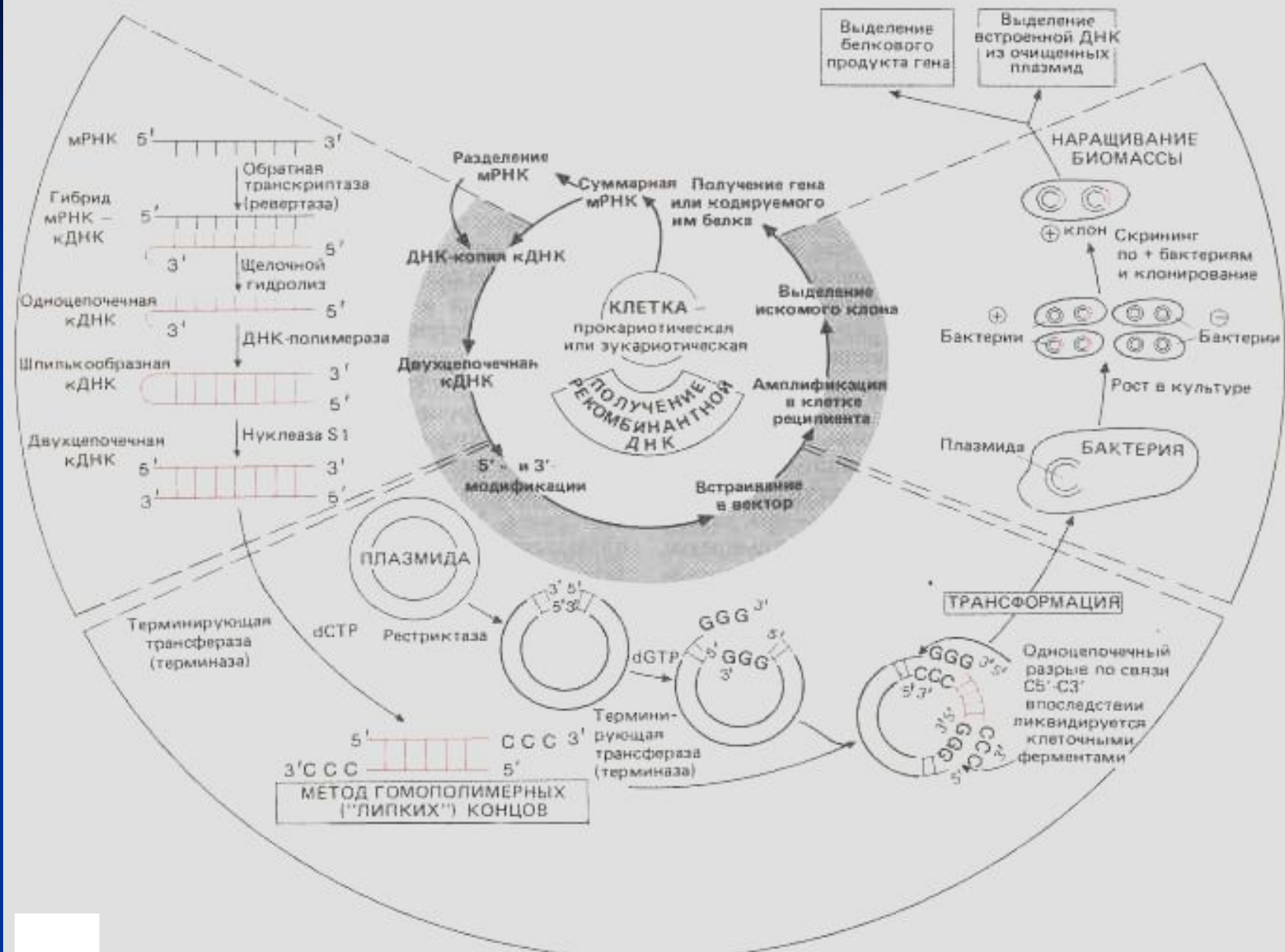
К генетической инженерии принято относить следующие операции:

1. синтез генов вне организма;
2. выделение из клеток отдельных генов или генетических структур (фрагментов хромосом, целых хромосом или даже целых клеточных ядер);
3. направленную перестройку выделенных структур;
4. копирование и размножение выделенных или синтезированных генов или генетических структур;
5. перенос и включение таких генов или генетических структур в подлежащий изменению геном;
6. экспериментальное соединение разных геномов в одной клетке.

Генная инженерия: клонирование генов

Выделение белкового продукта гена

Выделение встроившей ДНК из очищенных плазмид



Ферменты, используемые в генной инженерии.

Рестриктазы (рестрикционные нуклеазы) – ферменты, способные узнавать специфические последовательности ДНК (4-6 нуклеотидов) и расщепляющие их в строго определённых местах.

Ревертаза (РНК-зависимая ДНК-полимераза) – фермент, синтезирующий ДНК по матрице РНК.

Нуклеазы – большой класс ферментов, расщепляющих молекулы нуклеиновых кислот; имеются нуклеазы, расщепляющие одно- или двуцепочечные ДНК или РНК путём отщепления по одному нуклеотиду или небольших олигонуклеотидов.

Терминальная трансфераза – наращивает на концах фрагментов ДНК одностранные участки путём последовательного присоединения нуклеотидов; используется для создания на соединяемых фрагментах ДНК «липких» концов.

Расщепление фрагмента ДНК рестрицирующей эндонуклеазой типа II EcoR1 с образованием липких концов

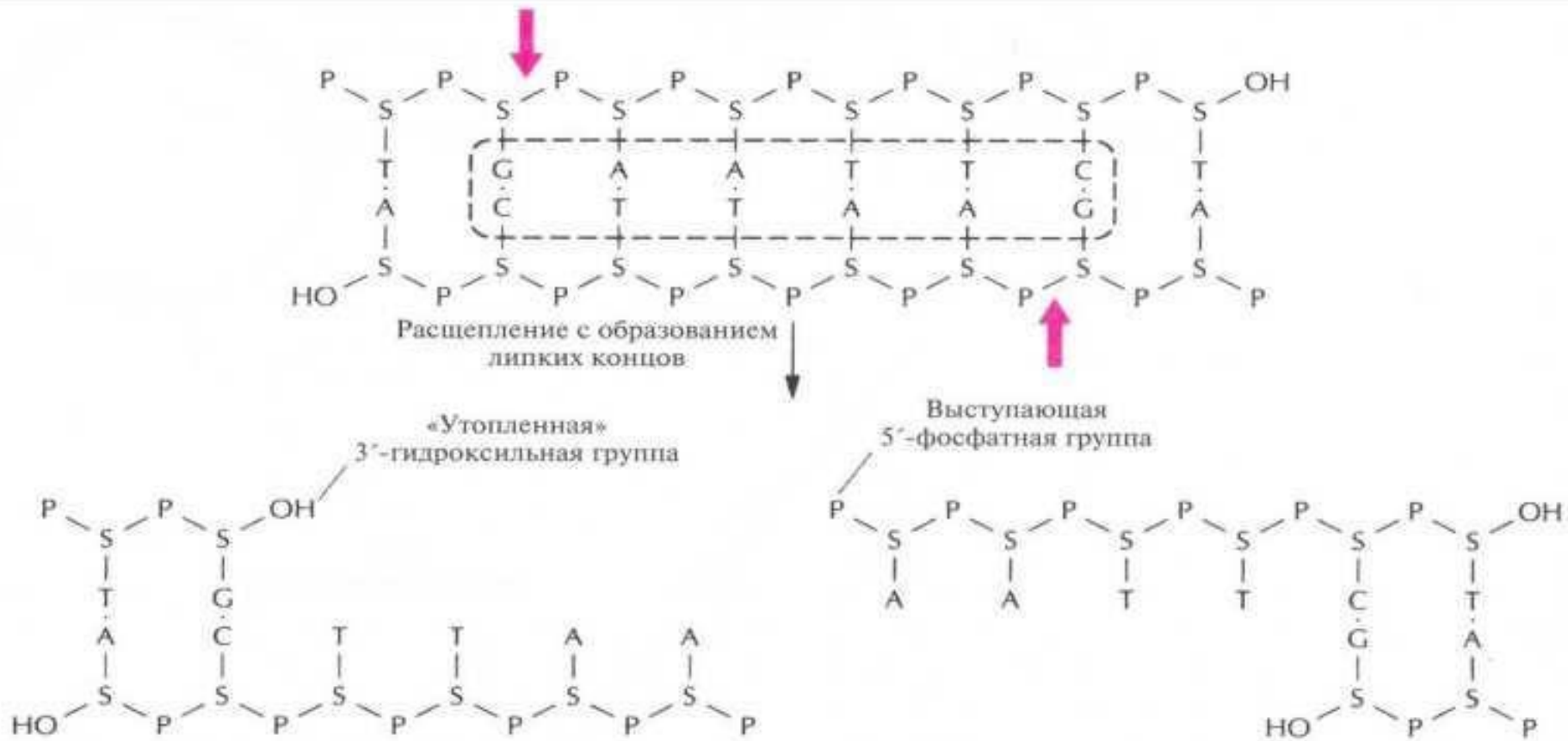
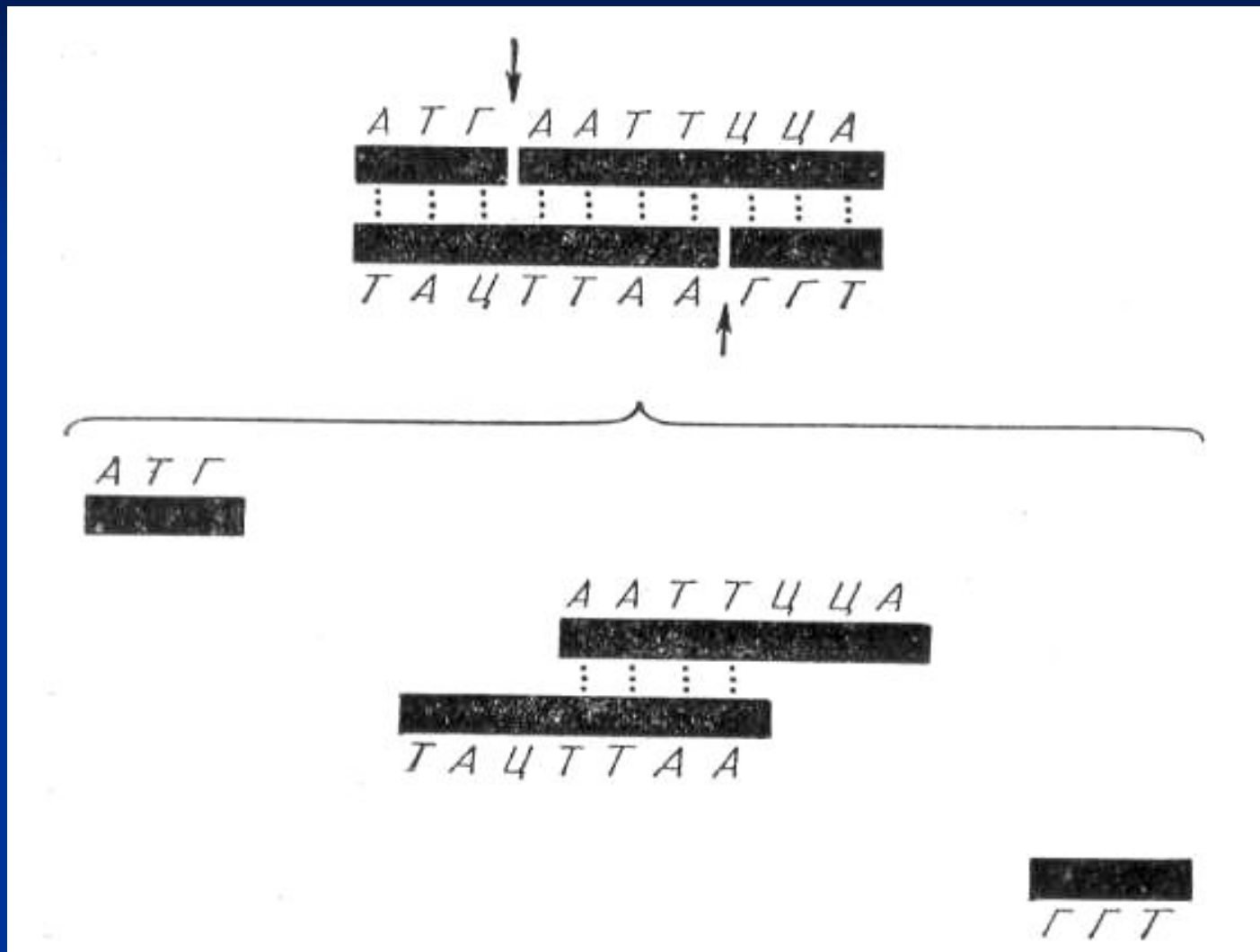
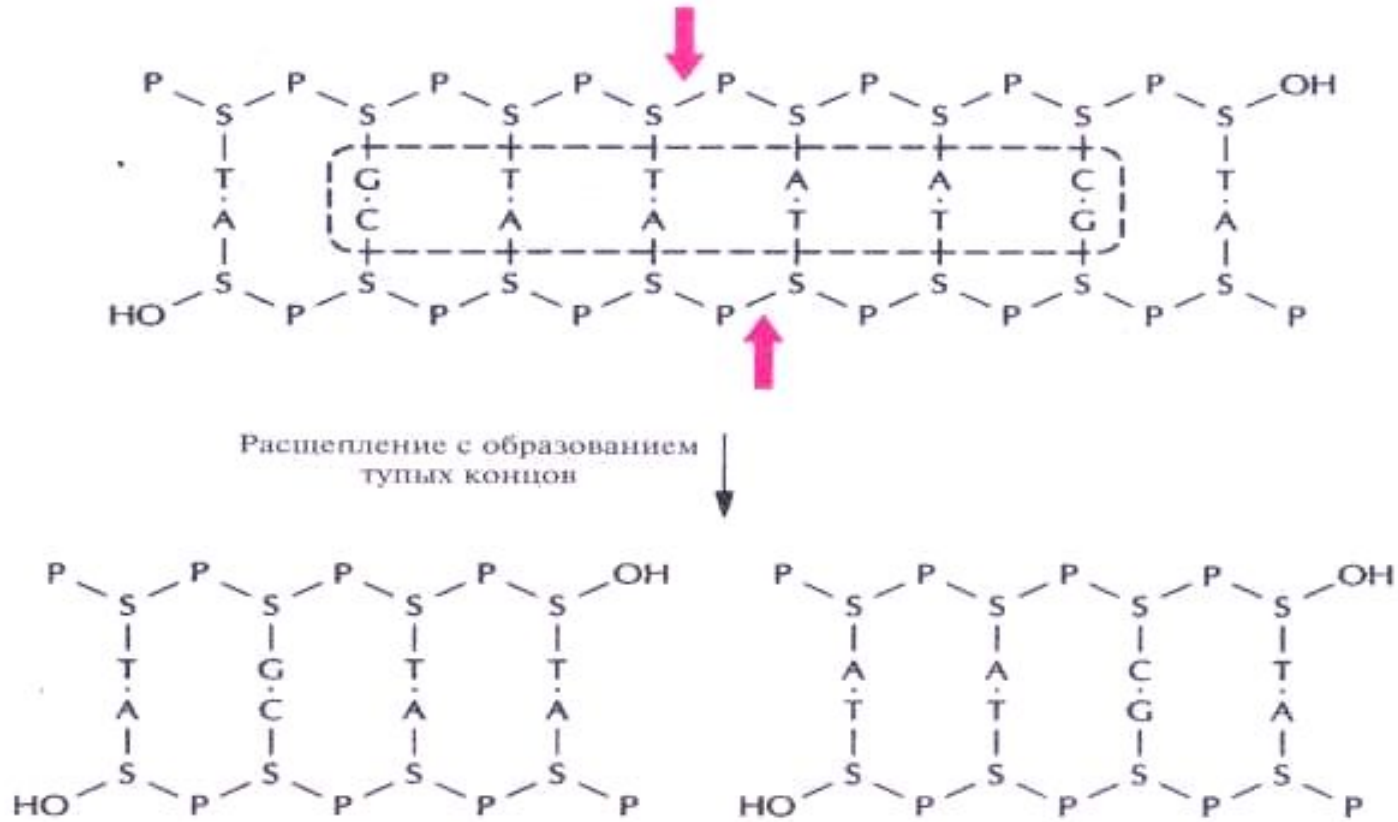


Схема действия рестриктазы EcoR 1



Расщепление фрагмента ДНК рестриктазой типа II Hind II с образованием тупых концов



**Нуклеотидные
последовательности,
распознаваемые
некоторыми
ферментами
рестрикции**

Фермент	Сайт узнавания	Характер образуемых концов
<i>EcoRI</i>	G [↓] A-A-T-T-C C-T-T-A-A [↑] G	Выступающие концы с 5'-фосфатной группой
<i>BamHI</i>	G [↓] G-A-T-C-C C-C-T-A-G [↑] G	Выступающие концы с 5'-фосфатной группой
<i>PstI</i>	C-T-G-C-A [↓] G G [↑] A-C-G-T-C	Выступающие концы с 3'-гидроксильной группой
<i>Sau3AI</i>	[↓] G-A-T-C C-T-A-G [↑]	Выступающие концы с 5'-фосфатной группой
<i>PvuII</i>	C-A-G [↓] C-T-G G-T-C [↑] G-A-C	Тупые концы
<i>HpaI</i>	G-T-T [↓] A-A-C C-A-A [↑] T-T-G	Тупые концы
<i>HaeIII</i>	G-G [↓] C-C C-C [↑] G-G	Тупые концы
<i>NotI</i>	G [↓] C-G-G-C-C-G-C C-G-C-C-G-G-C [↑] G	Выступающие концы с 5'-фосфатной группой

