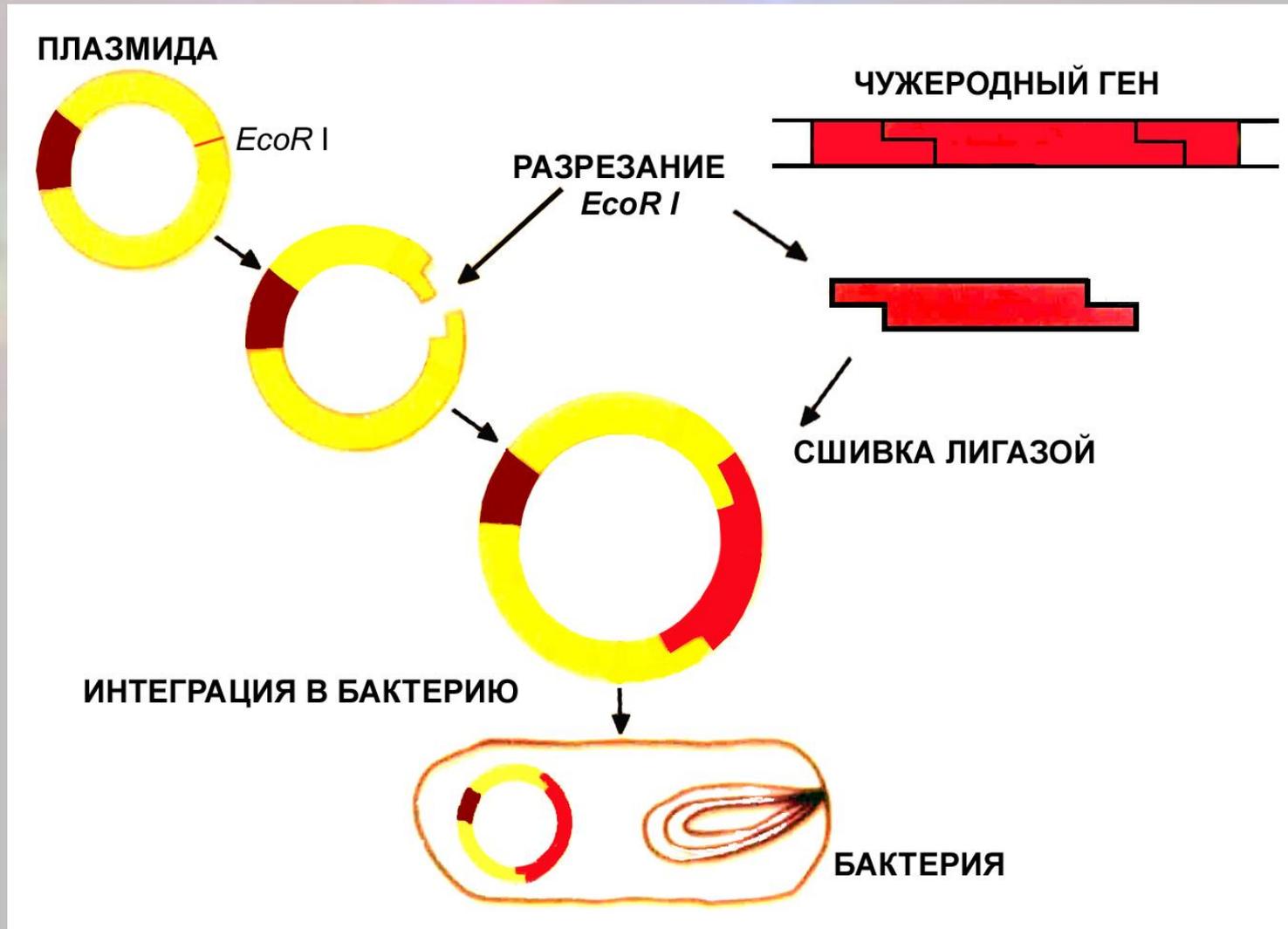


# Лекция 5

## ТРАНСГЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ





**Рис. .** Введение фрагмента рекомбинантной молекулы ДНК в плазмидный вектор pSC101 с помощью рестриктазы *EcoRI*, образующей «липкие» концы с последующим внедрением рекомбинантной плазмиды в бактерию кишечная палочка (*E. coli*) для клонирования (размножения) нужного гена.

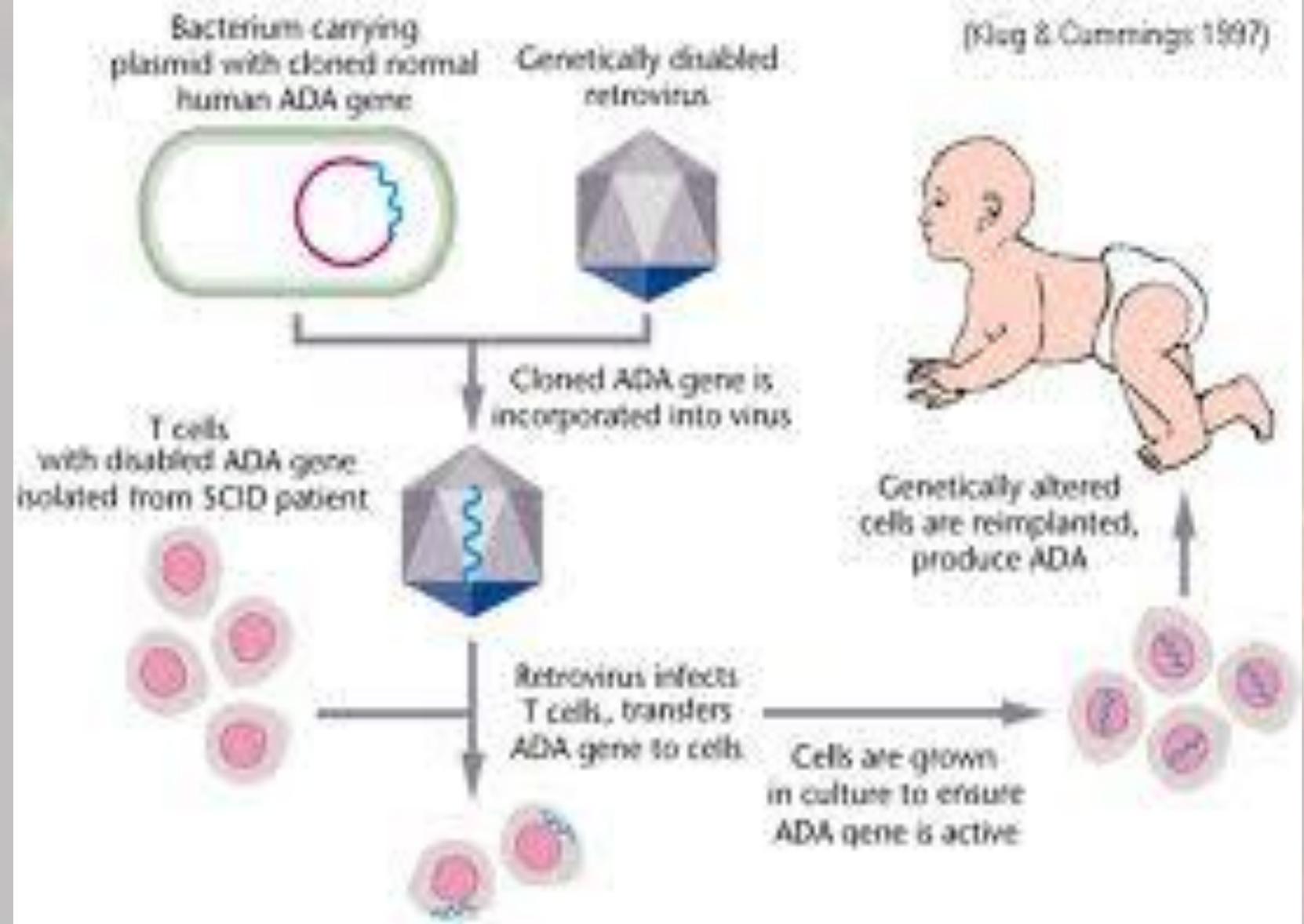


## Получение трансгенных животных с новыми признаками

- Организмы, несущие в своем геноме рекомбинантный (чужеродный) ген, принято называть *трансгенными*, а ген, интегрированный в геном реципиента, — *трансгеном*. Продукт этого гена (белок) является трансгенным. Благодаря переносу генов у трансгенных животных возникают новые качества.



