

# Методы получения трансгенных животных

Можно использовать один из следующих подходов:

- Ретровирусные вектора, которые инфицируют клетки эмбриона на ранних стадиях развития, затем эмбрионы переносят самке-реципиенту.
- Микроинъекция в зиготе в один из пронуклеусов (обычно мужской)
- Введение генетически трансформированных эмбриональных стволовых клеток в эмбрион на ранних стадиях развития с последующей трансплантацией его матери-реципиенту.
- Перенос диплоидного соматического ядра в энуклеированную яйцеклетку.

- 25-30 мышинных яйцеклеток с чужеродным геном после микроинъекции имплантируются в псевдобеременную самку, которая была предварительно спарена с вазектомированным самцом. Таким образом, ни одна яйцеклетка самки не может быть оплодотворена. Самка произведет на свет мышат из имплантированных яйцеклеток через 3 недели.
- После рождения присутствие чужеродной ДНК можно подтвердить ДНК – гибридизацией или ПЦР-анализом.
- Трансгенная мышь может быть спарена с другой трансгенной мышью чтобы получить гомозиготные трансгенные мыши.

# Использование вирусов для переноса генов

- Вирусные частицы имеют природное свойство адсорбироваться на поверхности клеток и внедрять ДНК в цитоплазму. Это можно использовать для введения рекомбинантной ДНК в клетки животных.
- Несколько классов вирусов применяли для генной терапии и, по крайней мере, 8 из них дошли до клинических испытаний. Трансген можно ввести в вирус либо в интактный геном, либо с заменой одного или нескольких вирусных генов. Проводится лигирование или гомологичная рекомбинация.

# Преимущества вирусных векторов

- Большая емкость для чужеродной ДНК
- У вируса нет цитотоксического эффекта, так как некоторые гены удалены.

## Аденовирус

- Это вирусы с линейной двуцепочечной ДНК примерно в 36 тыс.п.о. имеют следующие преимущества:
  - стабильность
  - Высокая емкость для чужеродной ДНК
  - Широкий спектр хозяев, включая не делящиеся клетки
  - Способность давать высокий титр вплоть до  $10^{11}$  pfu/ml.

# Адено-ассоциированные вирусы (AAV)

- Эти вирусы генетически не родственны аденовирусам, но называются так, потому что впервые были открыты как контаминанты аденовирусов.
- AAV являются одноцепочечными ДНК-содержащими вирусами и принадлежат к семейству парвовирусов.
- Они являются дефектными при репликации. Т.е. не могут реплицироваться и завершить инфекционный цикл без другого вируса, такого как аденовирус. AAV реплицируется по литическому пути и производит тысячи вирионов.

- Зависимость AAV от гетерологичного вируса-помощника, например, аденовируса, обеспечивает высокий уровень контроля над вирусной репликацией, делая AAV одним из самых безопасных векторов для генной терапии.
- Другим преимуществом этого вирусного вектора является широкий спектр хозяев и не делящиеся клетки.

- Геном AAV является маленьким (5 тыс.п.о.) и включает центральный район, содержащий ген гер (репликаза) и сар (капсида), фланкируемыми инвертированными терминальными повторами в 145 п.о.
- Чужеродная ДНК замещает район гена сар и экспрессируется с помощью локального вирусного промотора. Однако, гер белок может мешать экспрессии и иметь некоторый цитотоксический эффект.

- Созданы новые векторы с делецией генов *rep* и *cap genes* и использующие только повторяющиеся элементы, необходимые для репликации, транскрипции и интеграции провируса.
- AAV векторы используются для эффективного введения генов во многие клетки, включая печень, мышцы и нейроны.



# Бакуловирусные векторы (BV)

- Бакуловирусы обеспечивают высокий уровень экспрессии трансгена в клетках насекомых, однако их можно использовать и на клетках млекопитающих.
- Бакуловирусы имеют палочковидную форму капсида с большой двуцепочечной молекулой ДНК. Они эффективно инфицируют насекомых.

- Одна из проблем экспрессии белков млекопитающих в клетках насекомых – различный тип гликозилирования белков. Одним из решений является использование большой емкости BV векторов для ко-экспрессии различных трансгенов, таким образом можно модифицировать процесс гликозилирования в клетках хозяев путем экспрессии соответствующих ферментов гликозилирования одновременно с экспрессией трансгена.

