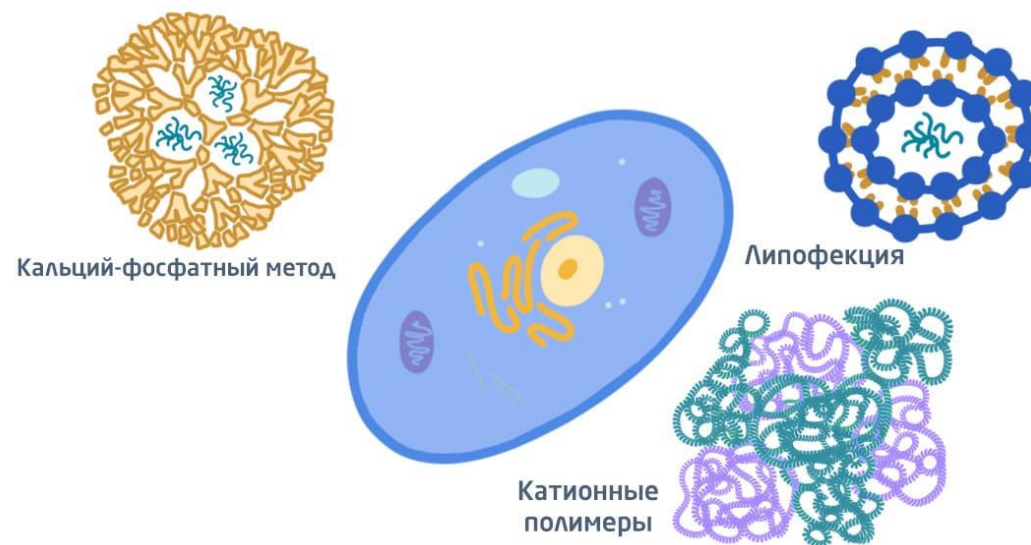


Методы доставки генов в клетки (трансформация, трансфекция, электропорация, липофекция, вирусные векторы).



Преподаватель: старший преподаватель
кафедры молекулярной биологии и генетики,
PhD, Сmekенов И.Т.

Дисциплина: Рекомбинация ДНК

(Лекция 7)

ЦЕЛЬ ЛЕКЦИИ

Показать основные методы доставки генетического материала в клетки, сравнить их по принципу действия, преимуществам, недостаткам и областям применения, чтобы подчеркнуть выбор оптимального метода для конкретной задачи.

Задачи

- ✓ Рассмотреть биологические и физико-химические принципы доставки генов в клетки.
- ✓ Описать механизмы и условия проведения трансформации, трансфекции, электропорации, липофекции и вирусного переноса.
- ✓ Сравнить эффективность, особенности и ограничения разных методов.
- ✓ Показать примеры применения данных методов в молекулярной биологии, биотехнологии и генной терапии.
- ✓ Обсудить биобезопасность и контроль экспрессии доставленных генов.

Ключевые термины

генетическая инженерия, трансформация, трансфекция, электропорация, липофекция, вирусные векторы, доставка генов, плазмиды, рекомбинантная ДНК, экспрессия генов, генная терапия, перенос ДНК, клетки-реципиенты.

- I. **Доставка генов** — это введение экзогенной ДНК (или РНК) в клетку с целью её экспрессии, репликации или интеграции в геном.
- II. **Трансформация** — естественное или искусственное включение чужеродной ДНК в бактериальные клетки.
- III. **Трансфекция** — процесс введения нуклеиновых кислот в эукариотические клетки. Может быть временной (транзиентной) или стабильной (с интеграцией в геном).
- IV. **Электропорация** — физический метод, основанный на временном повышении проницаемости мембраны под действием коротких электрических импульсов.
- V. **Липофекция** — химический метод доставки ДНК с использованием липосом (жироподобных пузырьков), которые сливаются с мембраной клетки и высвобождают ДНК внутрь цитоплазмы.
- VI. **Вирусные векторы** — модифицированные вирусы, способные переносить и экспрессировать целевые гены в клетках хозяина.

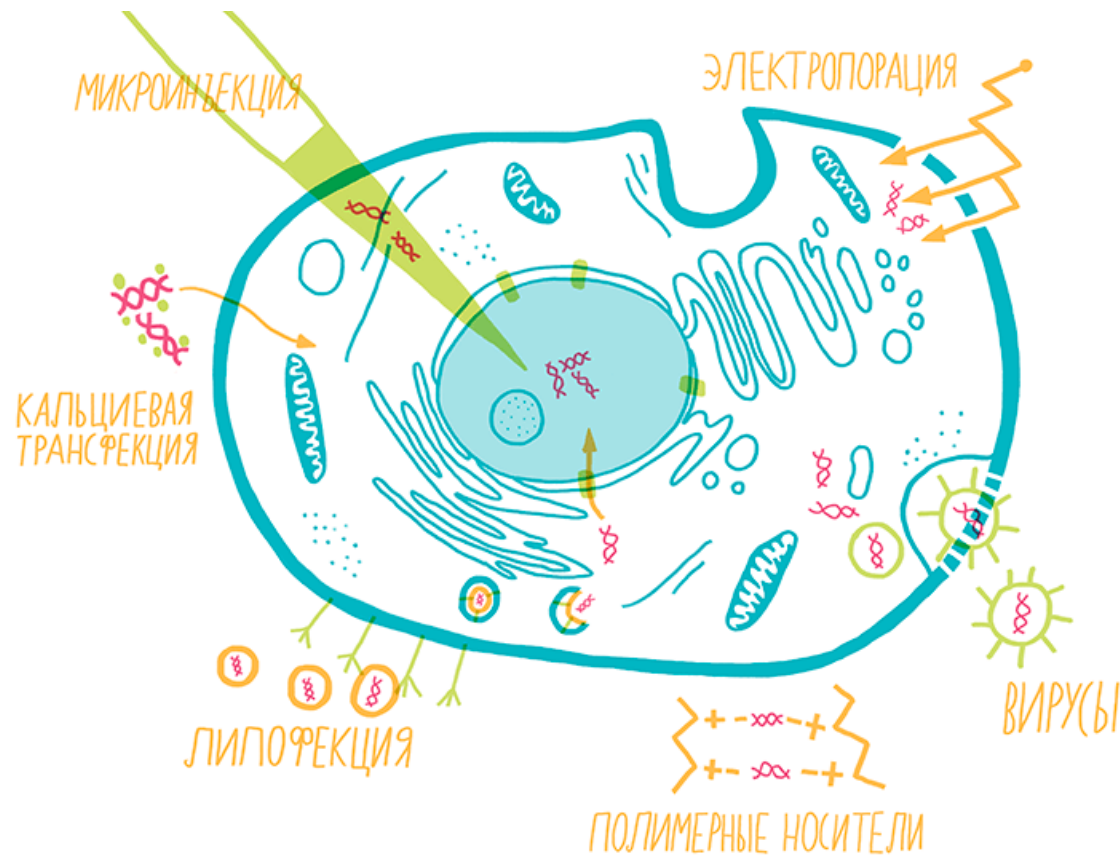


ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие основные группы методов доставки генетического материала в клетки существуют?
2. В чем отличие транзientной экспрессии от стабильной при доставке генов?
3. Как работает метод электропорации и для каких клеток он наиболее эффективен?
4. В чем преимущества и недостатки микроинъекции по сравнению с другими физическими методами?
5. Что такое биолистический метод и в каких системах его применяют чаще всего?
6. Как доставляются гены в клетки с помощью липофекции и какова роль липидных комплексов?
7. В чем принцип работы полиэтиленимина (PEI) как средства доставки ДНК?
8. Какие особенности имеет кальций-фосфатный метод трансфекции?
9. Каковы основные особенности аденовирусных векторов и в каких областях медицины их применяют?
10. Чем отличается аденоассоциированный вирус (AAV) от других вирусных векторов?
11. Что такое трансдукция и какие вирусные векторы чаще всего используют для этого метода?

❑ **Методы доставки генов в клетки** (т.е. методы трансфекции или трансдукции) используются, чтобы ввести ДНК, РНК или другие генетические конструкции в клетку для исследования, терапии или модификации.

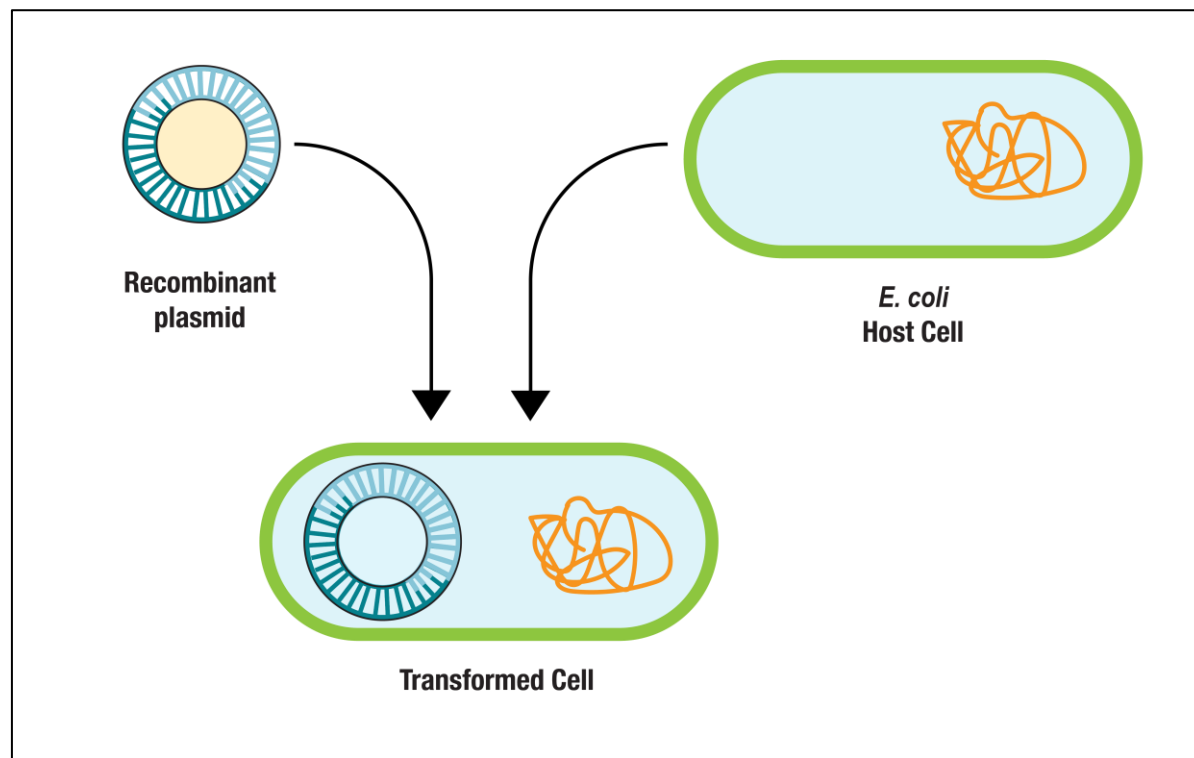
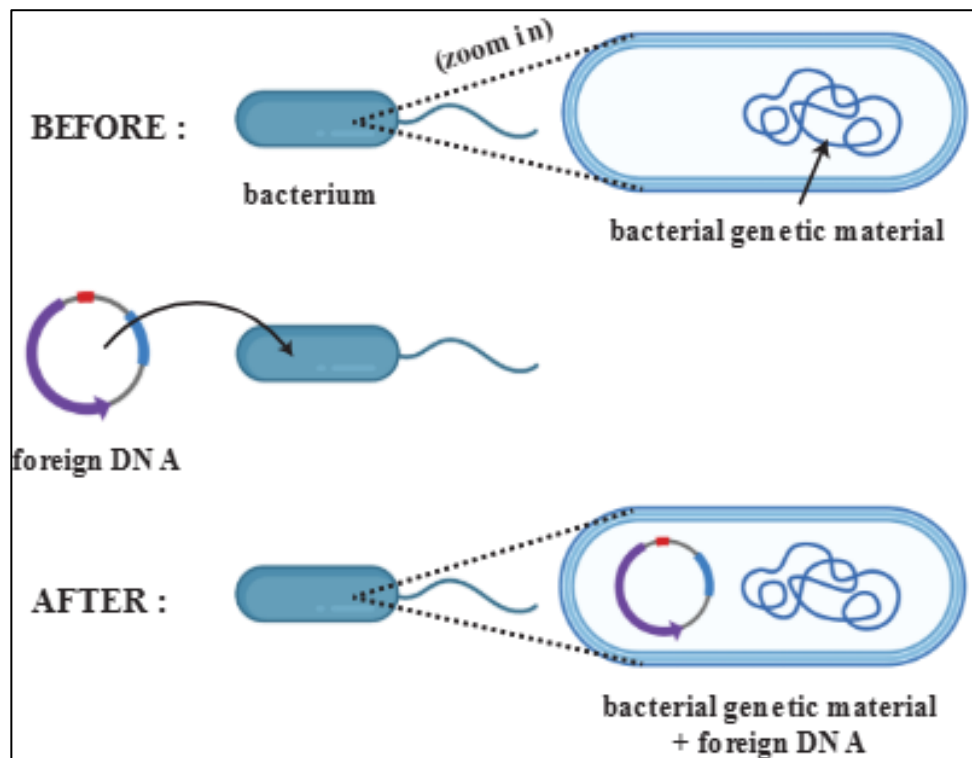
Методы доставки генов в клетку можно разделить на: Биологические / Физические / Химические.