Отжиг

комплементарных
липких концов

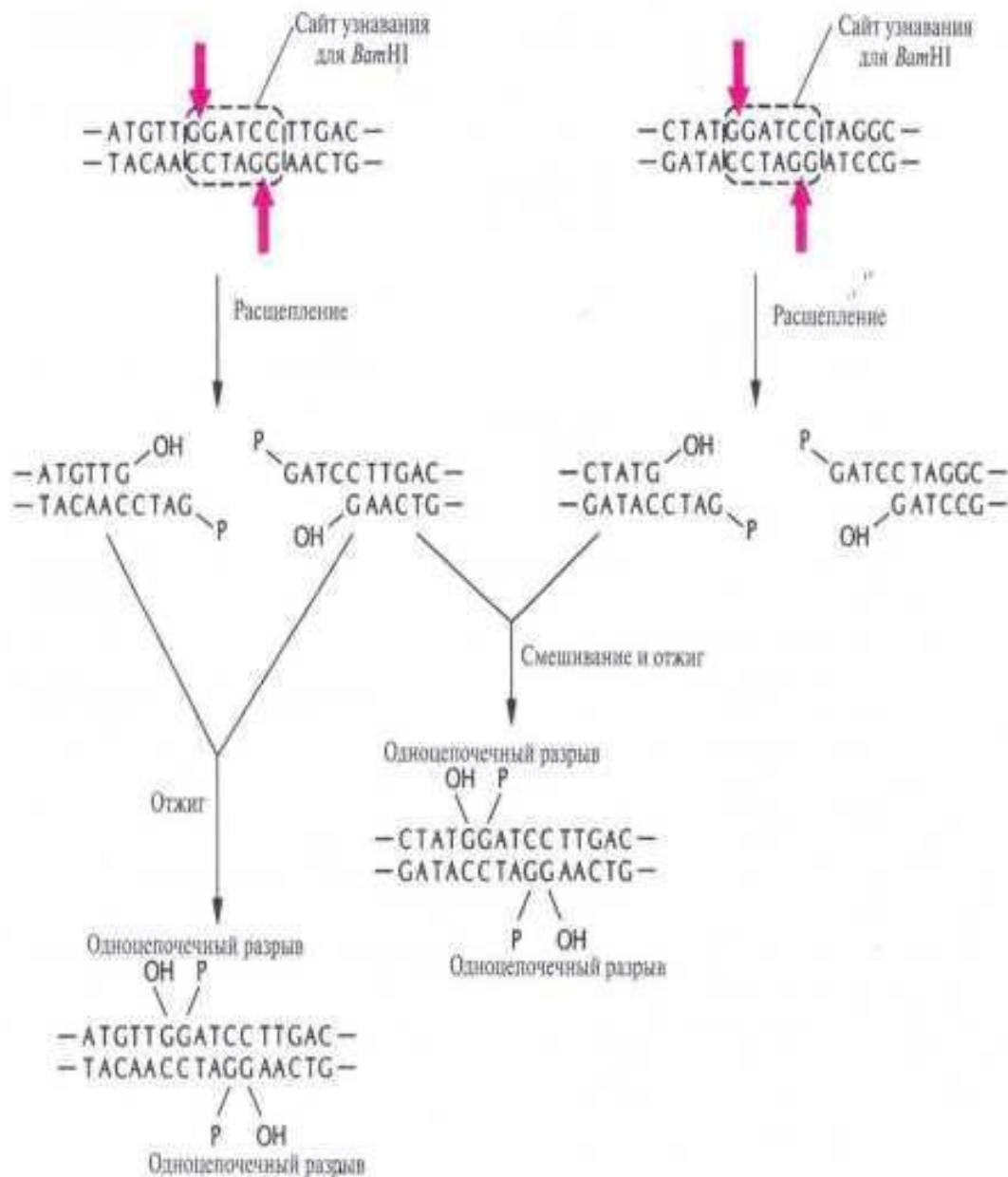
фрагментов,

образующихся при
расщеплении двух

разных образцов ДНК

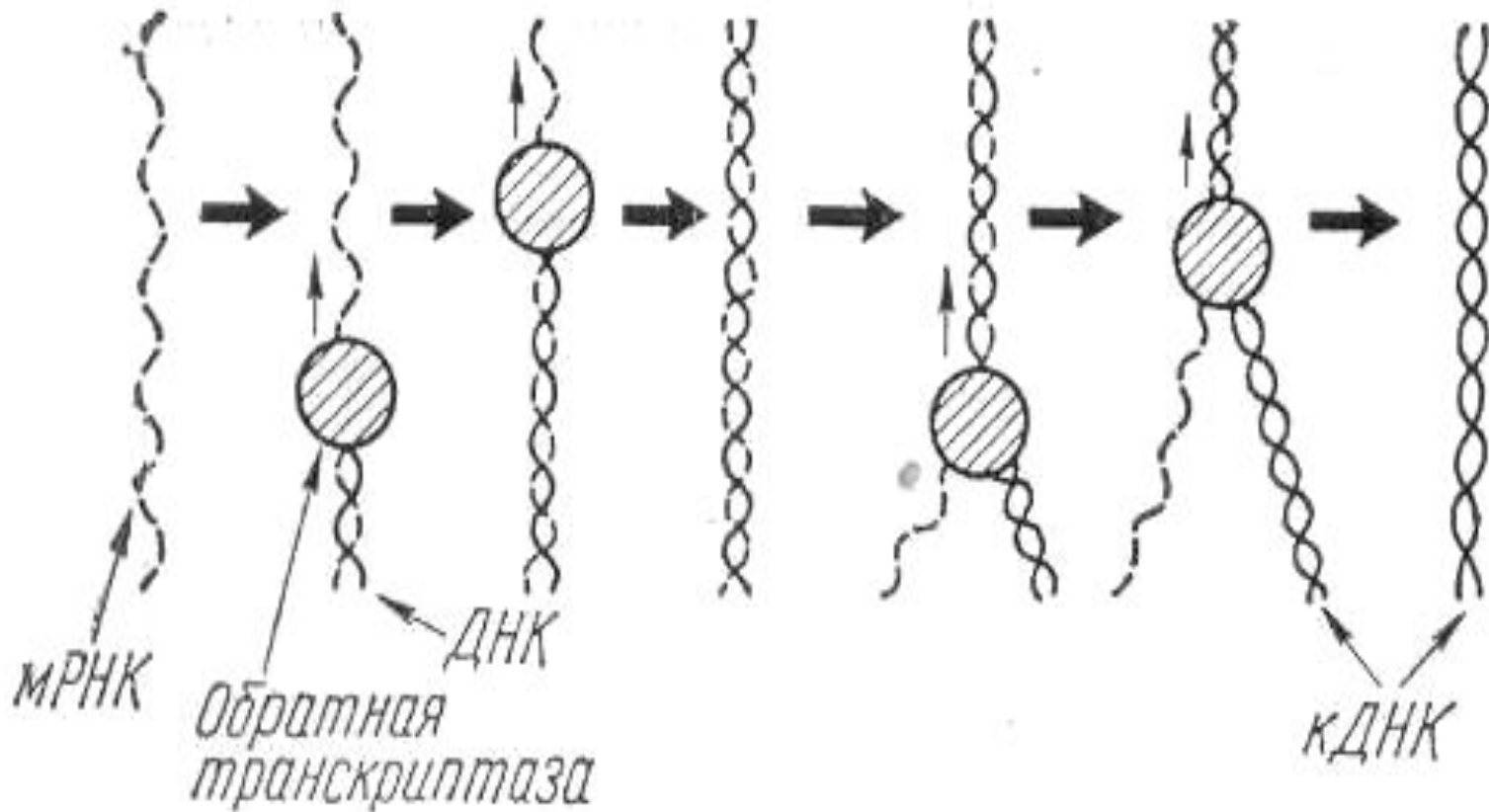
рестрицирующей

эндонуклеазой *Bam*HI

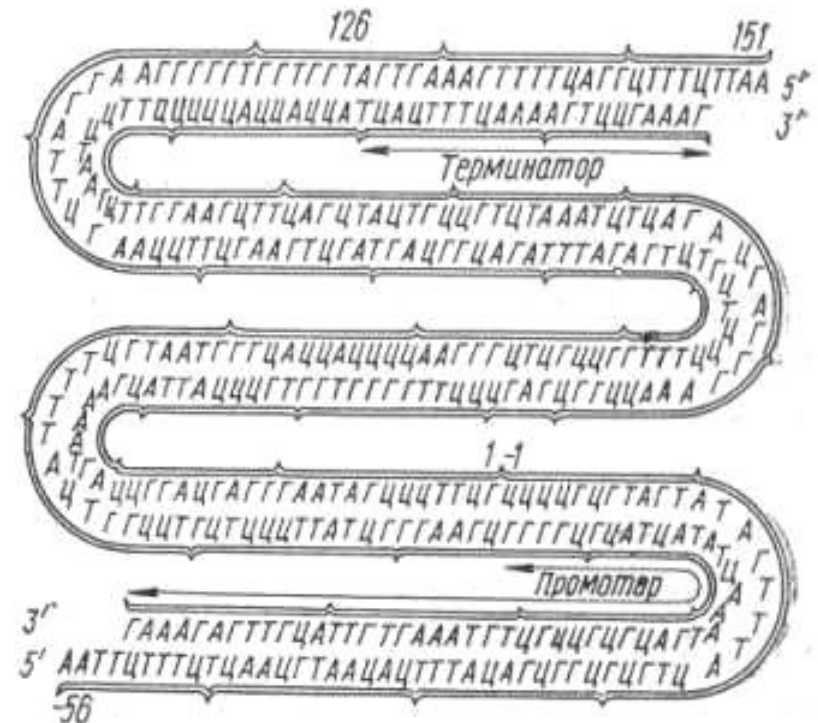
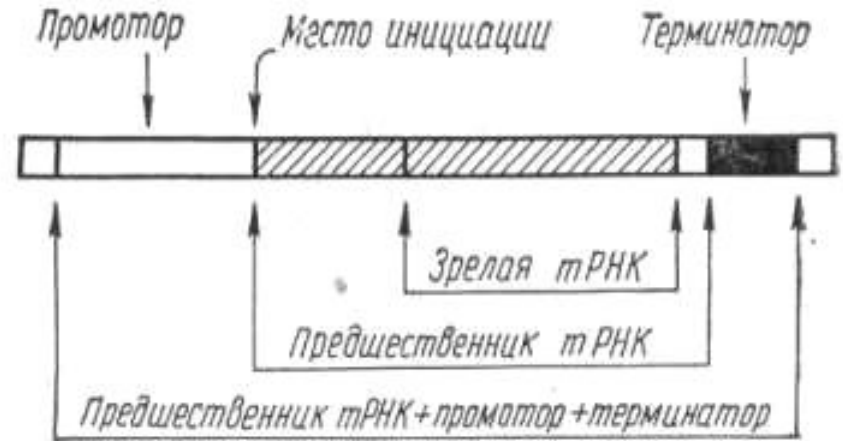


Синтез и выделение фрагментов ДНК

Схема ферментативного синтеза гена с помощью обратной транскрипции



Структура химически синтезированного Хораной функционально активного отрезка ДНК кишечной палочки

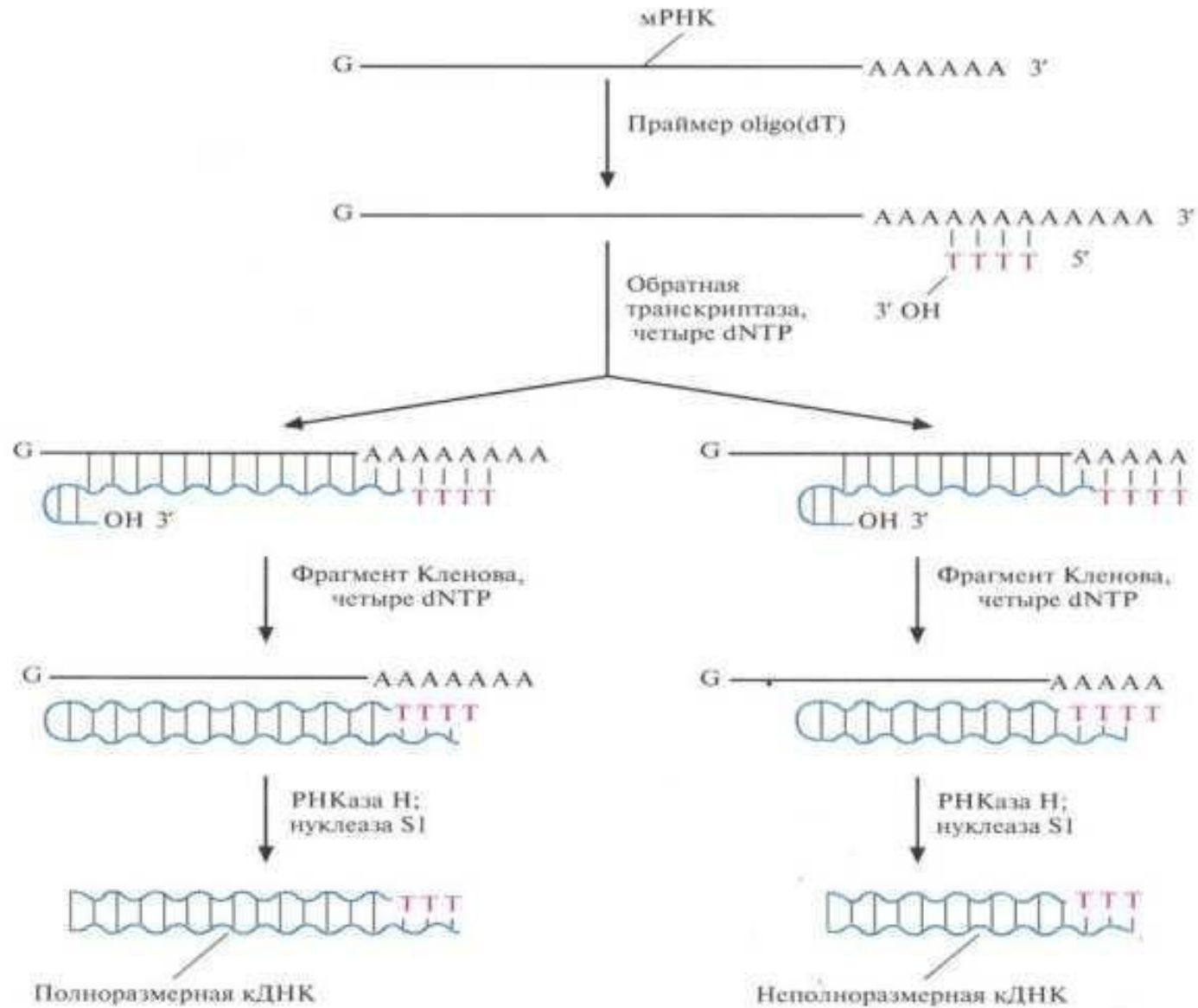


Цифры – нумерация нуклеотидов:
 промотор от -52 до -1
 ген супрессорной тирозиновой тРНК от 1 до 125
 терминатор от 127 до 146
 на концах отрезка
 тетра нуклеотиды ААТТ и ТТАА

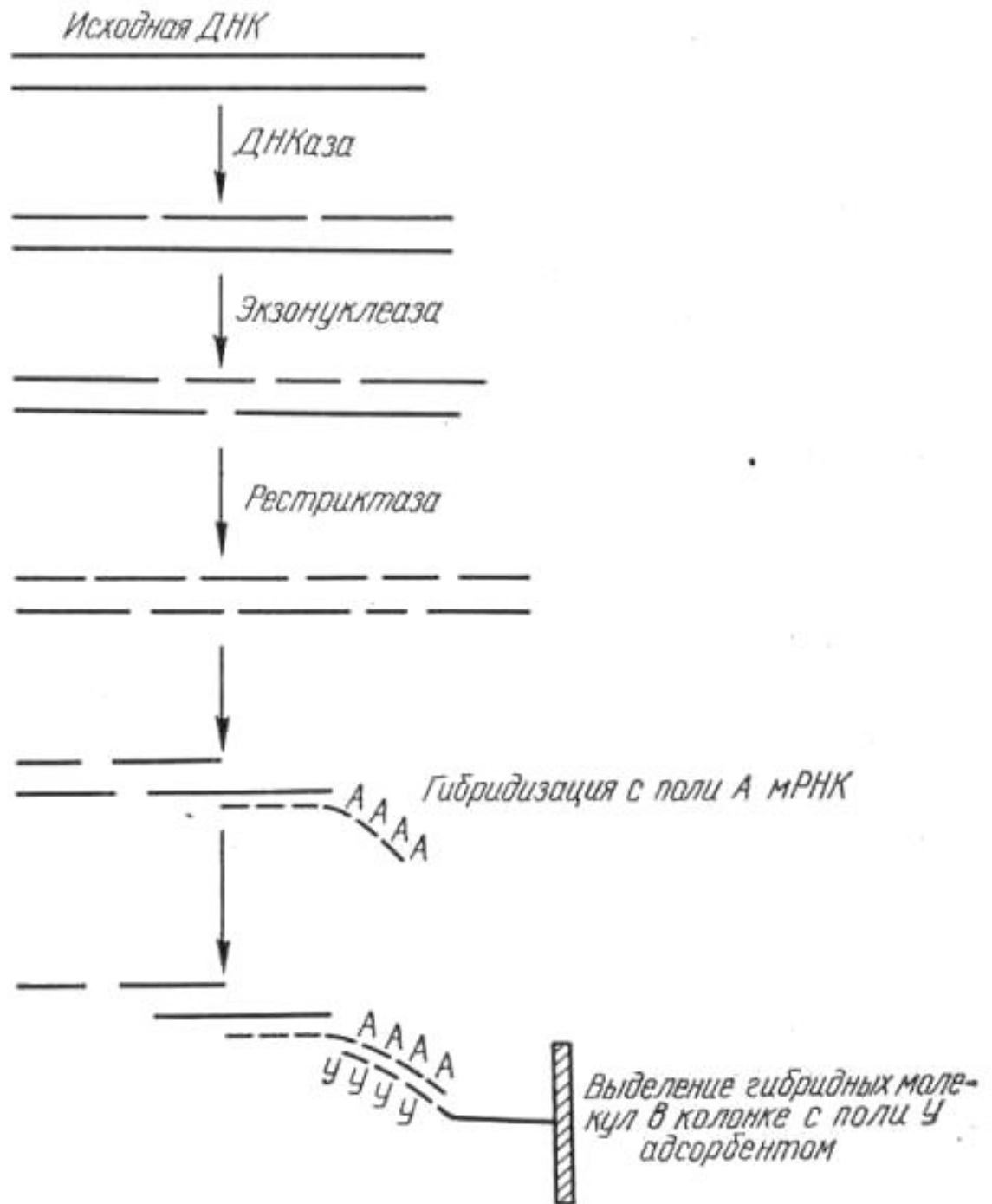
Синтез кДНК

Синтез кДНК. К препарату очищенной мРНК добавляют праймер oligo(dT). Для синтеза ДНК на РНК-матрице используют фермент обратную транскриптазу и четыре dNTP. In vitro обратная транскриптаза не обеспечивает синтез полноразмерных кДНК-копий на всех матрицах и образует на конце растущей цепи шпильку со свободной 3'-ОН-группой. Эта группа инициирует синтез второй цепи ДНК при участии фрагмента Клёнова. После завершения синтеза молекулы мРНК гидролизуют РНКазой H, а ДНК обрабатывают нуклеазой S1, в результате чего получают линейные молекулы ДНК с тупыми концами без шпилек.

