

Генетическая инженерия животных: трансгенные модели, нокаутные и нок-ин организмы



Преподаватель: старший преподаватель
кафедры молекулярной биологии и генетики,
PhD, Сметенов И.Т.
Дисциплина: Рекомбинация ДНК

(Лекция 6)

ЦЕЛЬ ЛЕКЦИИ

Изучить методы генной инженерии животных для создания трансгенных организмов и трансгенных линий, а также рассмотреть ключевые технологии введения трансгенов.

ЗАДАЧИ

- ✓ Рассмотреть методы создания трансгенных животных, включая пронуклеарную микроинъекцию и использование вирусных векторов
- ✓ Описать использование эмбриональных стволовых клеток для создания стабильных трансгенных линий
- ✓ Изучить методы введения трансгенов, такие как биобаллистика и электропорация, и их применение в генетических манипуляциях
- ✓ Изучить методы создания нокаутные и нок-ин организмы
- ✓ Обсудить практические области применения трансгенных животных в научных исследованиях и биотехнологии
- ✓ рассчитать процент агарозы / акриламида под нужный диапазон фрагментов

Ключевые термины

генная инженерия, трансгенные животные, трансген, пронуклеарная микроинъекция, вирусные конструкции, эмбриональные стволовые клетки, биобаллистика, электропорация, нокаутные и нок-ин организмы

- I. **Трансгенные животные** — это организмы, в геном которых введён **чужеродный ген (трансген)**, способный экспрессироваться и передаваться потомству.
Цель создания — изучение функции генов, моделирование заболеваний человека, получение биофармацевтических белков, повышение продуктивности и устойчивости к болезням.
- II. **Трансген** — это фрагмент ДНК, искусственно введённый в геном другого организма. **Пронуклеарная микроинъекция** — один из классических методов получения трансгенных животных.
Трансген вводится с помощью микроиглы непосредственно в **зародышевое ядро (пронуклеус)** оплодотворённой яйцеклетки. После имплантации в матку такие эмбрионы могут развиваться в трансгенных особей.
- III. **Вирусные конструкции** — используются как эффективные векторы для переноса генов.
В их геном вставляется трансген, после чего вирус теряет способность к репликации, но сохраняет механизм доставки ДНК в клетки хозяина.
Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) — применяются для **таргетированной модификации генома**.
В них вводят изменённый ген (например, с мутацией или вставкой), затем такие клетки внедряют в эмбрион, формируя **химерных животных**, у которых изменённый ген может наследоваться.
- IV. **Электропорация** — метод, при котором **клеточная мембрана временно проницаема** под действием электрического импульса, что позволяет молекулам ДНК проникать внутрь клетки.
- V. **Нокаутные организмы (knockout)** — животные, у которых **определённый ген полностью инактивирован** (удалён или нарушена его функция).
Применяются для изучения роли конкретных генов и моделирования заболеваний.
- VI. **Нок-ин организмы (knock-in)** — животные, у которых в геном **вставлен или заменён определённый ген** (например, человеческий ген).
Используются для получения моделей человека и для функциональных исследований белков.



ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ

- 1) Что такое генная инженерия и какие задачи она решает?
- 2) Что понимают под трансгеном и трансгенным организмом?
- 3) В чём заключается метод **пронуклеарной микроинъекции** и каковы его преимущества и недостатки?
- 4) Как вирусные векторы используются для доставки генов в клетки?
- 5) Какую роль играют **эмбриональные стволовые клетки** при создании трансгенных животных?
- 6) Что представляет собой метод **биобаллистики**, и в каких случаях он применяется?
- 7) Как происходит перенос ДНК в клетку при **электропорации**?
- 8) Чем отличаются **нокаутные** и **нок-ин организмы**?
- 9) Почему создание нокаутных моделей важно для медицины и фармакологии?
- 10) Какие риски и этические вопросы связаны с созданием трансгенных животных?



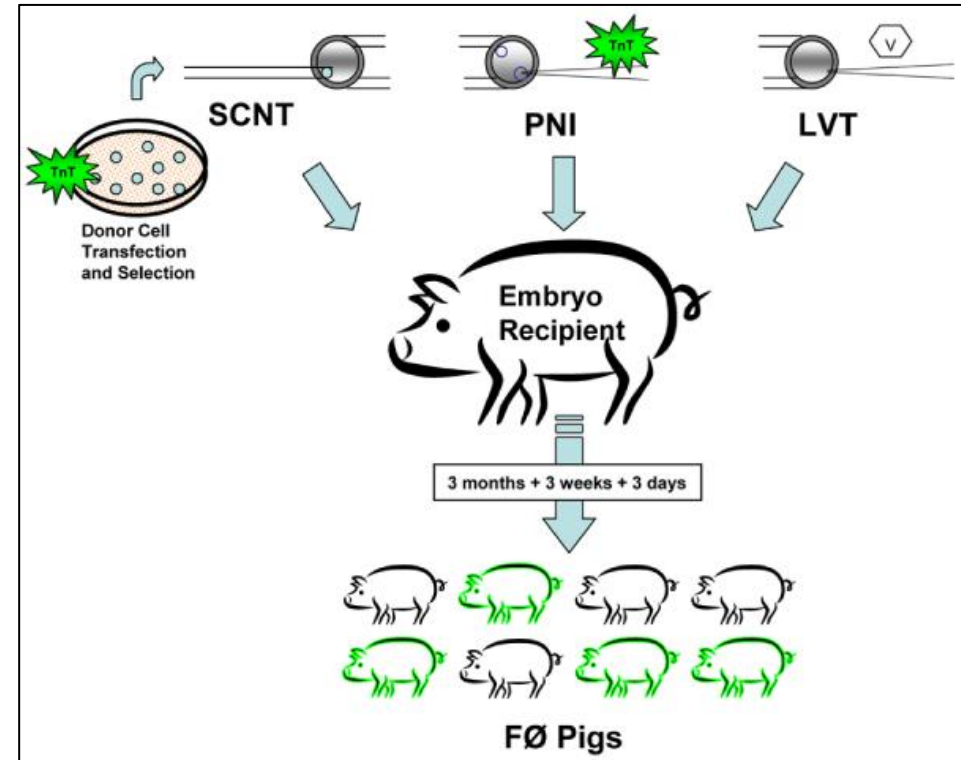
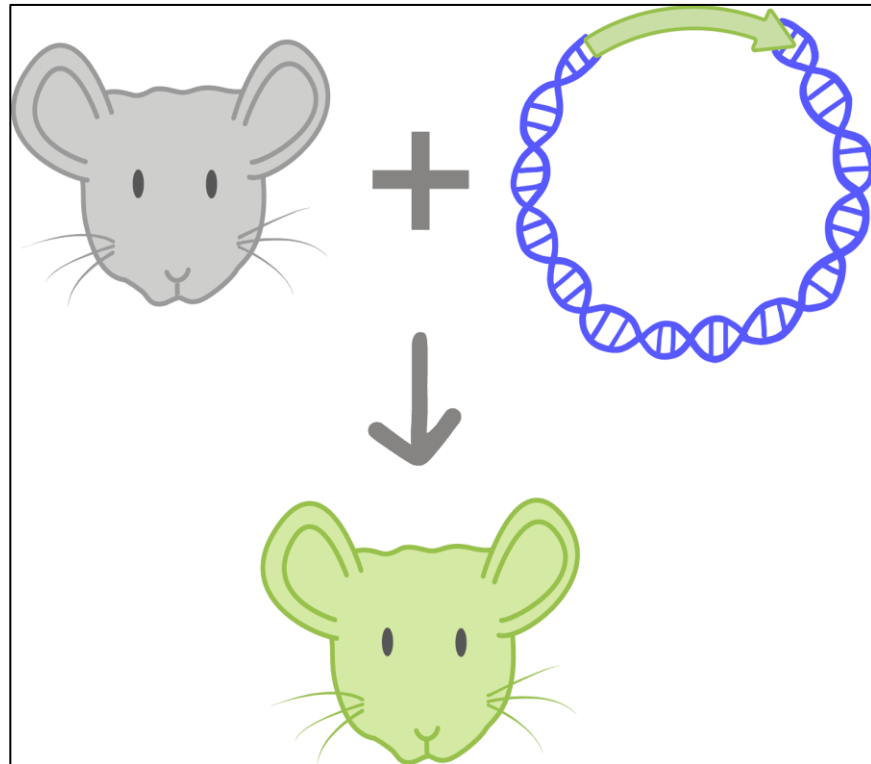
Флуоресцентные мыши

Манипуляции с клетками млекопитающих можно разделить на 2 большие группы: эксперименты с соматическими клетками и эксперименты по трансформации половых клеток. В последнем случае конечный **результат** — получение **трансгенных организмов**.