- К **биологическим методам** относятся вирусная трансдукция и агроинfiltrация, которые используют природные механизмы для переноса генетического материала.
- **Физические методы**, такие как электропорация, микроинъекция и магнитофекция, механически или с помощью физических полей вводят ген в клетку.
- **Химические методы**, например, липофекция, используют химические соединения (липиды, полимеры) для создания комплексов с нуклеиновой кислотой и облегчения её проникновения в клетку.

1) Трансформация

Трансформация — это процесс введения чужеродного генетического материала (ДНК или РНК) в клетку с последующим включением и экспрессией этого материала. В результате клетка приобретает новые генетические свойства, которые передаются при делении. Трансформацию используют также в экспериментах для определения порядка генов, расстояний между ними в молекулах ДНК и построения генетических карт.



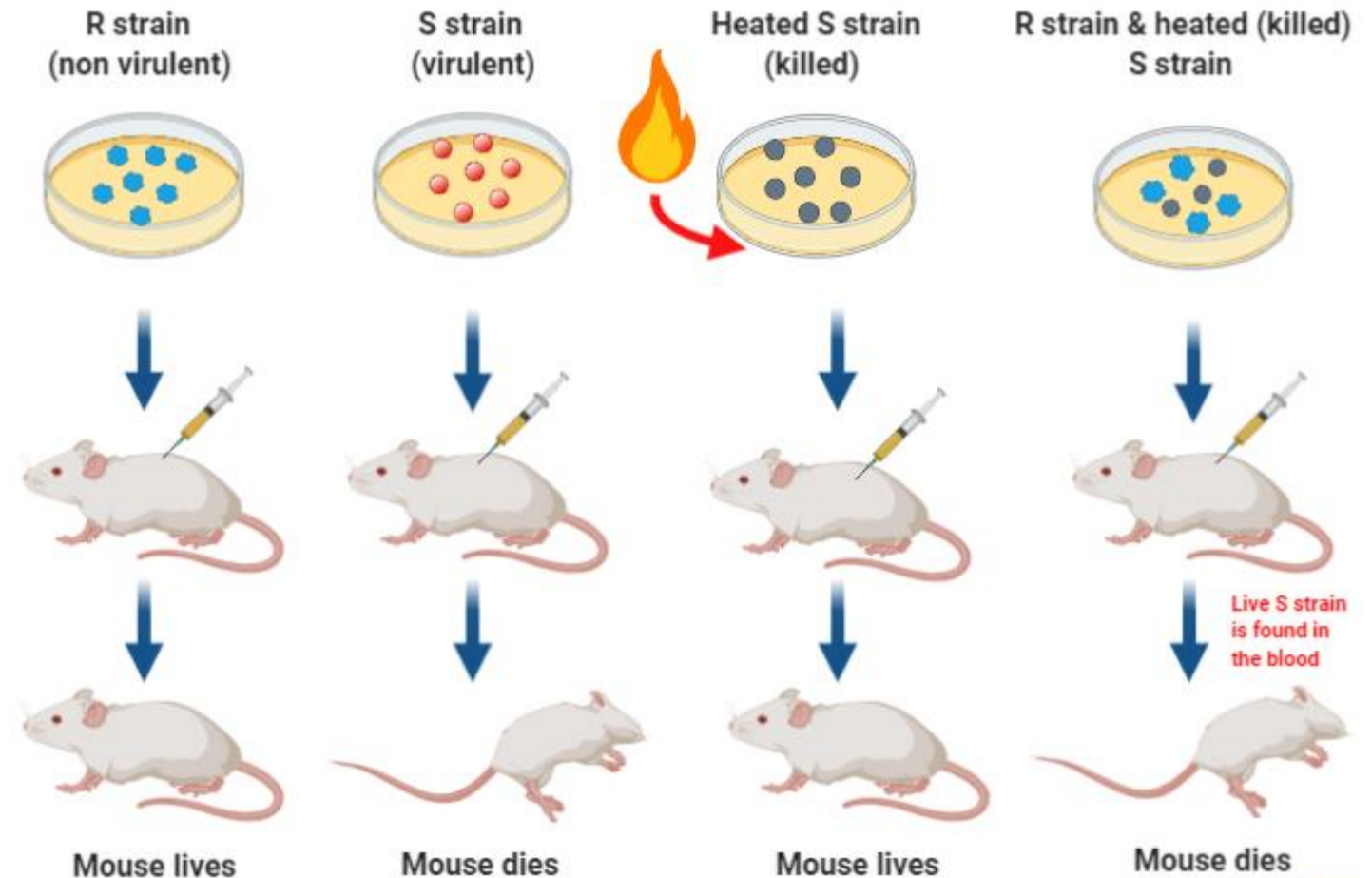
Классический опыт Гриффита (1928)

Гриффит изучал два штамма *Streptococcus pneumoniae*:

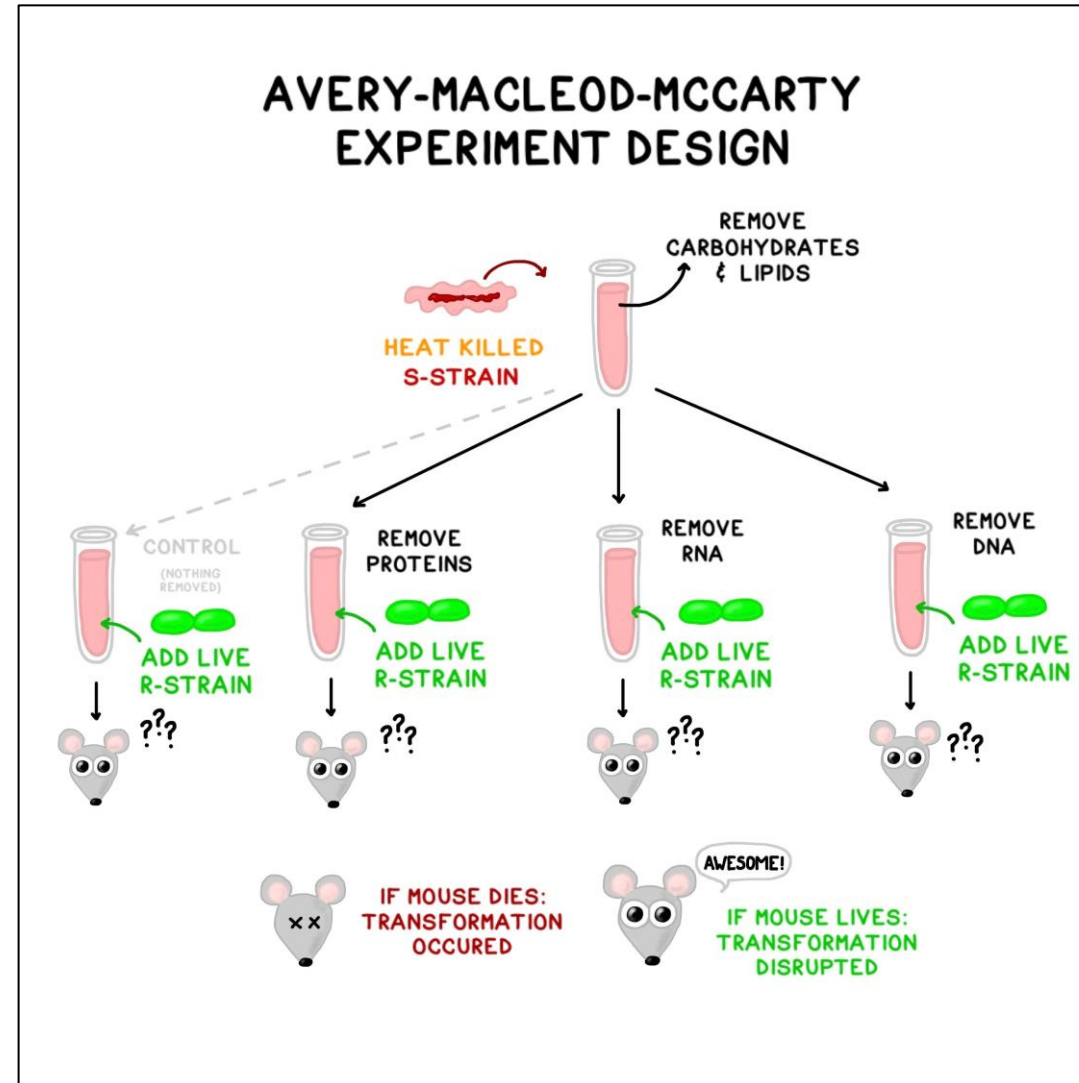
- гладкий (S) — вирулентный, с капсулой;
- шероховатый (R) — невирулентный.

После гибели вирулентных бактерий при нагревании и смешивания их с живыми R-клетками последние **приобретали вирулентность**.

Это стало первым доказательством существования «**фактора трансформации**», позже идентифицированного как **ДНК** (опыт Эйвери, Маклеода и Маккарти, 1944).



- Через 16 лет Эвери, Маклеод и Маккарти показали, что этим самым агентом была ДНК, содержащая гены, необходимые для формирования капсулы. Они выделили ДНК из вирулентного штамма *S. pneumoniae* и показали, что введение одной только этой ДНК в клетки авирулентного штамма превращает их в болезнетворные. Результаты Эвери и коллег поначалу были встречены скептически, и окончательно они были признаны достоверными после описания явления генетического переноса Джошуа Ледербергом — конъюгации (в 1947 году) и трансдукции (в 1953 году).



Механизм естественной трансформации (на примере бактерий)

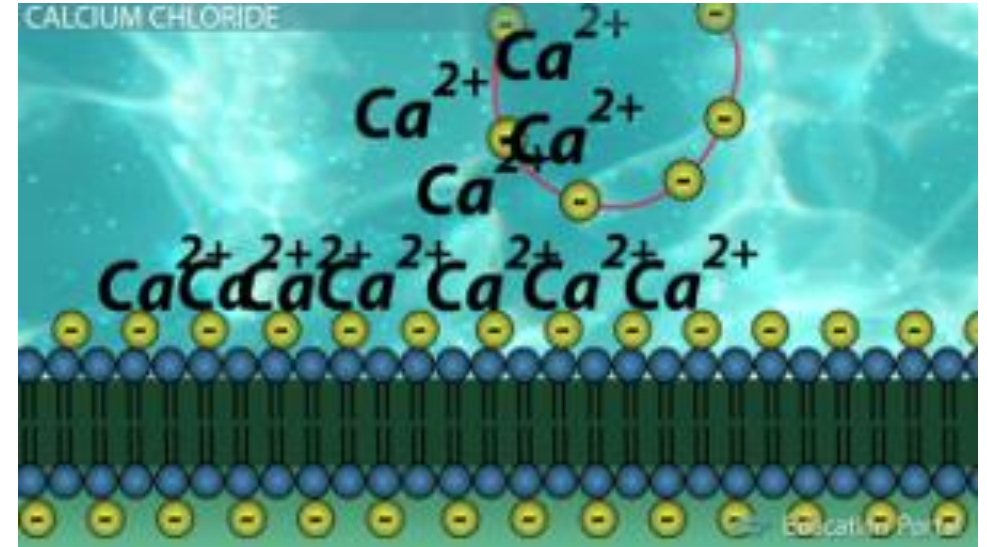
- **Распознавание ДНК** — клетка распознаёт внеклеточную ДНК и связывает её с поверхностными белками.
- **Транспорт через мембрану** — ДНК проникает внутрь клетки в одноцепочечной форме.
- **Интеграция в геном** — новая ДНК может встраиваться в хромосому реципиента посредством гомологичной рекомбинации.
- **Экспрессия гена** — клетка начинает синтезировать новые белки, кодируемые трансформированной ДНК.
- Этот процесс является **механизмом горизонтального переноса генов** у прокариот, способствующим эволюции и появлению, например, устойчивости к антибиотикам.