Синтез кДНК



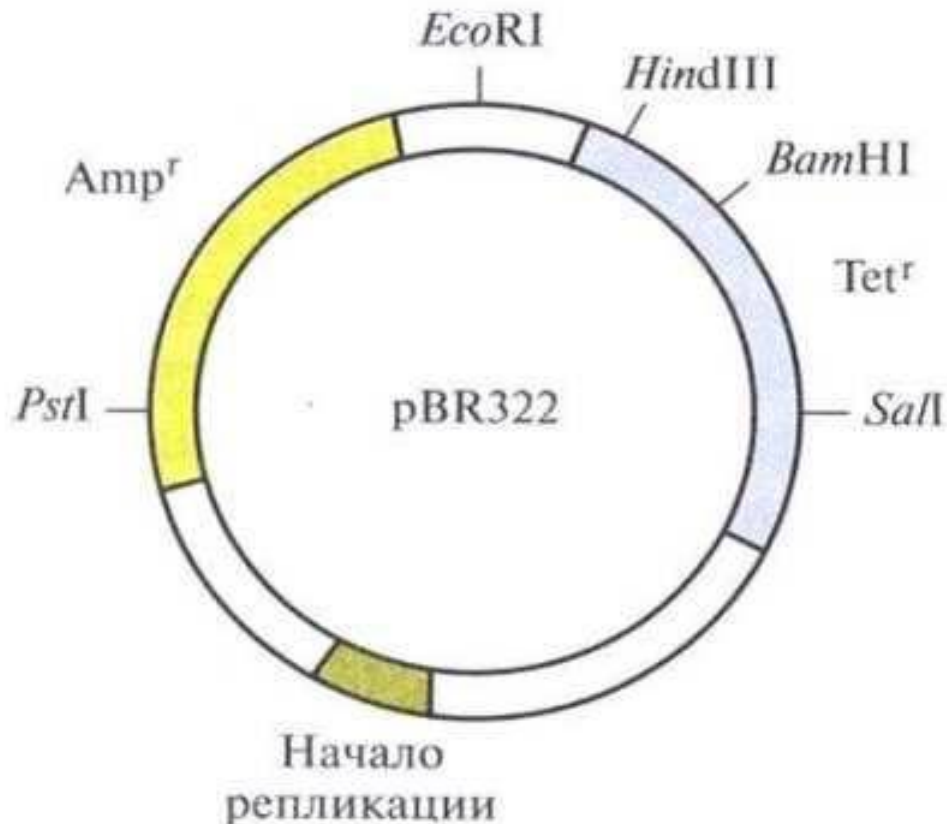
Выделение фрагментов ДНК, содержащих нужный ген



Векторы в генной инженерии.

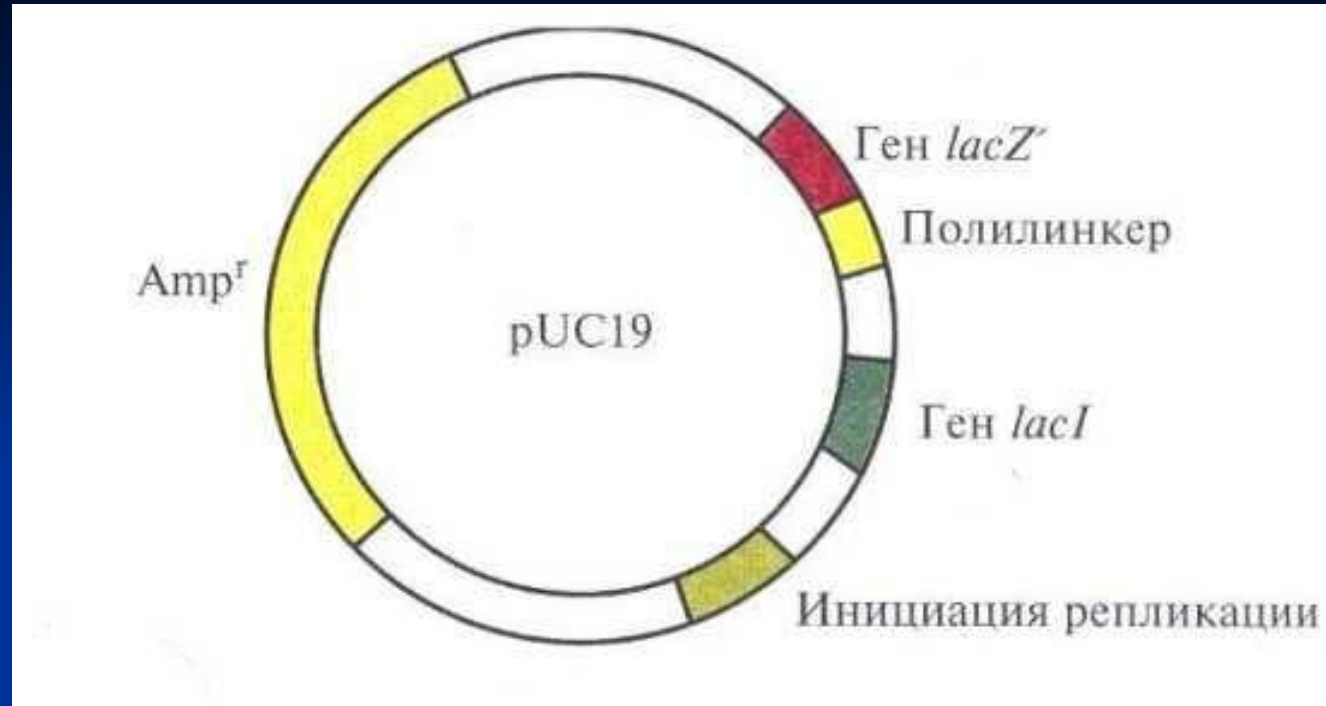
Для осуществления трансгеноза (введения чужеродных генов в клетку реципиента) используются векторы (переносчики). Векторы – это своеобразные молекулярные такси способные самостоятельно проникать в клетку-мишень, встраиваться в ДНК и в ней реплицироваться. В качестве векторов используют ДНК фага или бактериальные плазмиды.

Генетическая карта плазмидного вектора pBR322



Генетическая карта плазмидного вектора pBR322. Гены устойчивости к тетрациклину (Tet^r) и ампициллину (Amp^r) содержат уникальные сайты узнавания для *HindIII*, *SalI*, *BamHI* и *PstI*. *EcoRI*-сайт расположен вне этих генов. Длина вектора – 4361 п. н.

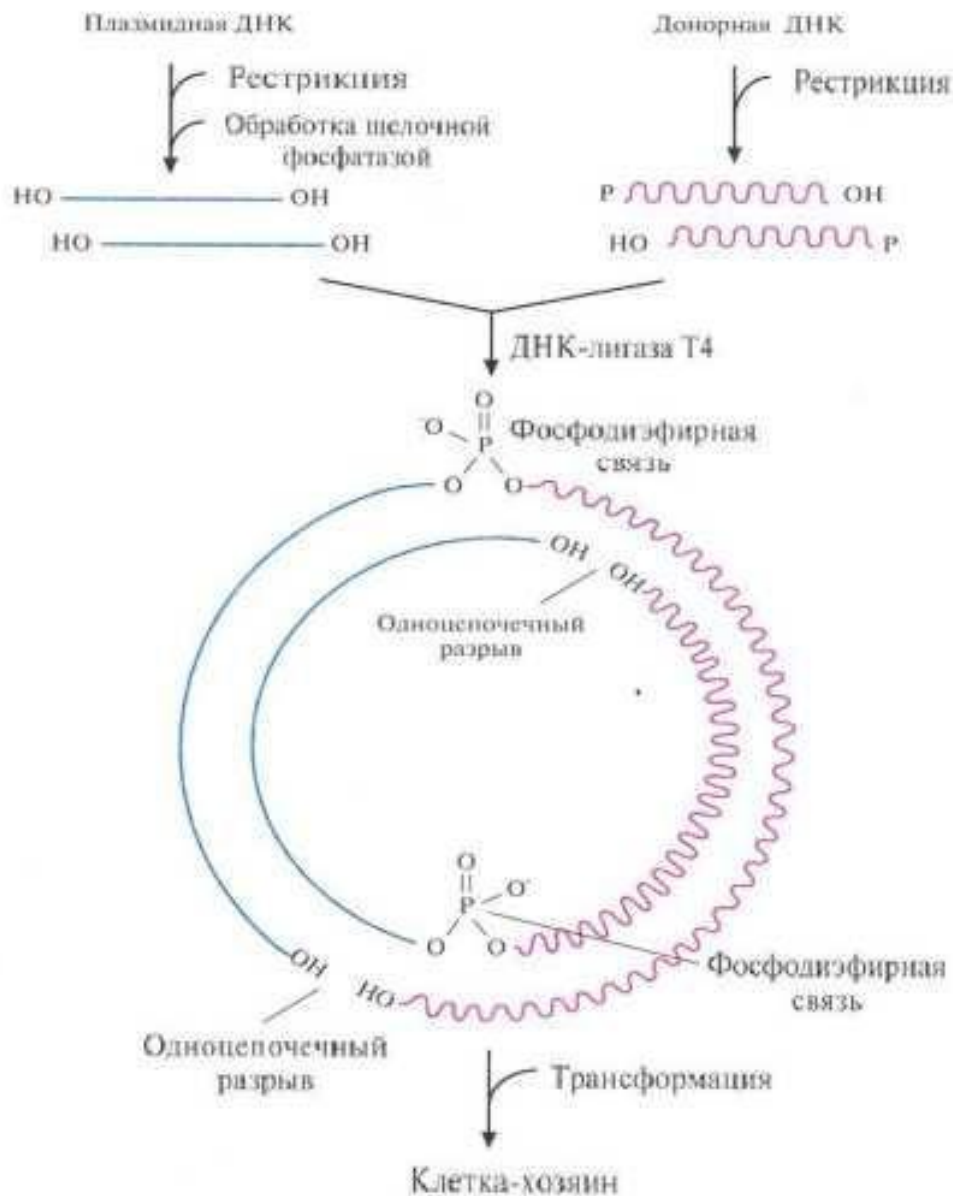
Генетическая карта плазмидного вектора pUC19



Плазмида состоит из 2686 пар нуклеотидов и содержит уникальные сайты узнавания для EcoR1, Sac1, Kpn1, Xma1, Sma1, BamH1, Xba1, Sal1, HincII, Acc1, Pst1, BspM1, Sph1 и HindIII, локализованные в полилинкере; ген устойчивости к ампицилину; сайт инициации репликации, функционирующий в *E.coli*; ген LacI, контролирующий синтез репрессора, который блокирует транскрипцию гена LacZ в отсутствии индуктора ИПТГ.

Встраивание чужеродной ДНК в плазмидный вектор

Плазмидную ДНК, обработанную рестриктазой и щелочной фосфатазой, смешивают с рестрицированной донорной ДНК, содержащей нужный ген, и добавляют ДНК-лигазу. Два из четырёх одноцепочечных разрывов при этом устраняются и конструкция оказывается стабильной благодаря образовавшимся фосфодиэфирным связям. После введения гибридной ДНК в клетку-хозяина происходит её репликация и образуются новые кольцевые молекулы уже без разрывов.



Ферментативный синтез гена и встраивание его в векторную плазмиду

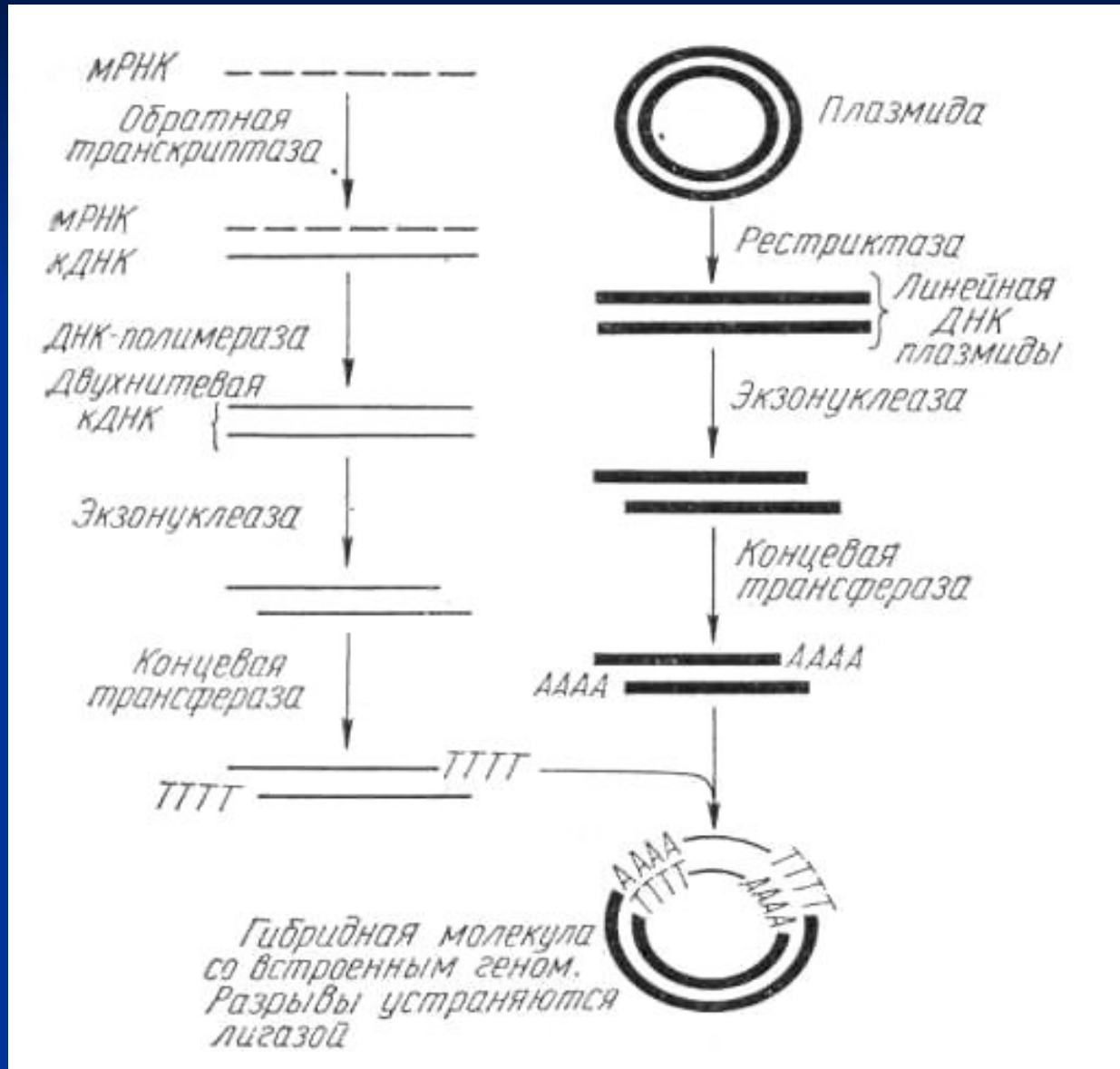
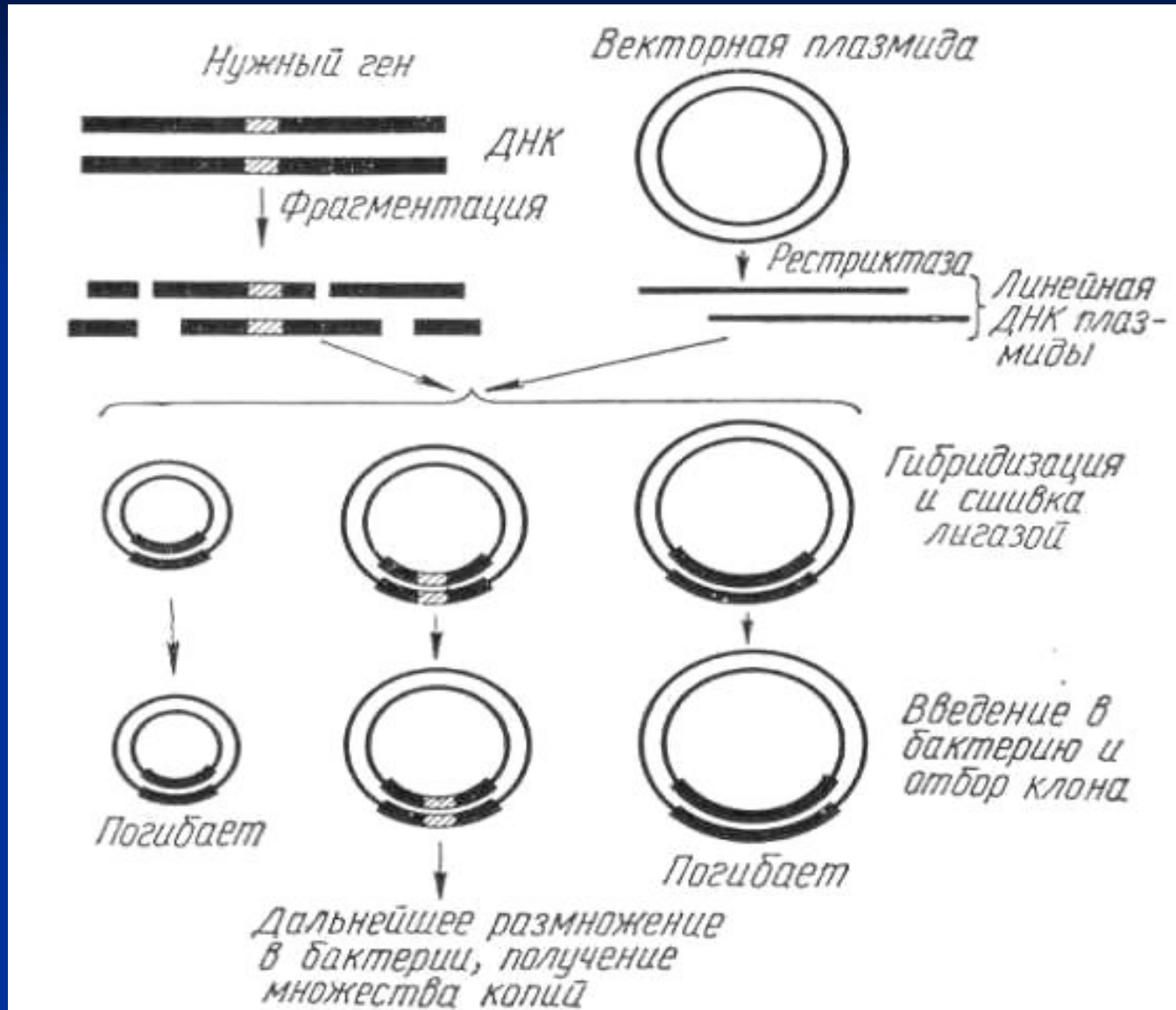