Какие животные генетически
модифицируются?



- ✓ Животное, несущее рекомбинантный ген, называется **трансгенным**;
- ✓ Ген, интегрированный в геном реципиента, называется **трансгеном**;
- ✓ Продукт этого гена — **трансгенным**.
- ✓ Селекция позволяет закрепить новый ген в потомстве и создать **трансгенные линии**.

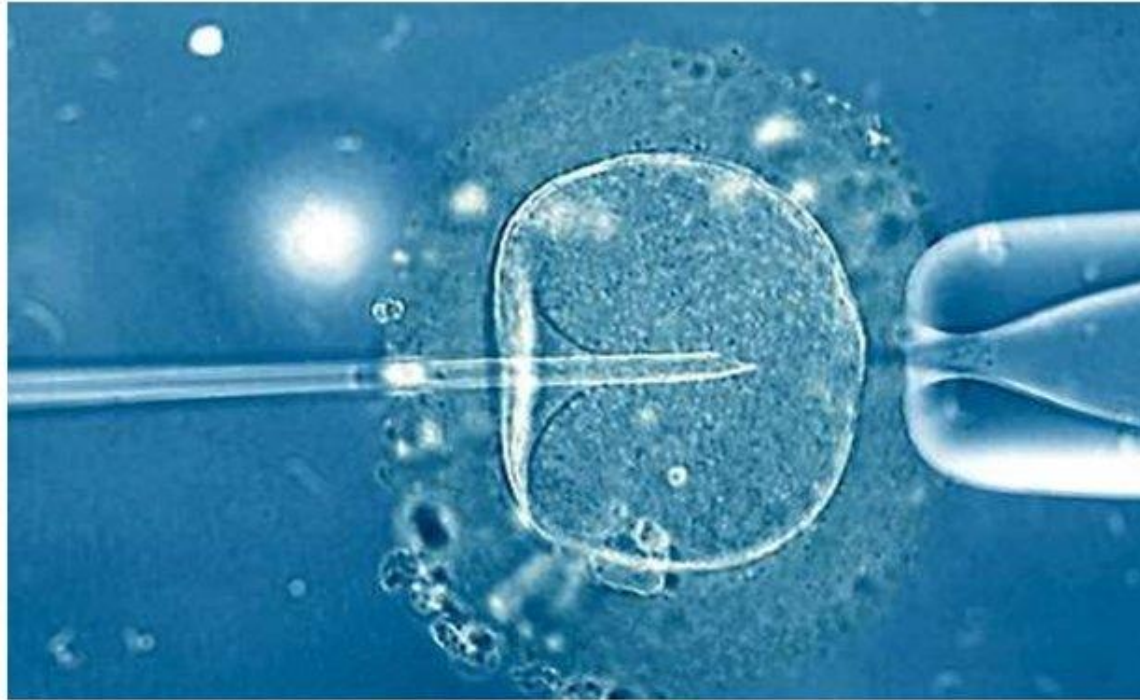


Существует несколько основных способов создания генных модификаций у высших животных:

1. пронуклеарная микроинъекция;
2. использование вирусных конструкций;
3. использование эмбриональных стволовых клеток.
4. использование биобаллистики
5. электропорация

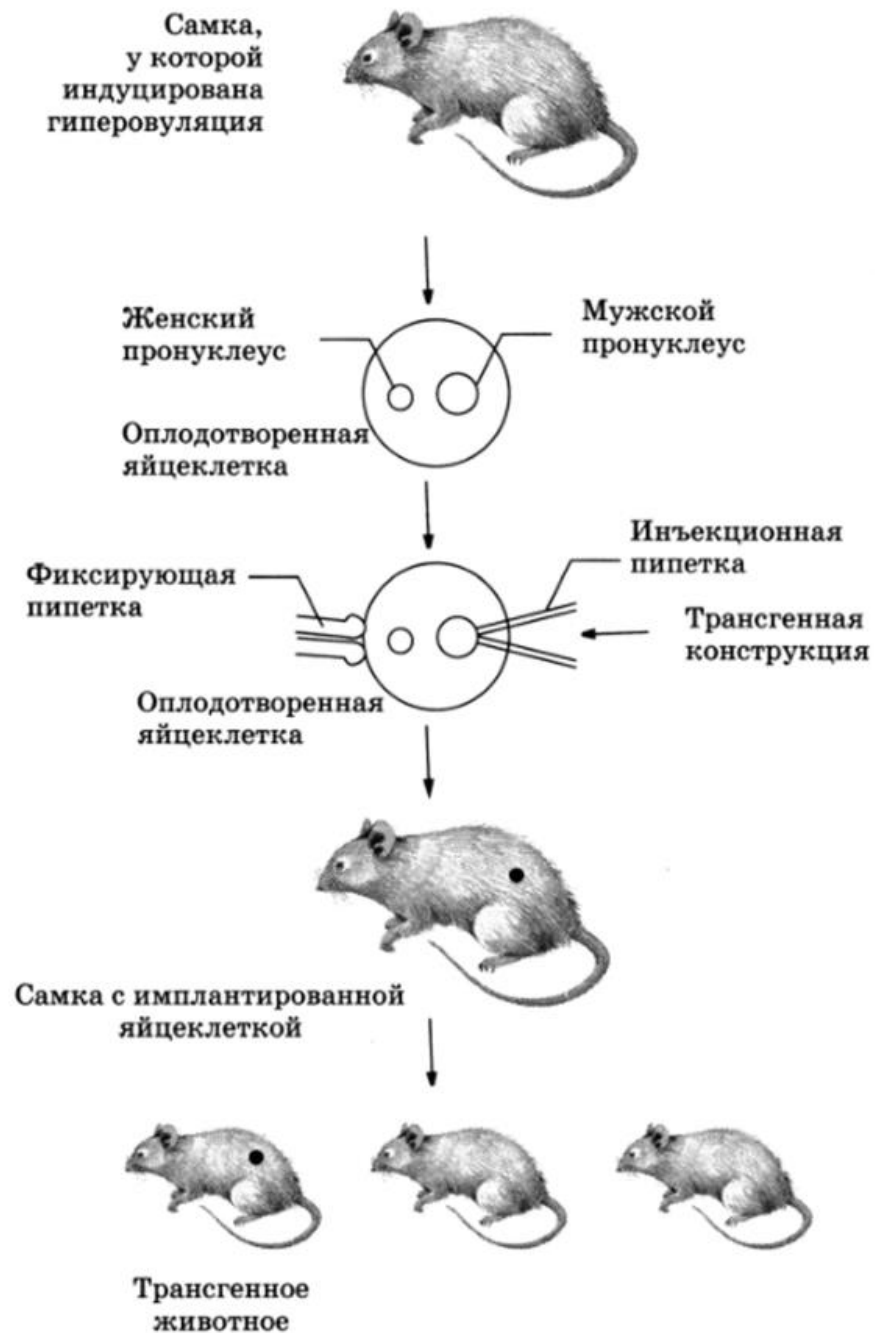
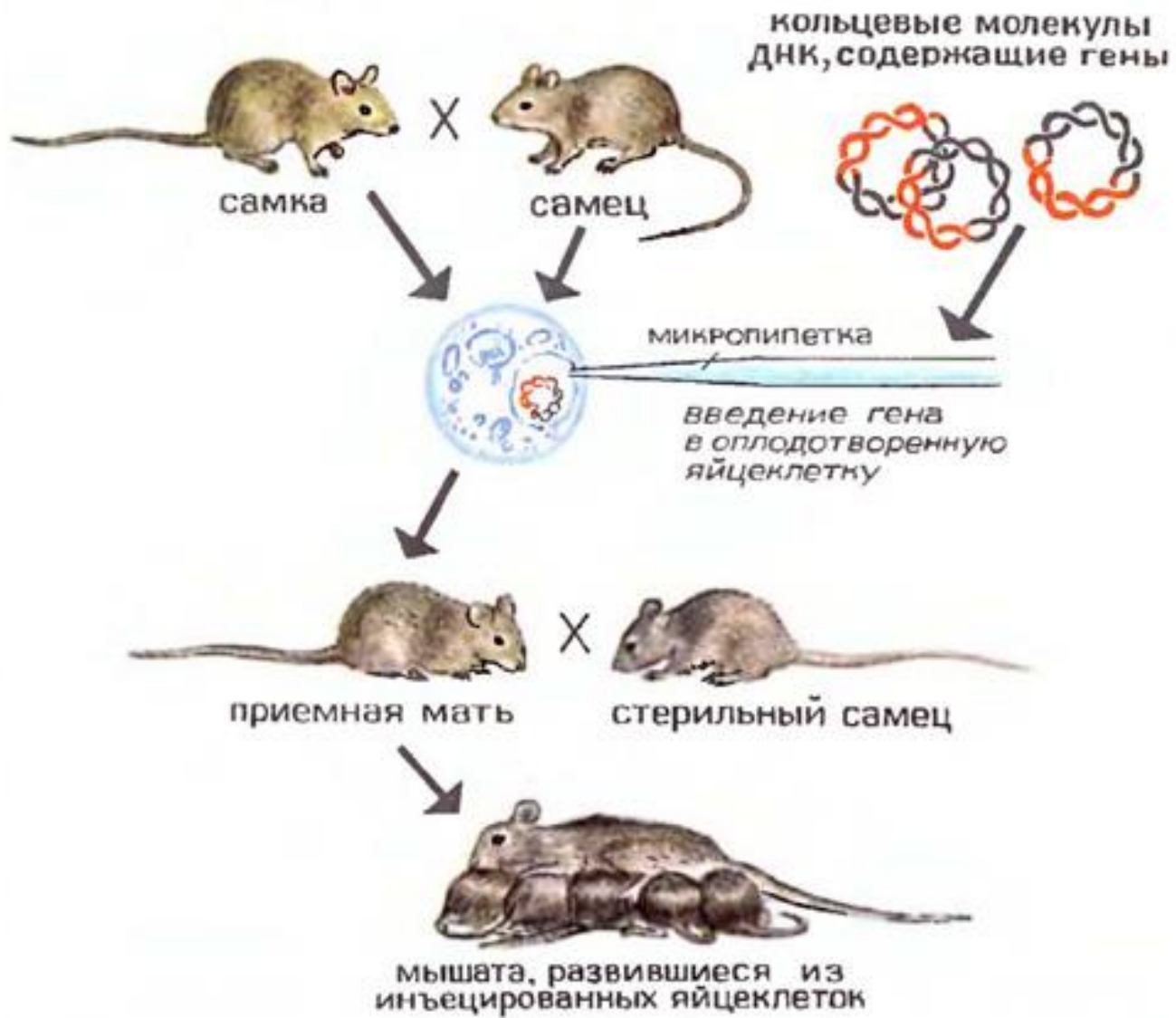
Микроинъекция

