



ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ  
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ  
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА КАФЕДРАСЫ

## ДӘРІС 9. ЖАНУАРЛАР ГЕНДІК ИНЖЕНЕРИЯСЫ

Лектор: PhD, қауымдастырылған  
профессор Тайпақова С.М.

## **Жоспар:**

- **Трансгенді жануарларды алу**
- **Трансгенді жануарларды алу үшін қолданылатын әдістер**
- **Реторовирустық векторлар**
- **Микроинъекция әдісімен трансгенді жануар алу**
- **Модификацияланған бағаналы клеткаларды пайдалану**
- **Ядроны алмастыру әдісімен трансгенді жануарлар алу**

# Жаңа қасиетке ие трансгенді жануарларды алу

**Трансгенді немесе трансформацияланған ағзалар** деп –геномында бөтен ген бар ағзаларды айтады. Трансгенді жануарлар алу *трансгеноз* әдісі арқылы іске асады.

**Трансгеноз дегеніміз** – генді бір биологиялық жүйеден басқа жүйеге жаңа белгілері бар организмнің формасын алу үшін жасанды жолмен тасымалдауды айтамыз. Трансгенді ағзалар әр түрлі биологиялық активті биотехнологиялық заттарды синтездеу және бағалы белгілері бар жануарлардың жаңа тұқымдарын алу үшін қолданылады. Трансгеноз әдісімен бөтен генді эукариоттық жыныс клеткаға енгізіп, оның жұмысын бақылау арқылы генетикалық инженерияның көптеген мәселелерін айқындауға болады, өйткені мұнда трансгенді эмбрионның жатырдағы даму ерекшеліктерін зерттеу мүмкін болады.

**Тасымалданған гендер (трансгендер)** генетикалық аппаратымен құрылымды ірі функциялы байланысқандықтан бұл процесс жағдайындағы генетикалық рекомбинацияға әкеледі.

## *Трансгенді жануарларды алу үшін қолданылатын әдістер:*

- 1. Вектор ретінде реторовирустарды қолдану*
- 2. Микроинъекция*
- 3. Модификацияланған бағаналы клеткаларды пайдалану*
- 4. Ядроны алмастыру*



- Трансгендерді енгізу арқылы көпжасушалы организмдердің генетикалық модификациясы бойынша тәжірибелер көп уақытты алады. Дегенмен, трансгенезис екі негізгі зерттеудің қуатты құралына айналды:
- • сүтқоректілердің гендерінің экспрессиясының молекулалық негіздерін және олардың дамуын **іргелі зерттеу**;
- • адамның ауруларын зерттеуге және **қолданбалы мақсатта жіті зерттеуге** мүмкіндік беретін модельдік жүйелерді құру:
- • өнімділігін арттыруды ынталандыратын гендерді енгізу үшін; бұл жағдайда трансфекцияланған жануарлар аз тамақтанумен тез өседі. жем сіңімділігін бірнеше пайызға ғана арттыру арқылы түпкілікті өнімнің (сиыр, шошқа еті және т.б.) өзіндік құнын едәуір төмендетуі мүмкін.
- • сонымен қатар сүтпен дәрі үшін маңызды ақуыздарды алу үшін жануарлардың сүт бездерінің жасушаларын генетикалық түрлендіру үшін.

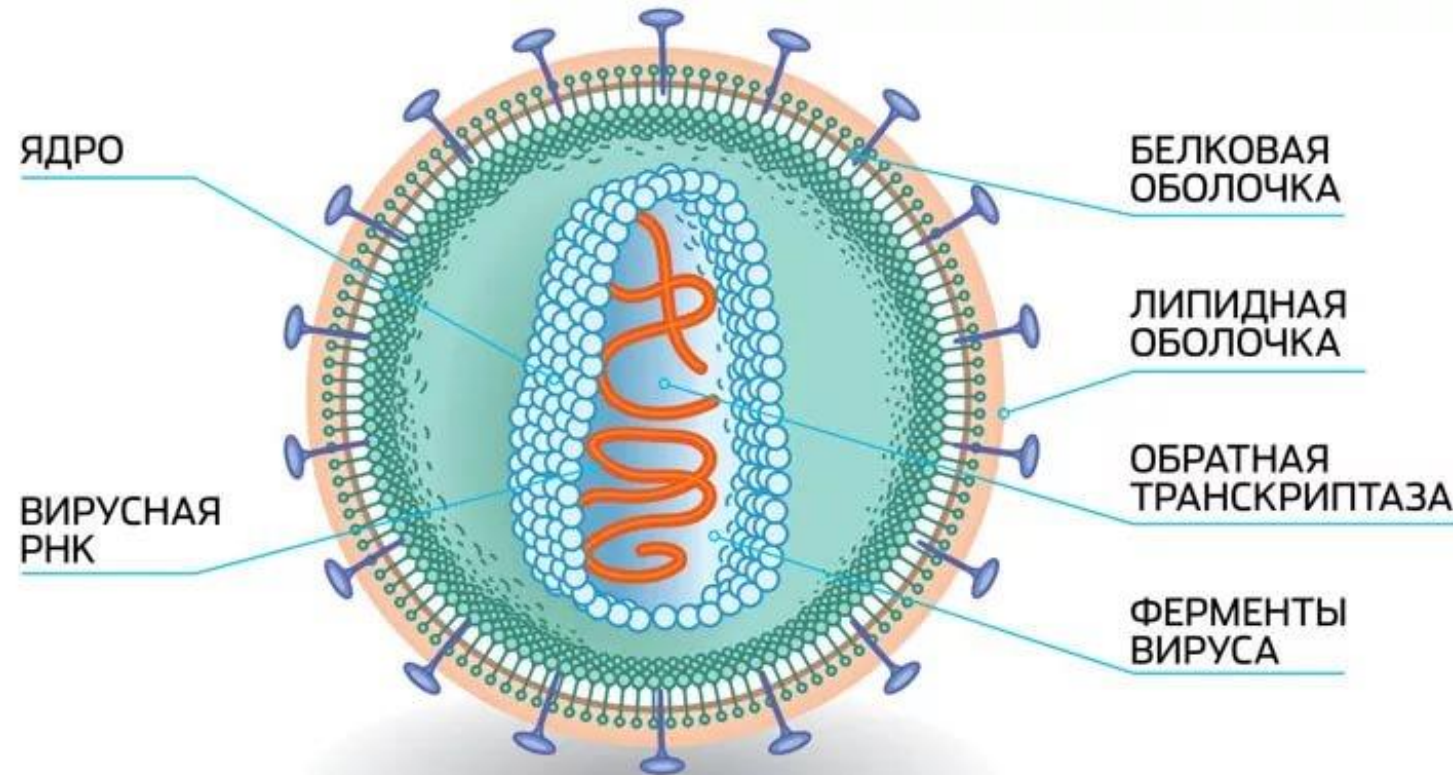
# 1. Вектор ретінде реторовирустарды қолдану

Жануарларда ген тасымалдаушы вектор ретінде вирустарды пайдалануға болады. Әдетте олар ауру тудыратын вирустар, әсіресе рак вирустары. Ондай вирустар кері транскриптаза ферменті арқылы өзінің РНҚ көшірмесін ДНҚ түрінде синтездеп, оны жануар клеткасының ДНҚ молекуласының құрамына еңгізеді. Олардың вектор ретінде пайдаланылуы осыған негізделген.

Тасымалдау барысында вирустар ауру тудырмас үшін алдын ала олардың нуклеин қышқылдарының кейбір бөлігін өзгертеді, сонда олар тек ген тасушы болып қалады. Дегенмен ондай вирусты сирек пайдаланған жөн.