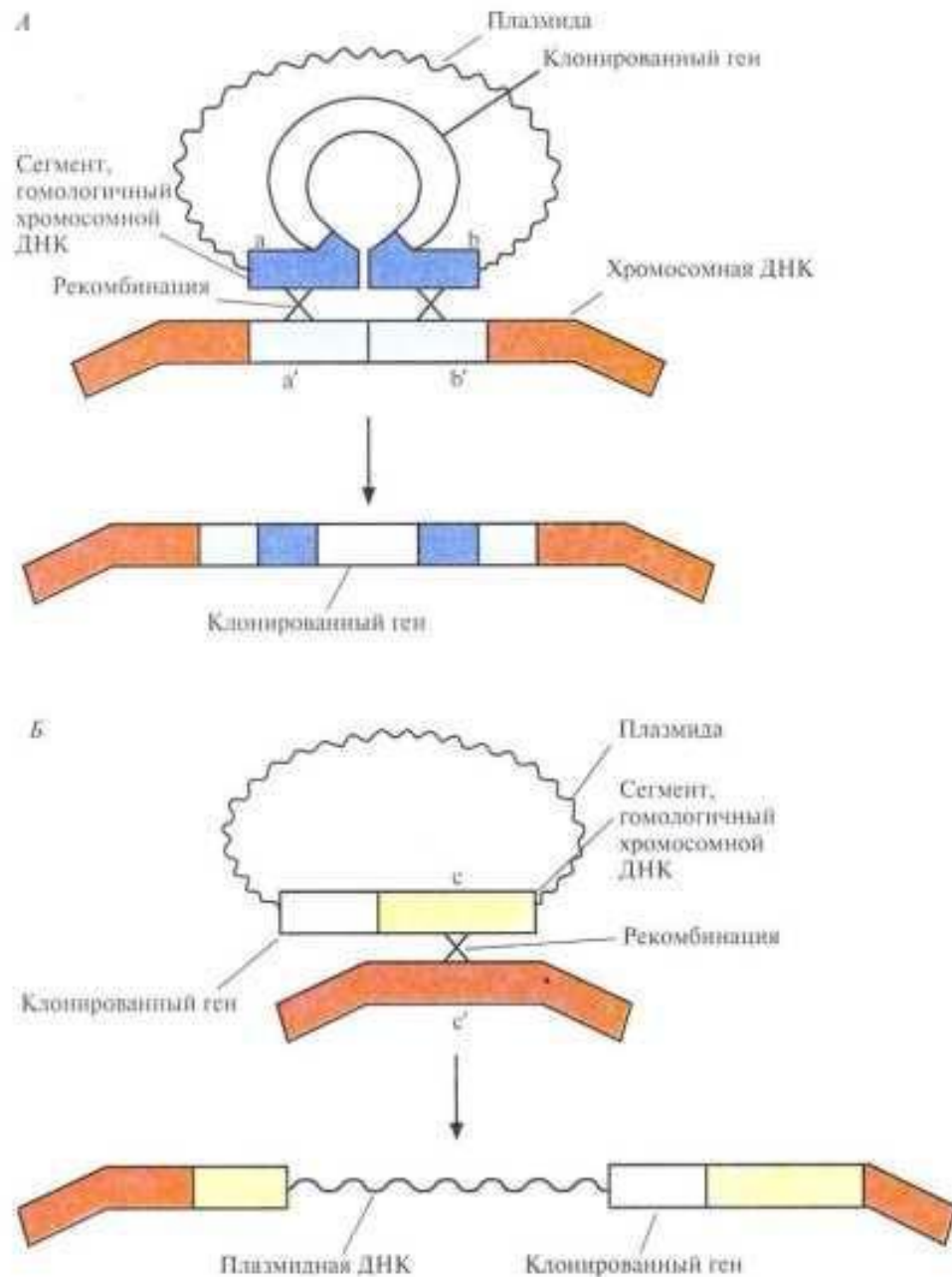
Схема получения и клонирования рекомбинантной молекулы



Интеграция чужеродной ДНК в хромосому хозяина

- Процесс интеграции состоит в следующем:
- Идентификация подходящего сайта интеграции, т. е. сегмента хозяйской ДНК, последовательность которого может быть прервана без ущерба для функционирования клетки.
- Выделение и клонирование всего хромосомного сайта интеграции или его части.
- Встраивание нужного гена вместе с регулируемым промотором в клонированный сайт интеграции или вблизи него.
- Перенос полученной генетической конструкции «хромосомный сайт интеграции/клонированный ген» в хозяйскую клетку в составе плазмиды, не способной к автономной репликации в клетках этого хозяина.
- Отбор и сохранение тех хозяйских клеток, которые экспрессируют клонированный ген. Наследование клонированного гена возможно только в случае его интеграции в хромосому клеток хозяина.

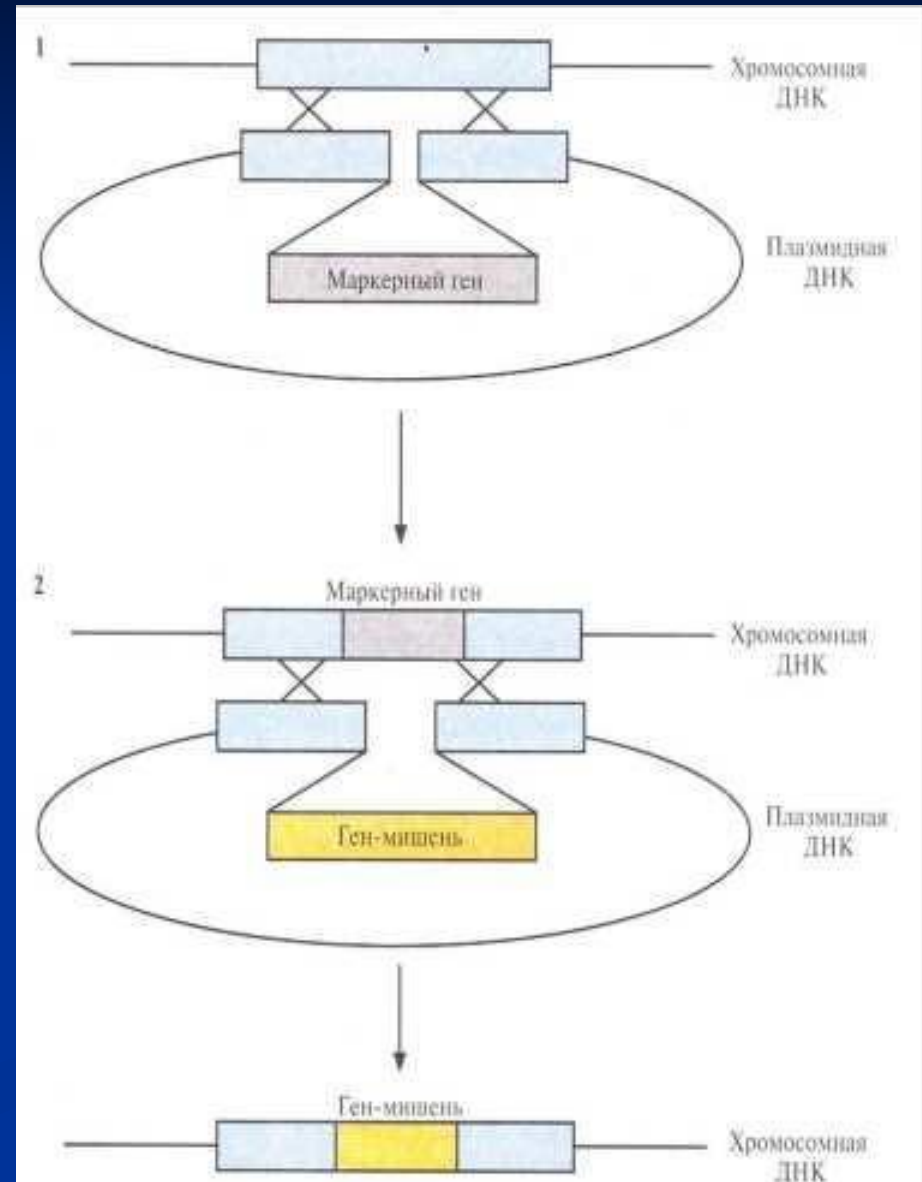
**Два способа интеграции
клонированного в
плазмиде гена в хромосому
в результате двойного (А)
и одиночного (Б)
кроссинговера**

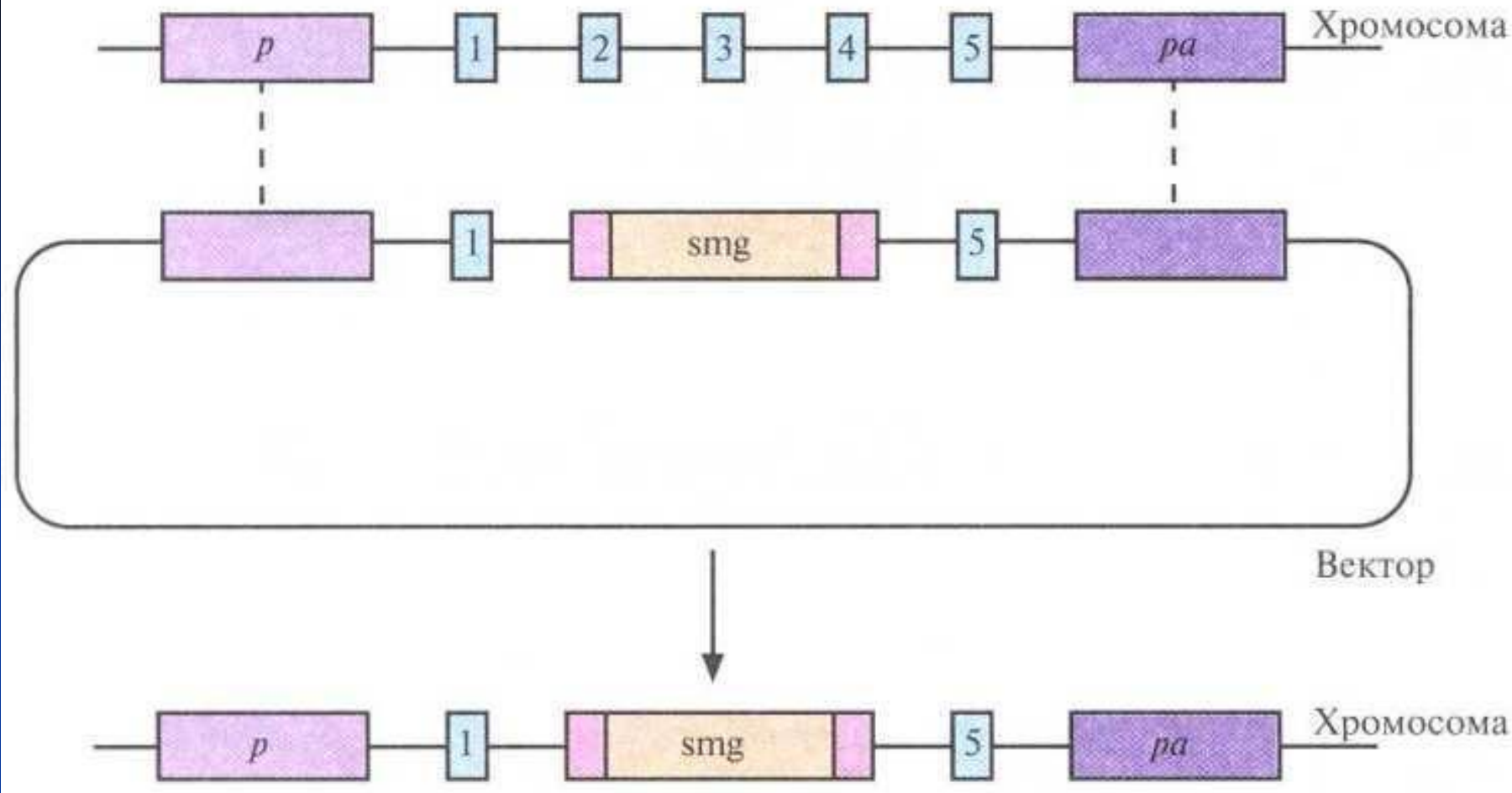


Встраивание чужеродного гена в заранее выбранный сайт в хромосоме *B.subtilis*

1 этап – в хромосомную ДНК хозяйской клетки с помощью гомологичной рекомбинации встраивают маркерный ген

2 этап – маркерный ген замещают геном-мишенью





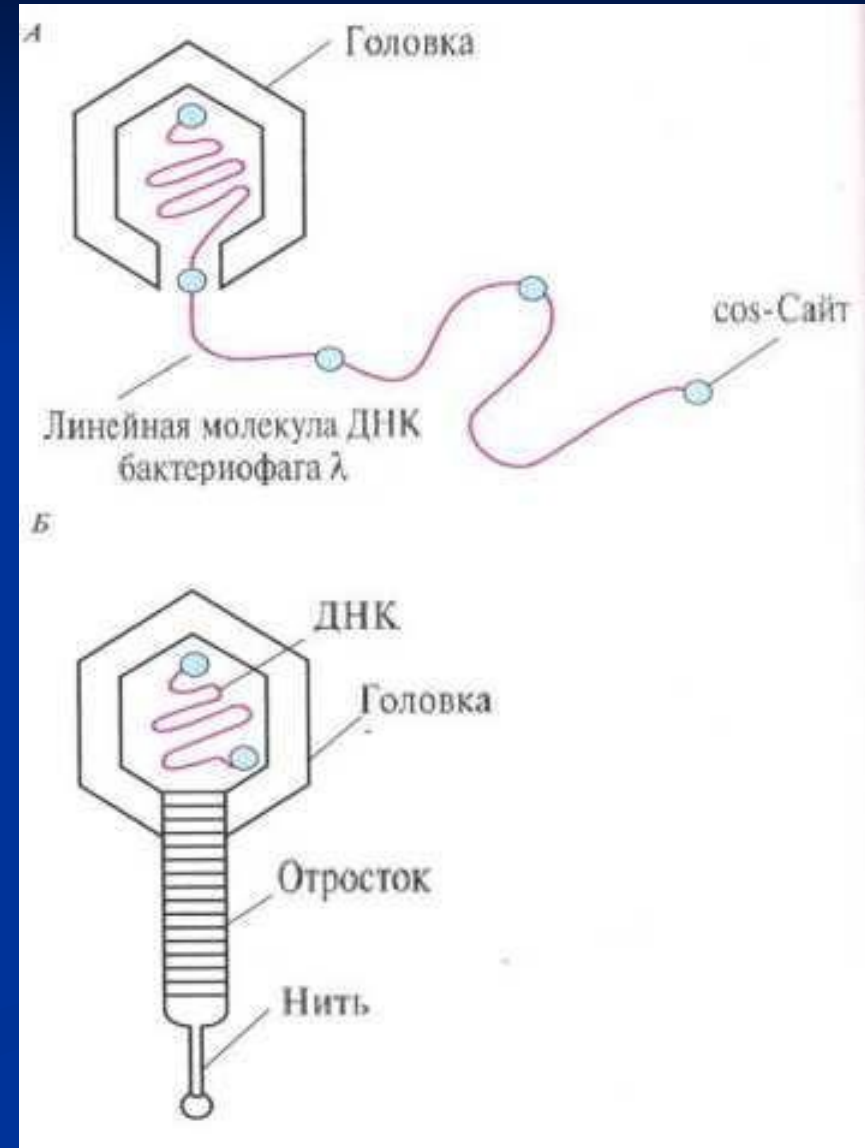
«Нокаут» гена с помощью направленной гомологичной рекомбинации. Вектор несет селективный маркерный ген (*smg*) и фланкирующие его последовательности, гомологичные соответствующим участкам гена-мишени. Последний содержит пять экзонов (1 – 5). В результате гомологичной рекомбинации (штриховые линии) ген-мишень прерывается («нокаутируется»).