Искусственная трансформация бактерий

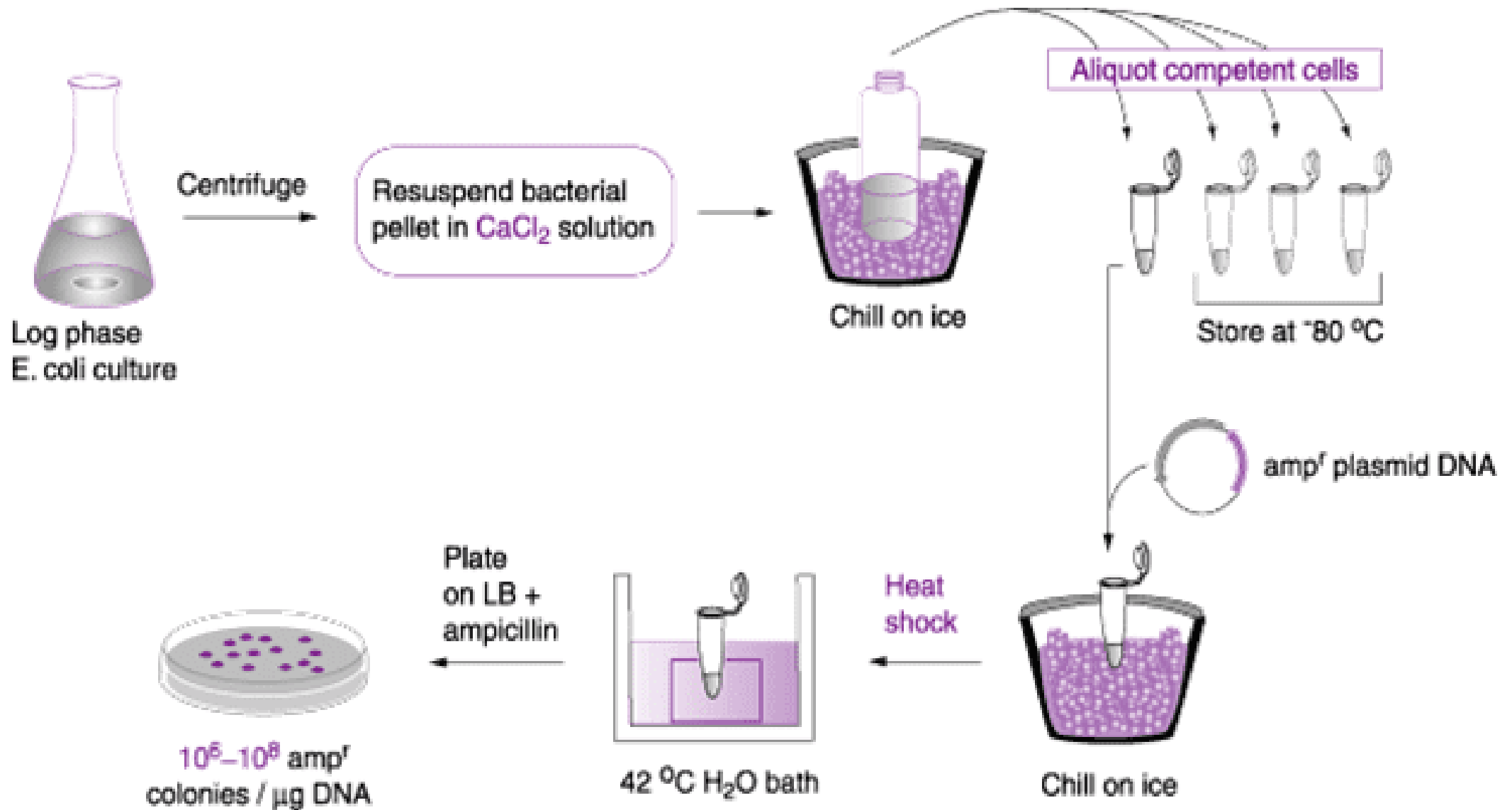
Для большинства лабораторных штаммов бактерий естественная способность к трансформации отсутствует, поэтому используют **искусственные методы**, повышающие проницаемость мембран.

Химическая трансформация (метод CaCl_2)

- ✓ Клетки обрабатывают холодным раствором CaCl_2 , что делает клеточную стенку более проницаемой.
- ✓ Затем добавляют ДНК и проводят **тепловой шок** (обычно 42°C на 30–60 с).
- ✓ Возникает кратковременное изменение мембранного потенциала, и ДНК проникает внутрь.
- ✓ Метод широко используется для трансформации *E. coli* при клонировании плазмид.



Шаги процесса трансформации бактерий:



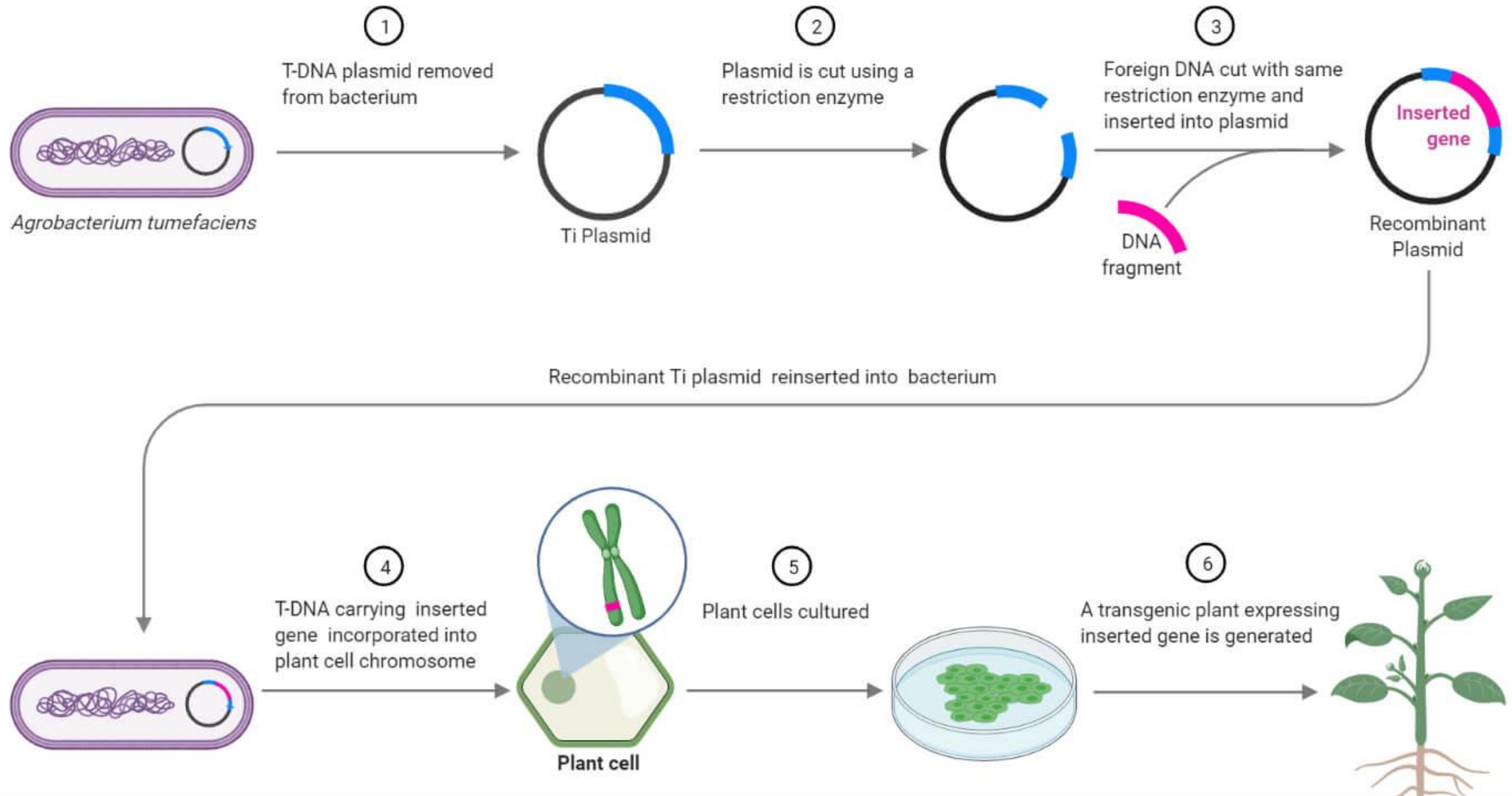
Трансформация растений — это процесс введения чужеродного гена в клетки растения с целью изменения его генотипа и фенотипа.

Агробактерийная трансформация — это метод введения генетического материала в растения с помощью бактерии *Agrobacterium tumefaciens*.

- ✓ *Agrobacterium* обладает естественной способностью переносить T-DNA (transfer DNA) из плазмиды Ti в геном растения.
- ✓ В лабораторных условиях T-DNA модифицируют так, чтобы она содержала желаемый ген без генов, вызывающих опухоль (опухолевая плаزمида Ti обезврежена).
- ✓ Этот метод используется для создания стабильных трансгенных растений.



Agrobacterium-Mediated Transformation



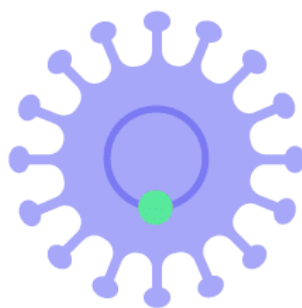
2) Трансфекция

Трансфекция — это процесс введения чужеродной нуклеиновой кислоты (ДНК, РНК или олигонуклеотидов) в эукариотические клетки без использования вирусов.

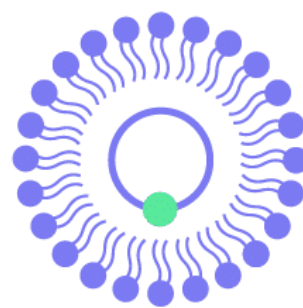
Types of Transfection



Transient vs.
Stable Transfection



Viral-Based
Transfection



Non-Viral Based
Transfection

Трансфекция применяется для:
экспрессии рекомбинантных белков в клетках;
изучения функции генов (gain/loss of function);
нокадауна или нокаута генов (siRNA, shRNA, CRISPR/Cas9);
тестирования промоторов и регуляторных элементов;
создания стабильных трансгенных клеточных линий.

По продолжительности действия:

1. ТРАНЗИЕНТНАЯ ТРАНСФЕКЦИЯ

- Это **временное** введение чужеродной ДНК (или РНК) в клетки. Введённая ДНК **не интегрируется в геном клетки**, а существует в виде **эпизомы** (вне хромосом).
- Экспрессия гена наблюдается в течение **нескольких часов — нескольких дней**, пока плаزمид не разрушается или не теряется при делении клетки. Используется для **временной экспрессии белков, тестирования промоторов, проверки активности конструктора**.

Преимущества:

Быстрота и простота метода.
Не требует отбора клонов.
Подходит для скрининга и временных экспериментов.

Недостатки:

Короткий срок экспрессии.
Невозможность стабильного поддержания гена при делении клеток.