**Ретровирустар**- Retroviridae тұқымдастығына кіретін 150-дей түрлерді қамтитын, ісік туғызатын вирустар.

Түрі-диаметрі 100-140 нм сфера тәрізді, Липопротеид қабықпен қапталған. Сыртқы қабаты-2 гликопротеидтен (Gp 120, Gp 41) қалыптасады – иммунды клеткаларын тіркелу әрекетін атқарады. Ішкі қабаты-белок р.17-ден құрылған –клетка орталығын тығыз қоршайды.Орталығында РНК-ның 2 молекуласынан қалыптасқан вирустың геномы орналасады.РНК-мен қатар – кері транскриптаза (ревертаза) протеаза, интеграза деген ферменттері де орын тапқан.



*Геномы (+) РНҚ-ның екі жіпшесінен тұрады, құрамында 7900-9800 нуклеотидтік қосақтар және вирустық үш фермент (кері транскриптаза, протеаза және интеграз) бар. Вирус геномы негізгі 3 құрылымдық геномдерден (*gag, pol, env*), 7 реттегіш және функционалдық гендерден (*tat, rev, nef, vif, vpr, vpu, vpx*) тұрады.*

- **LTR**- *long terminal repeats*-транскрипцияның инициациясы мен терминациясын қамтамасыз етеді
- **Φ**- белоктық капсидке қапталуын қамтамасыз ететін бірізділік
- Ген ***gag*** (*ағыл: group antigen-топтық антиген*) – матриктік , капсидтік, нуклеокапсидтік және протеазалық ақуыздарды кодтайды.
- Ген ***pol*** (*ағыл: polymerase- полимераза*)- кері транскриптазаны, протеазаны, РНҚ-азаны, интегразаны кодтайды.
- Ген ***env*** (*ағыл: envelope- қабықша*) – беткейлік gp-120 және трансмембраналық gp-41 ақуыздарды кодтайды.
- Реттеуші гендер (*rev, tat, nef*) және репродукциялық үрдісін жүргізуді және вирустың инфекциялық процесіне қатысуын қамтамасыз етеді (*vif, vpr, vpx*).
- Ген ***tat***- транскрипциялануды белсендіруші, ол құрылымдық, және де реттегіш ақуыздардың транскрипциялану жылдамдығын бірнеше есе күшейтеді.
- Ген ***rev***- вирустық ақуыздардың экспрессиясын реттейді, құрылымдық ақуыздардың (*gag, pol, env*) синтезделуін іске асырады.
- Ген ***nef***- экспрессияға кері әсер ететін фактор, вирус экспрессиясын азайтуға және инфекциялы латентті жағдайға ауыстыруға қабілетті, ген-*vpu*-мен бірге инфицирленген жасушалардың – Т- лимфоциттердің беткейіндегі CD-4 рецепторлардың санын азайтады.
- Ген ***vpu***- вирус жұққан жасушадан вирус бөлшектерінің трансмембраналық экспортын (бүршіктенуін) күшейтеді.
- Ген ***vif***- вирустың инфекциялық (жұқпалық ) факторы, бос вириондардың көрші жасушаларды инфицирлеу қабілеттілігін күшейтеді.
- Ген ***vpr***- ревертазаны реттейді, РНҚ және ДНҚ құрылымын тұрақтандырады, ДНҚ-н жасуша ядросына тасымалдайды және де вирустың макрофагпен өзара әректесуі үшін маңызы бар деген болжамдар айтылған.
- Ген ***vpx***- жасушалардың онкогендік трансформациялануына жауапты.



**Ревертаза** — кері транскриптаза. Кері транскрипция (яғни РНҚ негізінде ДНҚ түзу) жүргізетін фермент. Өте сирек фермент, ол тек ретровирустардың құрамында табылған. Трансферазалар тобына жатады. Оның әсерінен ең алдымен РНҚ —ДНҚ буданы пайда болады, одан соң ДНҚ-полимеразасының катынасуымен ДНҚ түзіледі, ол тізбек екі есе көбейеді, жаңадан пайда болған ДНҚ тізбегі клетка геномының құрамына провирус түрінде кіреді. Ревертаза мультифункционалды фермент, ДНҚ-полимеразалық қасиеттен басқа ол интегразалық (провирус ДНҚ клетка геномына енгізу) және эндонуклеазалық белсенділікке (керексіз болып қалған РНҚ-ын ыдырату) ие.