Векторы для клонирования крупных фрагментов ДНК

Литический путь развития λ .

А. При репликации кольцевой ДНК бактериофага λ образуется линейная молекула, состоящая из повторяющихся сегментов длиной примерно 50 т.п.н. Каждый из этих сегментов представляет собой полноразмерную фаговую ДНК.

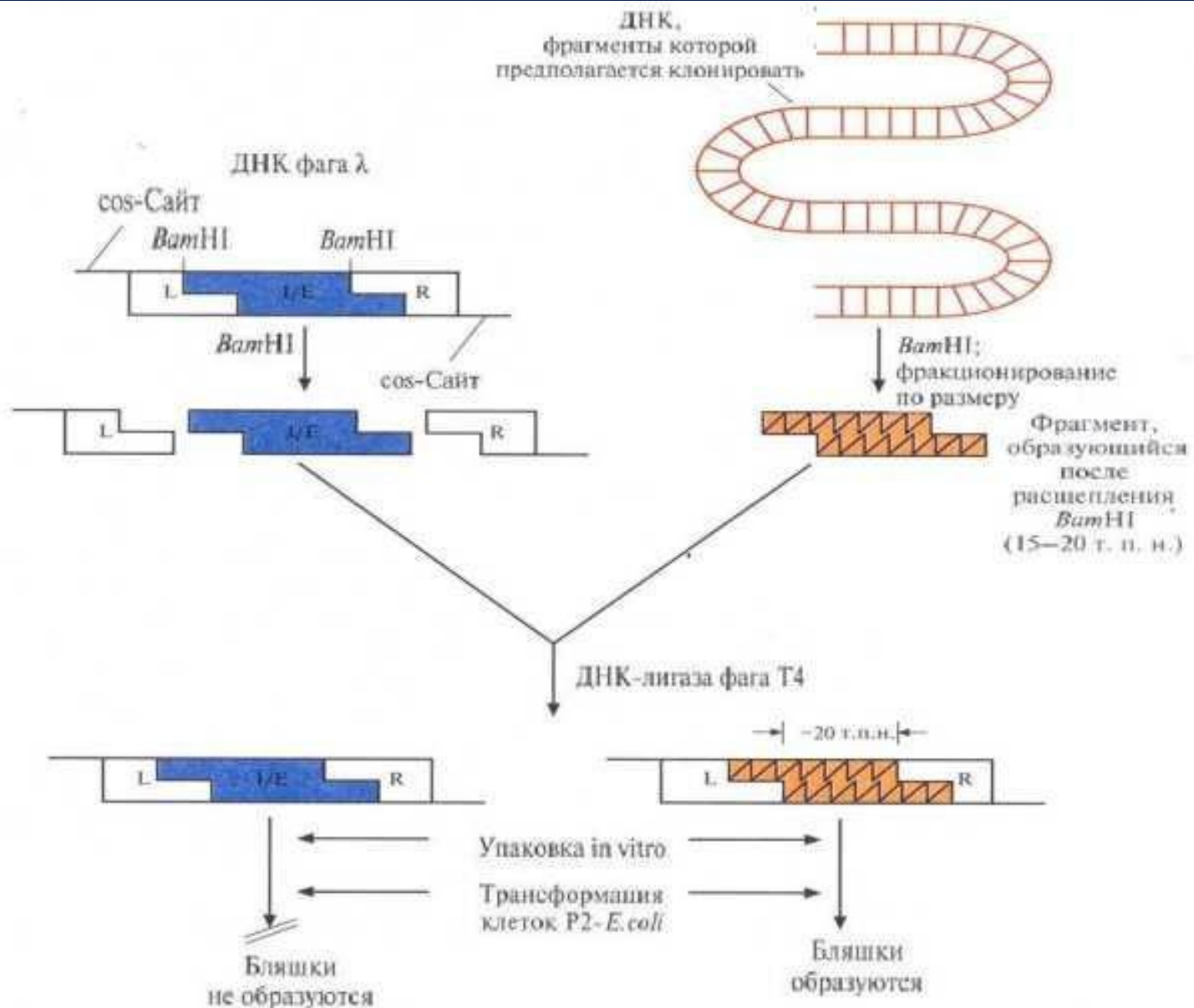
Б. Фаговая головка вмещает один такой сегмент, затем к головке присоединяется уже собранный отросток.



Клонирующая система на основе бактериофага λ .

Фаговая ДНК имеет два BamH1-сайта, фланкирующих её I/E-сегмент. Клонируемую ДНК расщепляют с помощью BamH1, фракционируют полученные фрагменты по размеру и выделяют из них те, которые имеют размер от 15 до 20 т.п.н. Фаговую ДНК обрабатывают этим же ферментом. Оба препарата ДНК смешивают и обрабатывают ДНК-лигазой фага T4. Лигированная смесь содержит самые разные комбинации ДНК, в том числе (1) восстановленную ДНК фага λ и (2) рекомбинантные молекулы, содержащие R- и L-области фаговой ДНК и вставку клонируемой ДНК размером ≈ 20 т.п.н., занявшую место области I/E фагового генома. Рекомбинантные молекулы упаковывают в головки бактериофага λ *in vitro*, и после добавления отростков получают инфекционные фаговые частицы. В инфицированных рекомбинантным фагом клетках *E.coli*, в хромосому которых интегрирована ДНК бактериофага P2, могут реплицироваться и образовывать инфекционные частицы только молекулы ДНК, составленные из R- и L-областей фаговой ДНК и клонированной вставки размером ≈ 20 т.п.н.

Клонирующая система на основе бактериофага λ

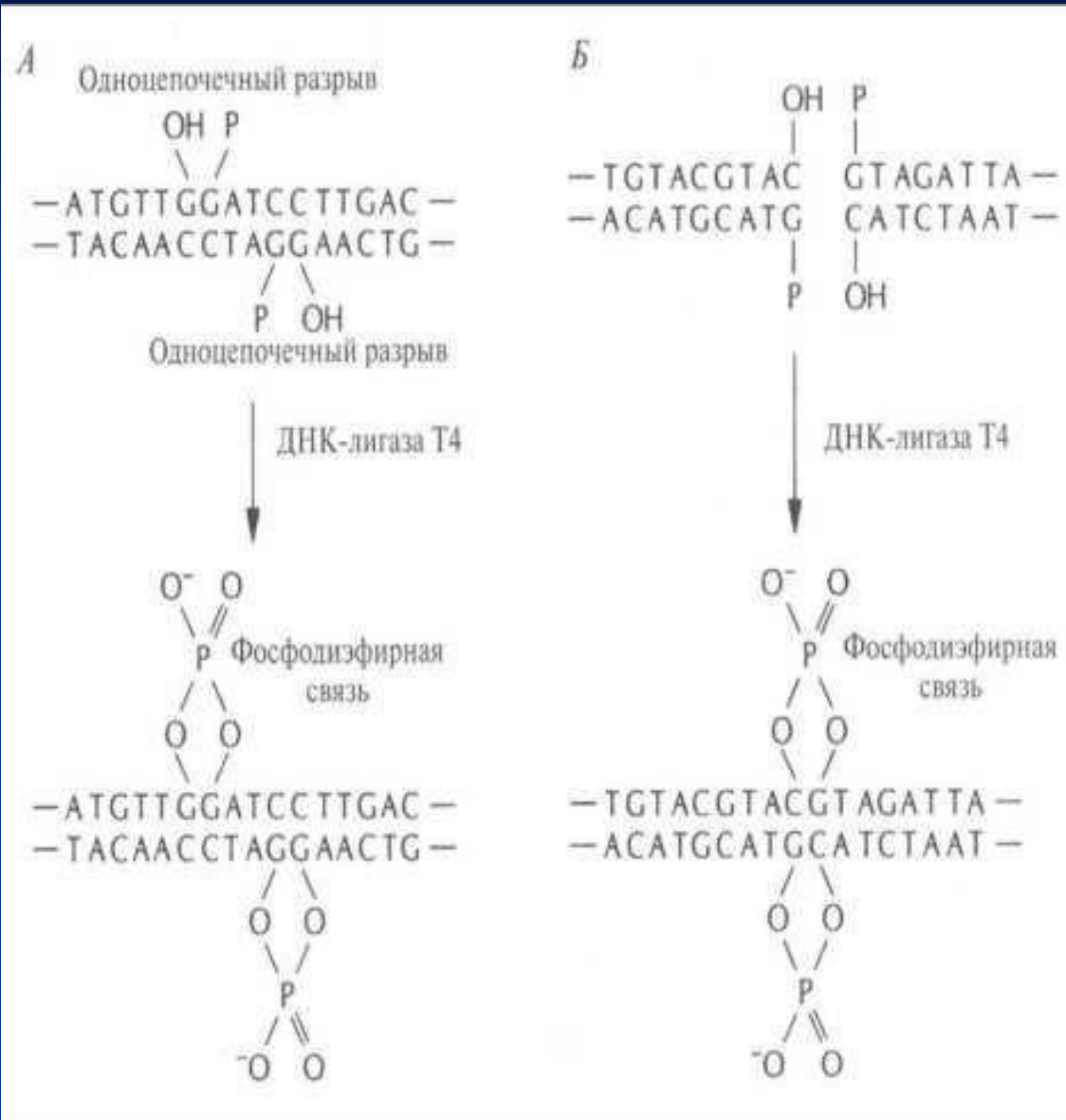


Лигирование липких и тупых концов в молекуле ДНК фагом Т4

ДНК фага Т4 образует фосфодиэфирные связи между 5'-фосфатными и 3'-гидроксильными группами в месте разрыва в остове двухцепочечной ДНК.

А – лигирование липких концов

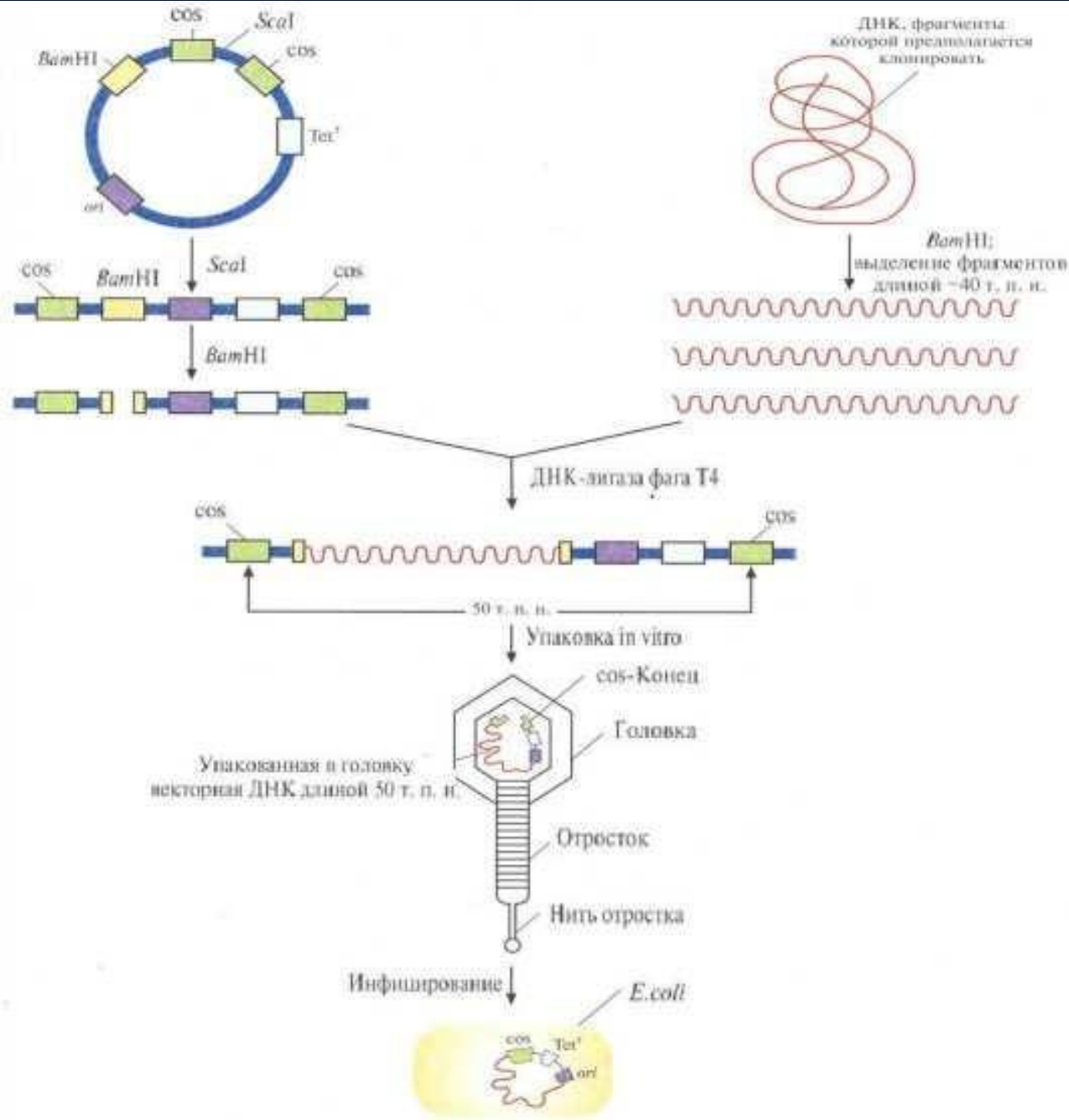
В – лигирование тупых концов



Клонирование с помощью космидного вектора

Космида имеет точку начала репликации (*ori*), обеспечивающую её существование в *E.coli* в виде плазмиды; два интактных *cos*-конца, разделённых уникальным сайтом для *ScaI*; *BamHI*-сайт вблизи одного из *cos*-сайтов и ген устойчивости к тетрациклину (*Tet^r*). ДНК, которую хотят клонировать, расщепляют рестриктазой *BamHI* и фракционируют по размеру, чтобы выделить молекулы длиной примерно 40 т.п.н. Плазмидную ДНК расщепляют с помощью *ScaI* и *BamHI*. Оба препарата ДНК смешивают и обрабатывают ДНК-лигазой фага T-4. Некоторые из гибридных молекул, образовавшихся после лигирования, содержат вставку размером около 40 т.п.н., так что их суммарная длина составляет примерно 50 т.п.н. Эти молекулы упаковываются *in vitro* в головки бактериофага λ , затем к головкам прикрепляются отростки, и образуются инфекционные частицы. При инфицировании этим фагом *E.coli* в бактериальной клетке оказывается линейная молекула ДНК с *cos*-концами, которые спариваются друг с другом. ДНК-лигаза клетки-хозяина зашивает одноцепочечные разрывы, и образовавшаяся кольцевая молекула существует в клетке-хозяине как автономно реплицирующаяся единица. Трансформированные клетки можно идентифицировать по признаку устойчивости к тетрациклину.