Клеточная мембрана прокалывается микроиглой и раствор, содержащий ДНК, вводится в цитоплазму клетки или напрямую в ядро, если ядро достаточно большое (например, ядро яйцеклетки).



Микроинъекция ДНК в клетки млекопитающих стала возможной с появлением прибора для изготовления микропипеток диаметром 0,1–0,5 мк и микроманипулятора. Этот метод позволяет вводить любую ДНК в любые клетки и для сохранения в клетках введенного гена не требуется никакого селективного давления.

СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ

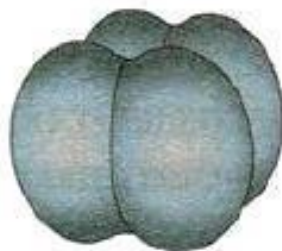




Зигота



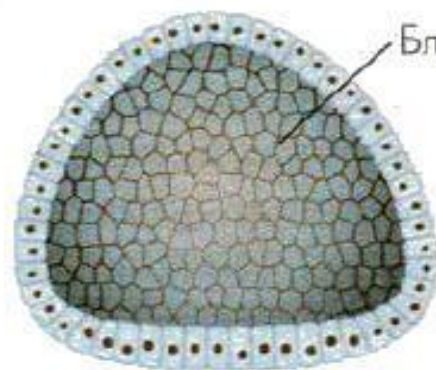
Стадия 2-х бластомеров



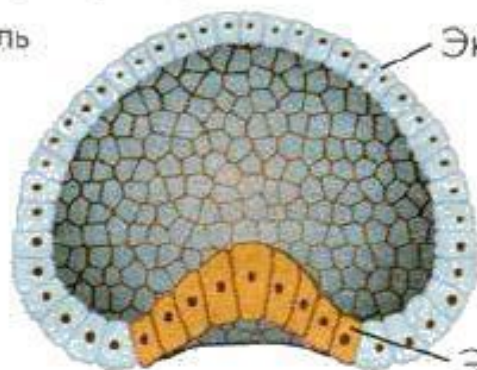
Стадия 4-х бластомеров



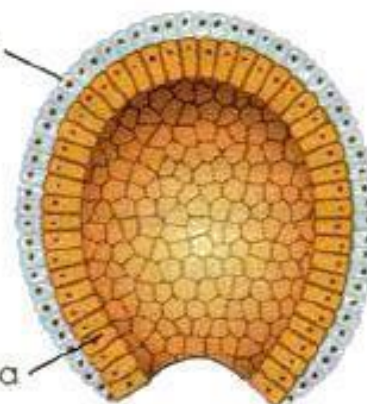