Рис. 22.4. Обратная транскрипция

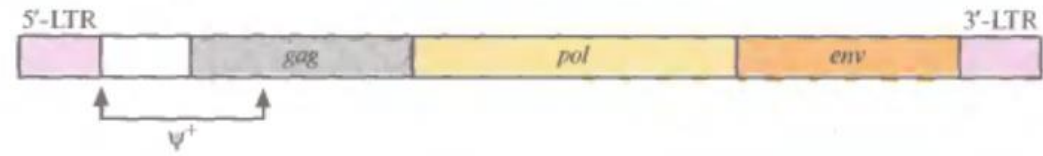
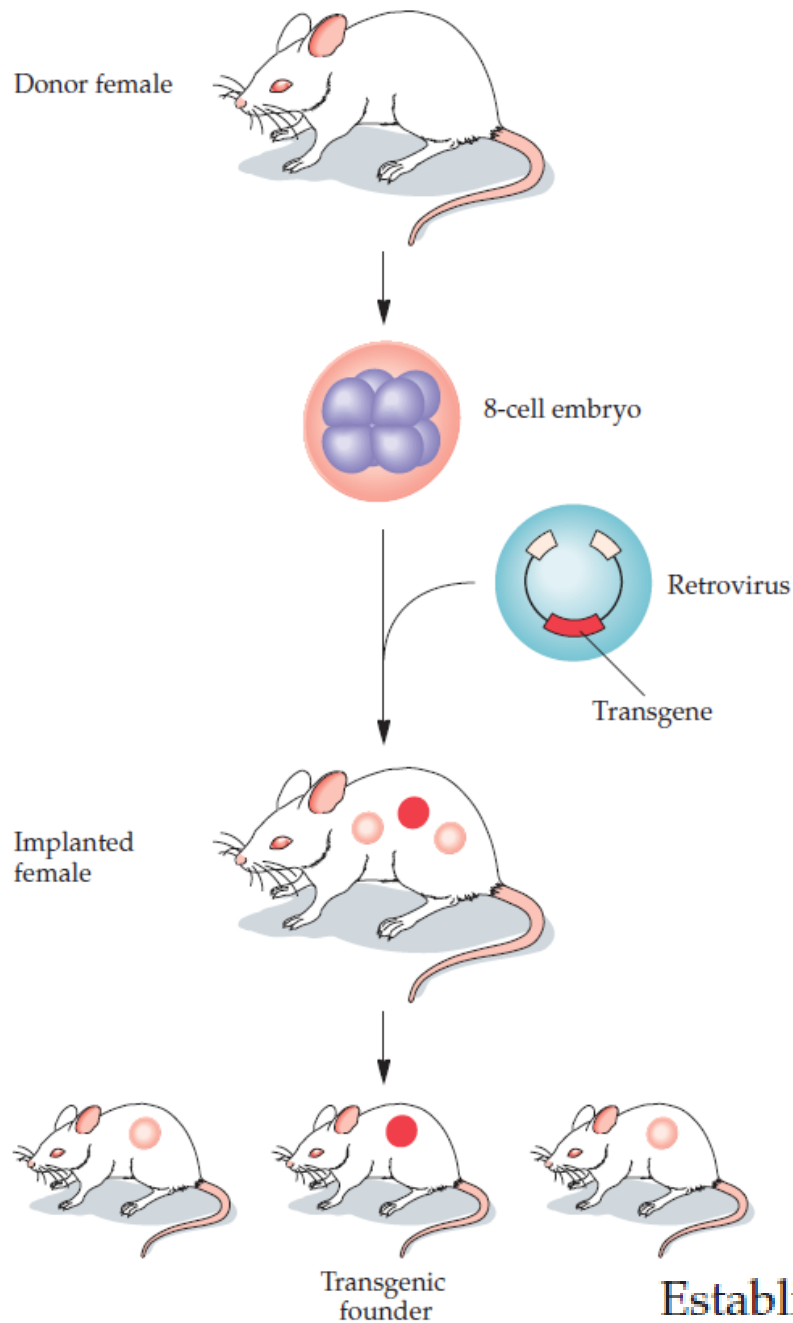
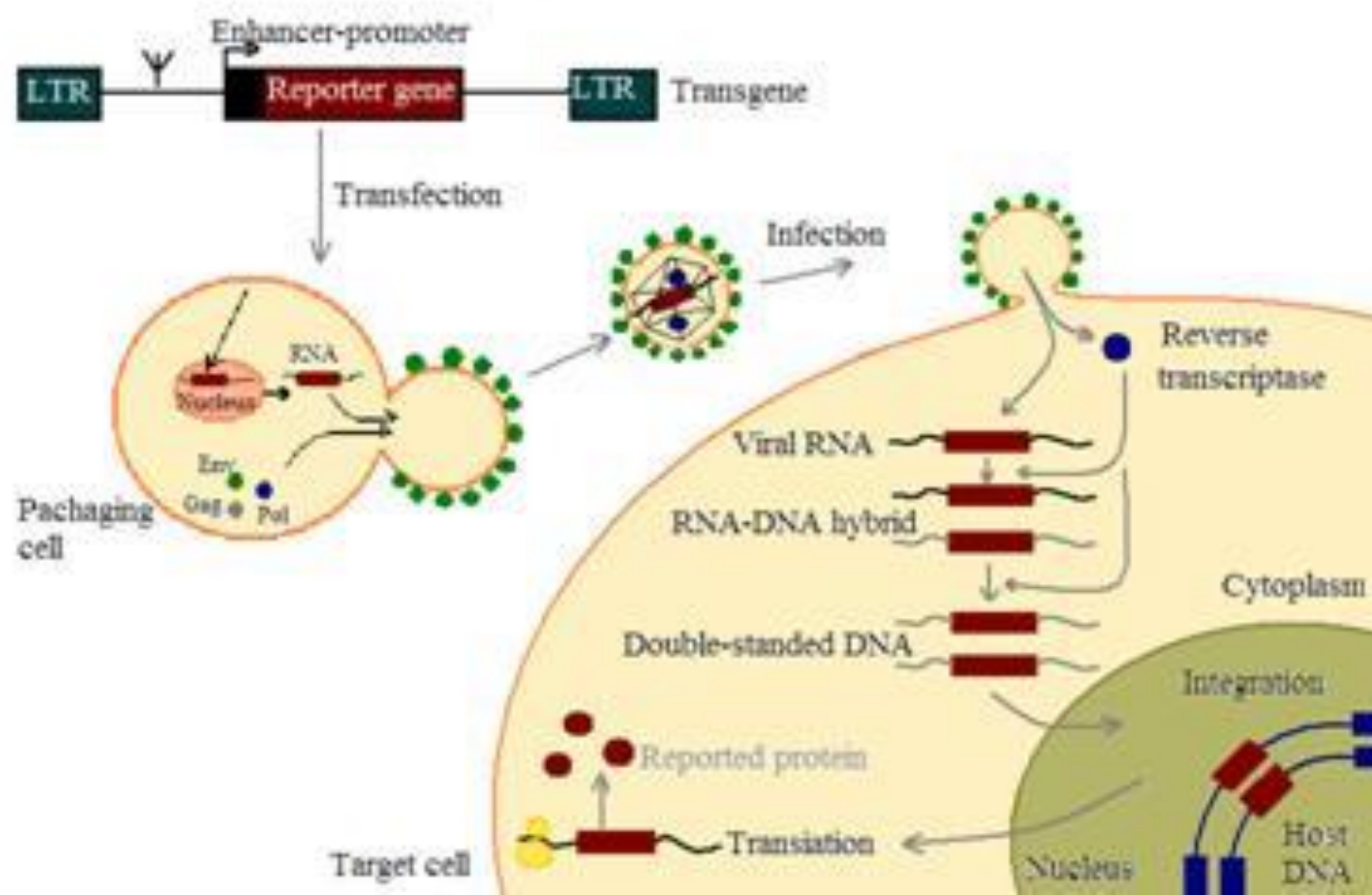


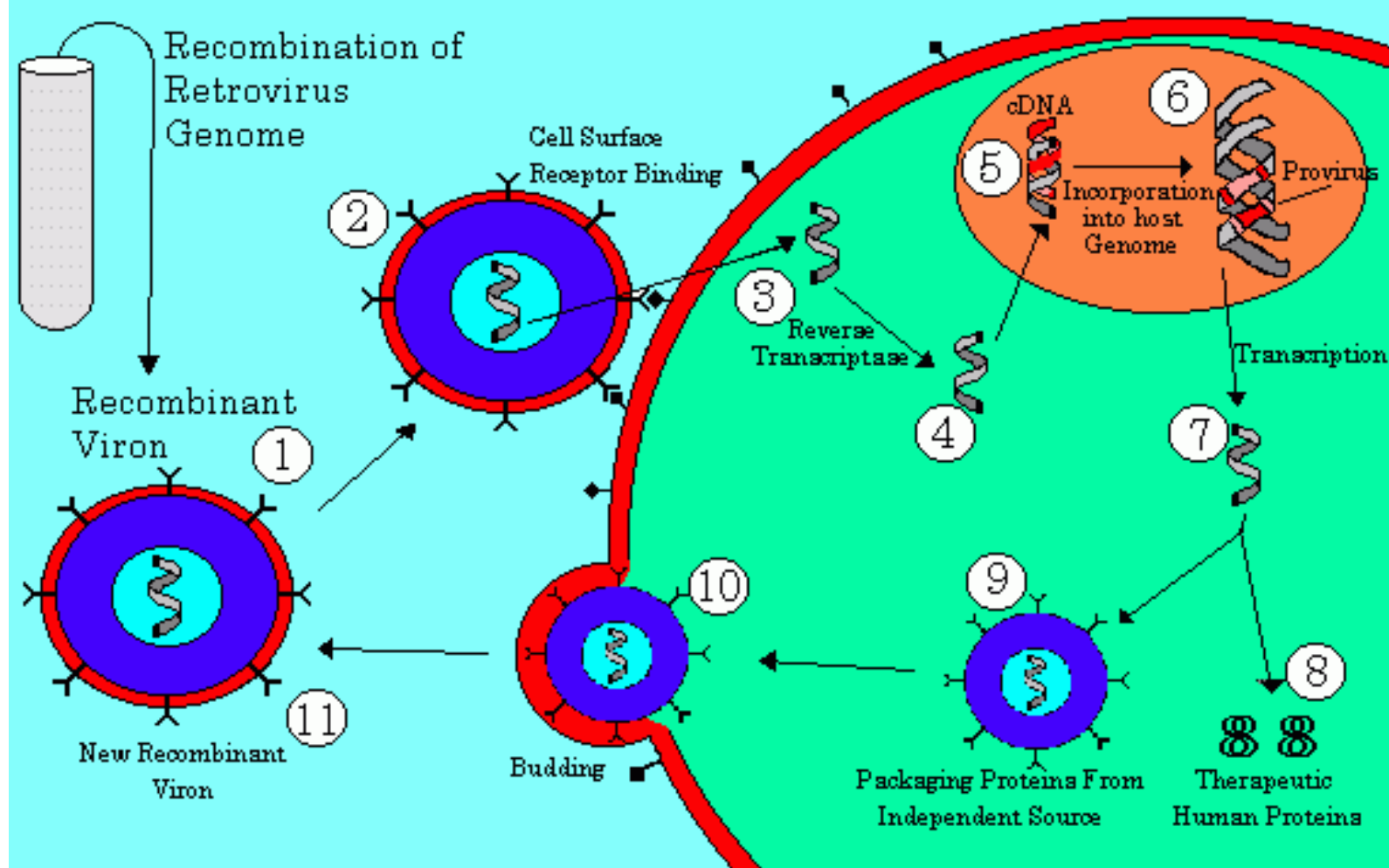
Рис. 21.2. Генетическая карта типичного ретровируса.  $\psi^+$  – последовательность, ответственная за упаковку, *gag*, *pol* и *env* – области, кодирующие соответственно белок капсида, белок, обладающий активностью обратной транскриптазы и интегразы, и белок оболочки. 5'-LTR содержит сигналы инициации транскрипции, причем весь геном транскрибируется как одна молекула РНК. 3'-LTR содержит сигнал полиаденилирования.