Клонирование с помощью космидного вектора



Перенос генов с помощью искусственных дрожжевых хромосом

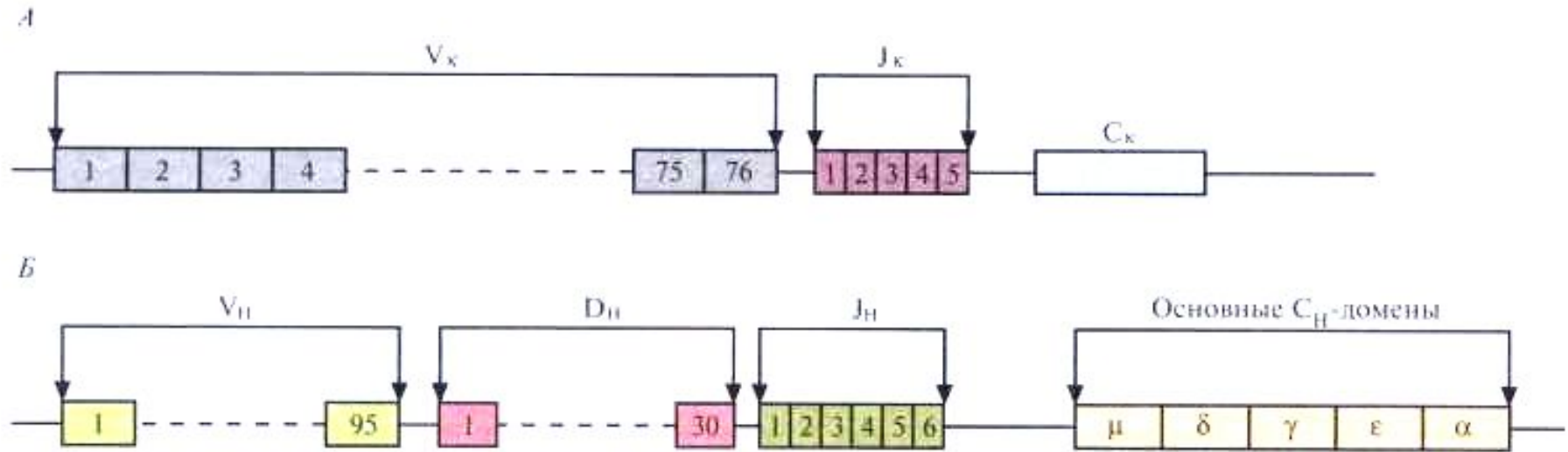
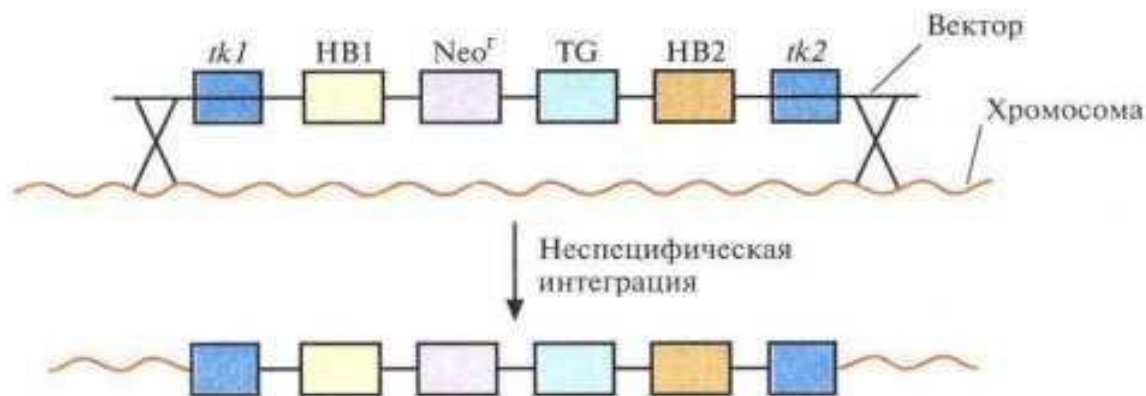


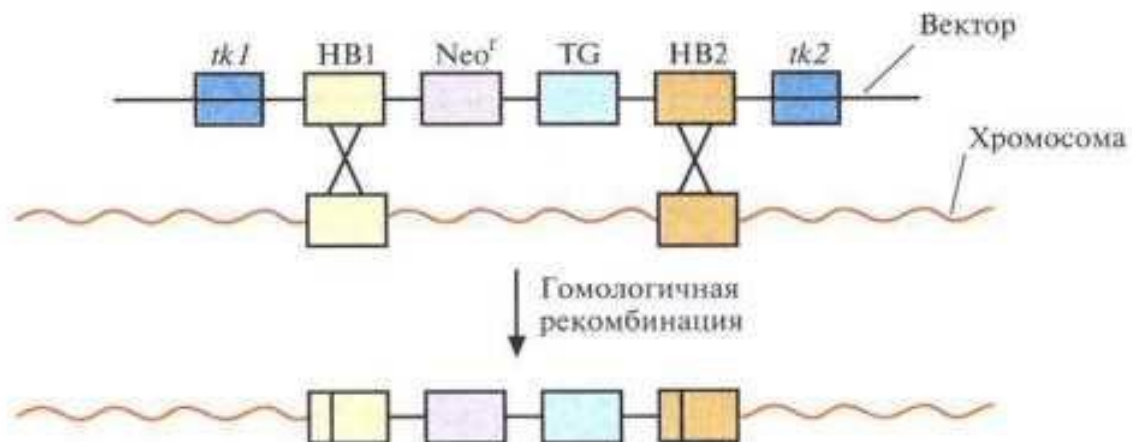
Рис. 19.9. Схематичное изображение генов к- и Н-цепей иммуноглобулинов человека. А. Структура гена к-цепи иммуноглобулина в клетках зародышевой линии. Штриховая линия – промежуточные домены, здесь не показанные. Ген функциональной к-цепи, например V_κ8-J_κ4-C_κ, образуется в В-клетках в результате нескольких перестроек соответствующих ДНК-доменов. Представленная здесь комбинация – лишь одна из 500 возможных. Б. Структура гена Н-цепи иммуноглобулина в клетках зародышевой линии. Штриховая линия – промежуточные домены, здесь не показанные. Ген функциональной Н-цепи, например V_H33-D_H26-J_H4-C_Hα, образуется в В-клетках в результате ряда перестроек соответствующих доменов. Представленная здесь комбинация – лишь одна из 140 000 возможных. На рисунке показан только один C_γ-домен, хотя на самом деле их четыре (C_γ1, C_γ2a, C_γ2b и C_γ3).

Идентификация клеток, несущих трансген

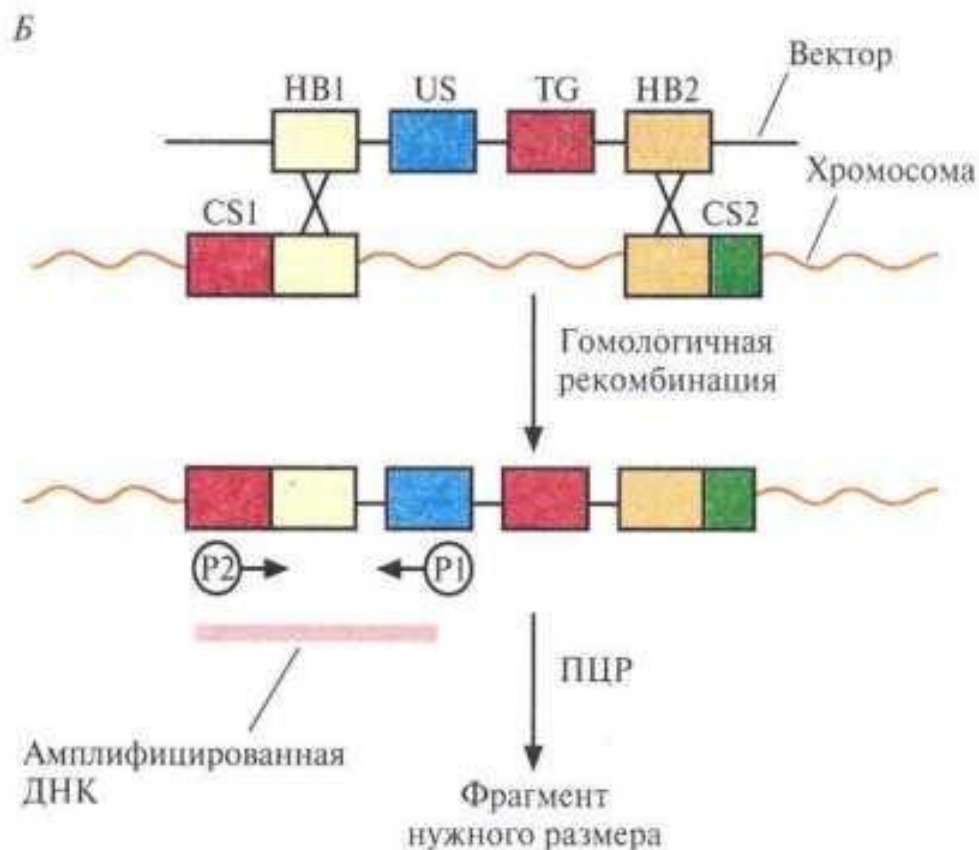
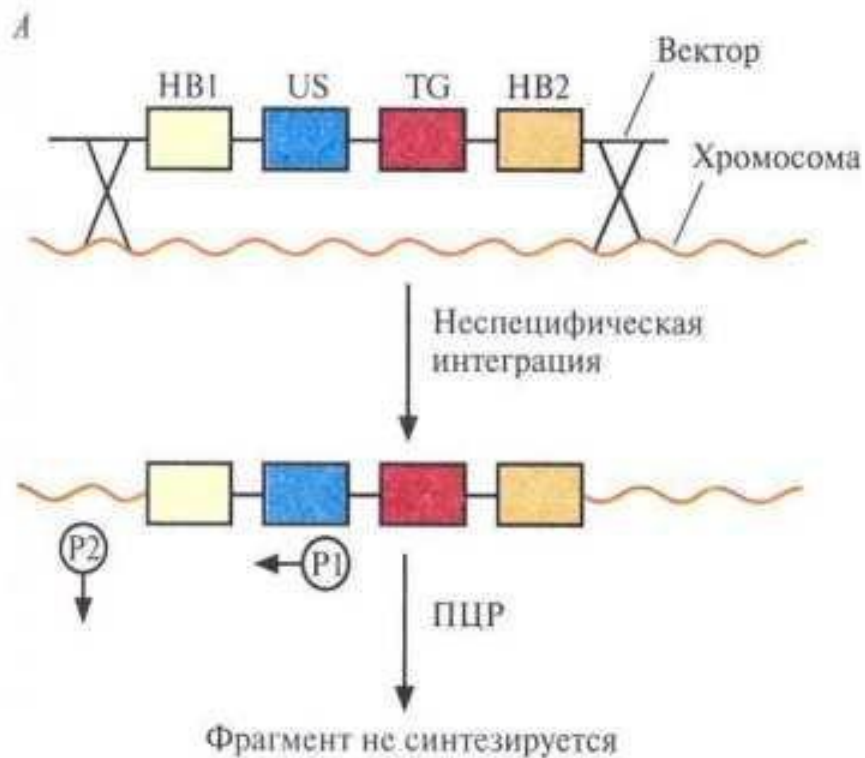
А



Б



Позитивно-негативная селекция. А. Неспецифическая интеграция. В хромосому встроились оба гена тимидинкиназы (*tk1* и *tk2*), два участка ДНК, гомологичные специфичным последовательностям хромосомной ДНК реципиентных клеток (HB1 и HB2), ген (Neo^r), обеспечивающий устойчивость к цитотоксическому соединению G-418, и трансген (TG). После трансфекции проводят тестирование клеток на устойчивость к G-418 и ганцикловиру, который становится цитотоксичным для клеток, синтезирующих тимидинкиназу. Интеграция может произойти и по-другому, со встраиванием в хромосому только гена тимидинкиназы. В присутствии G-418 и ганцикловира все такие клетки тоже погибают. Б. Специфическая интеграция с помощью гомологичной рекомбинации. В результате двойного кроссинговера между гомологичными участками (HB1 и HB2) векторной и хромосомной ДНК в последнюю встраивается фрагмент, не содержащий генов тимидинкиназы (*tk1* и *tk2*). В присутствии G-418 и ганцикловира выживают только клетки, в которых прошла гомологичная рекомбинация.



Идентификация клеток, несущих трансген в специфическом сайте, при помощи ПЦР. **А.** В результате неспецифического встраивания векторной ДНК один из праймеров (P2) не сможет гибридизоваться с участком хромосомы, находящимся на определенном расстоянии от места отжига праймера P1, и фрагмента нужного размера при амплификации не образуется. P1 гибридизуется с уникальным участком (US) встроенной ДНК, отсутствующим в хромосомной ДНК клетки-реципиента. **Б.** В результате гомологичной рекомбинации между участками HB1 и HB2 встраиваемой ДНК, с одной стороны, и комплементарными участками хромосомы CS1 и CS2, с другой, образуются участки, с которыми могут гибридизоваться оба праймера, P1 и P2, и которые находятся на определенном расстоянии друг от друга. В ходе ПЦР-амплификации синтезируются фрагменты одного размера, которые можно идентифицировать при помощи гель-электрофореза. Если ПЦР-продукт нужной длины образовался, значит трансген (TG), находящийся между гомологичными участками (HB1 и HB2), встроился в определенный сайт хромосомы.

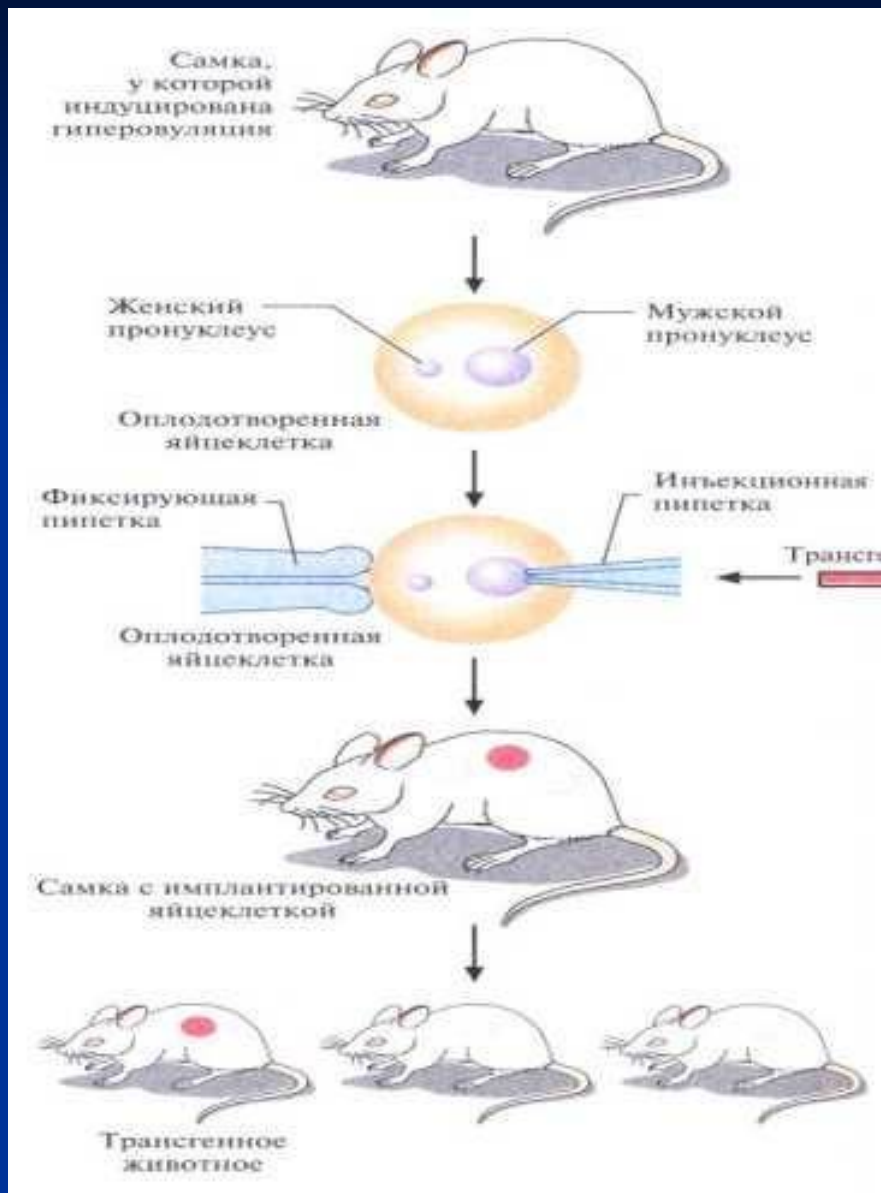
Методы получения трансгенных животных:

1. Метод микроинъекции
2. Вирусный метод
3. Эмбриональный метод

Метод микроинъекции

У самок вызывают гиперовуляцию после чего проводят спаривание с самцами. Из самок-доноров выделяют яйцеклетки. В мужской пронуклеус оплодотворённой яйцеклетки инъецируют трансгенную конструкцию. Яйцеклетки имплантируют «суррогатной» матери, которая производит на свет мышей – основателей трансгенной линии.

Получение трансгенных мышей методом микроинъекций



Получение линий трансгенных мышей методом микроинъекций. Яйцеклетки выделяют из самок-доноров, у которых была индуцирована гиперовуляция и проведено спаривание с самцами. Трансгенную конструкцию инъецируют в мужской пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки. Яйцеклетки имплантируют в «суррогатную» мать, которая производит на свет трансгенных мышат – основателей трансгенных линий.