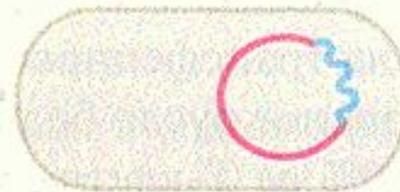
(Klug & Cummings: 1997)





Бактерия, несущая плазмиду с клонированным нормальным геном АДА

Генетически деактивированный ретровирус



Клонированный ген АДА внедряется в вирус

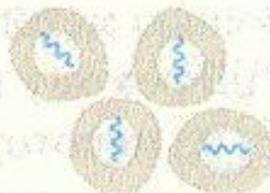
Т-лимфоциты, выделенные у пациента с SCID



Ретровирус инфицирует клетки крови, перенося в них гены АДА

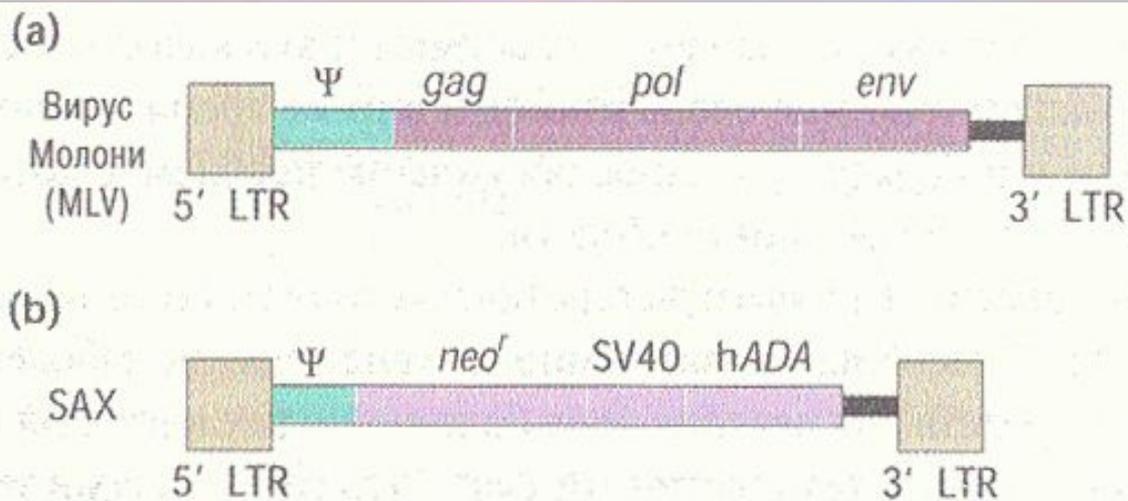


Генетически модифицированные клетки реимплантируются и производят АДА

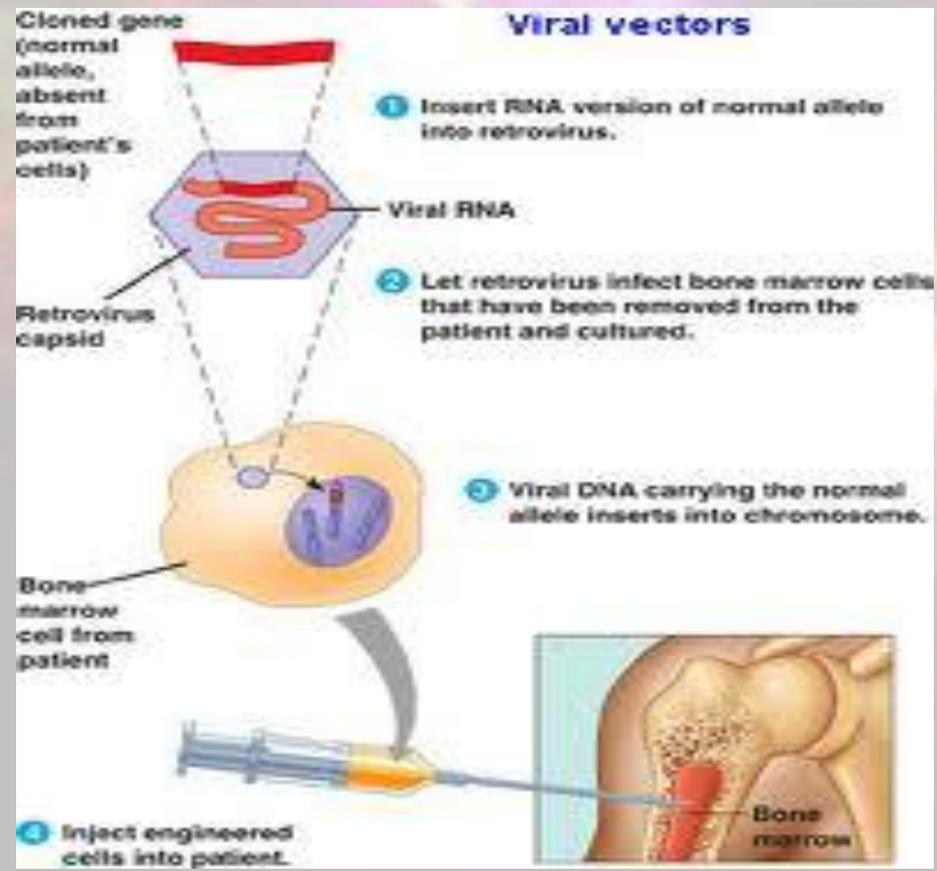


Клетки выращивают в культуре, чтобы убедиться, что ген АДА активен





**Рис. 19-10.** Ретровирусный вектор, сконструированный из вируса мышиноного лейкоза Молони (MLV). (a) Геном вируса содержит пси-последовательность ( $\Psi$ ), необходимую для упаковки вириона, а также гены, кодирующие белки вирусной оболочки (*gag*), РНК-зависимую ДНК-полимеразу (*pol*) и поверхностные гликопротеины (*env*). С каждой стороны геном фланкируют последовательности длинных концевых повторов (LTR), контролирующие транскрипцию и интеграцию в геном хозяина. (b) В векторе SAX, созданном из MLV, сохранены последовательности LTR и  $\Psi$ , и встроены бактериальный ген устойчивости к неомицину (*neo<sup>r</sup>*), служащий селективным маркером. Кроме того, вектор несет клонированный ген аденозиндезаминазы человека (АДА) с прикрепленным промотором/энхансером SV40. Конструкция SAX представляет собой типичный образец ретровирусного вектора, используемого в генной терапии человека.