Рис. 21.3. Генетическая карта ретровирусного вектора, несущего два гена. Транскрипция «терапевтического» гена (Ген X) контролируется 5'-LTR-промотором, транскрипция селективного маркерного гена (Neo<sup>r</sup>) – внутренним промотором (*p*). 3'-LTR содержит сигнал полиаденилирования.  $\psi^+$  – последовательность, ответственная за упаковку.

Establishing transgenic mice with retroviral vectors.





Ескерту. Қажетті гендері бар сусызданған РНҚ-вирустар (ретровирустар) ревертаза гендерімен бірге (сызбанұсқада – 1) клеткаға бағытталған. Клетка рецепторлар көмегімен вирустың қабатын таныған кейін (2), вирус клеткаға РНҚ ендіреді (3). Клеткада РНҚ ревертаза көмегімен ДНҚ ауыстырылады (4) және соматикалық клетканың ядросына енеді (5). Онда қажетті гендер мен кейбір вирустық гендерді тасымалдайтын бөгде ДНҚ синтезделінеді және клетканың өз ДНҚ қиыстырылып интеграцияланады (6). Әрі қарай клетка бөлінген жағдайда жаңартылған геномның көшірмесін жасайды, мРНҚ (7), қажетті терапиялық нәруыздарды (8) түзеді. Репликацияланған вирустық РНҚ капсидпен қапталады (9) және басқа клеткаларды жұқтырады (10)

## **Ретровирустық векторларды қолдану артықшылықтары:**

- Патогенді емес;
- Қожайын клетка геномына интегрирленеді;
- Жұмыс істеу оңай, манипуляция жүргізу қарапайым болып келеді;
- Биологиясы жақсы зерттелген.

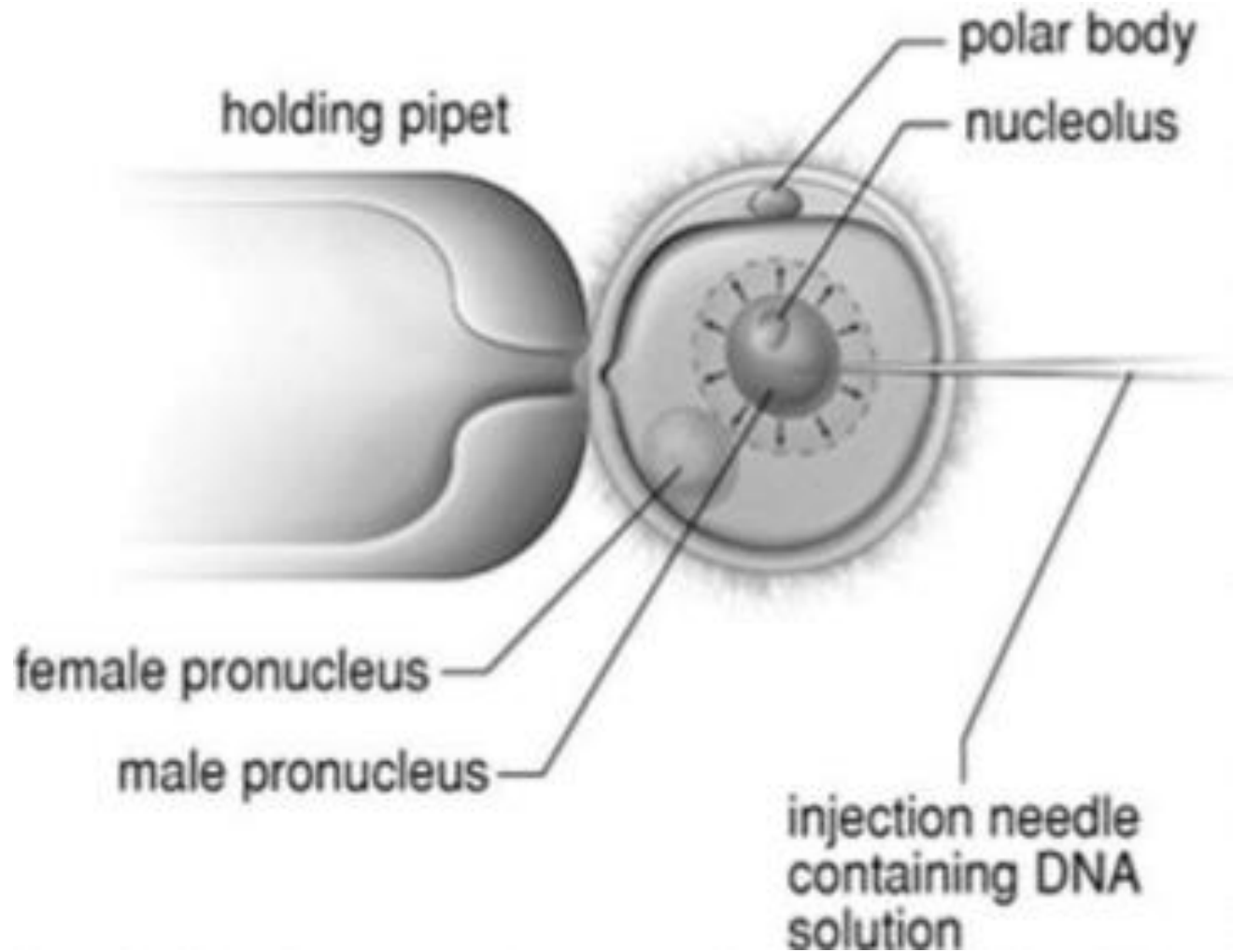
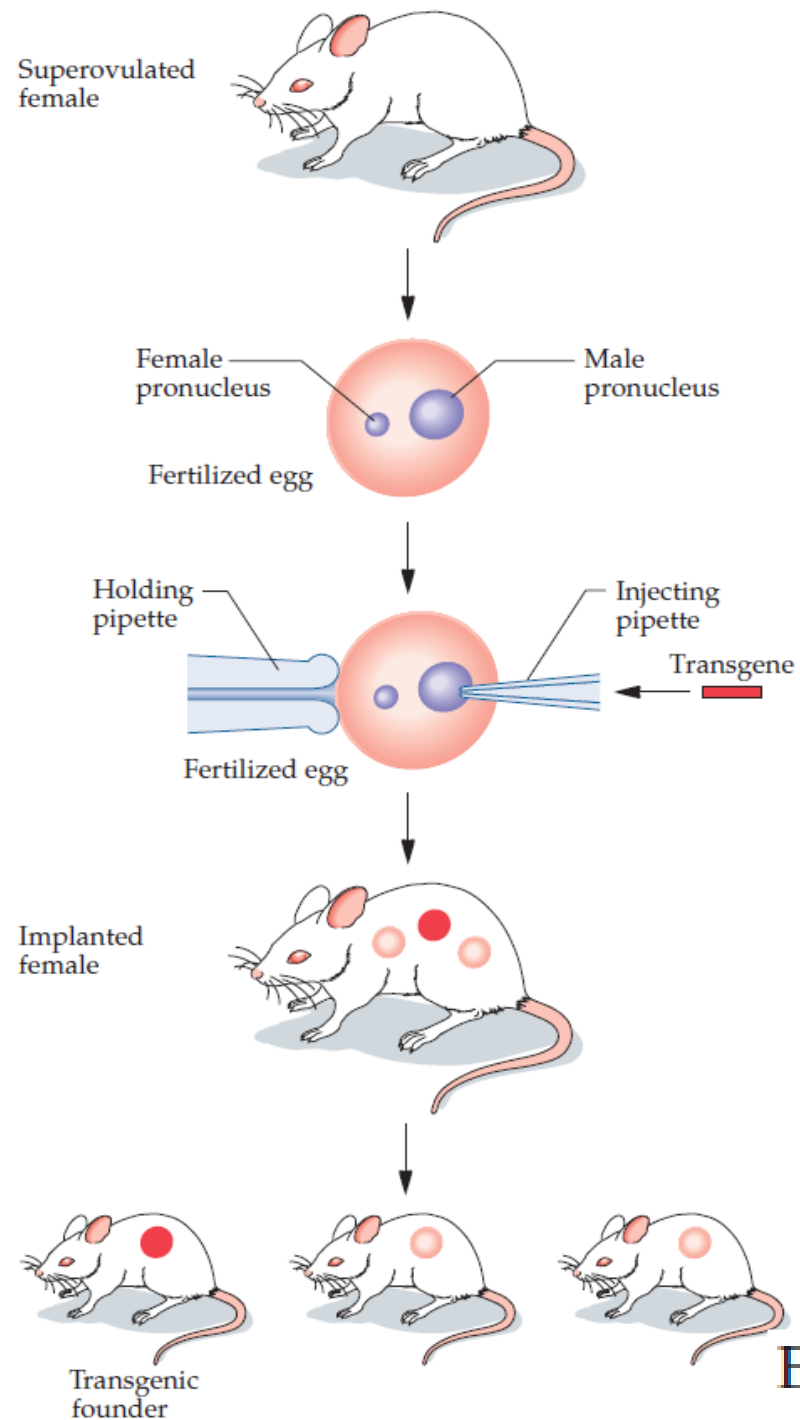
## **Кемшілігі:**