Примеры использования:

Анализ экспрессии белка,
тестирование эффективности плазмидных конструкций,
временное производство белков в клеточных культурах (например, HEK293, CHO).

2. СТАБИЛЬНАЯ ТРАНСФЕКЦИЯ

- Это **долговременное** внедрение чужеродной ДНК в **геном клетки-хозяина**. После интеграции трансгена он передаётся дочерним клеткам при делении, обеспечивая **постоянную экспрессию**.
- Для отбора успешно трансфицированных клеток применяют **селективные маркеры** (например, устойчивость к антибиотикам — неомицин, пурамицин).

Преимущества:

Долговременная экспрессия гена.
Возможность создания **стабильных клеточных линий**.
Удобство для производства рекомбинантных белков или функциональных исследований.

Недостатки:

Процесс занимает больше времени (недели).
Интеграция может нарушать собственные гены клетки (эффект вставки).
Требуется подбор селективных условий.

Примеры использования:

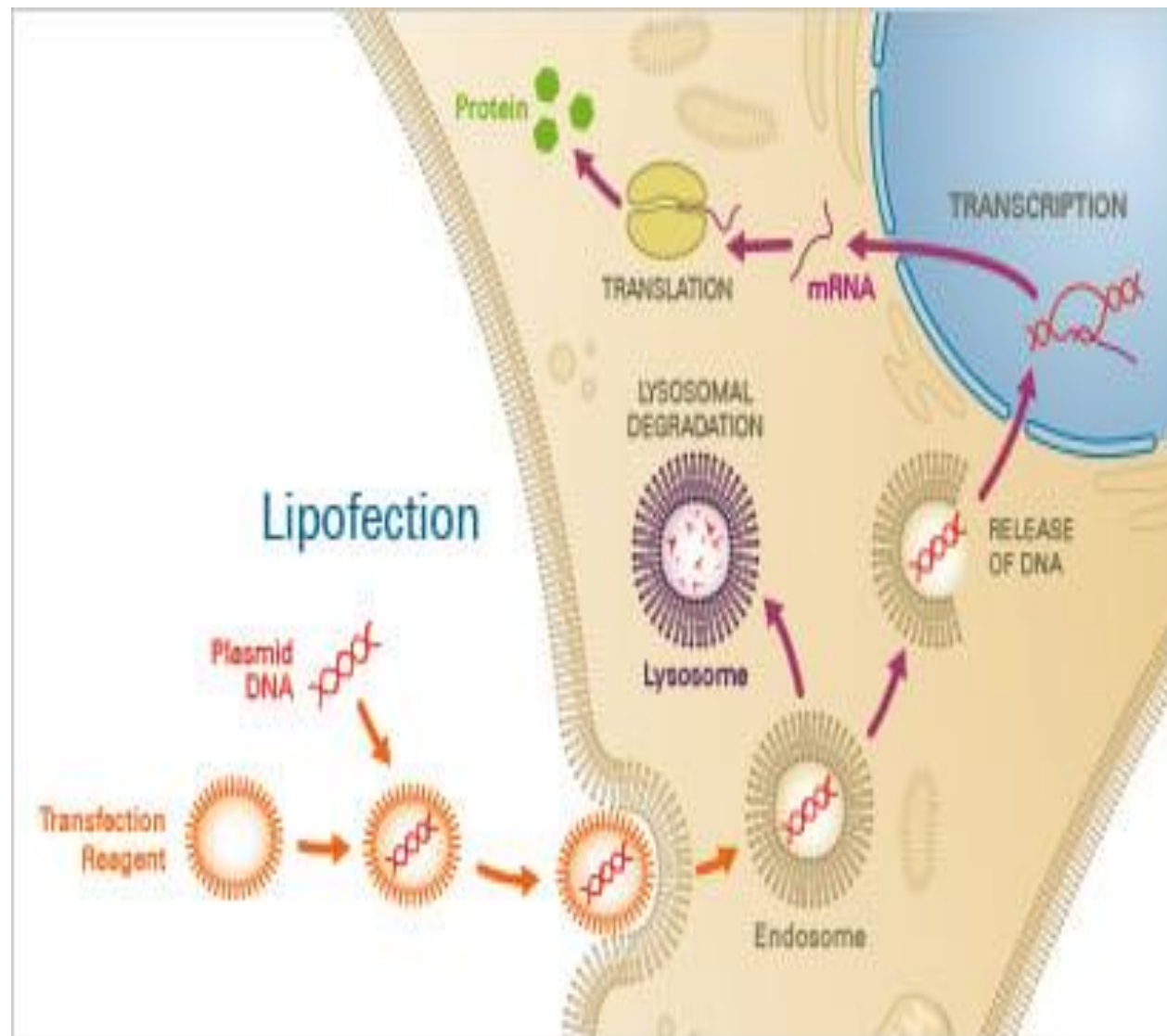
Создание клеточных линий, постоянно экспрессирующих белок.
Долговременные эксперименты по генной регуляции.
Производство терапевтических белков.

Категория	Методы	Принцип	
Химические методы	Липофекция	Комплексы ДНК/РНК с катионными липидами сливаются с мембраной клетки	
	Полиэтиленимин (PEI)	Катионный полимер образует комплексы с ДНК, доставляемые путём эндоцитоза	
	Кальций-фосфатный метод	Осадок CaPO_4 –ДНК поглощается клетками	
	Дендримеры, наночастицы	Полимерные или липидные наночастицы защищают и доставляют ДНК	
Физические методы	Электропорация	Кратковременный электрический импульс создаёт поры в мембране	
	Микроинъекция	Прямое введение ДНК микропипеткой в цитоплазму или ядро	
	Биолистический метод (генная пушка)	Микрочастицы золота/вольфрама, покрытые ДНК, проникают в клетку под давлением	
	Сонопорация, оптопорация, нанопорация	Ультразвук, лазеры или наноструктуры создают временные поры	

Липофекция

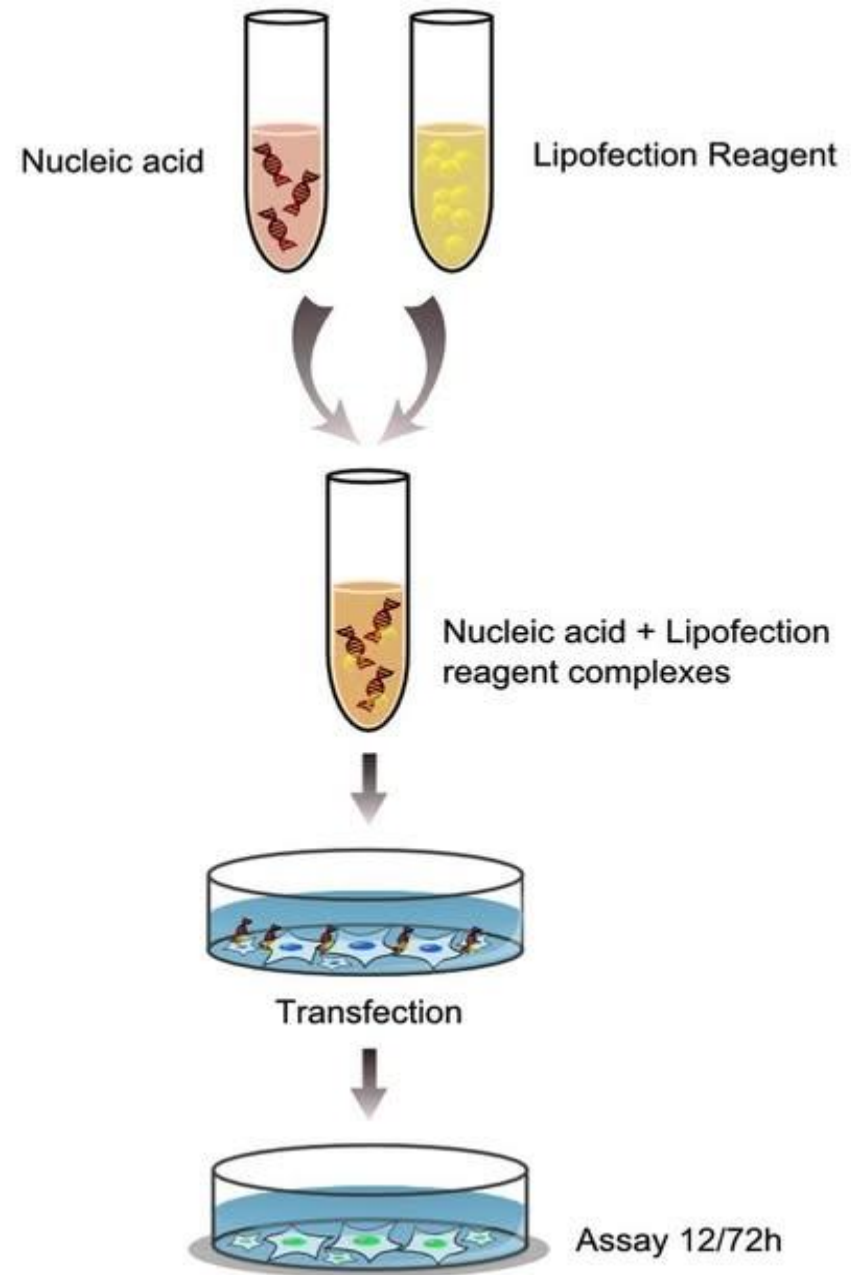
Липофекция — это метод доставки генетического материала, такого как нуклеиновые кислоты ДНК, РНК, в клетки с помощью липидных наночастиц, называемых *липосомами*.

- Липосомы образуют комплексы с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами и затем сливаются с клеточной мембраной, чтобы доставить содержимое внутрь клетки. Это распространенный способ химической трансфекции, который используется для введения чужеродного генетического материала в животные клетки.



Принцип действия

- **Формирование липосомальных комплексов:**
Катионные липиды (например, DOTAP, DOPE, Lipofectamine) взаимодействуют с отрицательно заряженной ДНК или РНК, формируя **липоплексы** — липидно-нуклеиновые комплексы.
- **Адсорбция на мембране клетки:**
Положительно заряженные липоплексы связываются с отрицательно заряженными фосфолипидами клеточной мембраны.
- **Эндоцитоз или слияние с мембраной:**
Комплексы встраиваются в мембрану или захватываются эндоцитозом, высвобождая ДНК/РНК в цитоплазму.
- **Доставка в ядро (для ДНК):**
ДНК перемещается в ядро, где происходит экспрессия целевого гена.



Полиэтиленимин (PEI) — это катионный полимер, широко используемый для доставки ДНК или РНК в эукариотические клетки.

Метод основан на электростатическом взаимодействии между положительно заряженными аминогруппами PEI и отрицательно заряженными фосфатными группами нуклеиновых кислот.

В результате образуются комплексы PEI/ДНК, которые могут проникать в клетку с помощью эндоцитоза.

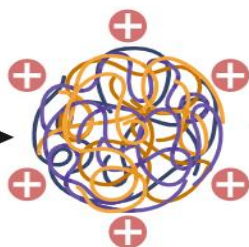
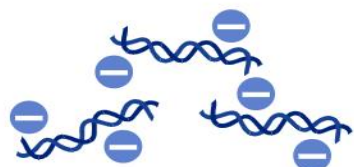
Принцип действия

- **Комплексообразование:** PEI связывает ДНК за счёт электростатических связей, формируя наночастицы (комплексы размером 100–300 нм).
- **Доставка в клетку:** Комплексы PEI/ДНК взаимодействуют с отрицательно заряженной клеточной мембраной и поглощаются эндоцитозом.
- **Выход в цитоплазму:** Благодаря “протонной губке” — способности PEI захватывать протоны — внутри эндосомы происходит осмотическое набухание, что разрушает мембрану эндосомы и высвобождает ДНК в цитоплазму.
- **Экспрессия гена:** ДНК транспортируется в ядро, где начинается транскрипция и экспрессия введённого гена.