Стадия 32-х бластомеров



Бластула в разрезе



Начало образования гастролы

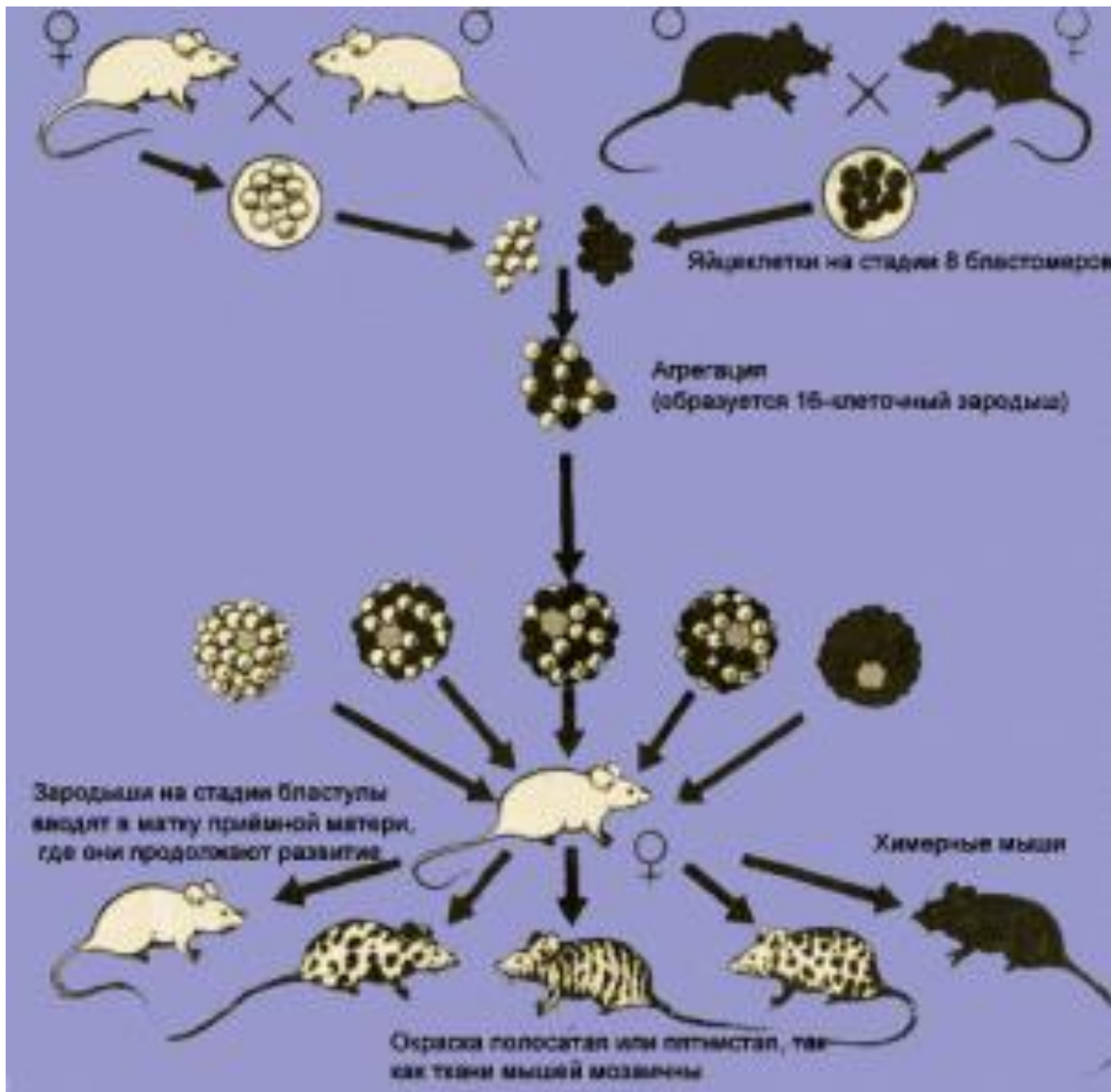


Гастроула



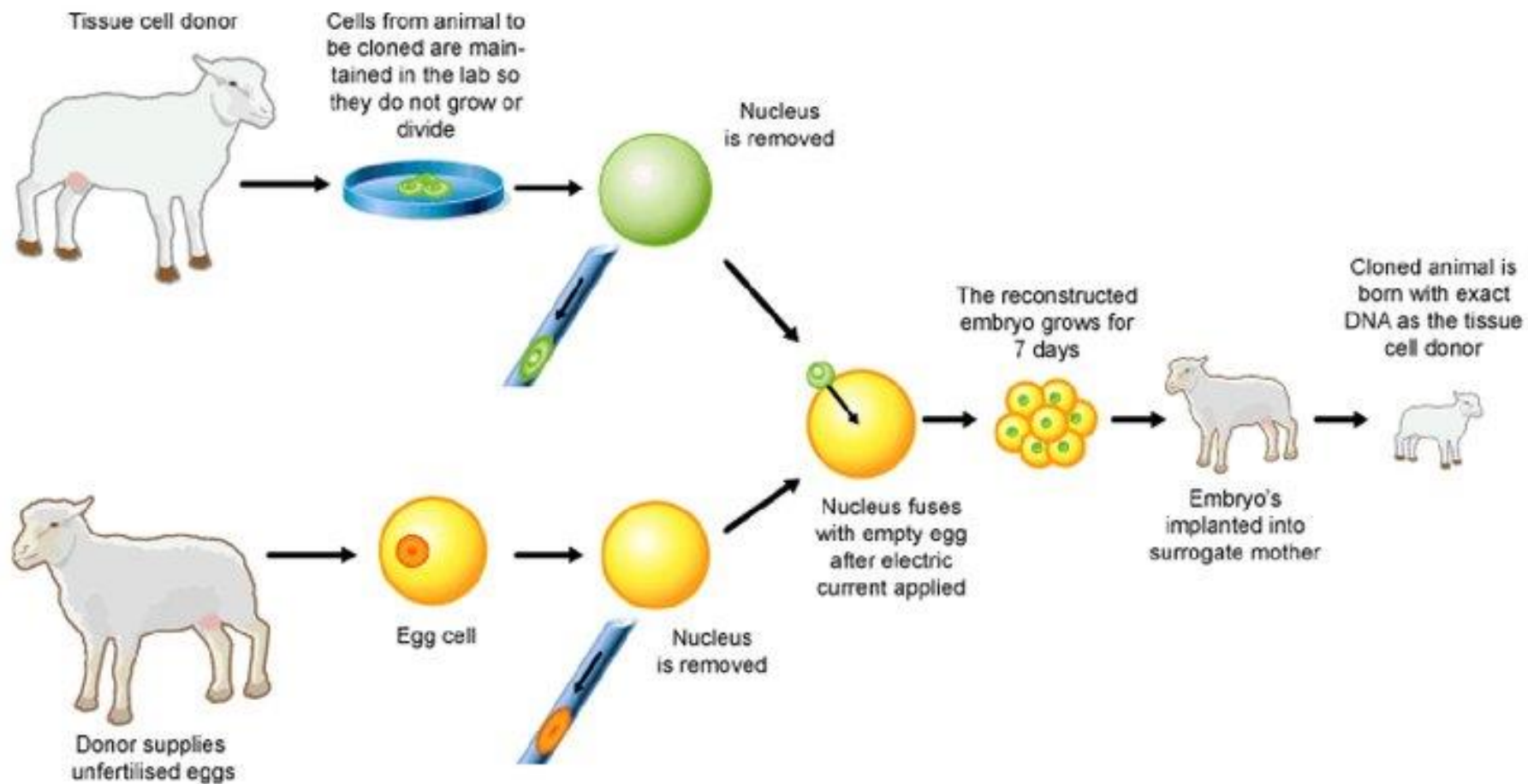
Ранняя нейрула

Нейрула

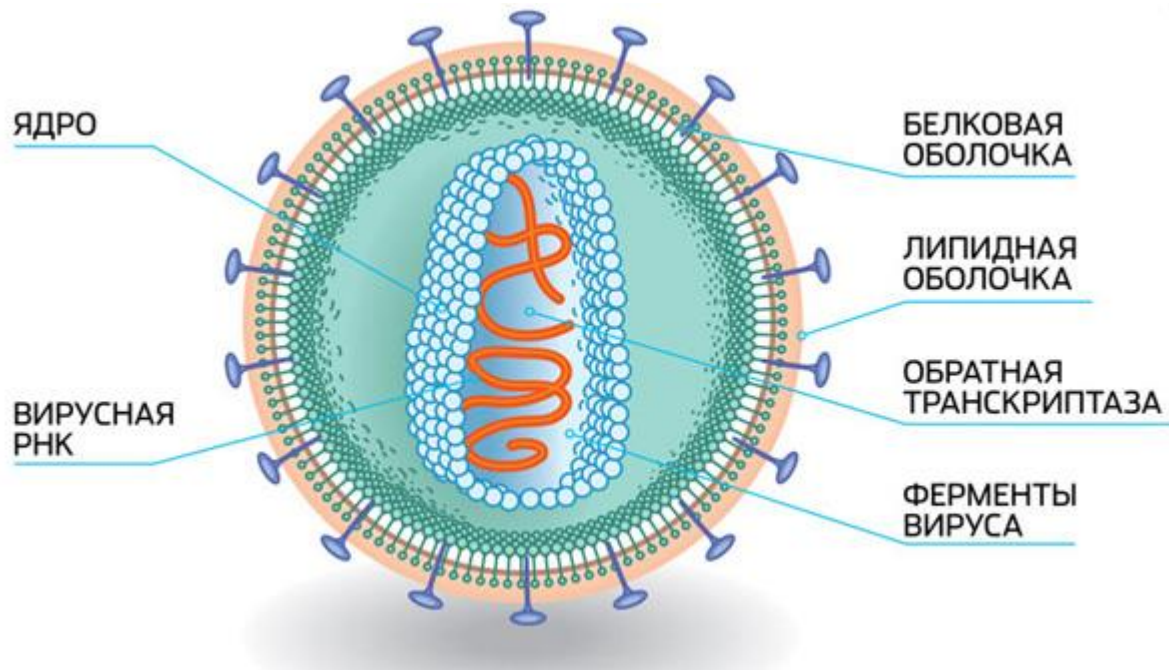


Были инъецированы гены интерферона и инсулина человека, ген β -глобина кролика, ген тимидинкиназы вируса простого герпеса и кДНК вируса лейкемии мышей. Число молекул, вводимое за одну инъекцию, колеблется от 100 до 300 000, а их размер - от 5 до 50 кб. Выживает обычно (10 – 30) % яйцеклеток, а доля мышей, родившихся из трансформированных яйцеклеток варьирует от нескольких до 40%. Таким образом, реальная эффективность составляет около 10%.

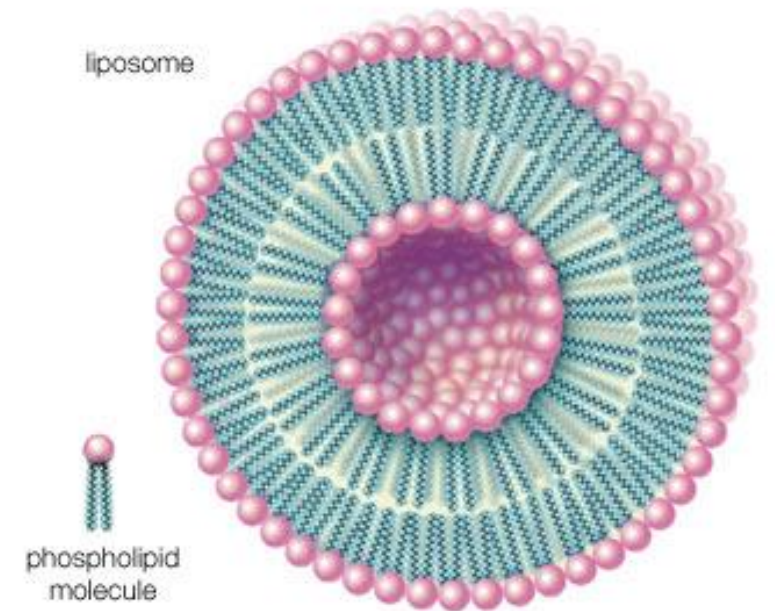
Зачем клонировать овец?