-

# Протокол для получения трансгенных телят

- Сбор ооцитов с мясокомбината (забой коров);
- *in vitro* созревание этих ооцитов;
- *in vitro* оплодотворение ооцитов спермой быков;
- Центрифугирование оплодотворенных ооцитов для лучшей визуализации пронуклеусов;
- Микроинъекция ДНК в мужской пронуклеус;
- *in vitro* развитие эмбриона;
- Транспалантация эмбриона в корову-реципиент;
- Скрининг на присутствие трансгена у новорожденных телят;
- С этой процедурой только 2 трансгенных теленка получено с использованием 2470 ооцитов, т.е. процедура возможна, но не очень эффективна.

# Цели получения трансгенных коров

- Изменить состав молока. Например, получать молока с желательными аллелями по гену каппа-казеина. При этом можно повысить выход и качество производимого из этого молока сыра.
- Получение трансгенных коров, производящих молоко, свободное от лактозы.
- Получение трансгенных коров генетически устойчивых к бактериальным, вирусным инфекциям, например, возбудителям мастита.

## Трансгенная птица

- Птичьи яйцеклетки обычно оплодотворяются через 30 минут после овуляции. Деление клеток происходит в яйцеводе в течение 20 часов до яйцекладки. За это время эмбрион состоит из приблизительно 60,000 плюрипотентных клеток, называемых бластодермом.
- Наличие желтка и множества пронуклеусов делает метод микроинъекции ДНК непрактичным.

## Протокол для птицы

Бластодермальные клетки удаляют из донорного яйца.

Эти клетки трансфицируют катионными липидами (липосомами) с чужеродной ДНК (липофекция).

Затем клетки снова вводят в эмбрионы свежеснесенных реципиентных яиц.

Часть потомства будет состоять из смеси клеток (донора и реципиента), т.е. будут химерами.

## Цели получения трансгенной птицы

Улучшить генетику существующих линий птицы в отношении:

Устойчивость к птичьим вирусным и кокцидиальным инфекциям;

Улучшить конверсию корма;

Понизить содержание жира и холестерина в яйце.

# **Методы получения трансгенных растений**



# • **Агробактерии - природные геномодификаторы**

- По мнению древних ученых-философов, ни один человек не способен придумать что-либо, чего в природе не существует. Людям отведена лишь роль первооткрывателей или (в худшем случае) искажителей идей и явлений самой природы.
- В отношении ГМО эта теория оправдана на все сто процентов.

## АГРОБАКТЕРИИ

- Род грамотрицательных аэробных бактерий. 4 вида, обитают в почве, главным образом в ризосфере. Способны вызывать образование галлов (опухолей) у многих растений. Патогенность агробактерий обусловлена наличием в их клетках плазмид.
- На основе этих плазмид создают векторы, которые используются в генетической инженерии для введения чужеродных генов в клетки растений.

- Клетки растений можно обработать лизоцимом для удаления клеточной стенки с получением протопластов, которые осторожно центрифугируют, наслаивая на монослой клеток млекопитающих для содействия их слиянию в присутствии полиэтиленгликоля.
- Использование липосом (липофекция) является эффективным инструментом, приводя к трансформации 90% клеток.