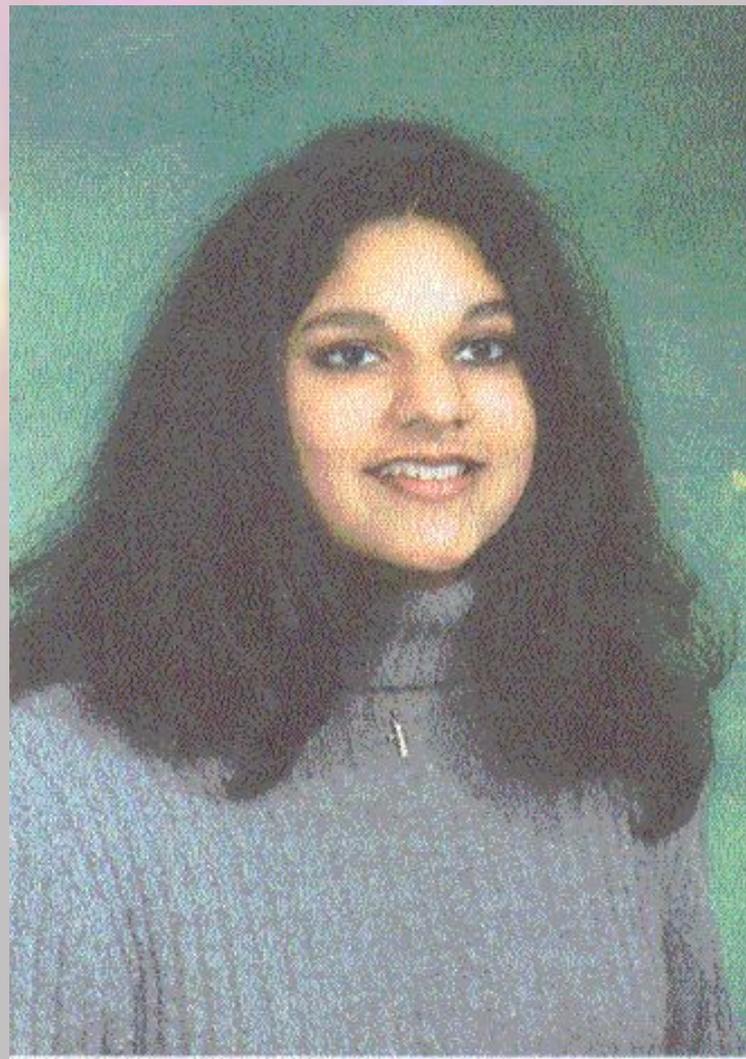


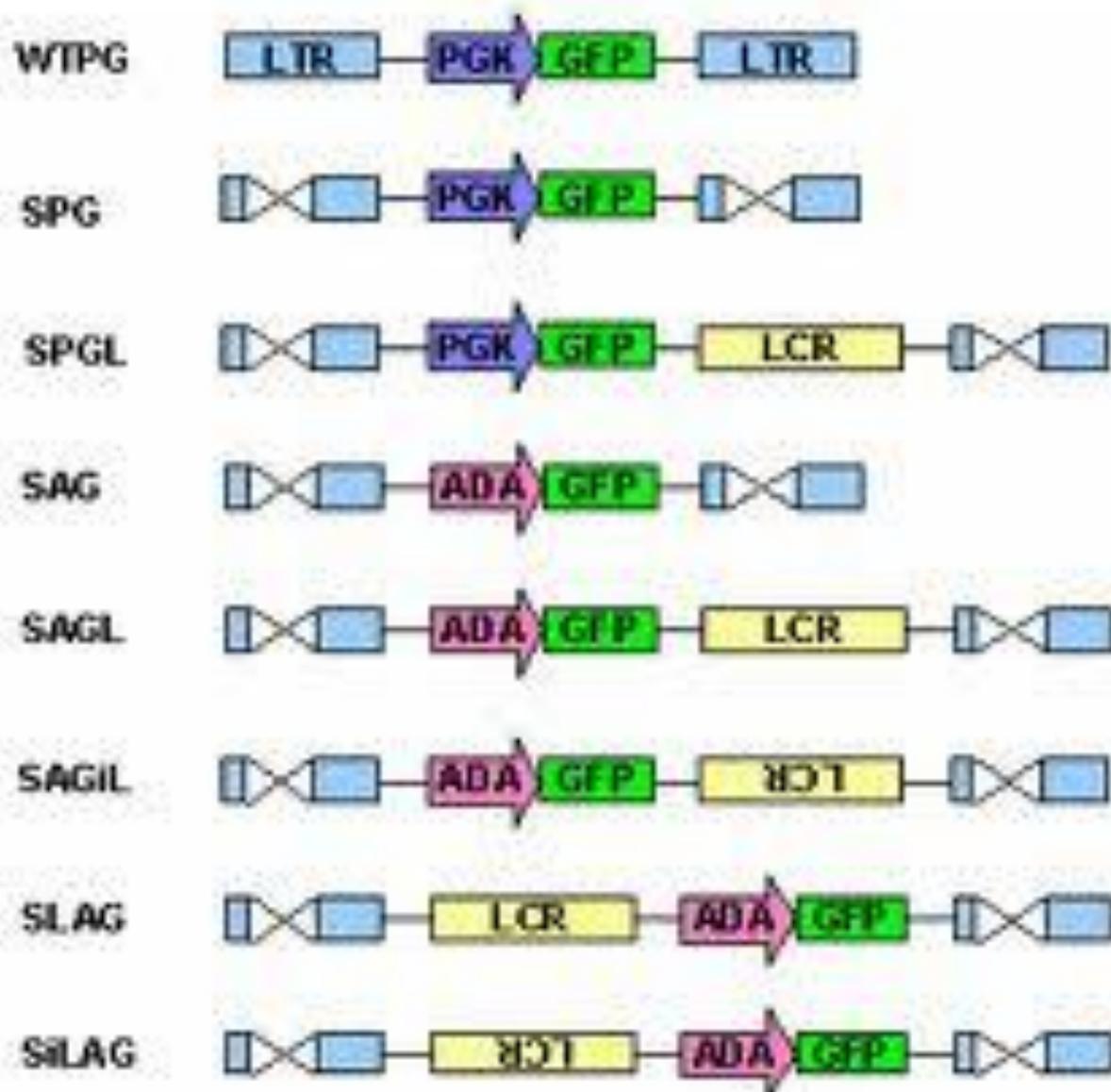


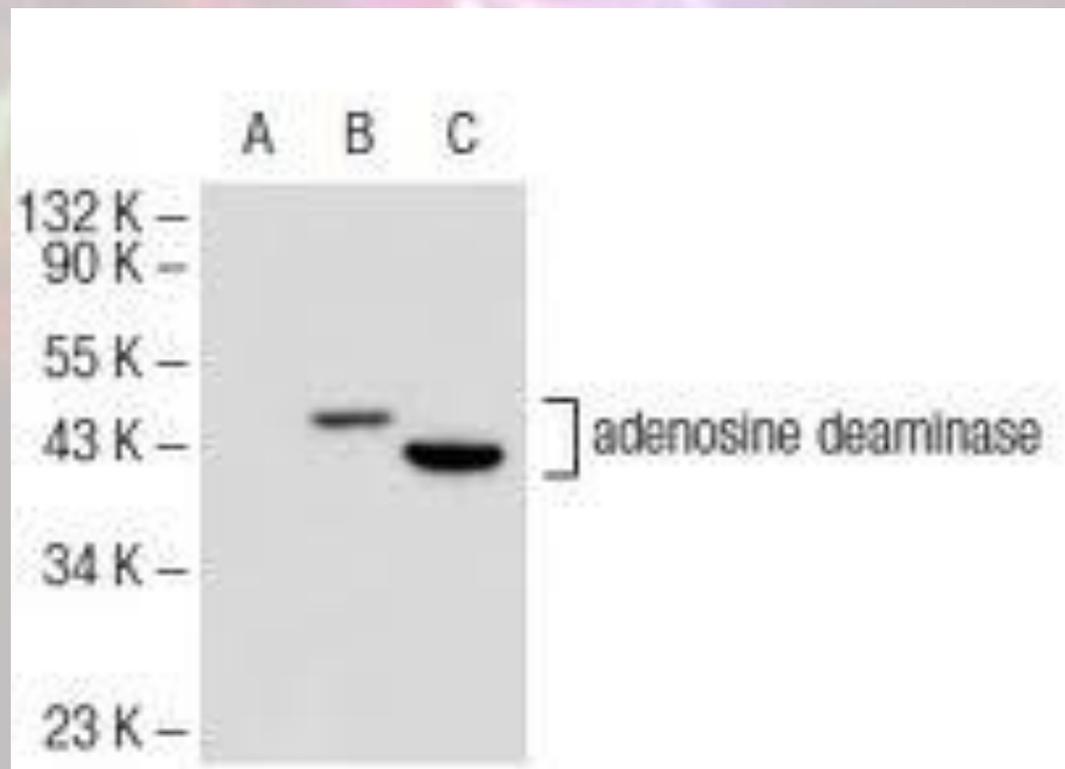


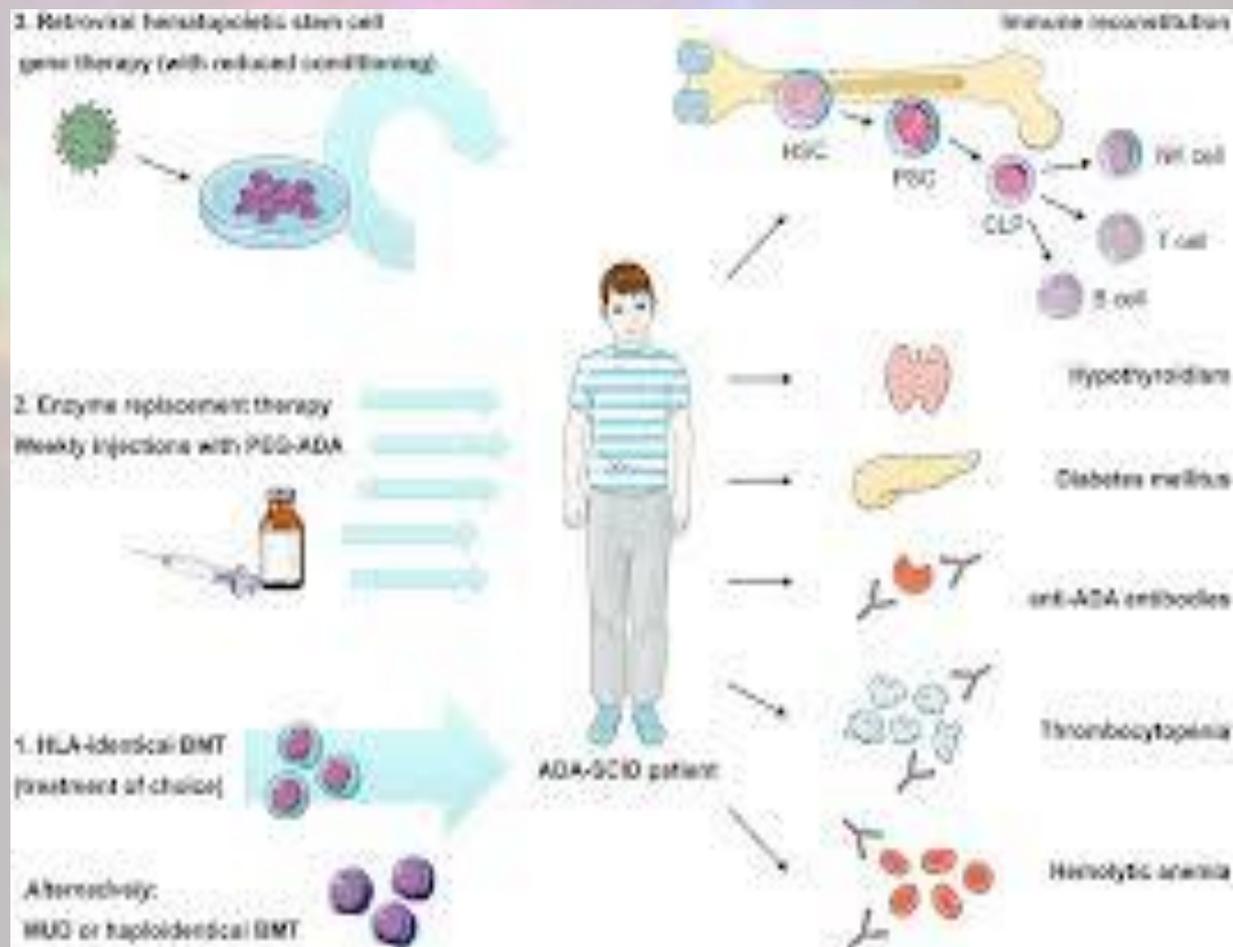
**In 1990 Ashanti de Silva became the first patient to receive gene therapy for ADA deficiency. Shown here at age 13, she continues to lead a healthy, active life.**

**Photo: Courtesy of Van de Silva**











# Human *ex vivo* Gene Therapy

Therapeutic Gene



Virus



Virus inserts therapeutic gene into target cell's DNA