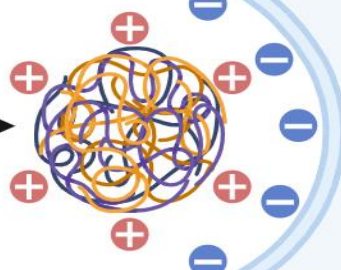
Positively-charged
polyethylenimine (PEI)



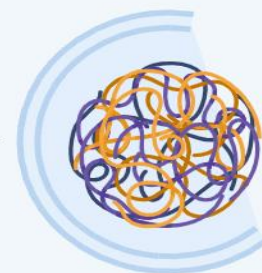
Negatively-charged
DNA



PEI-DNA
nanoparticle
(polyplex)



Endocytosed
nanoparticle



Endosome
releasing DNA



DNA transported
into nucleus



mRNA



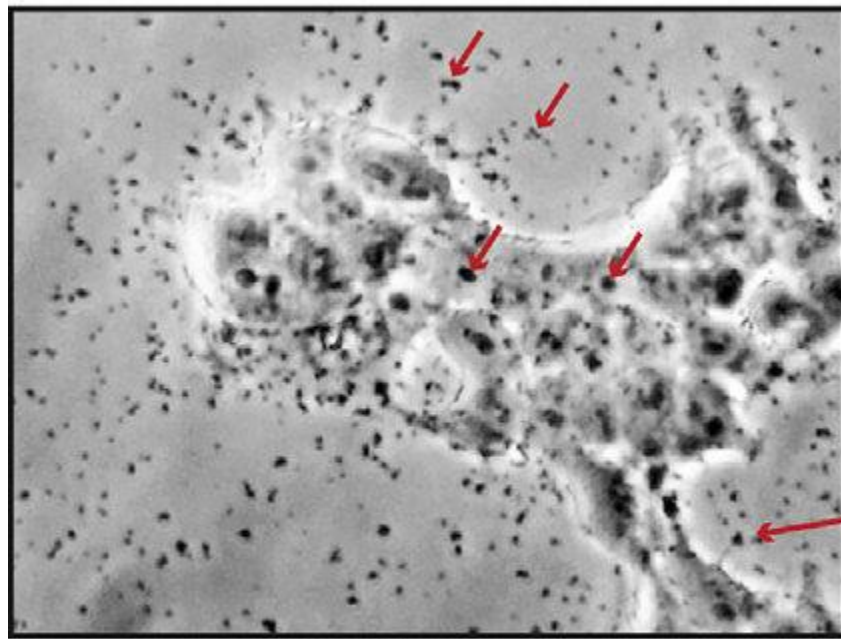
Proteins

Cytoplasm

Nucleus

Polyethylenimine (PEI) Transfection

Кальций-фосфатный метод — один из классических химических способов трансфекции, применяемый для введения ДНК в эукариотические клетки. Метод основан на образовании мелких кристаллов (осадка), состоящих из ДНК и фосфата кальция (CaPO_4). Эти комплексы адсорбируются на поверхности клетки и затем поглощаются эндоцитозом, доставляя ДНК внутрь. Метод был впервые описан в 1973 и остаётся одним из самых дешёвых и доступных способов доставки ДНК в клетки.



**Calcium phosphate/DNA
precipitates**

**293T cells
(Digital image)**

Принцип метода

Подготовка раствора ДНК и CaCl_2 .

Плазмидная ДНК растворяется в буфере с CaCl_2 .

Добавление фосфатного буфера.

При смешивании с фосфатным буфером образуется осадок фосфата кальция, в который включается ДНК.

Образование микрокристаллов.

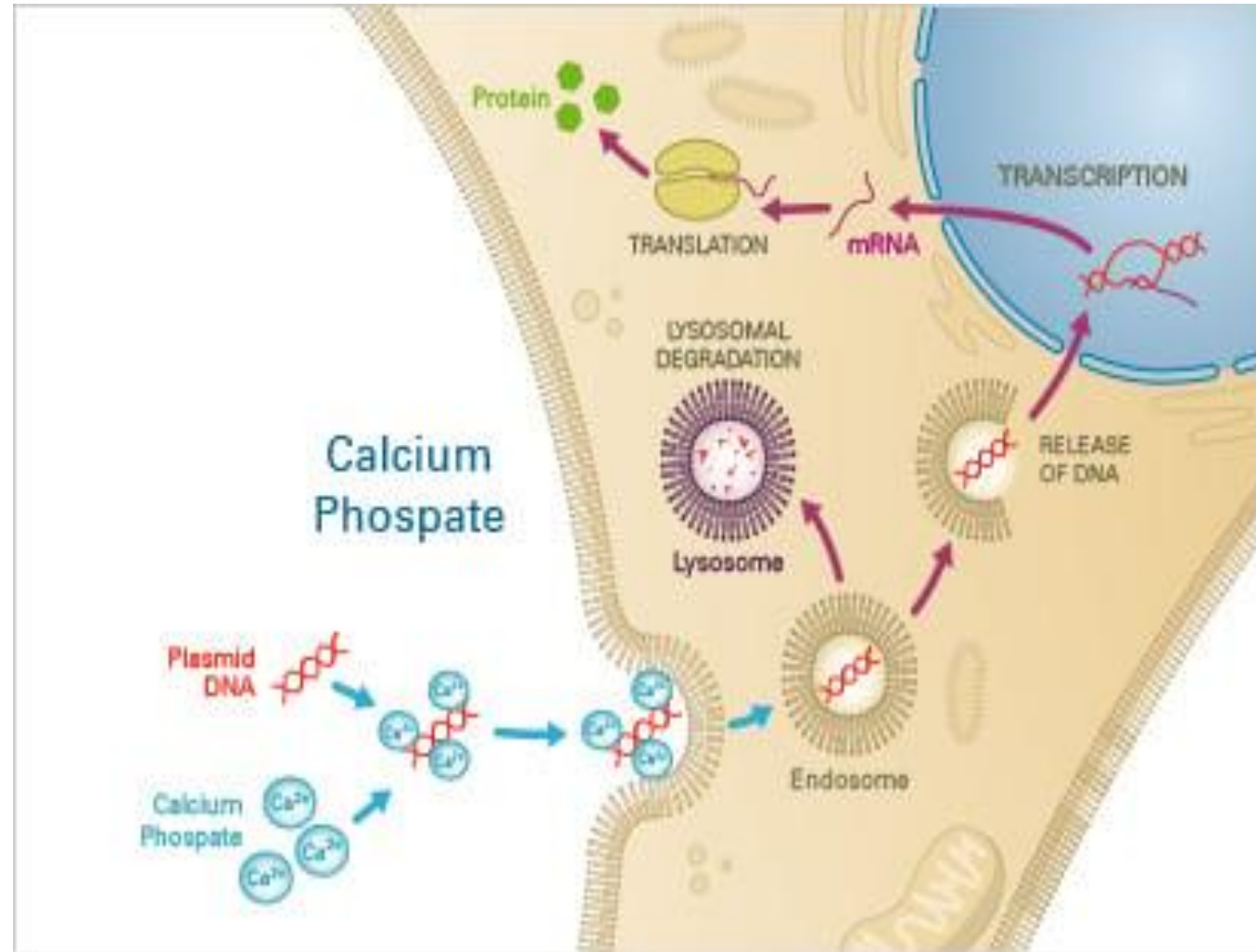
ДНК-осадок представляет собой наночастицы (100–300 нм), способные связываться с мембраной клетки.

Поглощение клетками.

Комплексы осаждаются на поверхности клеток и захватываются эндоцитозом.

Экспрессия введенного гена.

После выхода ДНК из эндосомы и попадания в ядро происходит транскрипция и экспрессия.



Сравнение химических методов трансфекции

Метод	Механизм	Преимущества	Недостатки
Липофекция	Липидные комплексы проникают через клеточную мембрану	Высокая эффективность, подходит для разных клеток	Возможная цитотоксичность, временная экспрессия
Полиэтиленимин (PEI)	Электростатическое связывание ДНК с полимером, эндоцитоз	Простота, низкая стоимость	Токсичен при высоких дозах
Кальций-фосфатный метод	Осаждение комплекса ДНК–CaPO ₄ , захватываемого клеткой	Дешёвый, доступный	Зависим от pH, не подходит для всех линий

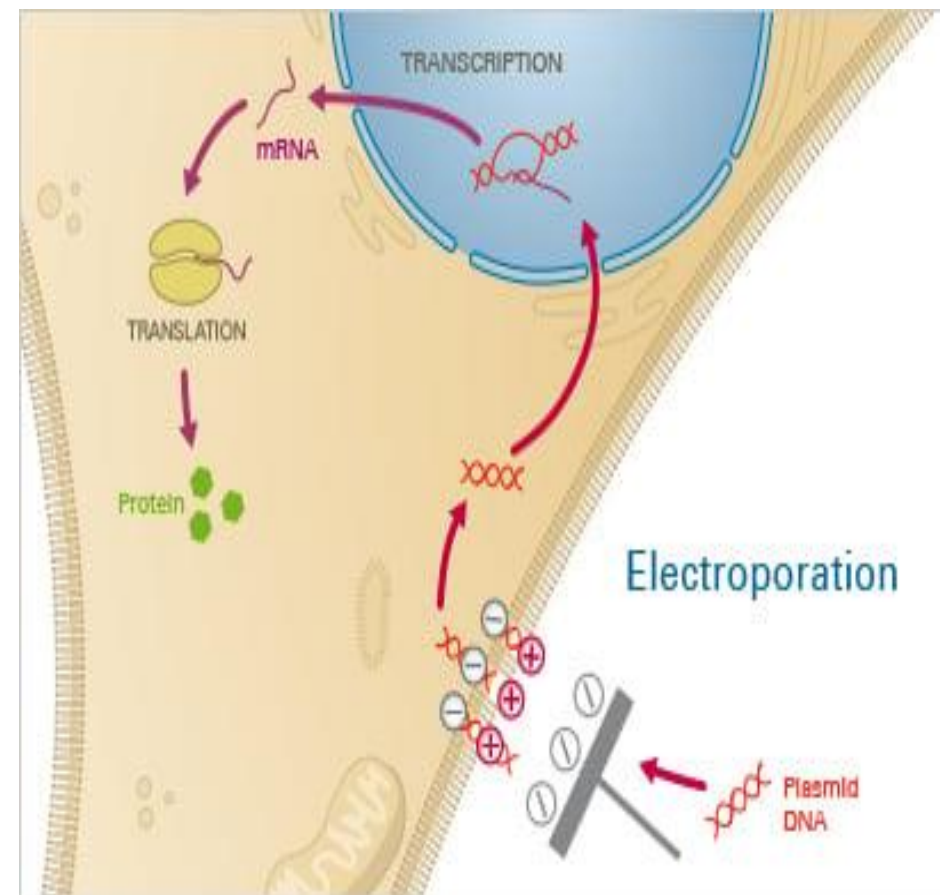
Физические методы

Электропорация — это физический метод трансфекции, при котором на клетки кратковременно воздействуют импульсом электрического поля высокой напряжённости.

Это приводит к временной перестройке липидного бислоя клеточной мембраны и образованию нанопор, через которые ДНК, РНК или белковые молекулы могут проникнуть внутрь клетки.