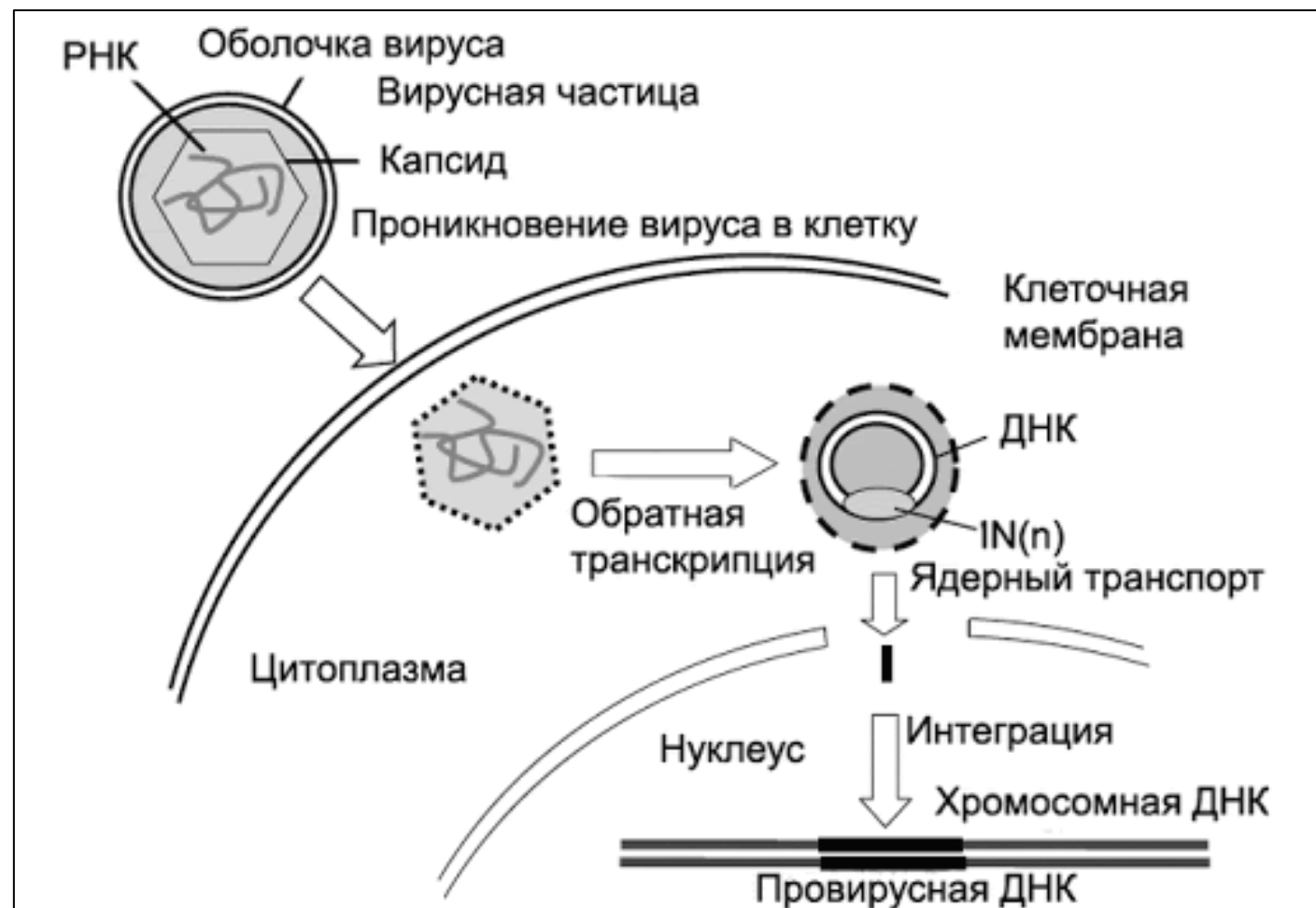
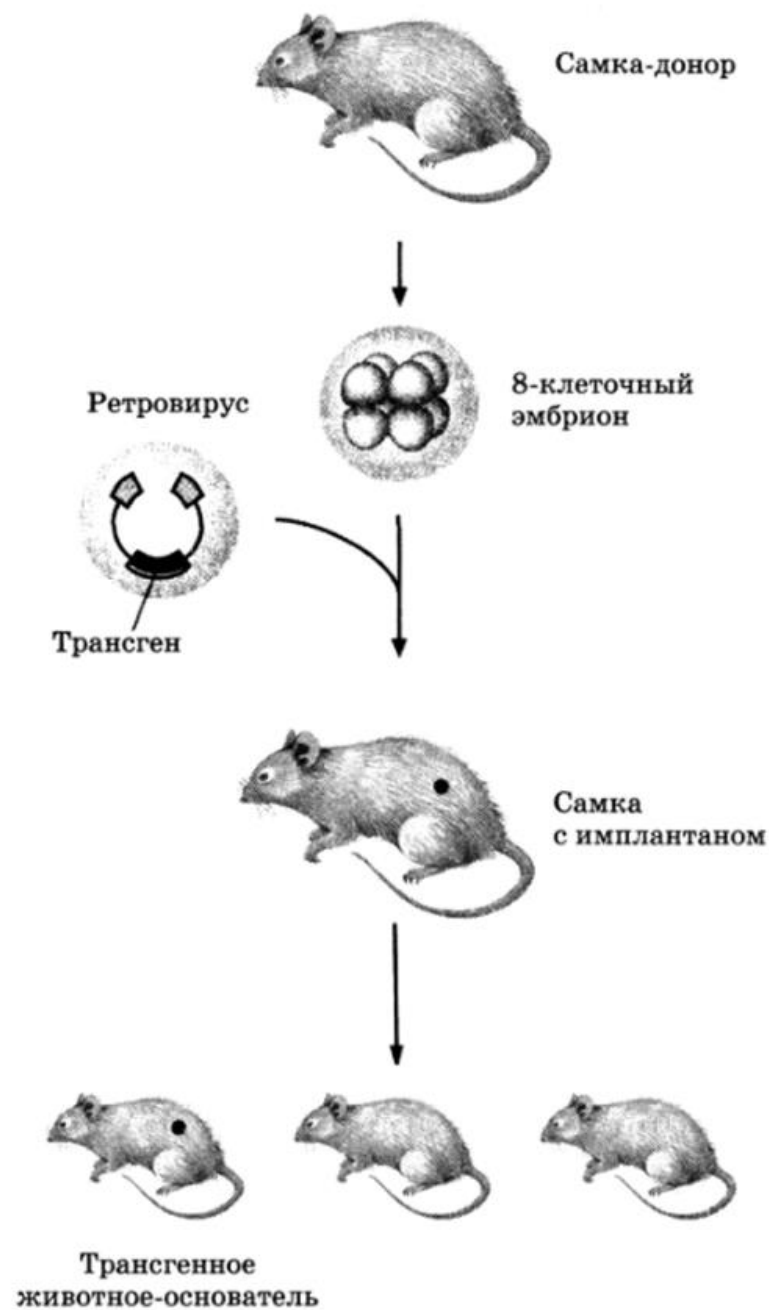
- В основном трансформации животных клеток осуществляют либо с помощью **ретровирусов** (около 40% от всех трансформаций), либо путем упаковки ДНК в **липосомы** (25%), реже используют **аденовирусы**, так как они могут вызывать сильный иммунный ответ, кроме того, невозможно их повторное введение.