1. Therapeutic gene is inserted into a specially engineered virus.

2. Cells from the target tissue are removed from the patient.



3. The cells are grown in large numbers in tissue culture plates. The cultured cells are then mixed with the virus.

4. The cells are then returned to the patient to replace the function lost due to inheritance of mutant gene(s).



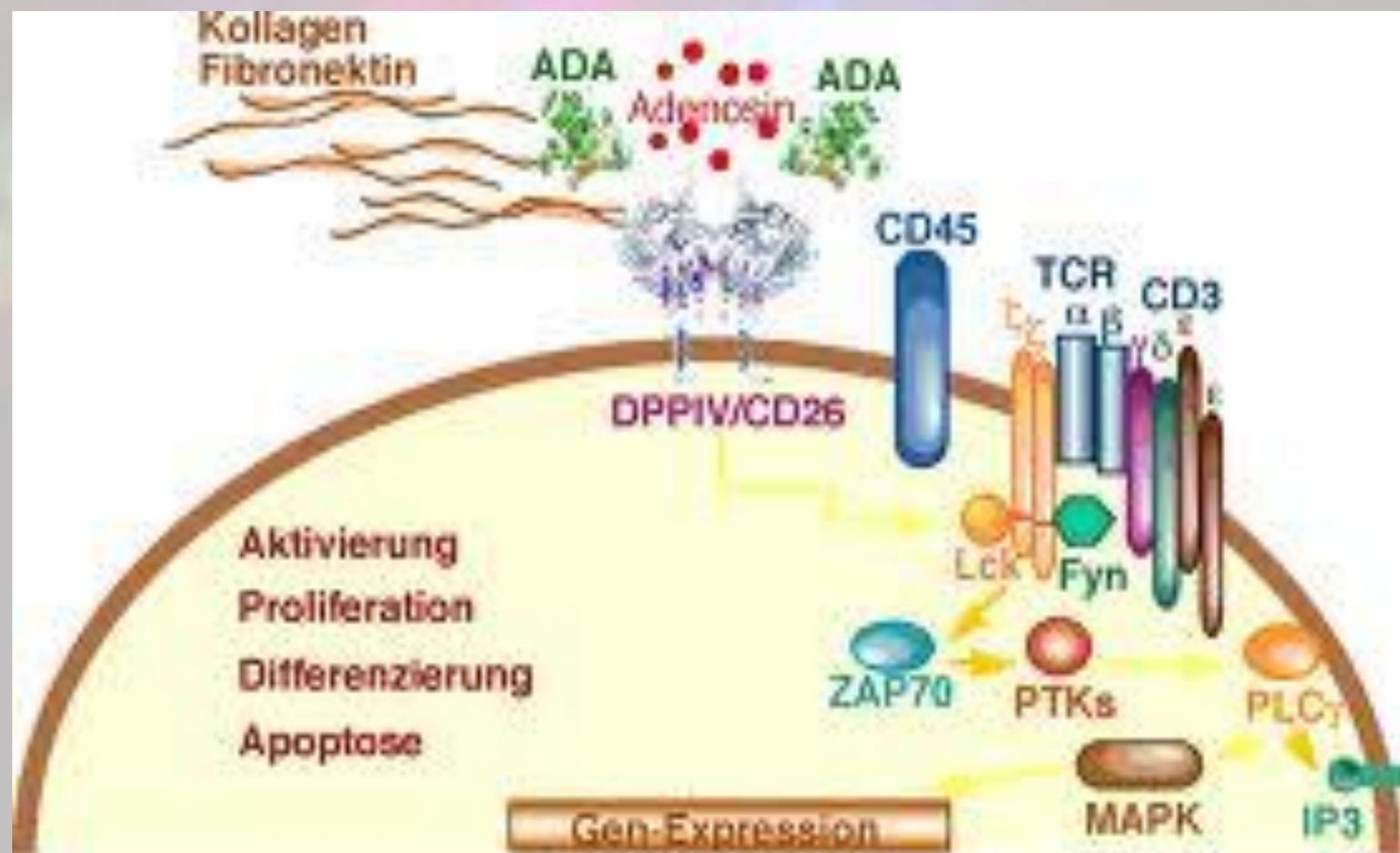
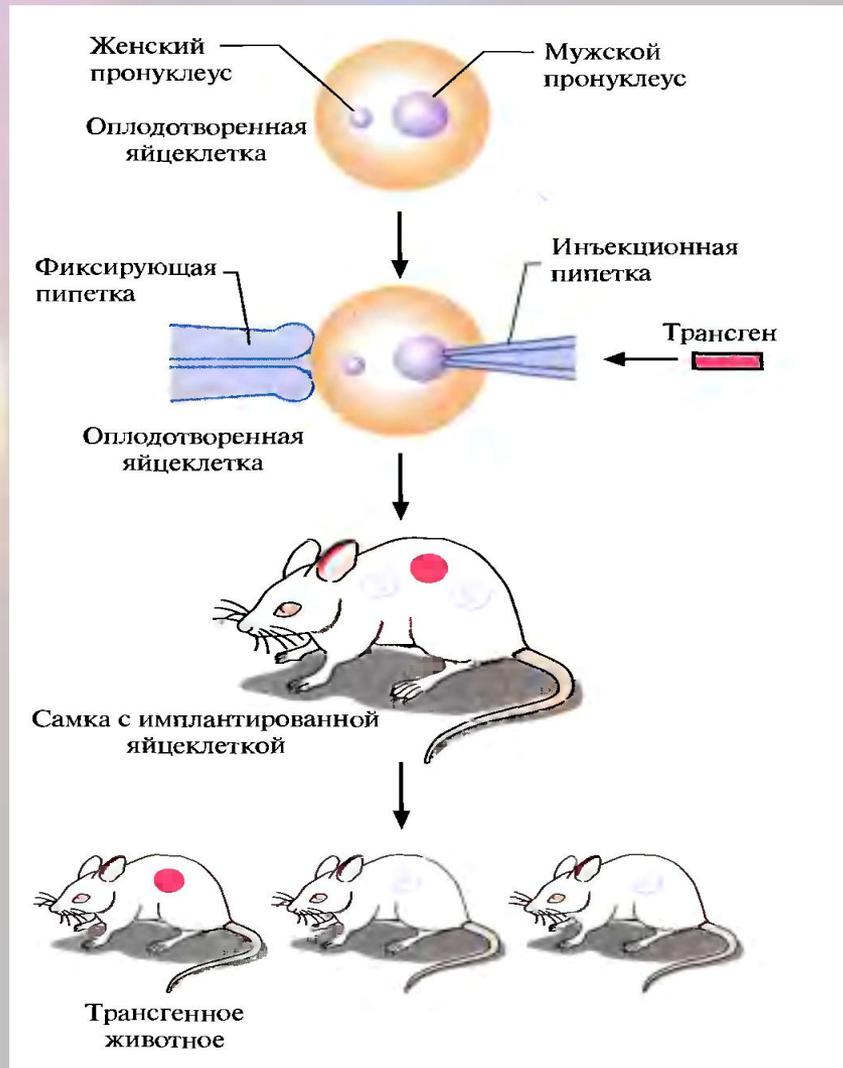