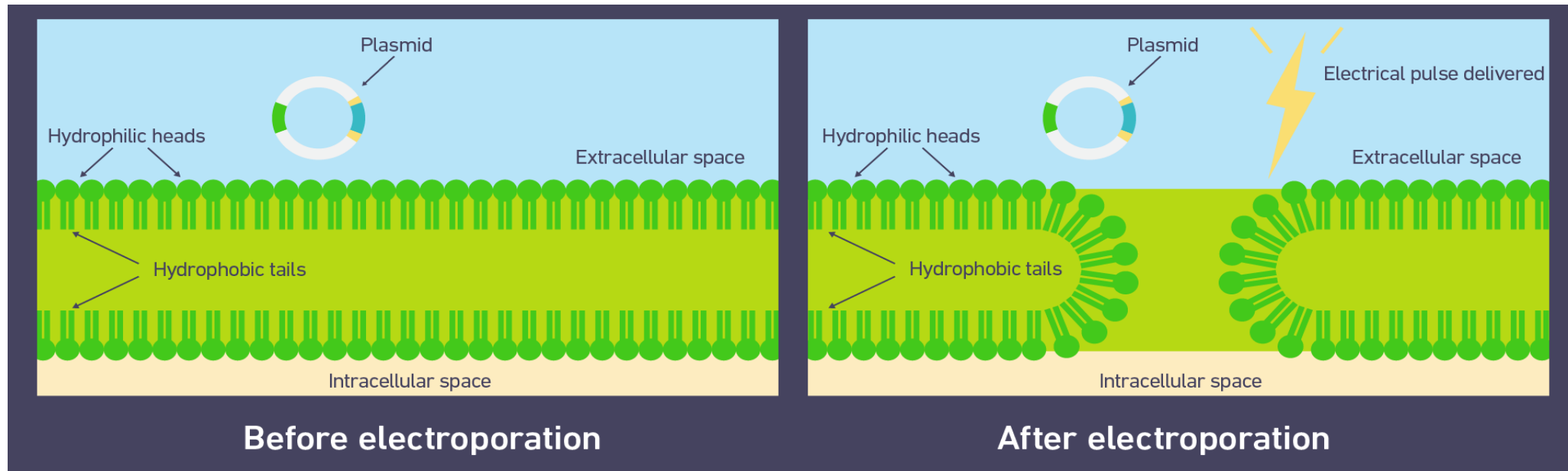
Метод универсален и применяется для:

- бактерий (введение плазмид),
- дрожжей,
- растительных и животных клеток,
- стволовых клеток,
- тканей и даже целых органов (in vivo электропорация).



Принцип действия

- **Приготовление клеточной суспензии** — клетки ресуспендируются в буфере с низкой электропроводностью (без солей).
- **Добавление нуклеиновой кислоты** — вносят плазмиду или РНК.
- **Воздействие электрическим импульсом** — высоковольтный разряд (обычно 100–2500 В/см) создаёт кратковременные поры в мембране.
- **Вход нуклеиновой кислоты** — под действием электрического поля молекулы проходят в цитоплазму через поры.
- **Восстановление мембраны** — после импульса клетка “заживает”, и введённый ген начинает экспрессироваться.



Микроинъекция — это физический метод доставки генетического материала, при котором ДНК, РНК или белковые молекулы непосредственно вводятся в цитоплазму или ядро клетки с помощью микропипетки.

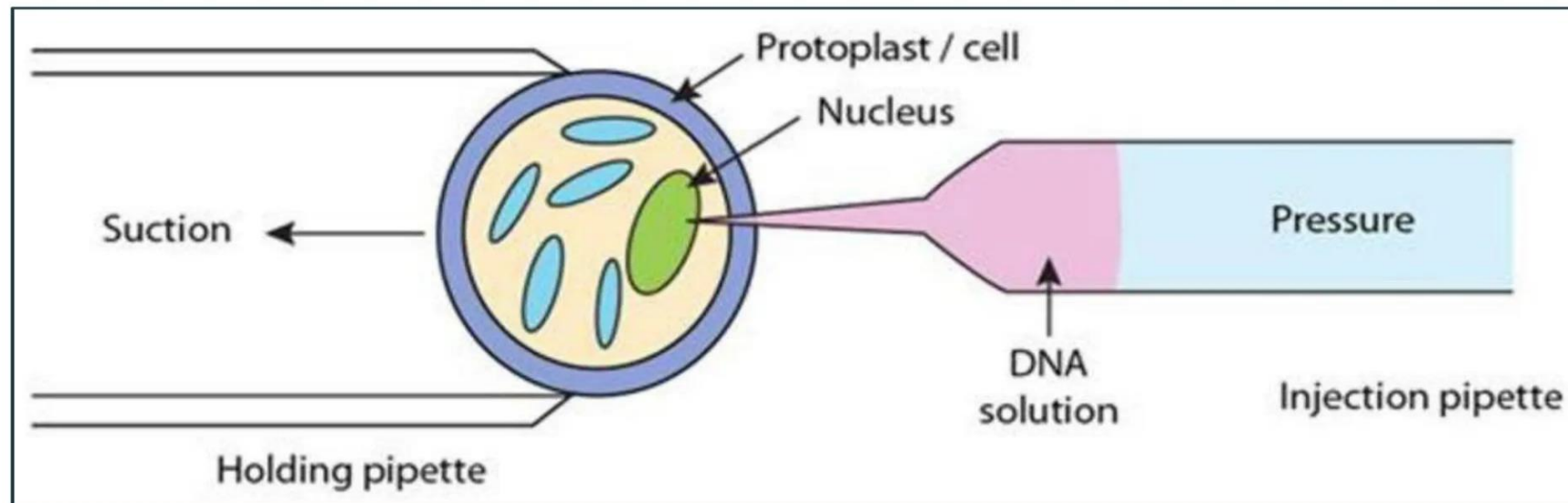
Микроинъекция широко используется в **фундаментальных и прикладных исследованиях**.

- **Создание трансгенных животных** — введение плазмид, генов или CRISPR-компонентов в зиготы и эмбрионы для получения потомства с заданными генетическими модификациями.
- **Исследования стволовых клеток и дифференцировки** — прямая доставка генов или РНК в первичные клетки позволяет изучать регуляцию развития и сигнальные пути.
- **Функциональный анализ генов** — с помощью микроинъекции можно вводить репортерные конструкции, siRNA, miRNA или мРНК для временной экспрессии или подавления генов.
- **Введение белков или ферментов** — метод позволяет доставлять функциональные белки внутрь клеток, минуя мембранные барьеры.
- **Разработка генной терапии и РНК-технологий** — микроинъекция используется в моделях для тестирования экспрессии терапевтических генов или доставки мРНК.

Принцип действия

1. Клетка фиксируется на микроскопическом держателе.
2. С помощью **микропипетки** под микроскопом аккуратно вводится ДНК или РНК.
3. После введения клетки восстанавливаются и продолжают жизнедеятельность, а введенный ген начинает экспрессию.

Основная особенность: **прямая доставка в ядро или цитоплазму**, минуя клеточную мембрану и эндоцитоз, что обеспечивает высокую эффективность.



MICROINJECTION METHOD OF TRANSFECTION

Биолистический метод (генная пушка) — это физический способ доставки генов, при котором ДНК или РНК закрепляют на микрочастицах (обычно золотых или вольфрамовых) и “выстреливают” в клетки или ткани с помощью сжатого газа.

- Биолистический метод широко используется в растительной биотехнологии, где трансформация с помощью *Agrobacterium* ограничена некоторыми видами растений. С его помощью создают трансгенные растения, вводят репортерные гены (GFP, GUS) для изучения экспрессии, исследуют функции промоторов и генетических элементов.
- В животных клетках и тканях биолистика позволяет доставлять плазмиды, мРНК, siRNA или белки в труднотрансфицируемые клетки, включая первичные клетки и клеточные культуры с низкой восприимчивостью к химическим методам.
- *Метод используется для:*
- Функционального анализа генов,
- Разработки вакцин и иммунотерапии, где доставка генов в ткани повышает экспрессию антигена,
- Создания моделей *in vitro* и *in vivo*, особенно при исследовании тканей, органоидов и эмбрионов.
- Таким образом, биолистика — это универсальный физический метод доставки генетического материала, особенно для систем, где химические и биологические методы малоприменимы.

Принцип действия

1. Подготовка микрочастиц —

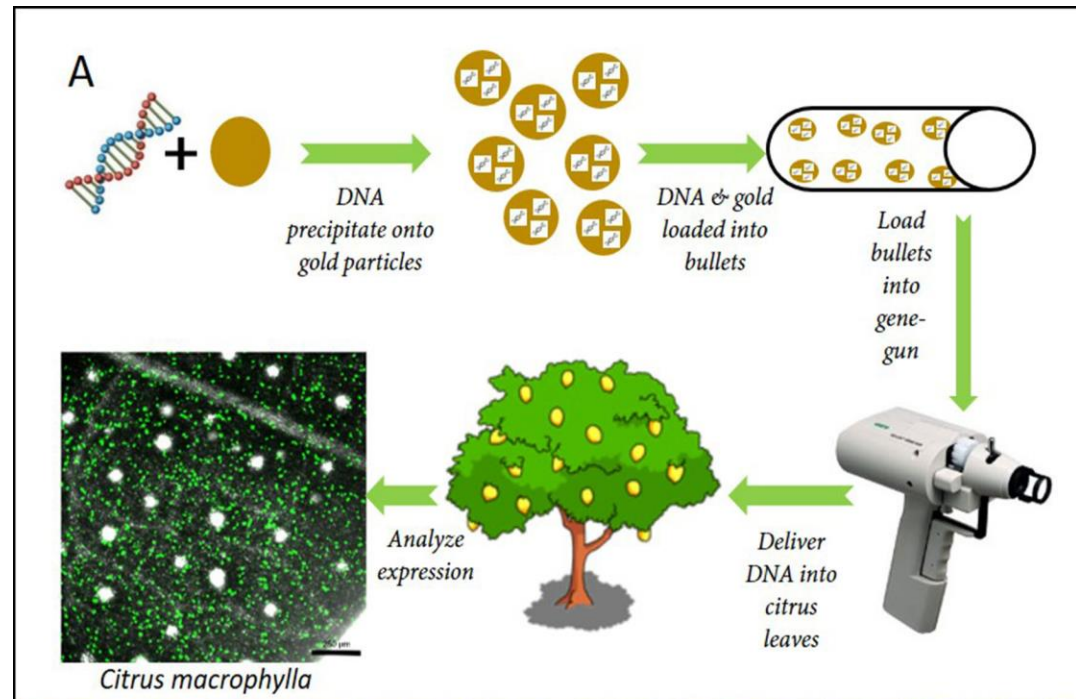
золото или вольфрам покрывают ДНК/РНК.

2. Загрузка в генератор — частицы помещают в специальный картридж или носитель.

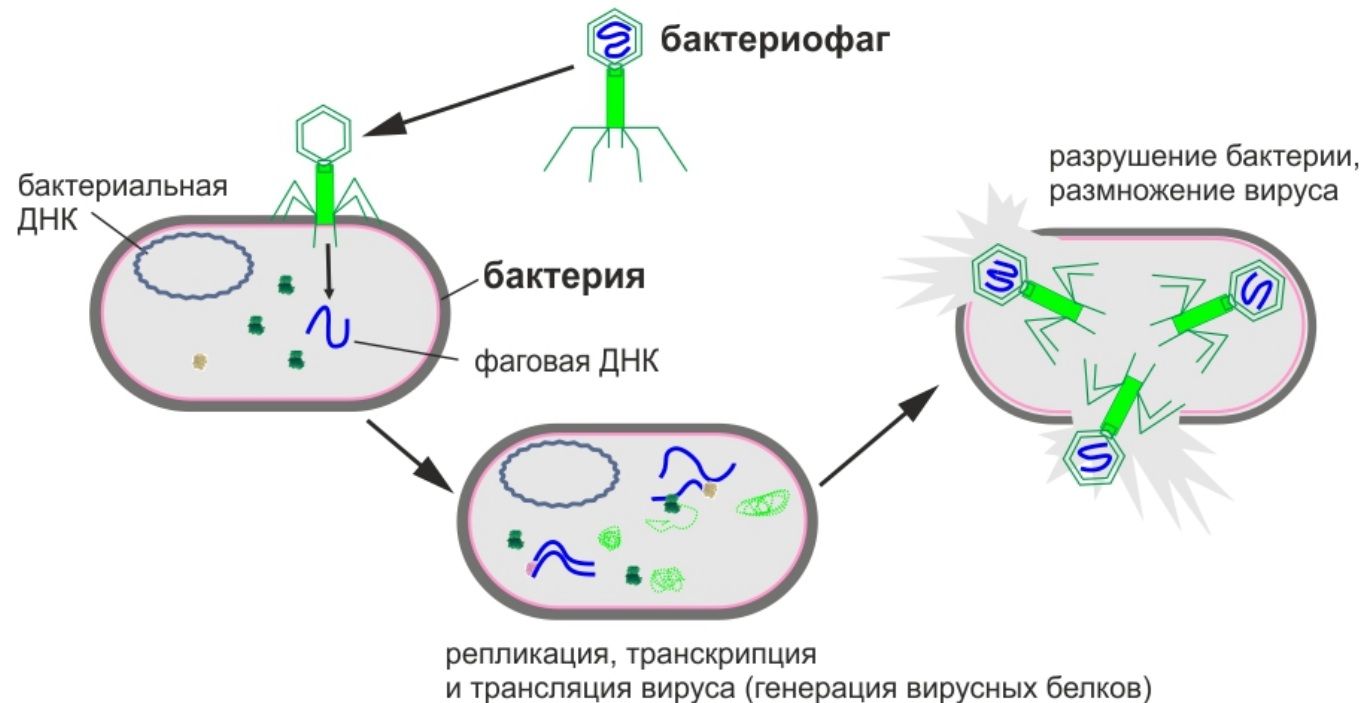
3. Выстрел в клетки — сжатый газ ускоряет частицы, которые проникают в клетки или ткани.