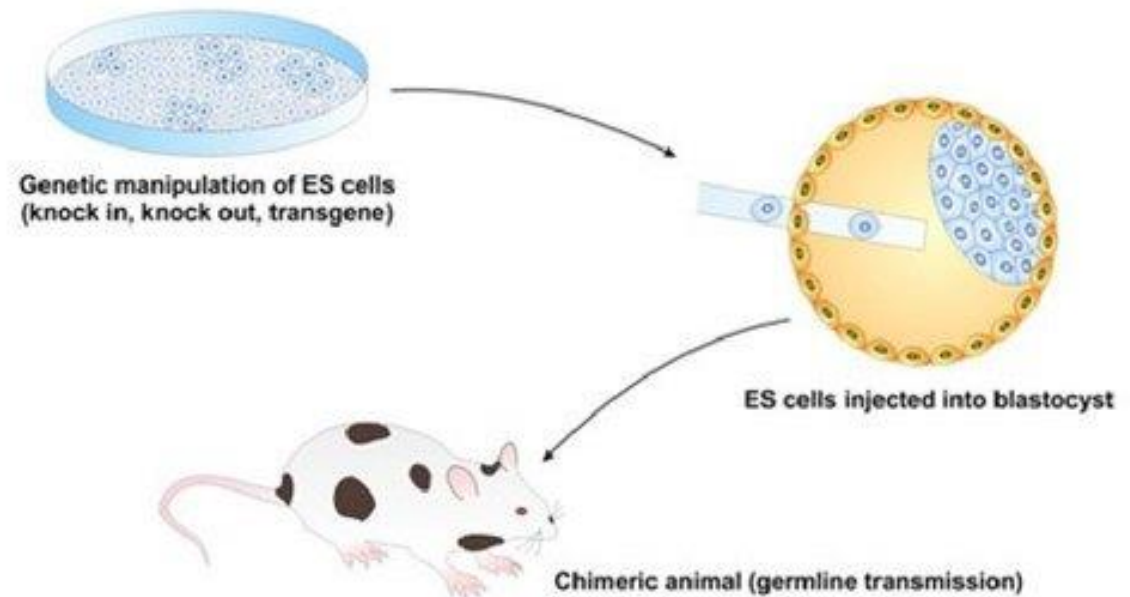
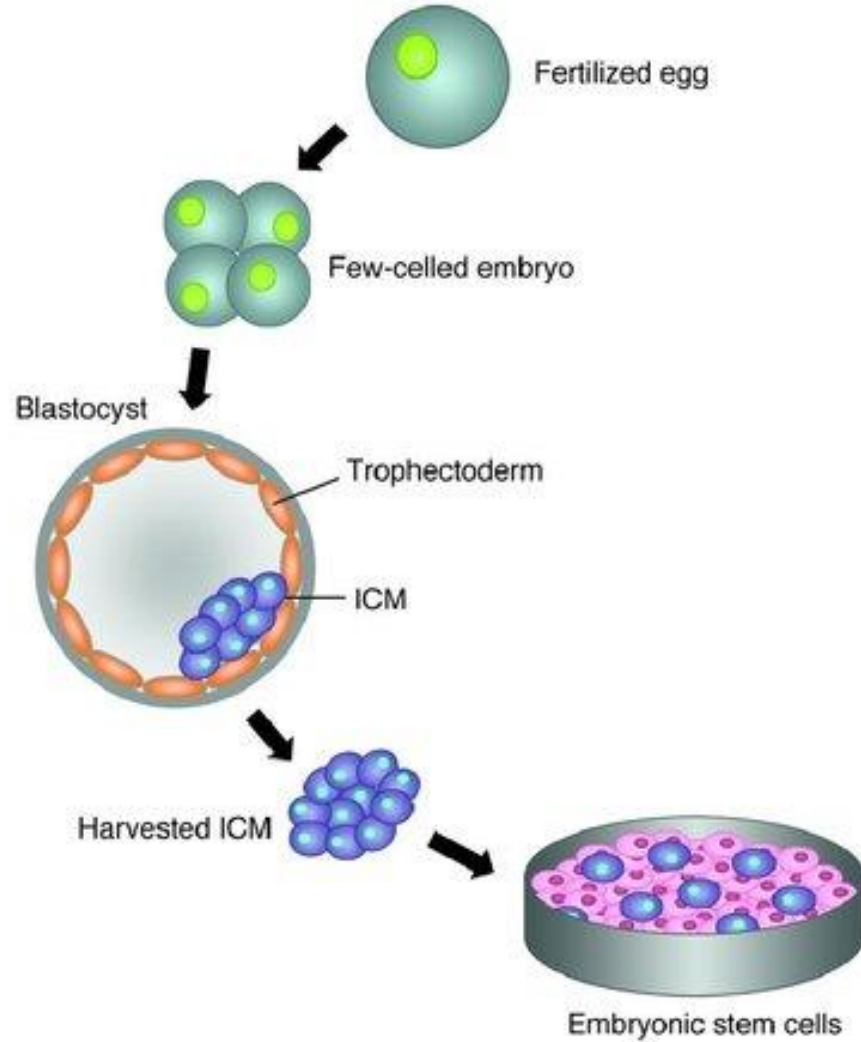
Ретровирусы



© 2007 Encyclopædia Britannica, Inc.



Эмбриональные стволовые клетки



Нокаутные Организмы (Knockout Organisms)

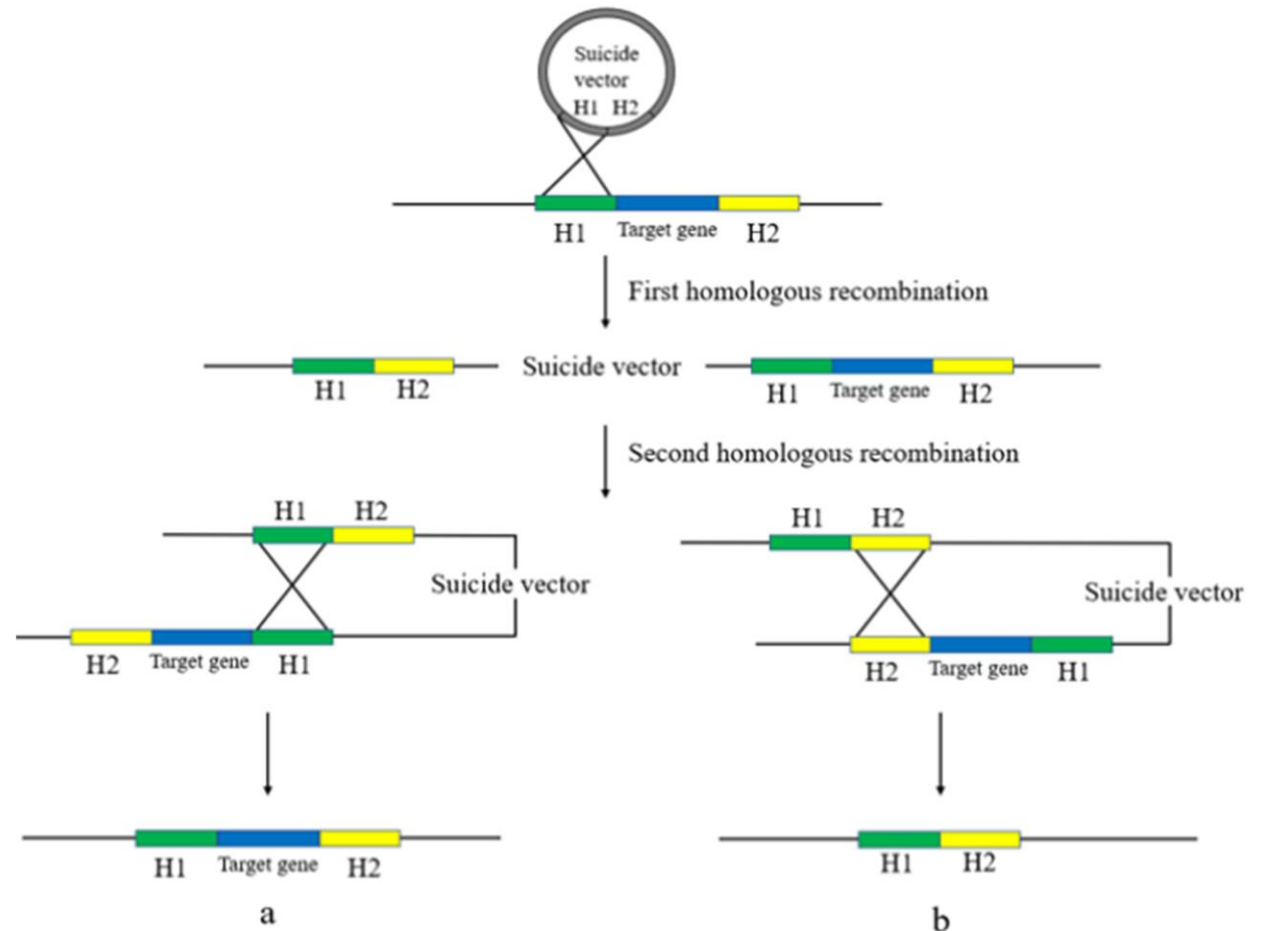
Нокаутный организм (чаще всего мышь, **Knockout mouse**) – это генетически модифицированный организм, в котором один или несколько эндогенных генов **полностью инактивированы (выключены)**.