- Вирустық титры төмен;
- Трансгенді енгізу сыйымдылығы шектеулі болып келеді: шамамен алғанда 8 мың жұп нуклеотид;
- Бөлінбейтін клеткаларды зақымдамайды (инфекцияламайды);
- In vivo жағдайында терапиялық мақсатта қолдануға қолайсыз;
- Гендердің экспрессиялануы ұзаққа созылмайды.
- Ретровирустық векторлар трансгенді жануарлармен жұмыс жасағанда қолданылады.
- Ретровирустық векторлардың генетикалық ақпаратты тасымалдау сыйымдылығы үлкен емес, шамамен 8 мың жұп нуклеотидке дейінгі ДНК кесіндісін тасымалдай алады.

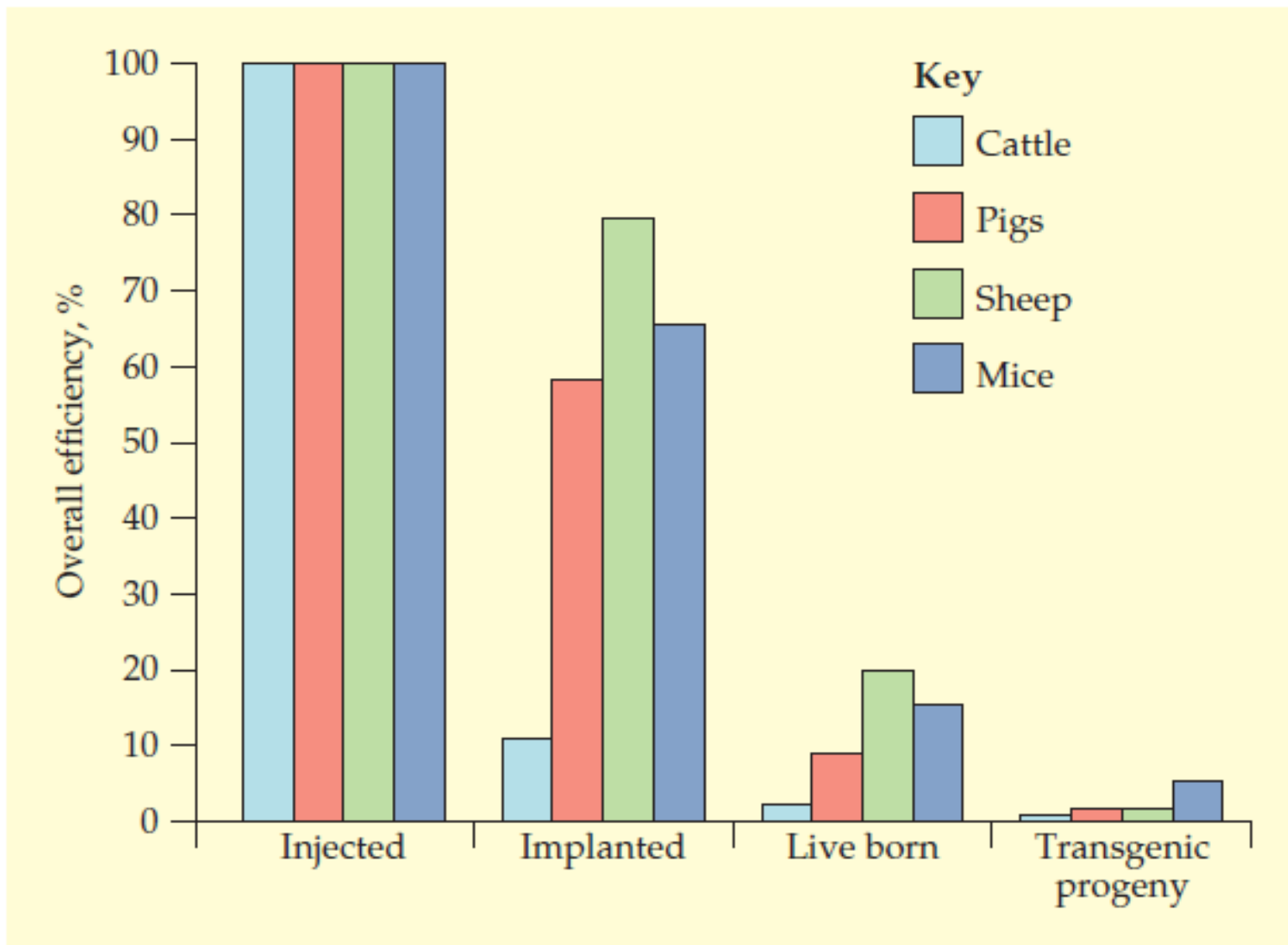
## *Микроинъекция әдісімен трансгенді жануар алу сатылары:*