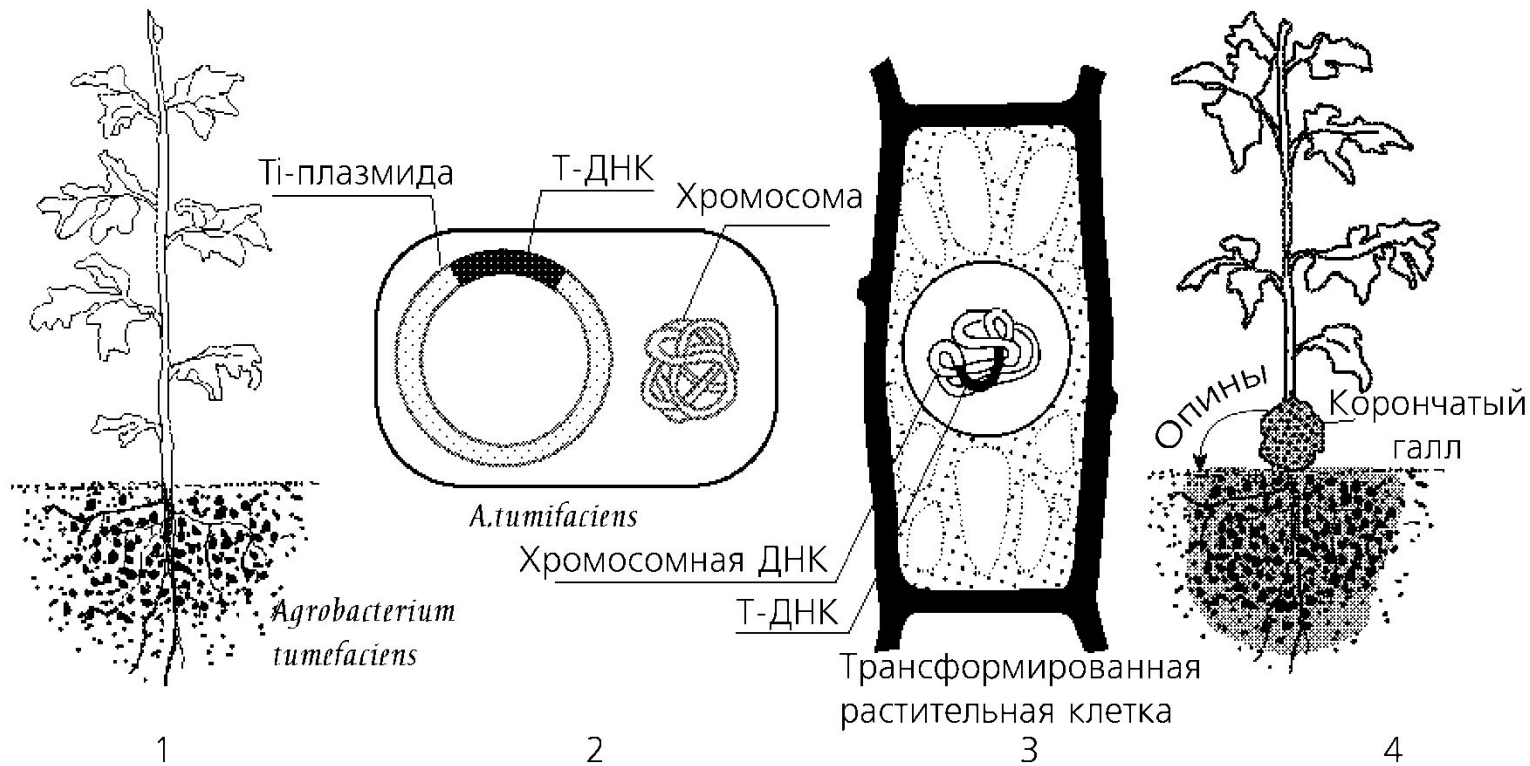


*Agrobacterium tumefaciens* поражает стебли и листья некоторых растений, причем ее Ti-плазмиды умеют встраивать часть своей ДНК в хромосому растительной клетки.

Корончатые галлы, образуемые на корнях



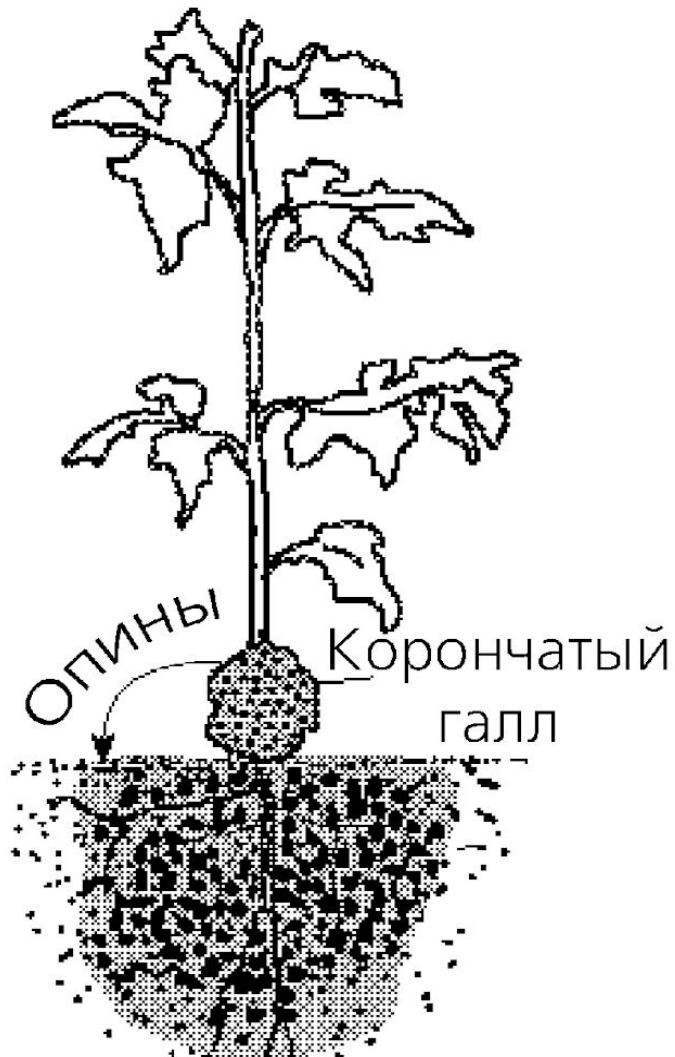
Получив такой подарок, клетки начинают бурно делиться, превращаясь в разрастание рыхлой ткани — корончатый галл, и вырабатывать ряд экзотических веществ, которыми и питаются трансформировавшие их бактерии.