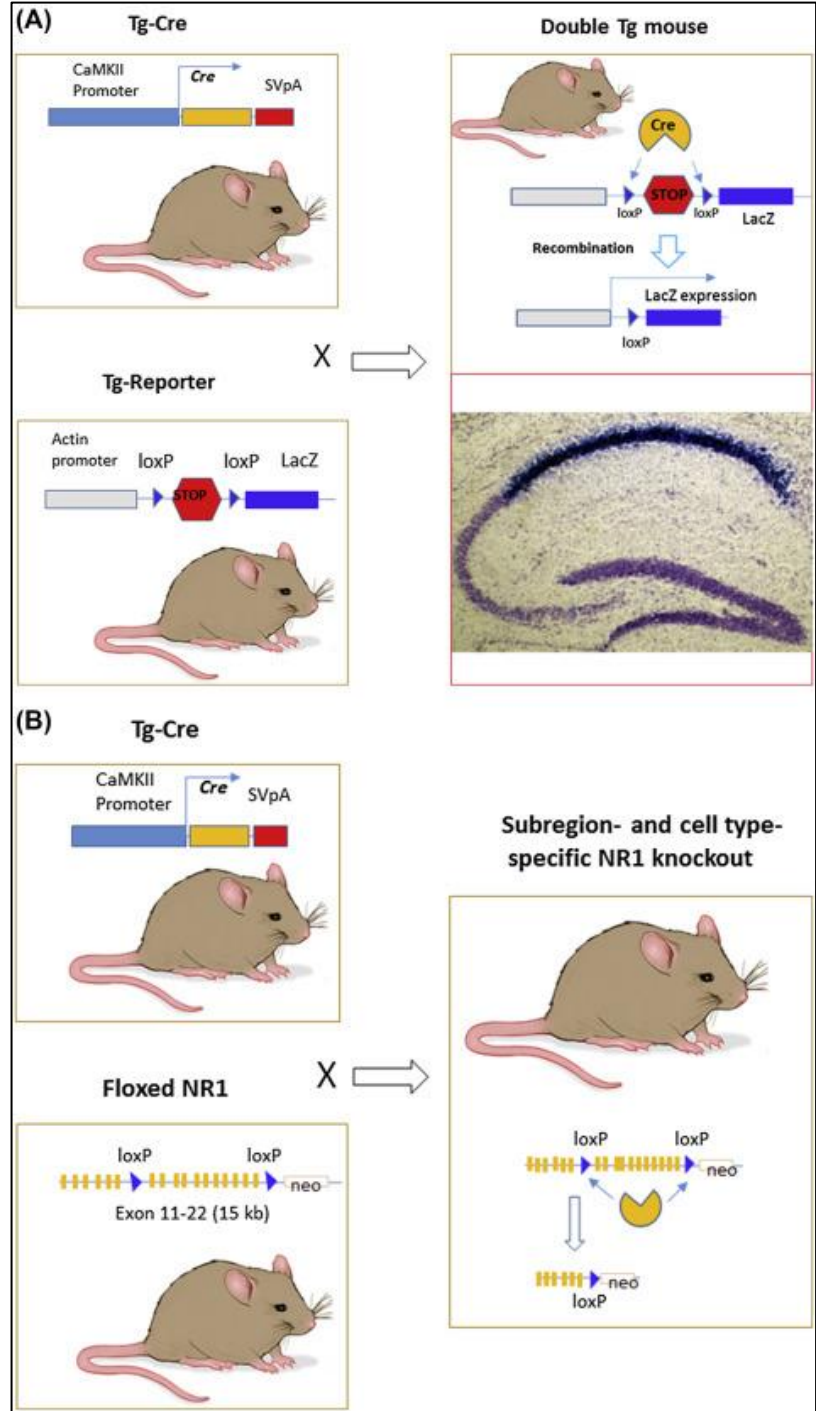
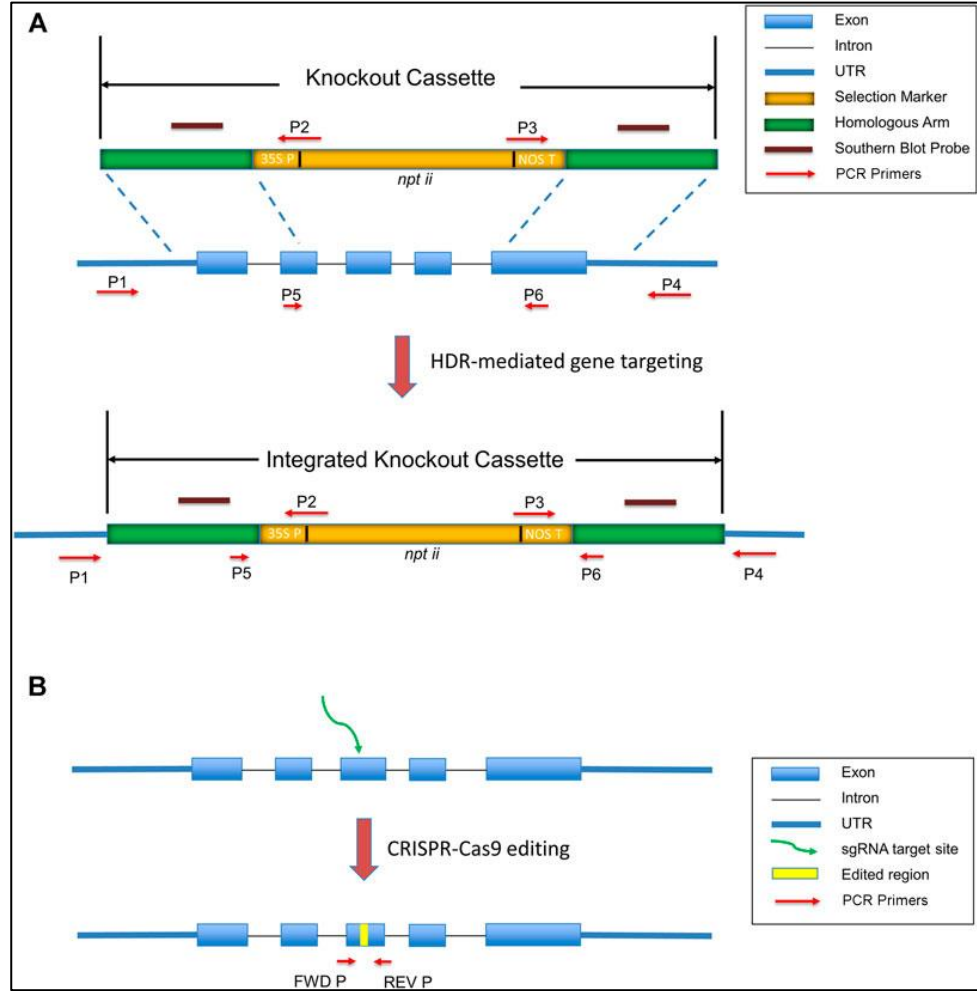
Механизм: Достигается путем направленного замещения нормальной последовательности гена на нефункциональный (дефектный) фрагмент или путем введения стоп-кодона/сдвига рамки считывания.

Классическая технология: Достигается с помощью гомологичной рекомбинации в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) с последующей селекцией и имплантацией.

Современная технология: Использование системы CRISPR/Cas9, которая позволяет вносить двуцепочечный разрыв в целевой ген. Клеточные системы репарации (НСБЦ) часто восстанавливают разрыв с ошибками (вставками/делециями), что приводит к инактивации гена.

Использование: Нокаутные мыши используются для моделирования наследственных заболеваний человека и для определения физиологической функции конкретного гена (что происходит, когда ген отсутствует?).





Нок-ин Организмы (Knock-in Organisms)

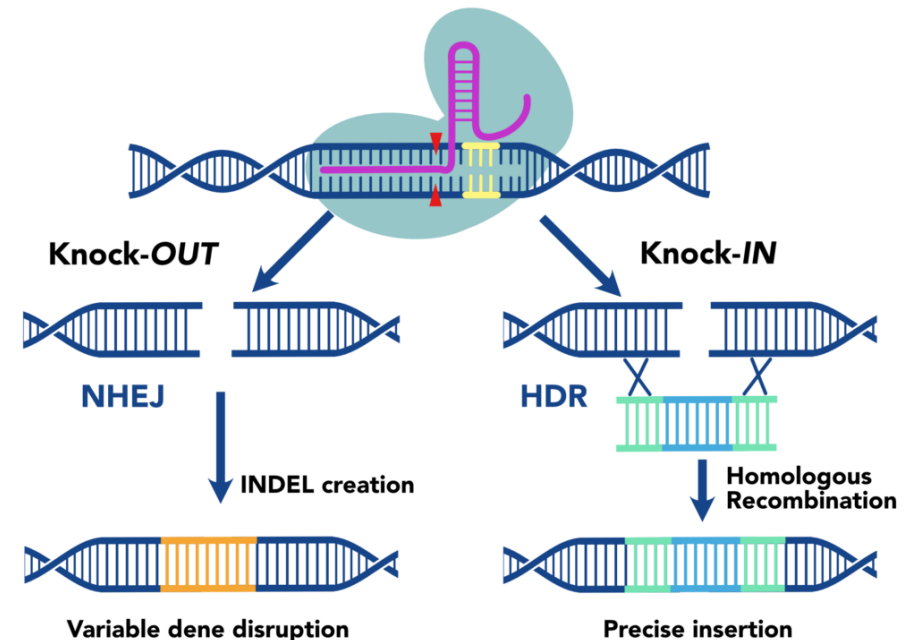
- Нок-ин организм (**Knock-in organism**) – это генетически модифицированный организм, в котором целевой ген был заменен на **модифицированный** ген, или в геном был **добавлен** новый ген в специфическую позицию.