- Жұмыртқа клеткасының гиперovuляциясы
- Трансгенозға жарамды зиготалар алу және олардың пронуклеустерін айқындау
- Рекомбинантты ДНҚ молекуласын құрастыру және оның клонын алу,
- Рекомбинантты ДНҚ көшірмелерінің белгілі мөлшерін зиготалар пронуклеустеріне микротүтікше арқылы енгізу;
- Зиготаларды гормондық дайындықтан өткен аналықтардың жыныс жолдарына тасымалдау;
- Туылған малдардың генотипі және фенотипі бойынша бағалап, тарнсенді екендігін анықтау,
- Трансгенді малдардың жаңа қасиетінің ұрпаққа тұқым қуалауын бақылау.



Establishing transgenic mice by DNA microinjection.



Микротүтікшенің кемегімен 0,5 секундтан 2 минут аралығында ең аз дегенде  $10^{-11}$  мл ДНҚ-ны зиготаға микроскоптан бақылап енгізеді. Микроинъекциялау процесі зиготалар үшін зақымды, сондықтан олардың біраз мөлшері жойылып кетеді. Микроинъекциядан кейін 2 сағатқа жетпей жарамды зиготаларды (трансгенді) алдын ала, арнайы дайындалған аналық — реципиенттерге тасымалдайды. Бұл кезеңде де зиготалардың көп мөлшері зақымданады. Аяғында, трансгенді жануарлардың шығуы 1%-ке тең болады. Алайда, мұның өзі трансформация және трансдукциямен салыстырғанда өте жоғары көрсеткіш болып саналады.

**FIGURE 21.4** Overall efficiency of the transgenesis process after DNA microinjection. All the fertilized eggs (100%) of cattle, pigs, sheep, and mice are inoculated with a transgene, but the success of implantation and giving birth to offspring is much lower, and only 5% or fewer of the treated eggs become transgenic progeny.



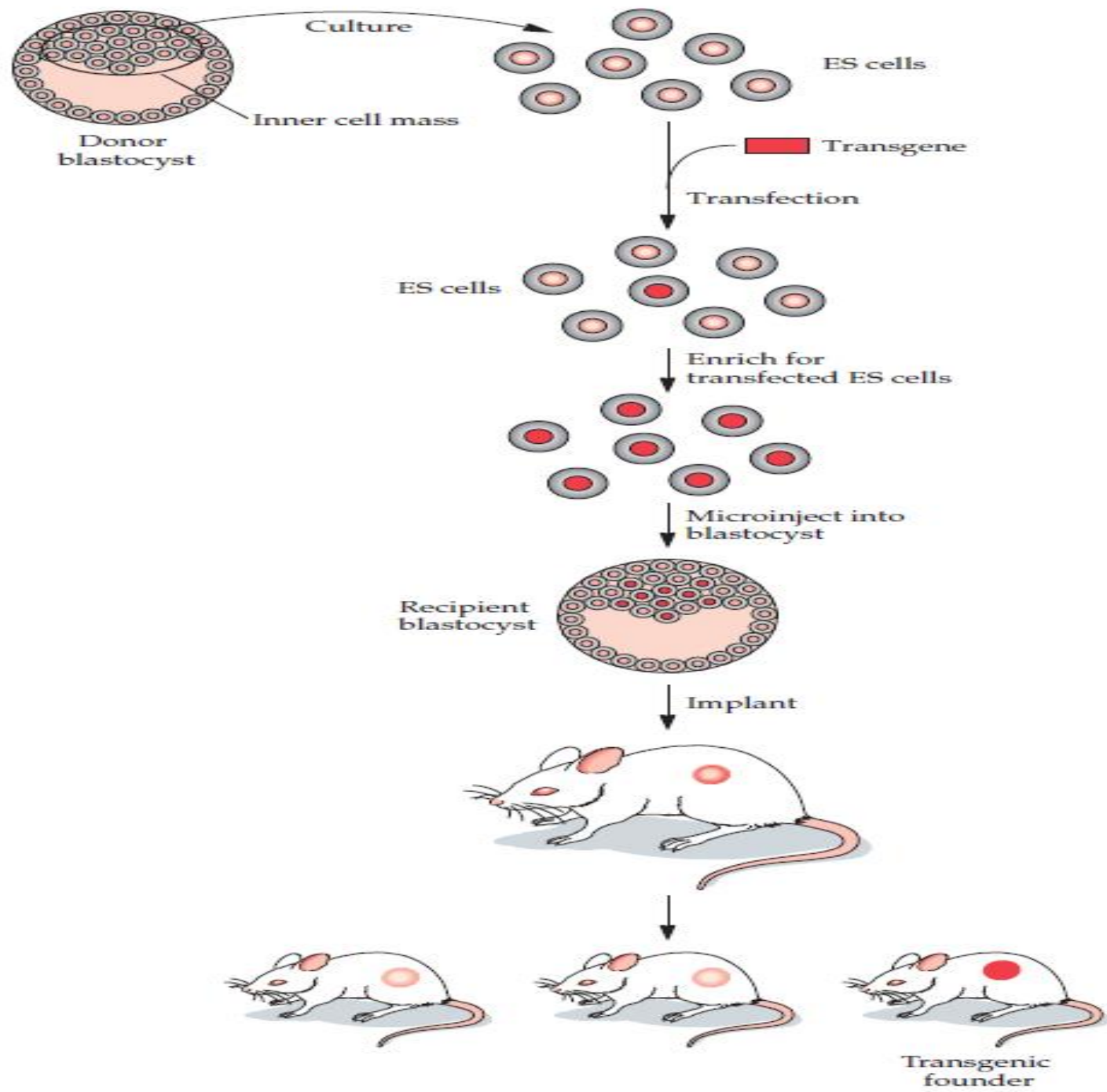
# Модификацияланған бағаналы клеткаларды пайдалану

Тышқан эмбриондарының бластоциста даму кезеңінде бөліп алған клеткалар *in vitro* жағдайында кез-келген клеткаларға бастама болады. Сондай-ақ бұндай типті клеткалар өзінің басқа клеткаларға бастама бола алу қасиетін бластоциста кезеңіндегі басқа эмбрионға енгізетін болса өзінің қасиетін өзгертпей сақтай алады. Мұндай клеткаларды плюрипотентті эмбриональды бағаналы клеткалар (ES) деп атайды.

**ES**клеткаларды культурада гендік инженериялық әдістерді пайдалана отырып олардың плюрипотенттілігін бұзбай отырып манипуляция жүргізуге болады. Мысалы, геномындағы мағынасыз сайттың орнына трансгенді енгізуге болады. Содан кейін генетикалық материалы өзгертілген клеткаларды таңдап алып, *in vitro* жағдайында культивирлеу арқылы трансгенді жануарлар алуда қолдануға болады.

Эмбриональды бағаналы клеткаларды пайдалана отырып трансгенді жануарлар алу микроинъекция және ретровирустарды қолдану әдістерінен айырмашылығы гендердің кездейсоқ орналасуын болдырмауға мүмкіндік береді.