Abb. 1. DPPIV/CD26 ist ein multifunktionelle Membranglykoprotein



- Этапы получения трансгенных мышей от введения фрагмента ДНК, содержащего несколько копий нужного гена в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки мыши с помощью микропипетки до получения взрослых особей, несущих чужеродную ДНК в каждом клеточном ядре представлены на рис. .
- *Метод микроинъекции ДНК* в оплодотворенные яйцеклетки с 1982-го года до настоящего времени остается наиболее популярным у исследователей, занятых получением трансгенных животных, несмотря на то, что он требует высокой квалификации и дорогостоящего оборудования.



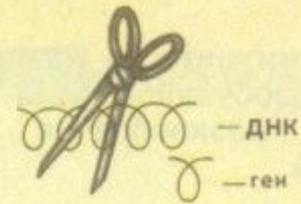
**Рис. .** Получение линий трансгенных мышей методом микроинъекций ДНК. Трансгенную конструкцию инъецируют в мужской пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки. Яйцеклетки имплантируют в суррогатную мать, которая производит на свет трансгенных мышат.



1. Выделение ДНК



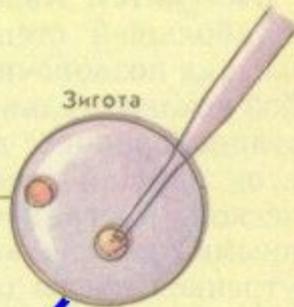
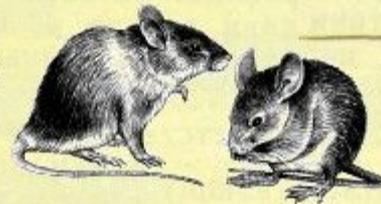
2. Вырезание гена



3. Размножение гена



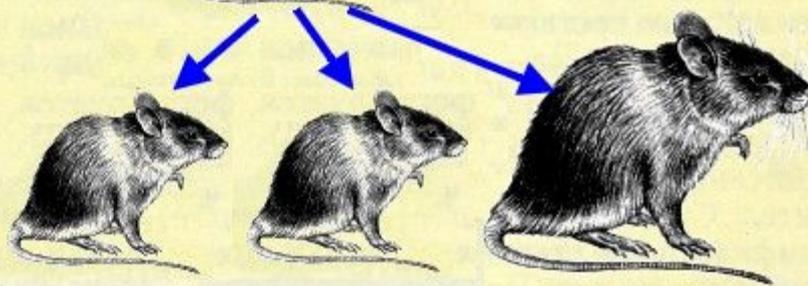
4. Введение раствора с ДНК в оплодотворенную яйцеклетку



5. Яйцеклетку трансплантируют приемной матери, где она продолжает развитие

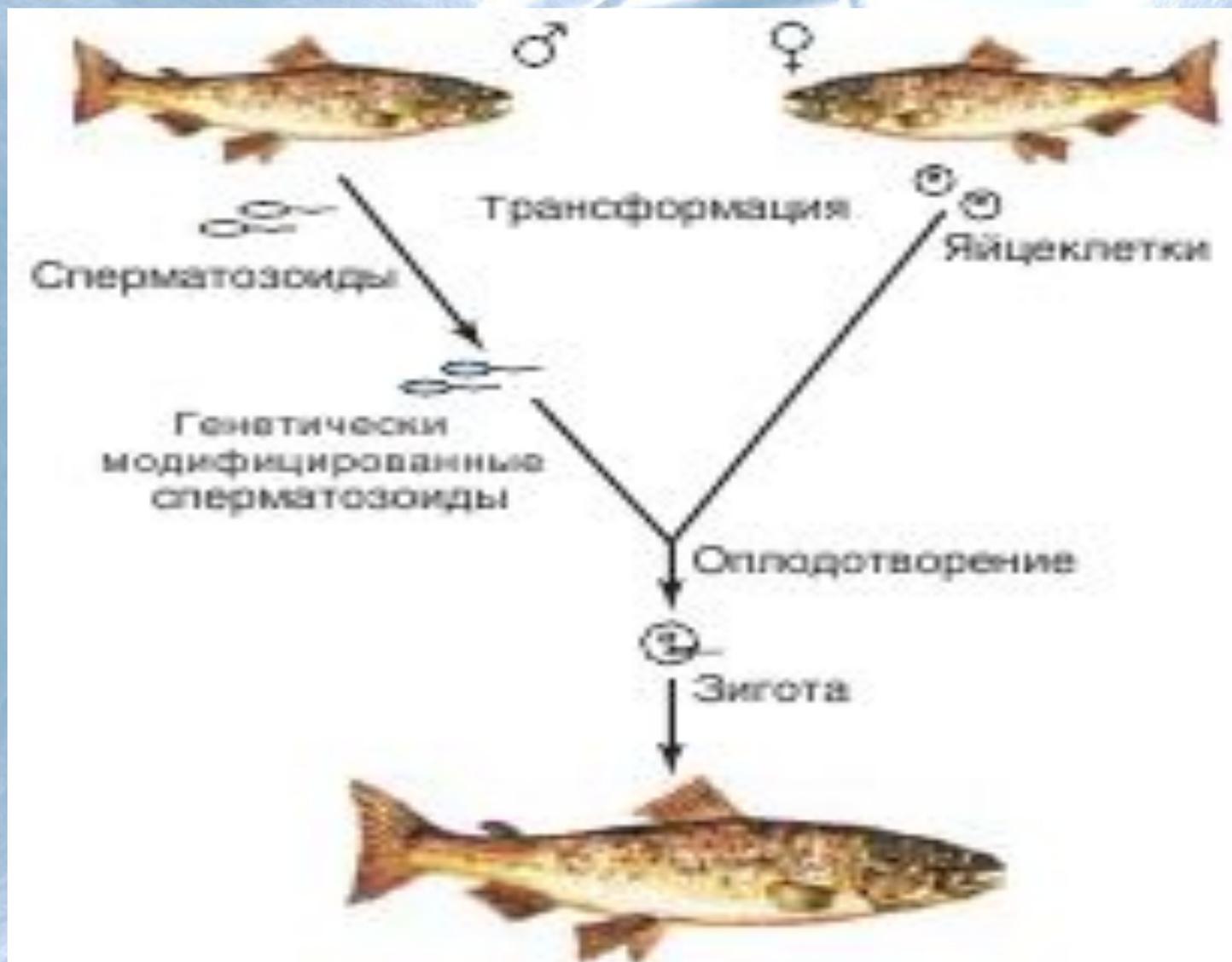


6. В потомстве появляется трансгенная гигантская мышь, если введен ген гормона роста





- В последние годы при создании трансгенных животных используют также *эмбриональные стволовые клетки*, которые берутся из эмбриона на самых ранних стадиях развития (из бластоцисты, состоящей из около 150 клеток). Эти клетки могут дифференцироваться в любые типы клеток многоклеточного организма.
- Эмбриональные стволовые клетки можно культивировать *in vitro* в течение длительного времени и вводить в них **целевые трансгены** с помощью вирусных векторов. После чего клетки со встроенными чужеродными генами можно вводить в другие эмбрионы на стадии бластоцисты для получения трансгенных животных.