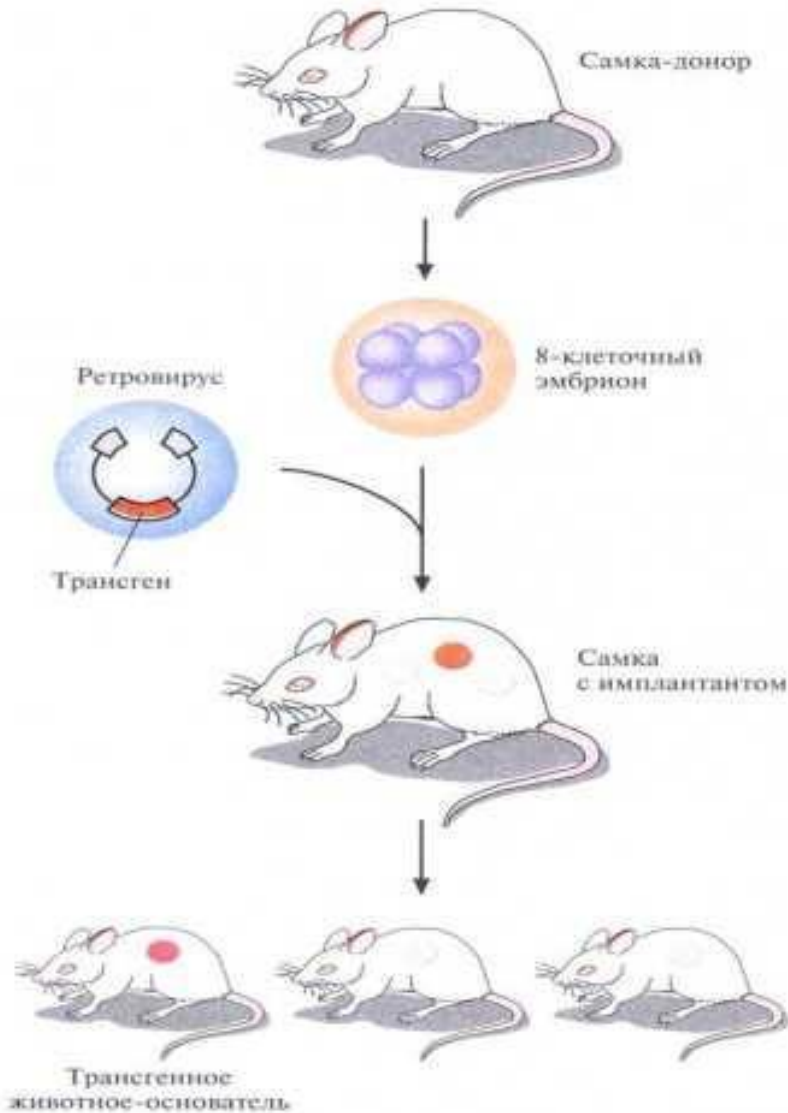
Метод микроинъекций ДНК

1. Увеличение числа яйцеклеток, в которых будет инъецирована чужеродная ДНК, путем стимуляции гиперовуляции у самок-доноров. Сначала самкам вводят сыворотку беременной кобылы, а спустя примерно 48 ч — хорионический гонадотропин человека. В результате гиперовуляции образуется примерно 35 яйцеклеток вместо обычных 5—10.
2. Скрещивание с самцами самок с гиперовуляцией и их умерщвление. Вымывание из яйцеводов оплодотворенных яйцеклеток.
3. Микроинъекция ДНК в оплодотворенные яйцеклетки - как правило, сразу после выделения. Часто вводимая трансгенная конструкция находится в линейной форме и не содержит прокариотических векторных последовательностей.

Вирусный метод

Эмбрион, находящийся на стадии 8 клеток, инфицируют рекомбинантным ретровирусом, несущим трансген. Самки, которым был имплантирован эмбрион, производят на свет трансгенное потомство. Для идентификации мышей, несущих трансген в клетках зародышевой линии, проводят ряд скрещиваний.

Получение трансгенных мышей с использованием ретровирусных векторов

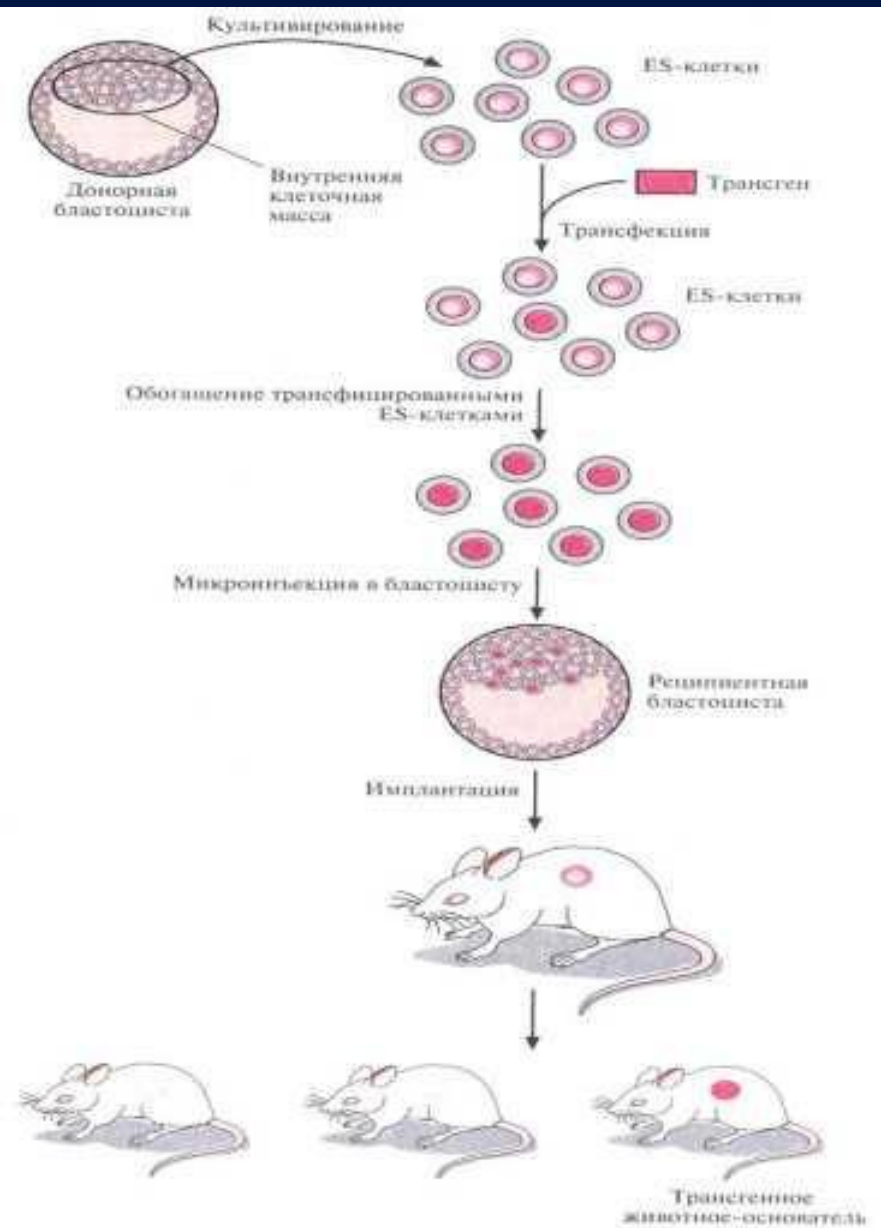


Получение линии трансгенных мышей с использованием ретровирусных векторов. Эмбрион, обычно находящийся на стадии 8 клеток, инфицируют рекомбинантным ретровирусом, несущим трансген. Самки, которым был имплантирован эмбрион («суррогатные матери»), производят на свет трансгенное потомство. Для идентификации мышат, несущих трансген в клетках зародышевой линии, проводят ряд скрещиваний.

Эмбриональный метод

Эмбриональные стволовые клетки получают из внутренней клеточной массы бластоцисты мыши. Их трансфицируют вектором, несущим трансген, культивируют. Трансфицированные клетки идентифицируют методом позитивно-негативной селекции (ПЦР). Популяцию трансфицированных клеток вновь культивируют и вводят в бластоцисты, которые затем имплантируют в матку «суррогатной» матери. Скрещивая животных-основателей, несущих трансген в клетках зародышевой линии, можно получить трансгенных мышей.

Получение трансгенных мышей с помощью генетической модификации эмбриональных стволовых (ES) клеток



ES-клетки получают из внутренней клеточной массы бластоцисты мыши. Их трансфицируют вектором, несущим трансген, культивируют и идентифицируют трансфицированные клетки методом позитивно-негативной селекции или ПЦР. Популяцию трансфицированных клеток вновь культивируют и вводят в бластоцисты, которые затем имплантируют в матку «суррогатных» матерей. Скрещивая животных-основателей, несущих трансген в клетках зародышевой линии, можно получить линии трансгенных мышей.

Использование модифицированных эмбриональных стволовых клеток

Клетки, выделенные из мышинных эмбрионов на стадии бластоцисты, могут пролиферировать в культуре, сохраняя способность к дифференцировке в любые типы клеток, в том числе и в клетки зародышевой линии, при введении в другой эмбрион на стадии бластоцисты. Такие клетки называются плюрипотентными эмбриональными стволовыми клетками (ES). ES-клетки в культуре легко модифицировать методами генной инженерии без нарушения их плюрипотентности. Например, в определенный сайт несущественного гена в их геноме можно встроить функциональный трансген. Затем можно отобрать измененные клетки, культивировать их и использовать для получения трансгенных животных. Это позволяет избежать случайного встраивания, характерного для метода микроинъекций и ретровирусных векторных систем.

Трансгенные животные

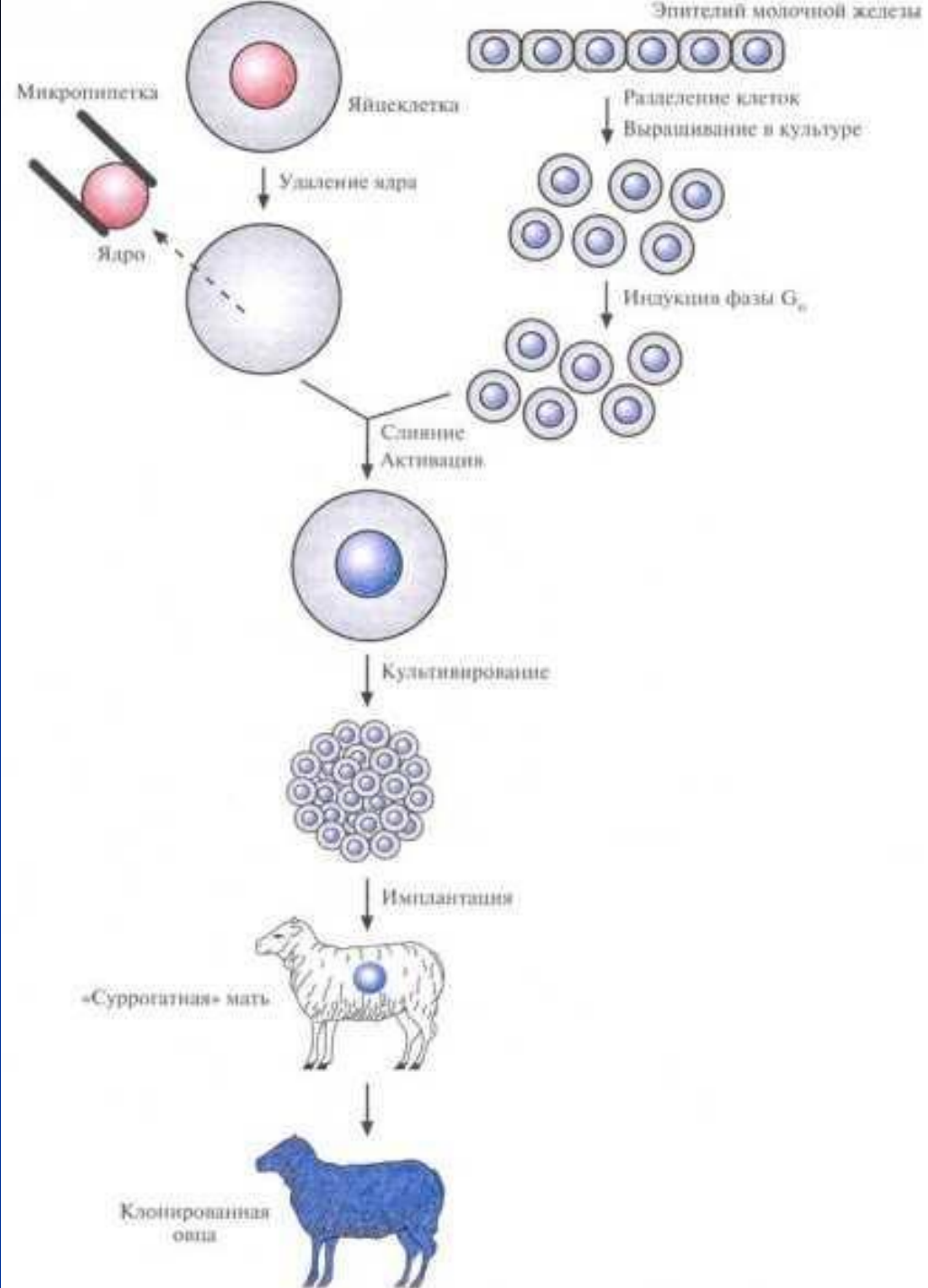
Стратегия по введению чужеродных генов в клетки млекопитающих состоит в следующем:

1. Клонированный ген вводят в ядро оплодотворенной яйцеклетки.
2. Инокулированные оплодотворенные яйцеклетки имплантируют в реципиентную женскую особь (поскольку успешное завершение развития эмбриона млекопитающих в иных условиях невозможно).
3. Отбирают потомков, развившихся из имплантированных яйцеклеток, которые содержат клонированный ген во всех клетках.
4. Скрещивают животных, которые несут клонированный ген в клетках зародышевой линии, и получают новую генетическую линию.

Клонирование овцы методом переноса ядра

Клонирование овцы методом переноса ядра. Ядро яйцеклетки удаляют с помощью микропипетки. Культивируют эпителиальные клетки молочной железы взрослой особи и индуцируют их переход в фазу G0. Осуществляют слияние клеток в G0-фазе и яйцеклеток, лишенных ядра, и выращивают восстановленные яйцеклетки в культуре или в яйцевом с наложенной лигатурой до ранних стадий эмбриогенеза, а затем имплантируют их в матку «суррогатной» матери, где и происходит дальнейшее развитие. В эксперименте, описанном Уилмутом и др. (1997), было проведено слияние 277 яйцеклеток с удаленными ядрами с клетками молочной железы в фазе G0; из 29 эмбрионов только один развился до жизнеспособного плода.

Клонирование овечки Долли



Трансгенный крупный рогатый скот

Если предполагается использовать молочную железу в качестве «биореактора», то наиболее предпочтительным животным для трансгеноза является крупный рогатый скот, который ежегодно дает до 10 000 л молока, содержащего примерно 35 г белка на 1 л. Если в молоке будет содержаться такое количество рекомбинантного белка и эффективность его очистки составит 50%, то от 20 трансгенных коров можно будет получать примерно 100 кг такого белка в год. По случайному совпадению, именно столько белка С, использующегося для предотвращения тромбообразования, требуется ежегодно. С другой стороны, одной трансгенной коровы будет более чем достаточно для получения требуемого ежегодно количества фактора IX (фактора Кристмаса) каскадного механизма свертывания крови, который вводят больным гемофилией для повышения свертываемости крови.

Для создания трансгенных коров использовали модифицированную схему трансгеноза мышей методом микроинъекций ДНК. Процедура включала следующие основные этапы:

1. Сбор ооцитов коров, забитых на скотобойне.
2. Созревание ооцитов *in vitro*.
3. Оплодотворение бычьей спермой *in vitro*.
4. Центрифугирование оплодотворенных яйцеклеток для концентрирования желтка, который в нормальных яйцеклетках мешает визуализации мужского пронуклеуса с помощью секционного микроскопа.
5. Микроинъекция ДНК в мужской пронуклеус.
6. Развитие эмбрионов *in vitro*.
7. Нехирургическая имплантация одного эмбриона реципиентной самке во время течки.
8. Скрининг ДНК потомков на наличие трансгена.