**FIGURE 21.5** Establishing transgenic mice with genetically engineered embryonic stem (ES) cells.



## Негативті және позитивті селекция

Бұл әдісті жүзеге асыру үшін арнайы вектор дайындалады. Ол вектордың құрамына мына компоненттер кіреді:

1. HB1 және HB2 (гомологты аудан)
2. Трансген
3. NeoR гені (G-418-ге тұрақтылықты қамтамасыз ететін ген)
4. tk1 және tk2 (тимидинкиназаның түзілуіне жауапты ген)

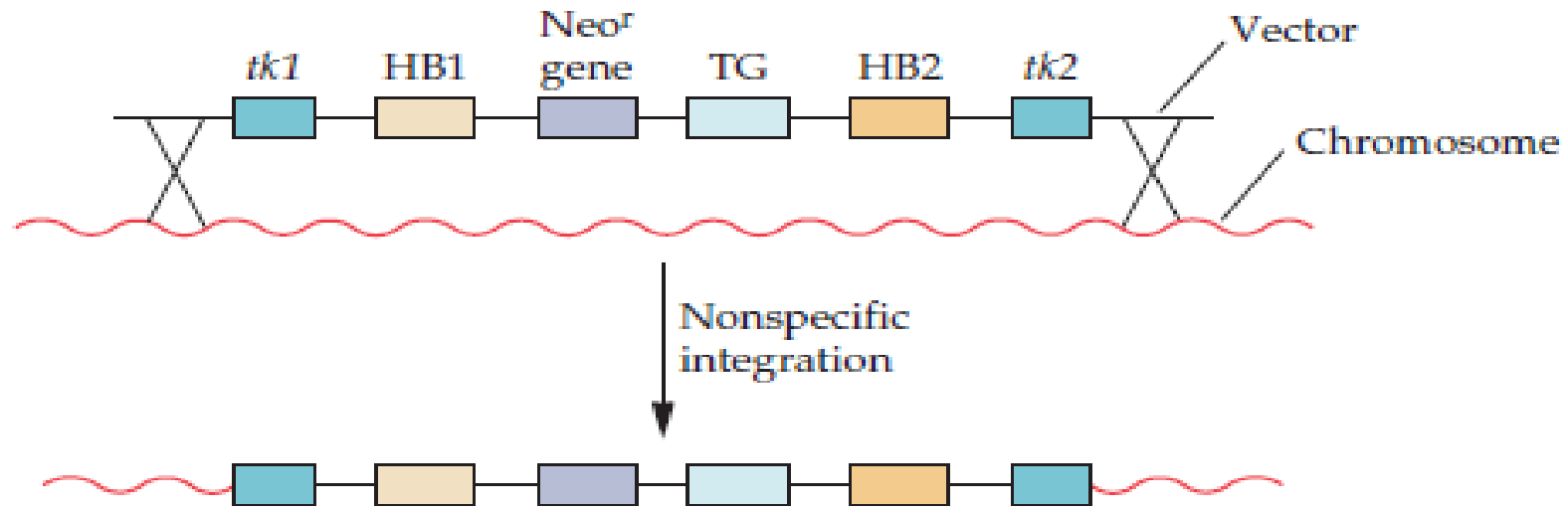
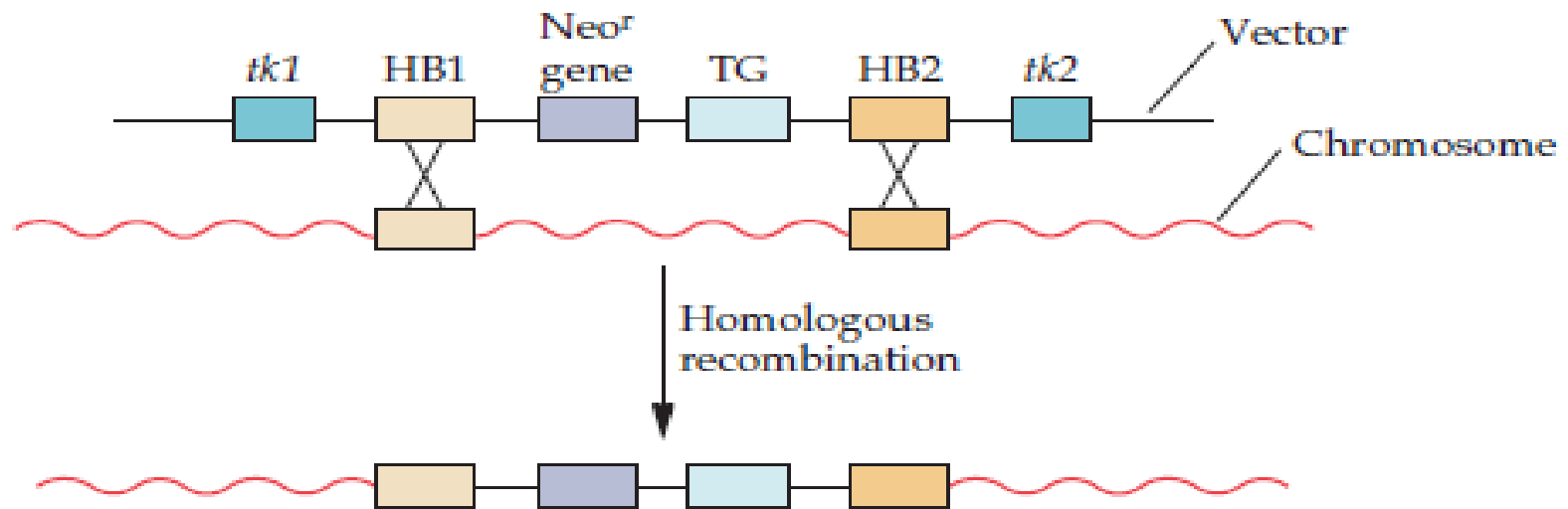
Бұл векторды клеткаға енгізудің спецификалық және спецификалық емес әдістері бар.