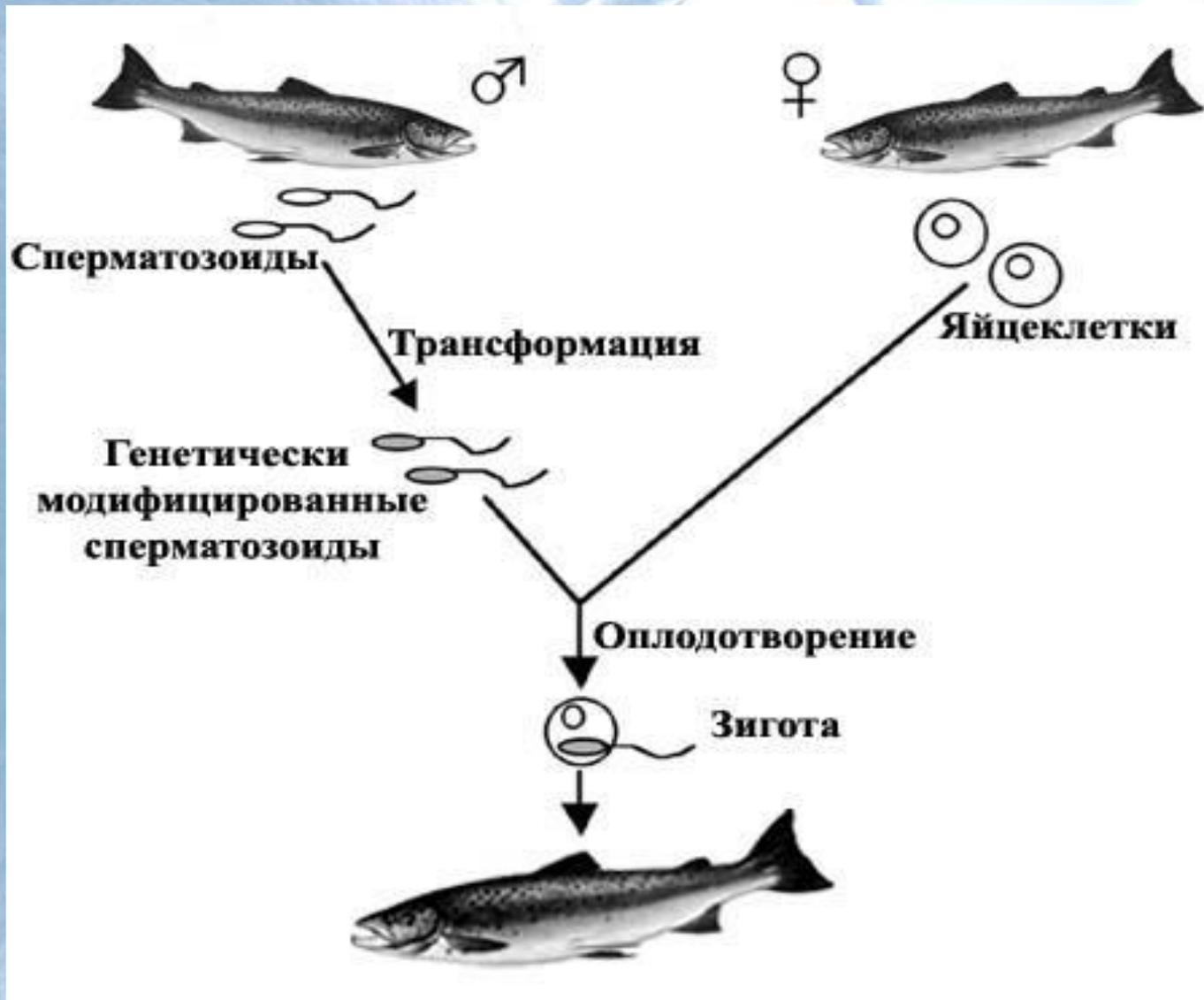


Схема получения трансгенных лососей со встроенным геном гормона роста. Трансгенные особи на 20% крупнее обычных и значительно быстрее достигают товарной массы.





## Получение трансгенных животных с необходимыми признаками

- Одна из важнейших задач современной биотехнологии — выведение трансгенных животных с улучшенной продуктивностью и более высоким качеством продукции, устойчивостью к болезням, а также создание так называемых *животных-биореакторов* — продуцентов ценных биологически активных веществ. Особый интерес представляет ген, кодирующий гормон роста.









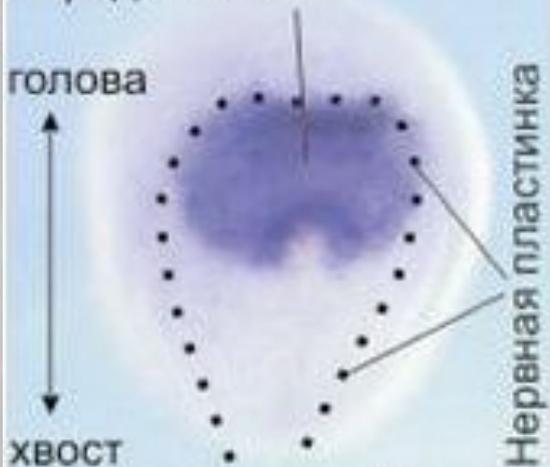




- В конце 70-х годов XX в. ген гормона роста крупного рогатого скота был интегрирован в геном кишечной палочки. Было показано, что гормон роста, выделенный из кишечной палочки, оказывает такое же стимулирующее действие на лактацию (продукцию молока) и рост животных, как и гипофизарный гормон.
- Гормон роста, полученный с помощью методов генетической инженерии, при крупномасштабном применении вызывал увеличение удоев на 23-31% при дозе 13 мг в день. При ежедневной инъекции гормона роста молодняку крупного рогатого скота, свиней и овец удалось увеличить суточные привесы на 20-30% при значительном сокращении расхода кормов на единицу прироста. У молодняка свиней с ускорением роста увеличивалось содержание белка и уменьшалось содержание жира в тканях, что повышало качество мясопродуктов.



Экспрессия *Anf* в зачатке переднего мозга



**А** Стадия нейрулы



**Б** Стадия головастика

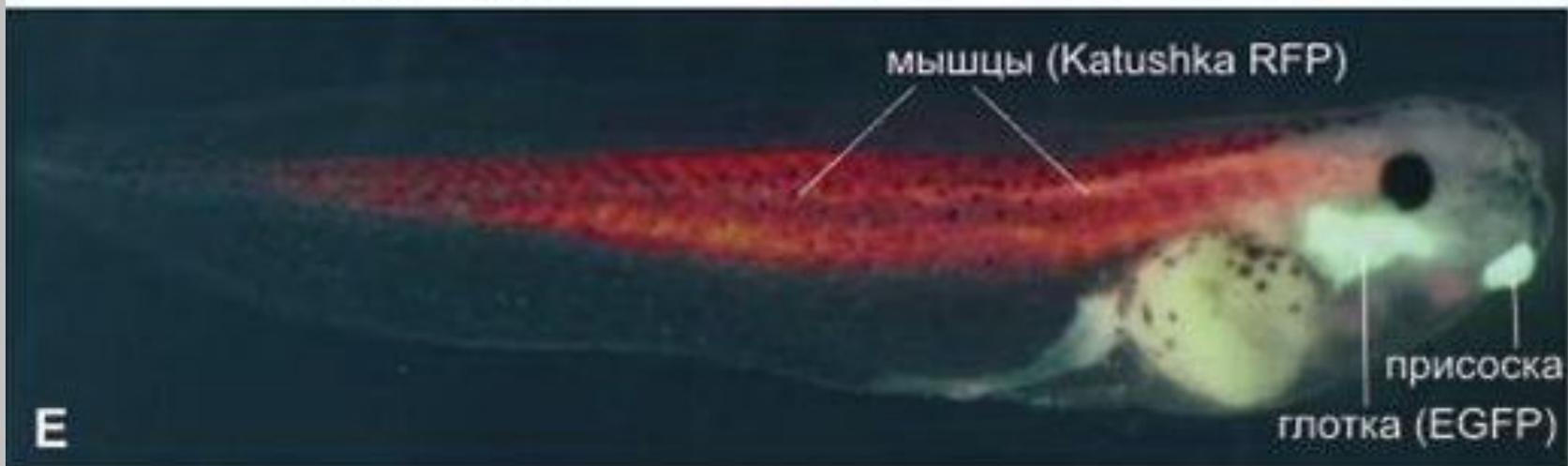
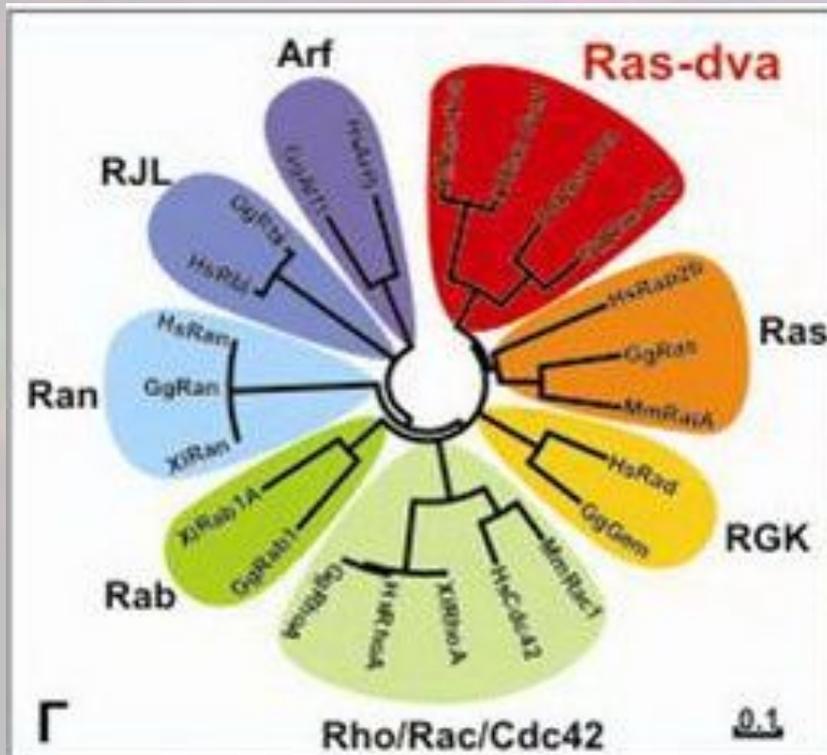