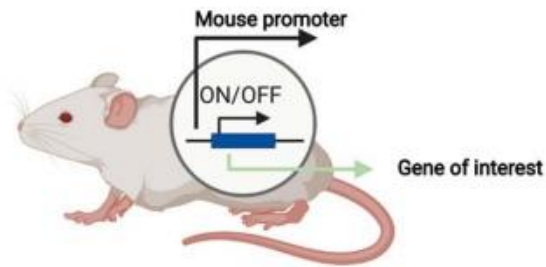
Отличие от Нокаута: Нокаут – это выключение гена. Нок-ин – это замещение (замена) или вставка (введение новой функции).

Основные типы Нок-ин:

- Замещение (Точечный Нок-ин): Замена одного нуклеотида в эндогенном гене для создания специфической мутации, моделирующей заболевание человека (например, мутации при кистозном фиброзе).
- Вставка репортерного гена: Встраивание гена-маркера (например, GFP – зеленого флуоресцентного белка) под контроль естественного промотора целевого гена. Это позволяет отследить, где и когда экспрессируется исходный ген.

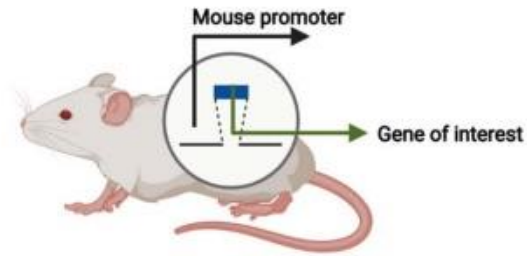
Технология: Преимущественно используется система CRISPR/Cas9 с донорской матрицей ДНК. Донорская матрица используется для направленного встраивания нового фрагмента путем гомологично направленной репарации (ГНР).





Conditional Knock-in/out

A gene of interest can be inactivated in specific cell types in a certain tissue. You control where and when your target gene is knocked out.

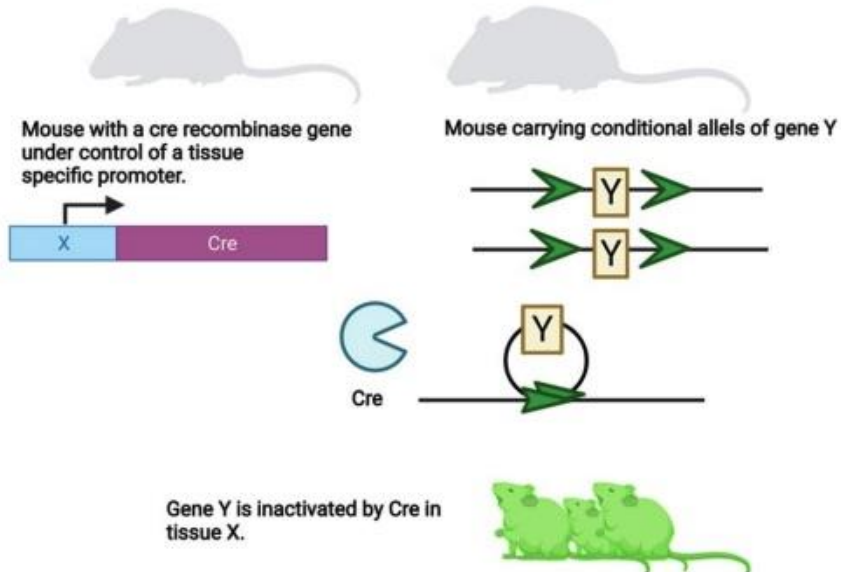


Constitutive/Conventional Knock-in/out

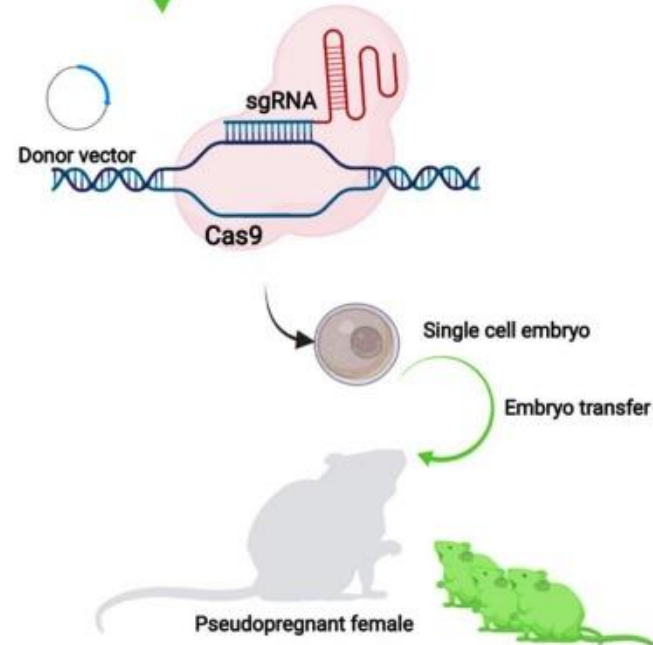
Insertion of an exogenous gene in a mouse gene locus of interest. Target gene is knocked-in/ out in all tissues at all times.

Reporter gene
Knock-in/ out:
Transgenic
Mice Models

Cre- loxP Mice Models



CRISPR Knock-in Models



- Уже успешно используются овцы с вполне обычной внешностью, которые вырабатывают молоко, содержащее *фермент химозин*. В молокоперерабатывающей отрасли он очень важен для производства твёрдых сыров.



- В Англии существует большое стадо генномодифицированных коров, продуцирующих молоко с идеальным составом для производства сыра «Чеддер», который так высоко ценится в мире.
- Созданы коровы, в молоке которых значительно снижено содержание веществ, способных вызвать аллергические реакции у потребителей.
- С помощью генной инженерии созданы также свиньи, у которых добавлен геном, кодирующий выработку пищеварительного фермента *фитазы*.





- получены трансгенные рыбы нескольких видов, в генетический код которых добавлен ген, кодирующий повышенный синтез соматотрофного гормона (гормона роста), благодаря чему рыба растёт быстрее и вырастает крупнее своих обычных размеров.

- Рекомбинантная вакцина при введении ее в организм принесет ДНК фибера в клетку, выработка вирусного белка спровоцирует синтез специфических антител, т. е. вызовет иммунный ответ. Достоинством таких вакцин является очень маленький объем – для иммунизации одной мыши достаточно (10-50) мкг плазмиды, одной коровы – (200-300) мкг. Плазмида сохраняется в организме до 1 года.



Препарат «**Спутник V**» состоит из двух компонентов, в состав каждого из которых входит рекомбинантный аденовирусный вектор на основе аденовируса человека

ЛИТЕРАТУРА

I. Фундаментальные Учебники по Молекулярной Биологии и Генетике

1. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рафф М., Робертс К., Уотсон Дж. *Молекулярная биология клетки*. (В 3-х томах). Перевод с английского. **5-е или 6-е издание**. Москва: Лаборатория знаний (ранее БИНОМ). Год выпуска: **2013–2020**.
2. Уотсон Дж. Д., Бекер Т. А., Майерс Р. А., Уейнер А. М. *Молекулярная биология гена*. (Перевод с английского). **7-е издание** или более позднее. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний. Год выпуска: **2014–2020**.
3. Пирс Б. Э. *Генетика*. (Перевод с английского). Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний. Год выпуска: **2005** (и последующие переиздания).

II. Специализированные Источники по Генной Инженерии и Биотехнологии

4. Глик Б. Р., Пастернак Дж. Дж. *Молекулярная биотехнология. Принципы и применение*. (Перевод с английского). **2-е или 3-е издание**. Москва: Мир. Год выпуска: **2002–2014**.
5. Щелкунов С. Н. *Генетическая инженерия*. Учебное пособие. Москва: РИЦ НГУ / ИНФРА-М. Год выпуска: **2004** (и последующие переиздания).
6. Льюин Б. *Гены X*. (Перевод с английского). Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний. Год выпуска: **2011–2017**.