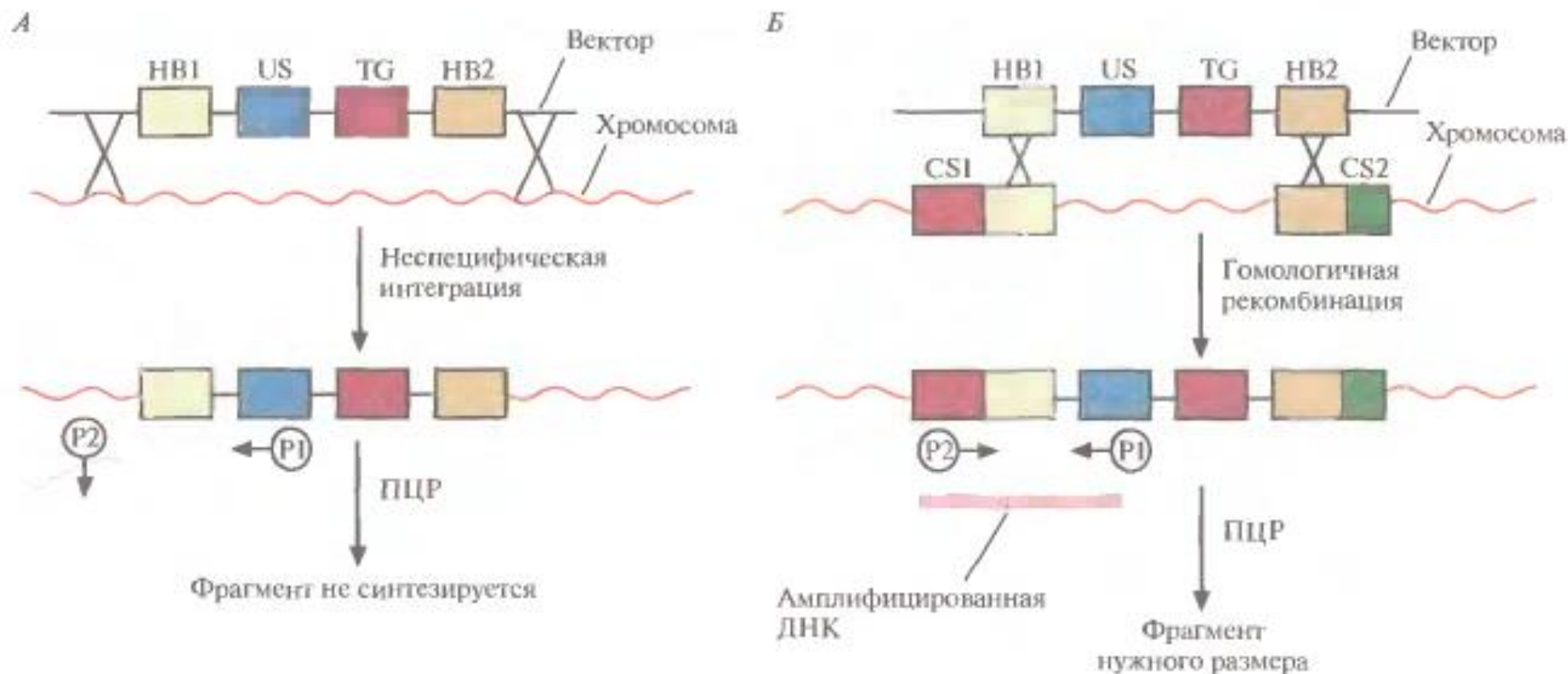
Спецификалық әдіс кезінде векторды клетка геномына HB1 және HB2 гомологты аудандары бойынша рекомбинациялайды. Ол кезде геномға tk1 және tk2 (тимидинкиназаның түзілуіне жауапты ген) гендері енбей қалады.

Ал спецификалық емес әдіс кезінде вектор клетка геномына басқа тыс жатқан гомологты аудан арқылы рекомбинацияланады, ол кезде клетка геномына tk1 және tk2 (тимидинкиназаның түзілуіне жауапты ген) гендері де еніп кетеді.

Егер ортаға G-418-ді қосатын болсақ онда екі әдіс бойынша рекомбинацияланған клетка да тірі қалады. Ал егер ортаға ганцикловир қосатын болса, онда тек спецификалық әдіс арқылы рекомбинацияланған клеткалар ғана тірі қалады. Ал спецификалық емес рекомбинацияланған клеткалар өліп қалады, себебі тимидинкиназа мен ганцикловир қосылып улы қосылысқа айналады. Сол себепті клеткалар өліп қалады. Ал тимидинкиназа гені енбеген, яғни спецификалық әдіс арқылы рекомбинацияланған клеткалар тірі қалады. Демек тек дұрыс рекомбинацияланған клеткалар ғана тірі қалады.

Бұл әдістер позитивті және негативті селекция деп аталады.

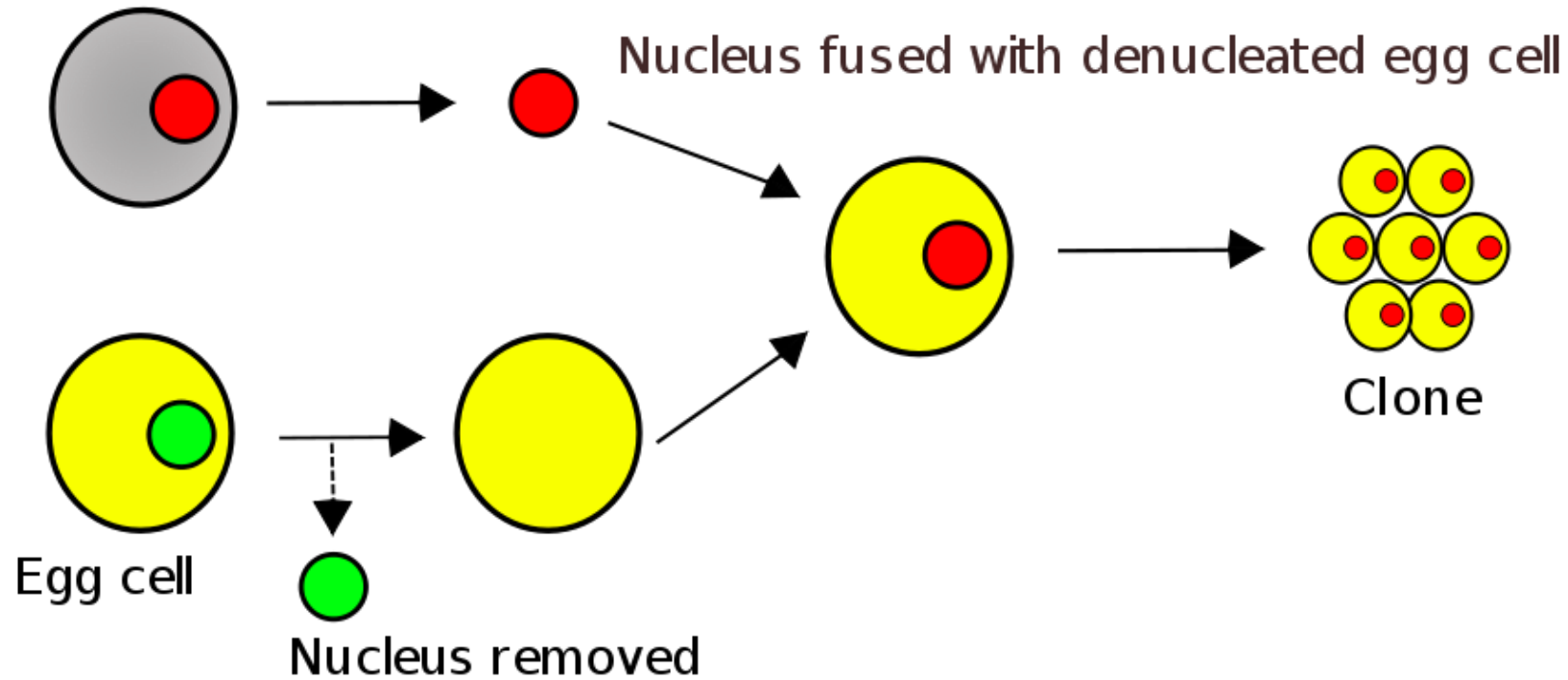
**A****B**



**Рис. 19.6.** 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.

# Ядроны алмастыру әдісімен трансгенді жануарлар алу

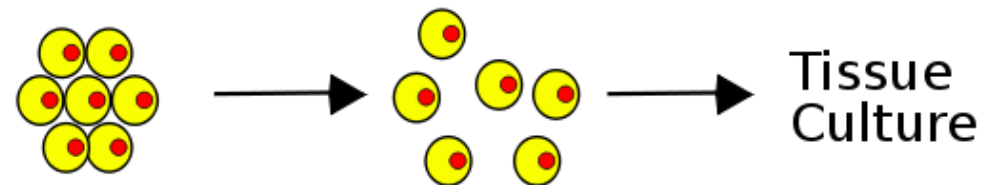
Somatic body cell with desired genes



REPRODUCTIVE CLONING



THERAPEUTIC CLONING



# Nuclear Transfer: Dolly The Sheep