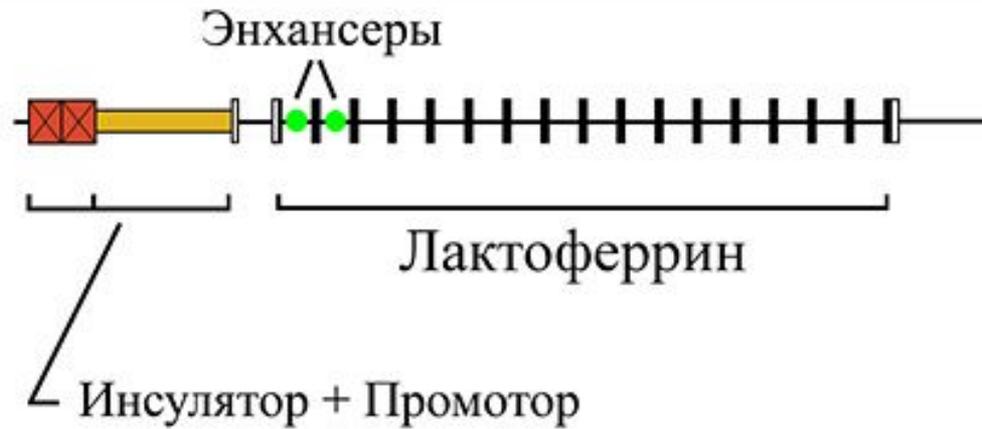
**Б'** Стадия головастика

Индукция второго мозга и глаза в результате эктопической экспрессии одной из мишеней *Anf* - ингибитора TGF-beta сигнализации *Noggin2*