Получение трансгенных коров



Трансгенные овцы, козы и свиньи

Таблица 19.2. Трансгенные конструкции, содержащие гены человека под контролем промоторов, специфичных для молочных желез, и реципиентные организмы

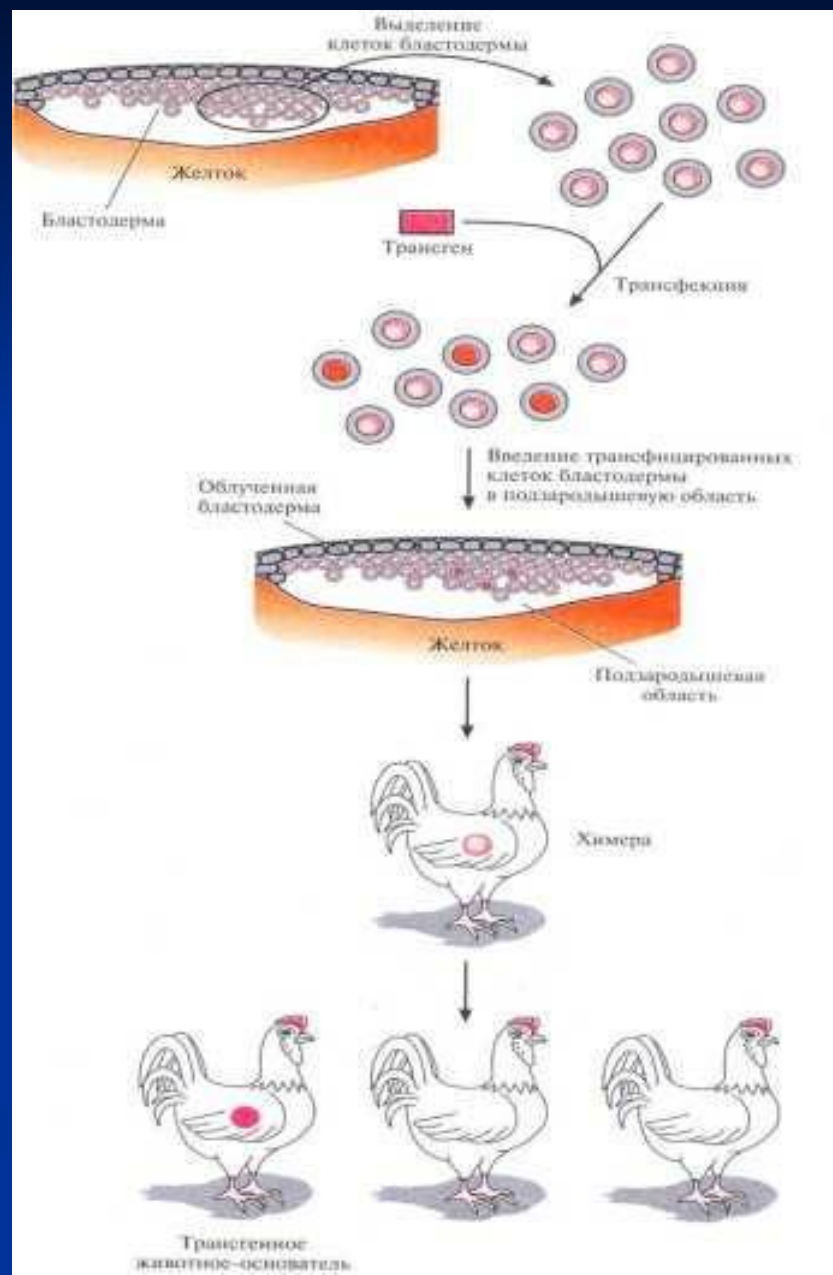
Трансген	Промотор	Реципиент
Ген активатора плазминогена длительного действия	Ген белка сыворотки	Коза
Ген α_1 -антитрипсина	Ген β -лактоглобулина	Овца
Ген фактора IX системы свертываемости крови	Ген β -лактоглобулина	Овца
Ген растворимого белка CD4	Ген белка сыворотки	Мышь
Ген лактоферрина	Ген α_{S1} -казеина	Корова
Ген урокиназы	Ген α_{S1} -казеина	Мышь
Ген CFTR	Ген β -казеина	Мышь
Ген интерлейкина-2	Ген β -казеина	Кролик

Трансгенные птицы

Микроинъекция ДНК в оплодотворенные яйцеклетки птиц с целью получения трансгенных линий - непростая процедура. Это связано с некоторыми особенностями воспроизводства и развития птиц. Так, при оплодотворении у птиц в яйцеклетку могут проникнуть сразу несколько сперматозоидов, а не один, как это обычно бывает у млекопитающих, и идентифицировать тот мужской пронуклеус, который соединится с женским, становится невозможно. Метод микроинъекции ДНК в цитоплазму тоже не подходит, поскольку в этом случае ДНК не интегрируется в геном оплодотворенной яйцеклетки. Наконец, даже если удастся осуществить микроинъекцию ДНК в ядро, дальнейшие операции будет трудно осуществить, поскольку у птиц яйцеклетка после оплодотворения достаточно быстро обволакивается прочной мембраной, покрывается слоем альбумина и внутренней и наружной известковыми оболочками.

Получение трансгенных цыплят

Получение трансгенных цыплят изолированных клеток бластодермы. Выделенные клетки трансфицируют трансгеном с помощью липосом и вводят в подзародышевую область облученной бластодермы реципиента. Часть полученных потомков являются химерами, а некоторые из них, несущие трансген в клетках зародышевой линии, при скрещивании могут дать начало трансгенным линиям.



Трансгенные рыбы

По мере истощения природных рыбных запасов все большую роль будет приобретать разведение рыбы в искусственных условиях. Основная цель исследований в этой области — создание рекомбинантных рыб путем трансгеноза. До настоящего времени трансгены вводили микроинъекцией ДНК или электропорацией оплодотворенных яйцеклеток различных видов рыб - карпа, зубатки, форели, лосося и т. д. Поскольку у рыб пронуклеус в оплодотворенной яйцеклетке плохо различим в обычный микроскоп, линейаризованную трансгенную ДНК вводят в цитоплазму оплодотворенных яйцеклеток или клеток эмбрионов, достигших стадии четырех бластомеров. Эмбриогенез у рыб протекает в водной среде вне организма, поэтому в имплантации нет необходимости. Все дальнейшие процессы могут протекать в резервуарах с регулируемой температурой. Выживаемость эмбрионов рыб после микроинъекций довольно высока, от 35 до 80%, а доля трансгенных потомков колеблется от 10 до 70%. Трансген можно обнаружить с помощью ПЦР с использованием либо препаратов эритроцитов зародышей, либо суммарной ДНК. Скрещивая трансгенных рыб, можно вывести трансгенные линии.

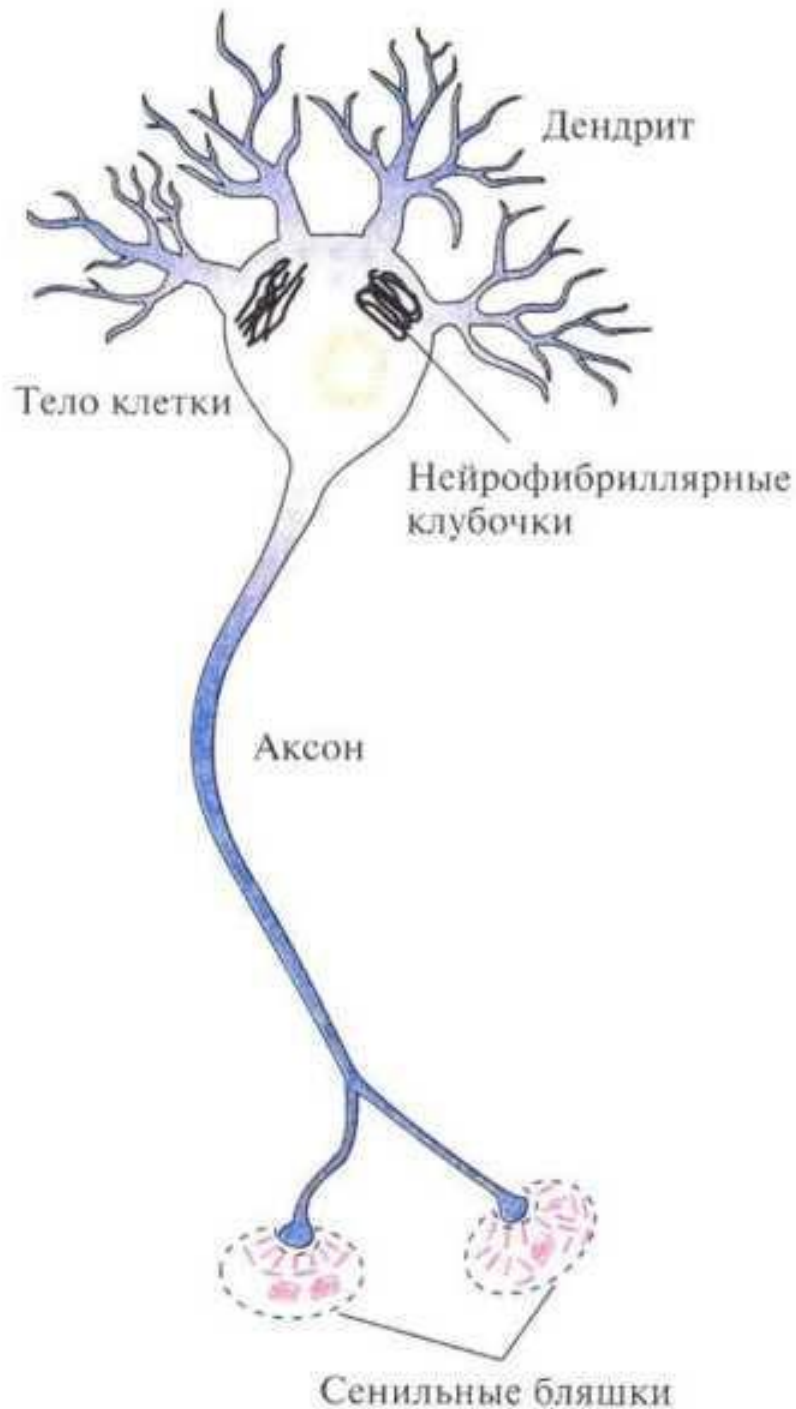
Трансгенные мыши: методология

Введение чужеродной ДНК мышам можно осуществить разными методами:

1. С помощью ретровирусных векторов, инфицирующих клетки эмбриона на ранних стадиях развития перед имплантацией эмбриона в самку-реципиента;
2. Микроинъекцией в увеличенное ядро спермия (мужской пронуклеус) оплодотворенной яйцеклетки;
3. Введением генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток в предимплантированный эмбрион на ранних стадиях развития.

Трансгенные мыши: применение как модельного объекта изучения болезни Альцгеймера.

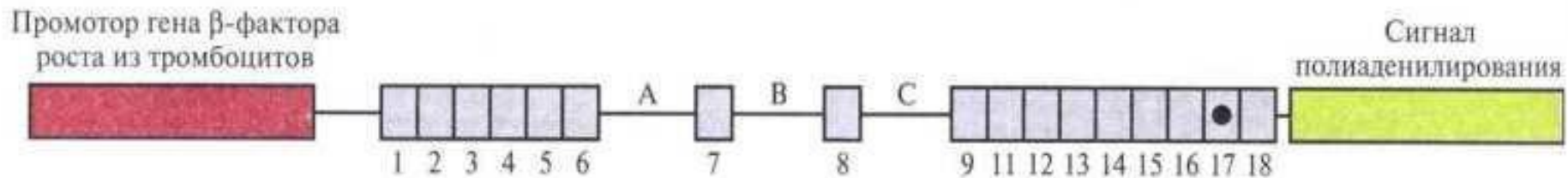
Болезнь Альцгеймера — это дегенеративный процесс, приводящий к утрате клеток различных отделов головного мозга. Наиболее ранним проявлением служит ухудшение памяти. Этот процесс прогрессирует, к нему присоединяются утрата способности к абстрактному мышлению, изменение личности, нарушения речи, снижение физического статуса. Патология наблюдается у 1% людей возрастной группы от 60 до 65 лет и у 30% людей старше 80 лет. При патоморфологическом исследовании в теле нейронов обнаруживаются нейрофибриллярные клубочки, а у синаптических окончаний - плотные агрегаты, называемые сенильными бляшками. Кроме того, в кровеносных сосудах мозга обнаруживаются конгломераты - амилоидные бляшки.



Схематическое изображение нейрона коры головного мозга человека с указанием некоторых гистологических особенностей, характерных для болезни Альцгеймера. У синапсов образуются сенильные бляшки, содержащие амилоидные скопления и обломки клеток. В теле нейрона накапливаются нейрофибриллы, включающие агрегаты из белков цитоскелета и других белков. Происходят и другие изменения, здесь не показанные.

Основным компонентом сенильных и амилоидных бляшек является белок А β (амилоид р\ р-белок, р-амилоидный белок, (3/А4) мол. массой 4 кДа. Существуют А β -белки с разным числом аминокислотных остатков, например А β 40 и А β 42. Все они образуются в результате протеолитического расщепления белка-предшественника (АРР). Причины аккумуляции А β -белка не установлены. Члены некоторых семей, в которых с высокой частотой встречается болезнь Альцгеймера, несут мутации в гене АРР, что наводит на мысль об участии этого гена в возникновении данной патологии. К сожалению, проследить в деталях за возникновением и развитием болезни Альцгеймера на человеке не удастся. Неоценимую помощь в этом могла бы оказать какая-нибудь «животная» модель.

Моделирование развития болезни Альцгеймера



Генетическая конструкция, называемая мини-геном PDAPP, с помощью которой можно моделировать развитие болезни Альцгеймера у трансгенных мышей. 1–10 – экзоны кДНК белка-предшественника амилоида, А–С – введенные интроны. Регуляторными элементами являются промотор гена β -фактора роста из тромбоцитов и сигнал полиаденилирования вируса SV40.

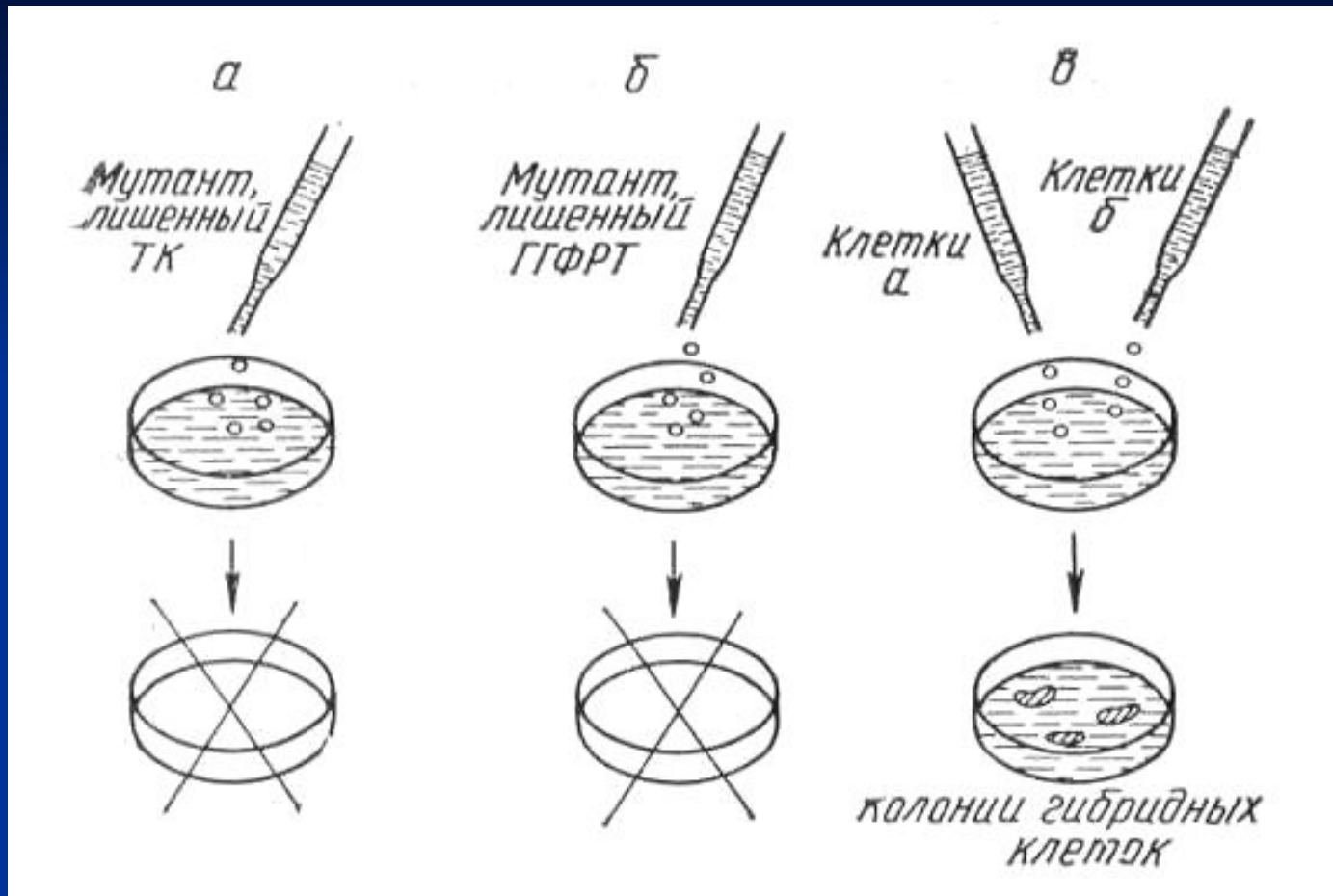
Муковисцидоз — распространенная генетическая болезнь, поражающая в странах Европы одного из 2500 новорожденных. Первичный эффект дефектного CF-гена — это изменение функции CFTR, который в норме служит каналом для ионов хлора. В результате блокирования потока этих ионов в клетку и из клетки в протоках некоторых органов, особенно в легких и поджелудочной железе, скапливается слизь. Она становится источником бактериальной инфекции, которая с трудом поддается лечению антибиотиками. ДНК, высвобождающаяся из лизировавших бактерий, делает слизь очень густой. Загустевшая слизь забивает протоки, нарушается нормальная работа органа и симптомы муковисцидоза еще более усиливаются. Продолжительность жизни больных муковисцидозом составляет в настоящее время 25—30 лет.



Генетическая конструкция «кДНК CFTR – ген β-казеина козы». Полноразмерная кДНК CFTR встроена между экзонами 2 (EX2) и 7 (EX7) гена β-казеина козы. Сохранены промотор, терминатор и экзоны 1, 8 и 9 (EX1, EX8 и EX9) гена казеина.

Гибридизация соматических клеток

Методика изоляции соматических гибридов (по Шапиро)



ТК – фермент тимидинкиназа

ГГФРТ – фермент гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза

На селективной среде могут размножаться гибридные клетки, способные вырабатывать оба фермента одновременно

Некоторые сочетания геномов, полученные слиянием соматических клеток

Тип гибридов	Сочетание
Внутривидовые гибриды	Человек × человек
	Мышь × мышь
	Китайский хомячок × китайский хомячок
	Табак × табак
Отдаленные гибриды	Человек × кролик
	Человек × мышь
	Человек × шпорцевая лягушка
	Человек × комар
	Человек × морковь
	Человек × табак
	Мышь × обезьяна
	Мышь × крыса
	Мышь × курица
	Корова × норка
	Золотистый хомячок × черепаха
	Курица × дрожжи
	Соя × кукуруза
	Соя × горох
Морковь × азотобактер (бактерия)	

БЛАГОПОНЯТИЕ ЗА ВНИМАНИЕ!