4. Экспрессия гена — введённая ДНК начинает экспрессию в цитоплазме или ядре, в зависимости от конструкции.

Особенность: метод мгновенно доставляет генетический материал внутрь клеток, минуя барьеры мембраны или клеточной стенки.

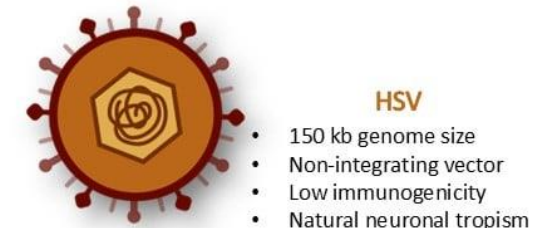
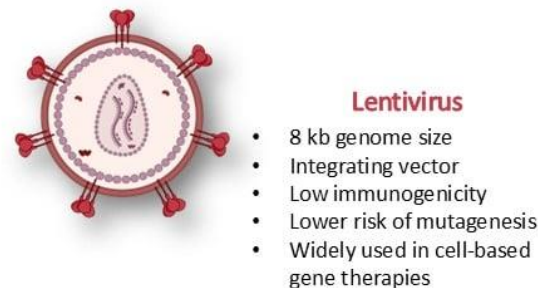
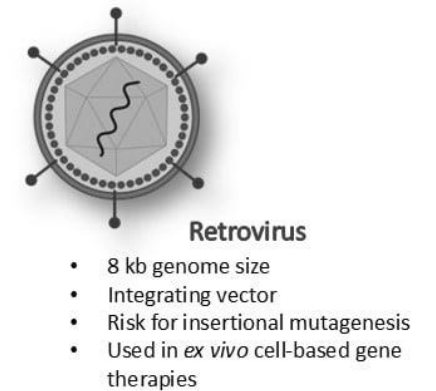
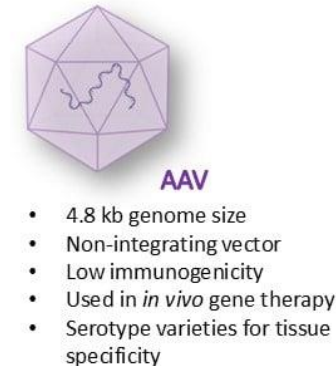
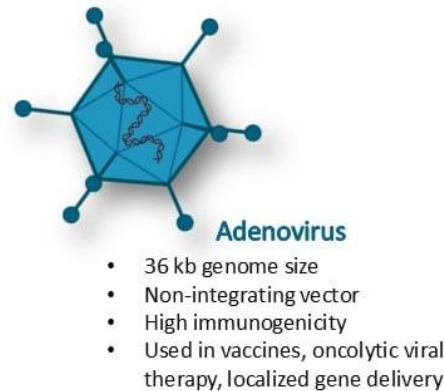
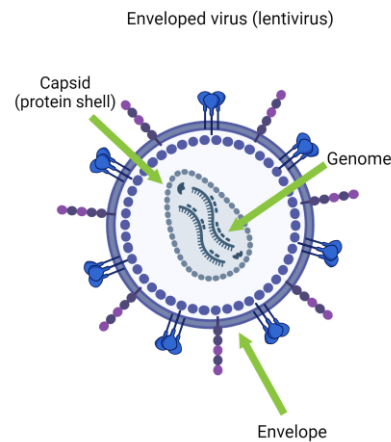
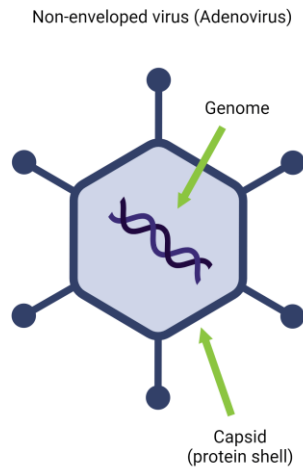


- **Трансдукция** — это процесс введения генетического материала в клетки с помощью вирусного вектора. Фактически это вирусная форма **трансфекции**.
- Ключевой этап этого процесса — упаковка переносимой ДНК в головку фага во время литической фазы его жизненного цикла, то есть когда клетка погибает, высвобождая наружу вирусные частицы. При сборке вирусных частиц в головку фага попадает его собственная ДНК, но изредка случаются ошибки, когда в головку фага попадают фрагменты бактериальной ДНК, которые могли образоваться, например, при вызванном фагом разрушении бактериальной хромосомы.
- Фаговые частицы, содержащие фрагменты бактериальной ДНК, называют **трансдуцирующими частицами**. Когда после прикрепления к клетке фаг впрыскивает в неё свою геномную ДНК, он впрыскивает и бактериальную ДНК, содержащуюся в его головке.



- **Вирусные векторы** — это биологические системы доставки генов, основанные на ослабленных или модифицированных вирусах, способных переносить генетический материал в клетки хозяина.
- *Основная идея:* вирусы сохраняют свою способность проникать в клетки, но лишены репликативной активности, что делает их безопасными для лабораторного и терапевтического применения.
- *Вирусные векторы* обеспечивают высокую эффективность доставки генов, особенно в клетках, которые трудно трансфицировать химическими или физическими методами.

Viral vectors in approved gene therapies



Тип вектора	Источник	Характеристика и применение
Аденовирусный (AdV)	Аденовирус человека	Высокая транзientная экспрессия; не интегрируется в геном; широко используется для вакцинации и временной экспрессии белков
Аденоассоциированный (AAV)	Аденоассоциированный вирус	Безопасный, низкая иммуногенность, стабильная экспрессия; применяется для генной терапии in vivo
Ленти- и ретровирусные векторы	Ретровирусы, HIV-1	Интегрируются в геном клетки, обеспечивая стабильную экспрессию; используются для создания устойчивых клеточных линий и CAR-T терапии
Вакцинные вирусные векторы (MVA, VSV)	Вакцины, вирус везикулярного стоматита	Используются для разработки вакцин и иммунотерапии; способны экспрессировать чужеродные антигены

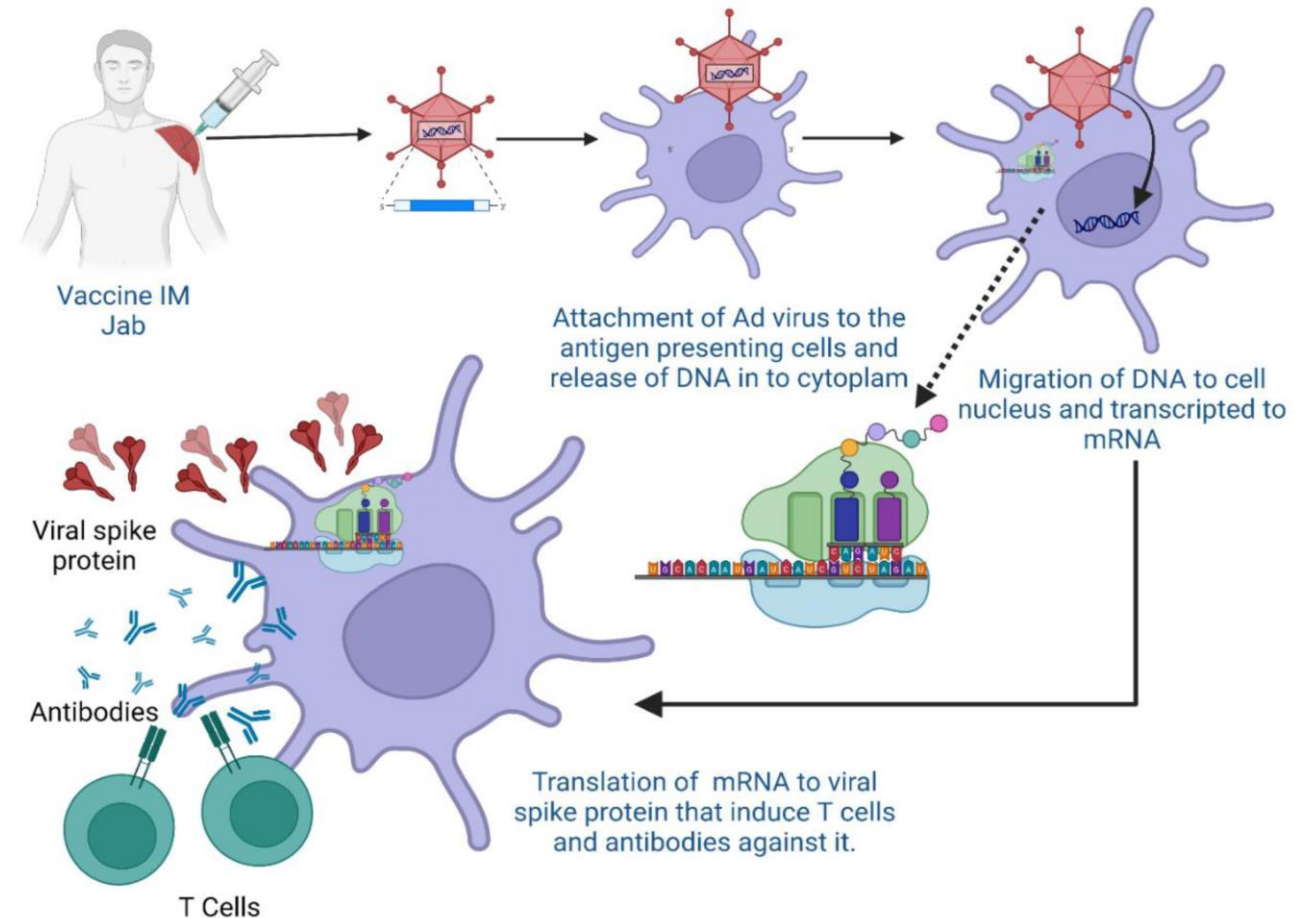
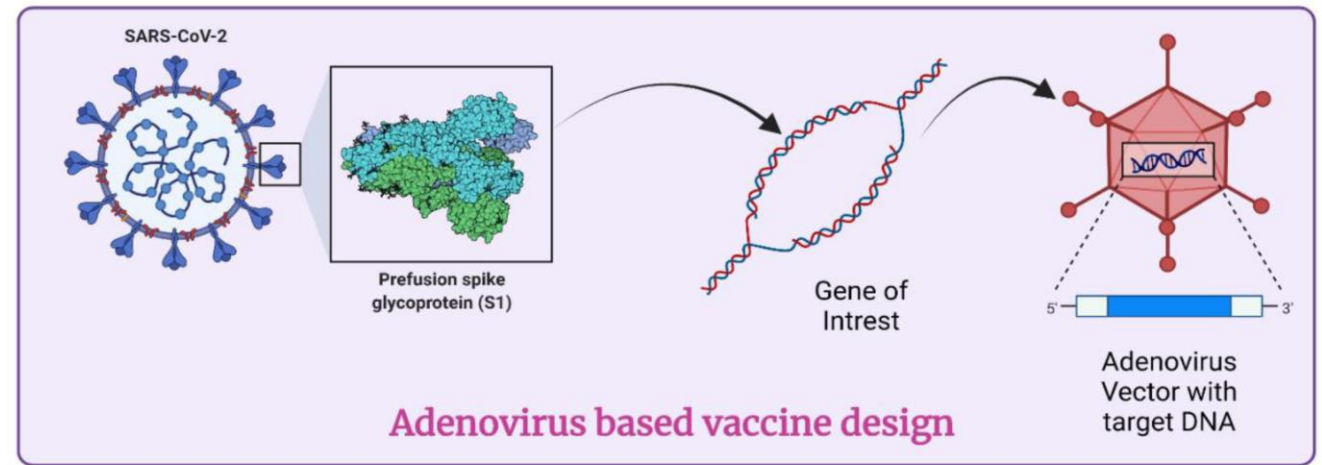
Вирусные векторы применяются как в научных исследованиях, так и в клинической практике.