**В**





Трансгенные козы -  
производители  
лактоферрина



Контрольные  
КОЗЫ



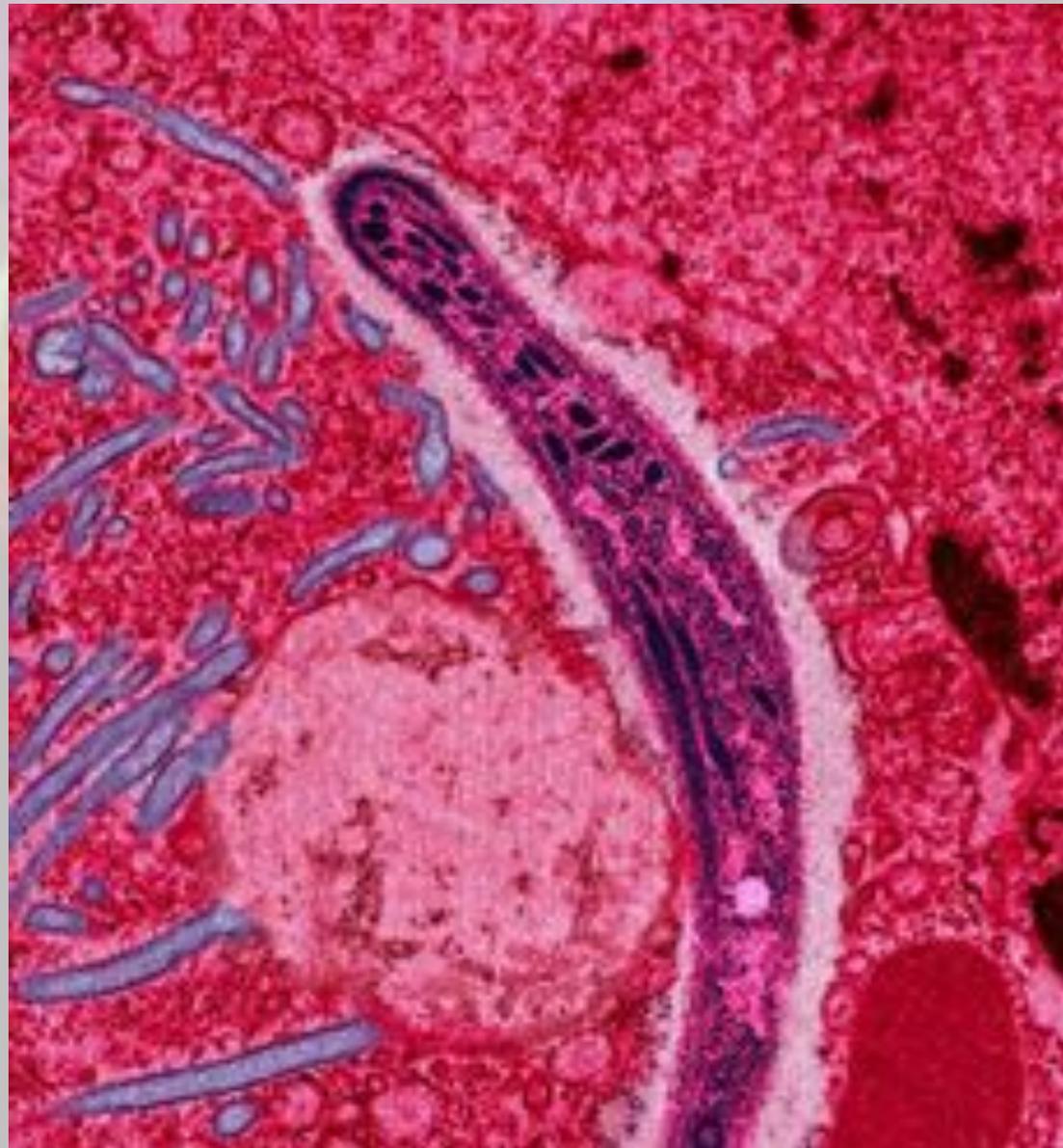
Трансгенные  
КОЗЫ

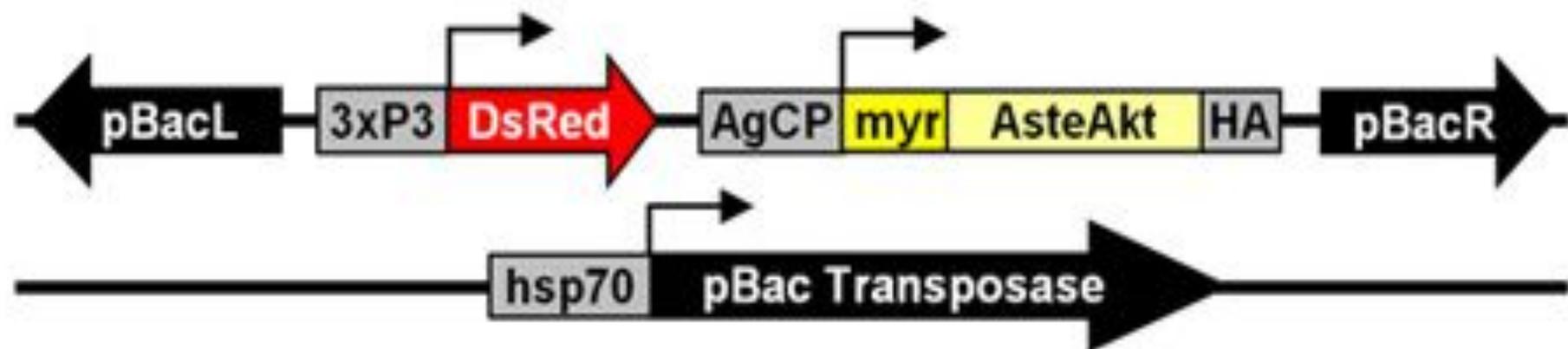


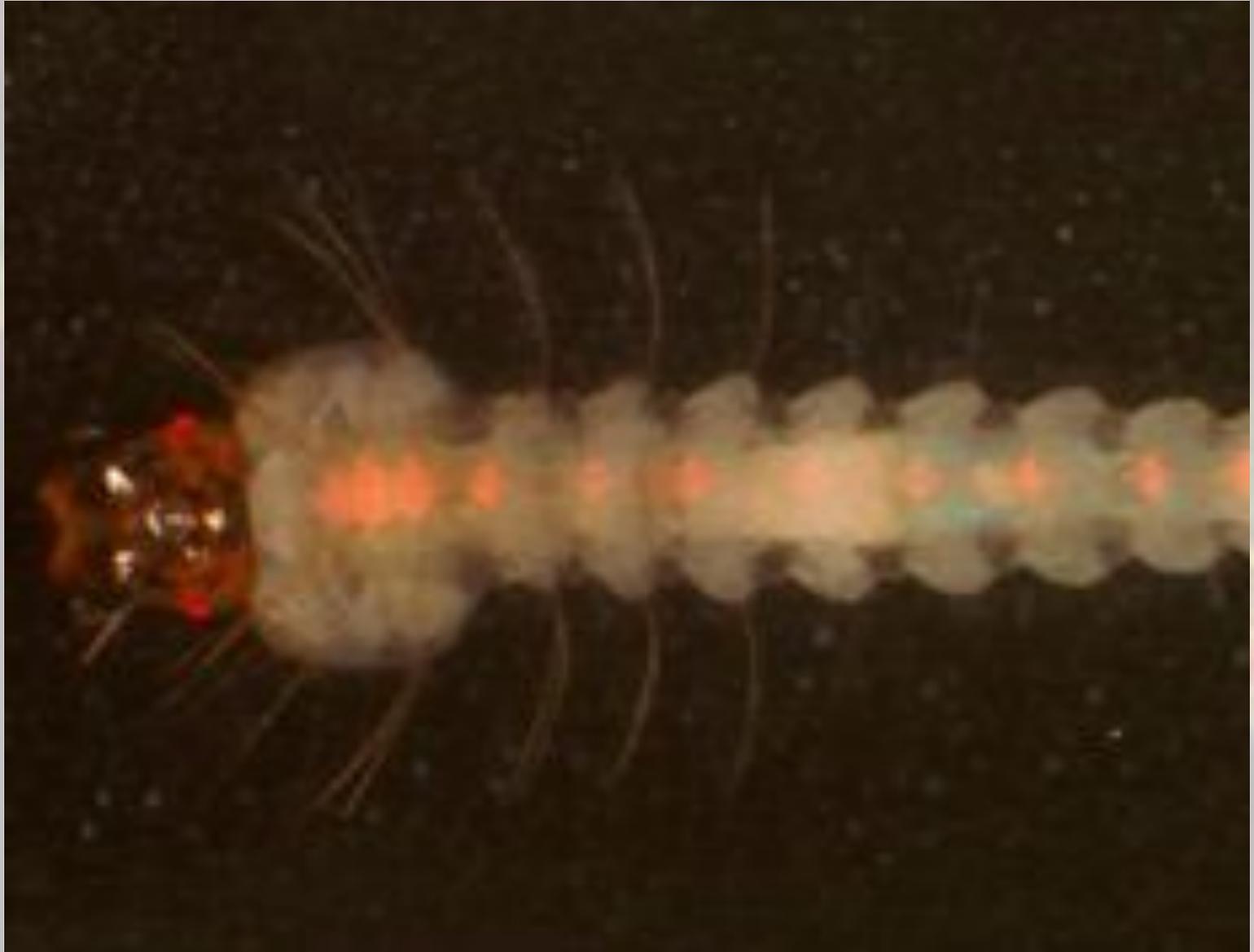
Лактоферрин  
человека

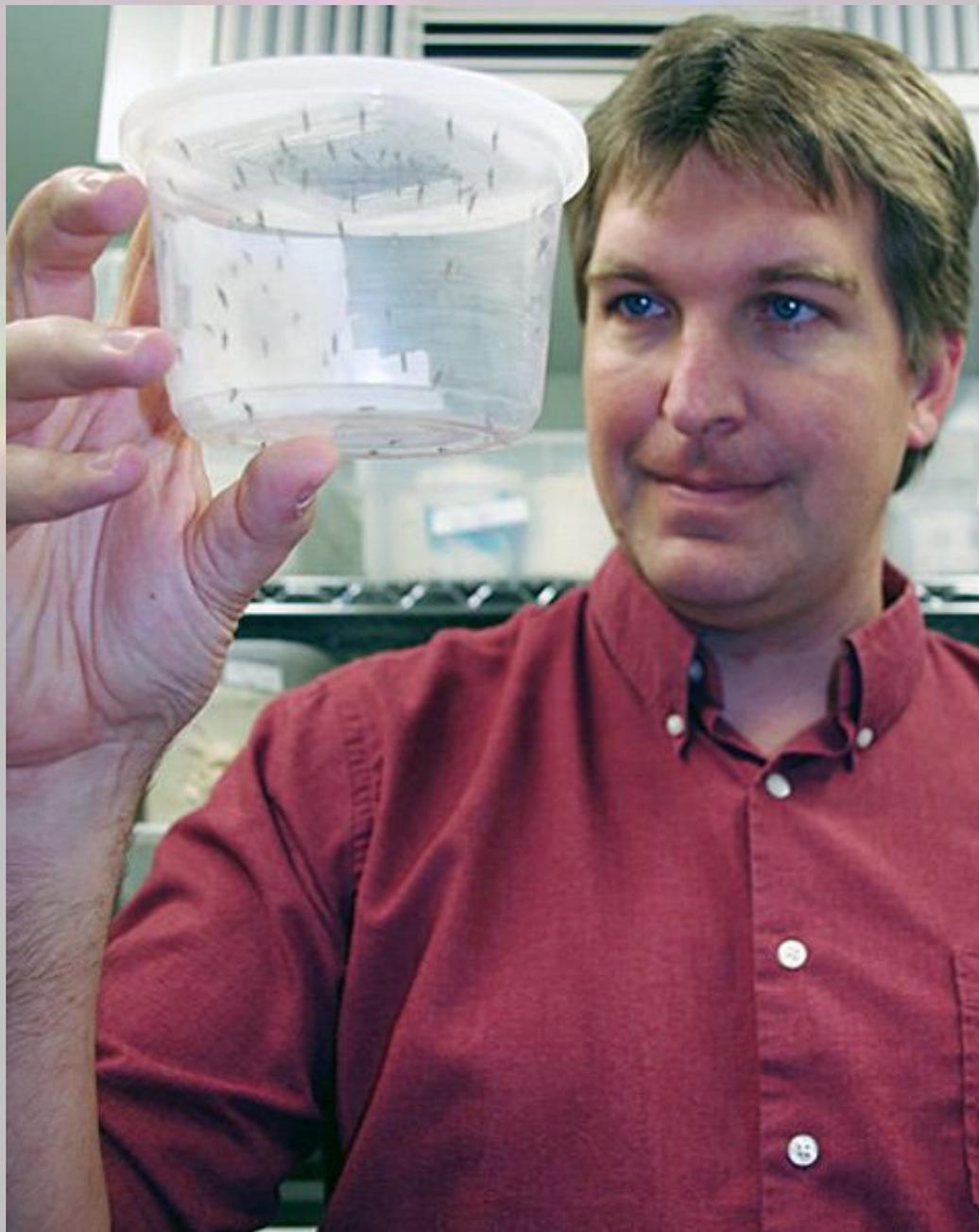
Белки молока











Вирусный промотор

EPSP-синтаза

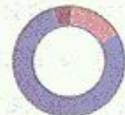


*Agrobacterium*, содержащая плазмиду Ti



Плазмида Ti

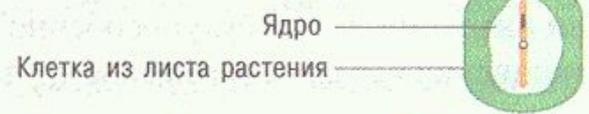
Гибридный ген, внедренный в плазмиду Ti



Рекомбинантная плазмида Ti, вставленная в *Agrobacterium*



*Agrobacterium* переносит плазмиду Ti, несущую гибридный ген EPSP, на хромосому растительной клетки, что стимулирует клетки синтезировать большое количество EPSP-синтазы и обуславливает устойчивость к глифосату



Каллусы с гибридным геном EPSP, выращенные в глифосат-содержащей среде