## Генетическая колонизация растения

- 1- агробактерии существуют в ризосфере;
- 2 - строение *A. tumefaciens*;
- 3 – встраивание Т-ДНК в геном;
- 4 – образование опухоли

Локализация корончатого галла на шейке корней растений.



Опины (необычное для растений соединение) синтезируются трансформированными растениями.

Не обнаруживаются в нетрансформированных растительных тканях.

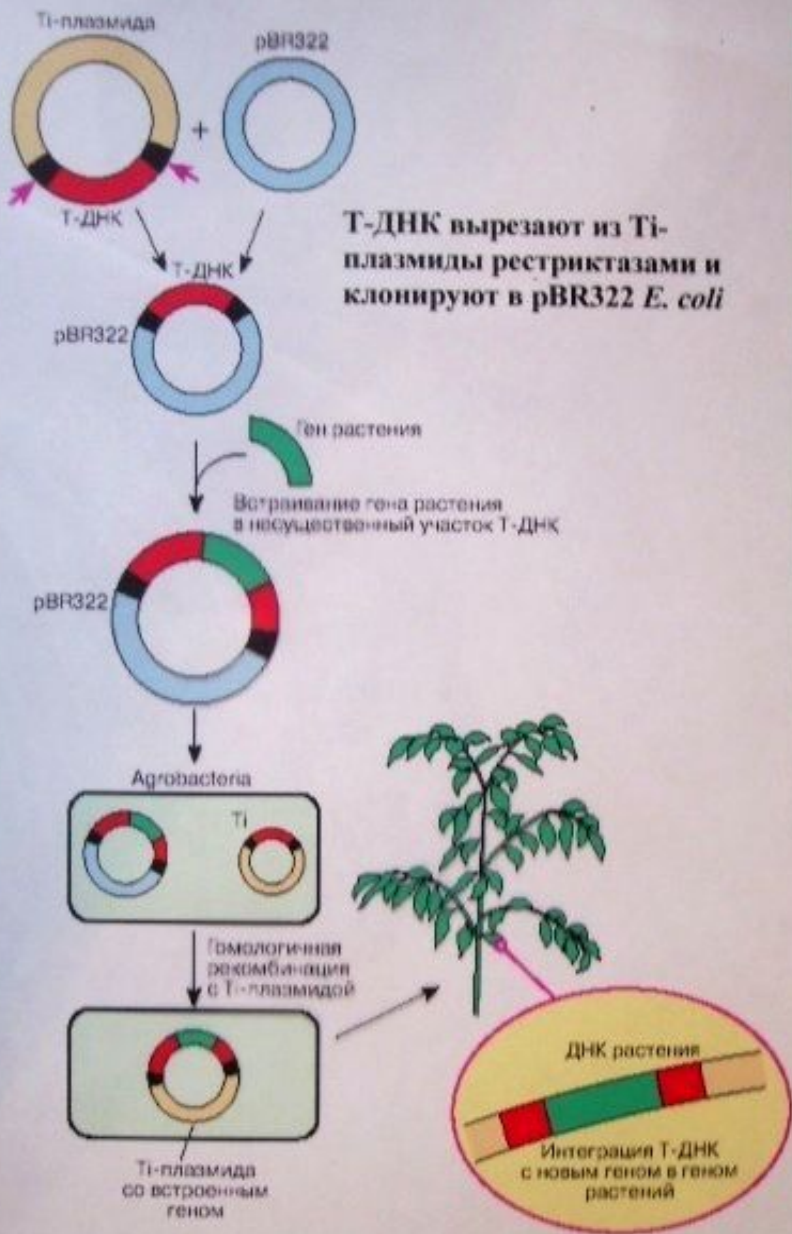


Корневой рак плодовых культур.



copyright: IFFF (BOKU)





- Выделение генов (отдельных фрагментов ДНК) из клеток бактерий, растений или животных.
- Соединение (сшивание) отдельных фрагментов ДНК любого происхождения в единую молекулу в составе плазмиды;
- Введение гибридной плазмидной ДНК, содержащей нужный ген, в клетки хозяина;
- Копирование (клонирование) этого гена в новом хозяине с обеспечением его работы.

● **Получение трансгенных растений с помощью агробактерий**