- 1. Генная терапия** — введение функционального гена в клетки пациента для лечения наследственных заболеваний (например, AAV при гемофилии).
- 2. Создание стабильных клеточных линий** — лентивирусные векторы интегрируются в геном, позволяя длительную экспрессию белка или репортера.
- 3. Вакцины и иммунология** — векторные вакцины доставляют антигены вирусов или бактерий в клетки организма, стимулируя иммунный ответ (MVA, VSV).
- 4. CAR-T и иммунотерапия** — лентивирусные и ретровирусные векторы вводят рецепторы в Т-клетки для направленной атаки на опухолевые клетки.
- 5. Исследование регуляции генов** — вирусные векторы позволяют доставлять репортерные конструкции и модифицированные белки в труднодоступные клетки и ткани.

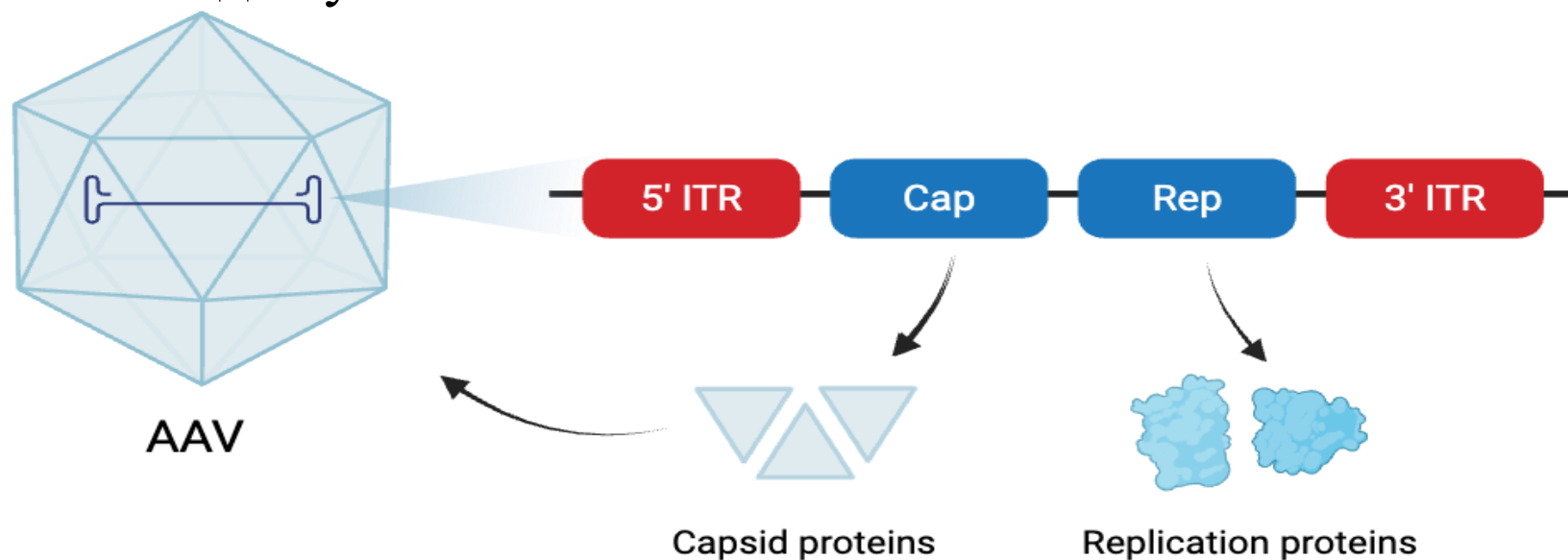
Аденовирусный вектор — это вирусная система доставки генов, основанная на модифицированных аденовирусах человека или животных, лишённых репликационной способности.

- Сохраняет способность вируса проникать в широкий спектр клеток (делящиеся и неделящиеся).
- Не интегрируется в геном хозяина, поэтому обеспечивает транзientную экспрессию генов.
- Используется в генной терапии, разработке вакцин, исследовании функции генов и создании репортерных систем.

Аденовирусы относятся к двухцепочечной ДНК-вирусам без оболочки, их геном легко модифицировать для вставки чужеродных генов.



- **Аденоассоциированные вирусы (ААВ)** — это небольшие безоболочечные вирусы, содержащие небольшой линейный одноцепочечный ДНК-геном (ssDNA). Безоболочечные вирусы не имеют липидного бислоя, окружающего вирусную частицу, и состоят только из белкового капсида и вирусного генетического материала внутри.
- Геном ААВ длиной около 4,7 кб состоит из двух открытых рамок считывания, Rep и Cap, фланкированных двумя инвертированными концевыми повторами (ITR) длиной 145 п.н. Регион Rep кодирует четыре неструктурных репликативных белка (Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40), которые участвуют в репликации генома и упаковке вируса. Регион Cap кодирует три структурных капсидных белка (VP1, VP2 и VP3), которые образуют икосаэдрический капсид вируса. Последовательности ITR служат точками начала репликации и сигналами для упаковки.



Исследователи модифицировали AAV дикого типа для создания рекомбинантных аденоассоциированных вирусных (rAAV) векторов для доставки генетического материала в клетки. Рекомбинантные конструкции AAV конструируются путем замены областей Rep и Cap между двумя ITR кассетой генной экспрессии, которая обычно содержит целевой трансген. Размер генетического материала, который может быть включен между ITR, ограничен физическим пространством внутри небольшого капсида AAV и напрямую коррелирует с размером ДНК, удаленной из вирусного генома (~4,7 кб). Для получения вектора rAAV области Rep и Cap поставляются в *транс-положении* с помощью другой плазмиды.

- Для создания векторов rAAV необходимы три плазмиды:
- **Транспортная плазмида** (также известная как цис-плазмида) — содержащая интересующий трансген между двумя ITR.
- **Упаковочная плазмида** (также известная как плазмида Rep/Cap) — содержащая области Rep и Cap, необходимые для производства и сборки вирусных капсидов.
- **Хелперная плазмида** — содержит гены аденовируса, отсутствующие в геноме AAV и необходимые для репликации вируса (E4, E2a и VA). Иногда они объединены в упаковочной плазмиде.

Transfer plasmid



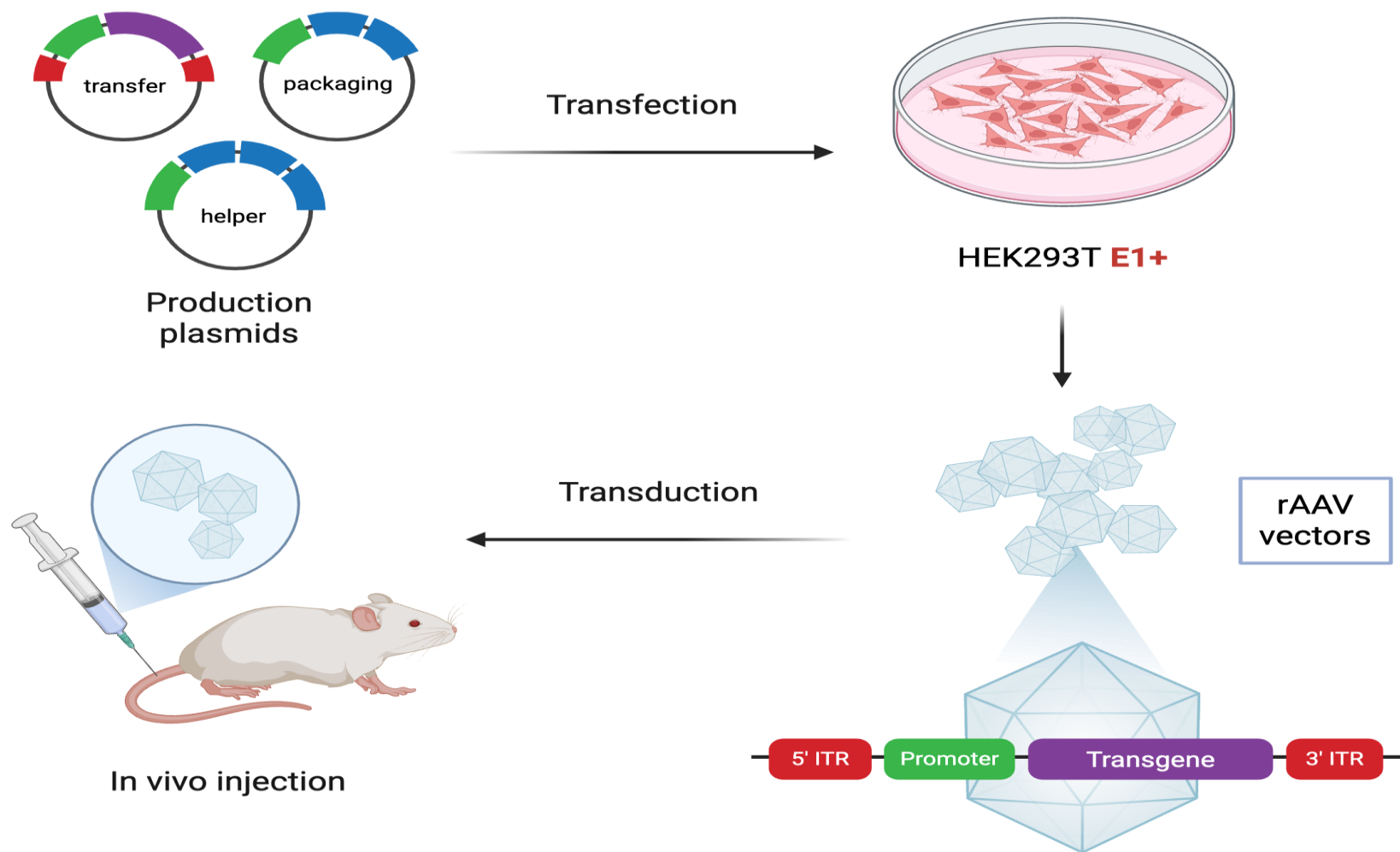
Packaging plasmid



Helper plasmid



Плазмиды, необходимые для производства вектора rAAV.



Обзор процесса создания вектора rAAV

ПРИМЕНЕНИЕ AAV

Генная терапия наследственных заболеваний

- *Luxturna*: доставка гена RPE65 при наследственной слепоте (Leber congenital amaurosis).
- *Zolgensma*: лечение спинальной мышечной атрофии (SMA) путем доставки копии SMN1 гена.

Исследования нейронауки

- Введение гена репортера (GFP, RFP) в нейроны для изучения нейронных цепей и сигнализации.

Кардиология и гепатология

- Доставка генов для стимулирования регенерации сердечной мышцы или коррективки метаболических функций печени.

Создание моделей животных

- Введение мутантных генов in vivo для моделирования наследственных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

- 1) Грин Р., Стаут Дж., Тейлор Д. Биология (в 3-х томах). Перевод с англ. под редакцией Р. Г. Бузаева. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013.
- 2) Сингер М., Берг П. Гены и геномы. В 2-х томах. Москва: Мир, 1998.
- 3) Егорова Т. А., Клунова С. М., Живухин С. В. Основы биотехнологии. Москва: Academia, 22013. Учебник рассматривает практические аспекты биотехнологии, включая методы культивирования клеток-реципиентов и конкретные физические и химические методы трансфекции (например, электропорация и липофекция), а также основы применения вирусных векторов для доставки генов.
- 4) Кульбак С. И. Генная терапия: Введение в биотехнологию. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011.
- 5) Самбрук Дж., Фрич Э., Маниатис Т. Молекулярное клонирование: Анализ ДНК. В 3-х томах. 2-е издание. Москва: Мир, 1989.