



Міністерство освіти і науки України

**ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет енергетики, робототехніки та
комп'ютерних технологій**

**Кафедра електромеханіки, робототехніки,
біомедичної інженерії та електротехніки**

**БІОІНЖЕНЕРНІ МЕТОДИ ОТРИМАННЯ І ЗАСТОСУВАННЯ
ТРАНСГЕННИХ ТВАРИН**

**Методичні вказівки
до виконання практичної роботи**

**для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти денної та
(заочної) форми навчання, спеціальності
163 «Біомедична інженерія»**

**Харків
2023**

Міністерство освіти і науки України
ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет енергетики, робототехніки та комп'ютерних технологій
Кафедра електромеханіки, робототехніки, біомедичної інженерії та
електротехніки

БІОІНЖЕНЕРНІ МЕТОДИ ОТРИМАННЯ І ЗАСТОСУВАННЯ
ТРАНСГЕННИХ ТВАРИН

Методичні вказівки
до виконання практичної роботи

для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти денної та
(заочної) форми навчання, спеціальності
163 «Біомедична інженерія»

Затверджено
рішенням науково-методичної
ради факультету ЕРКТ
Протокол № 3 від 22 лютого 2023 р.

Харків
2023

УДК 636.082 : 575.113

Схвалено
на засіданні кафедри електромеханіки, робототехніки, біомедичної інженерії
та електротехніки
протокол № 1
від 31 серпня 2022 р.

Рецензент:

О.М. Мороз, д-р тех. наук, проф. кафедри електропостачання та енергетичного менеджменту, Державний біотехнологічний університет.

Біоінженерні методи отримання і застосування трансгенних тварин : метод. вказівки до виконання практ. роботи для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти денної (заочної) форми навч., спец. 163 «Біомедична інженерія» / Державний біотехнологічний університет ; уклад.: В. О. Шигимага. – Харків : [б. в.], 2023.– 30 с.

Методичні вказівки включають практичну роботу та список літератури. Матеріал розкриває сутність різних біоінженерних методів і технологій щодо отримання трансгенних тварин, напрямки і перспективи їх застосування в тваринництві, біомедицині та ін.

Видання призначене здобувачам першого (бакалаврського) рівня вищої освіти денної форми навчання спеціальності 163 Біомедична інженерія.

Відповідальний за випуск: В.О. Шигимага, д. т. н., проф.

© Шигимага В.О., 2023

© ДБТУ, 2023

Практична робота № 1

Біоінженерні методи отримання і застосування трансгенних тварин

1. Мета роботи: Ознайомити студентів з основними методами отримання трансгенних тварин; розглянути переваги та недоліки генно-інженерних методів, розглянути проблеми, що виникають в процесі створення трансгенних тварин, а також перспективи їх застосування.

2. Введення. Загальні відомості.

Сучасні методи селекції сільськогосподарських тварин базуються на використанні внутрішньовидової генетичної мінливості. Як правило, види генетично ізольовані один від одного і не схрещуються між собою, так як цьому перешкоджає репродуктивна ізоляція. У класичній селекції, де використовують для схрещування тварин зі статевою сумісністю, не можна застосовувати міжвидову генетичну мінливість і створювати нові генетичні форми, так як рекомбінація генів відбувається тільки між хромосомами тварини одного виду. Подолати біологічні межі видів і використовувати міжвидову генетичну мінливість для створення нових генотипів тварин можна за допомогою біотехнологічних методів і процесів перенесення генів.

Під перенесенням чужорідного гена розуміють пересадку *in vitro* певної конструкції гена в клітини іншої тварини незалежно від її видової приналежності. Якщо конструкція гена інтегрувалася в геном іншої тварини, то такий ген позначається, як трансген. Кодований трансгеном білок носить назву трансгенного продукту. Тварина, яка містить в своєму геномі трансген, називається трансгенною. Якщо тварини передають трансгени своїм нащадкам, то утворюються родинні групи трансгенних тварин – трансгенні лінії.

Трансгенні або генетично модифіковані організми (ГМО) – організми, постійний генетичний матеріал яких був змінений методами генної інженерії,

що входять в комплекс сучасних біотехнологій. Ці методи широко відомі, так само, як технології рекомбінантних ДНК або молекулярне клонування. При використанні даних біотехнологій молекули ДНК з різних джерел комбінують в одну молекулу, утворюючи новий генний комплекс. Така нова молекула називається рекомбінантною ДНК. Впровадження різними методами рекомбінантної ДНК в живий організм перетворює його в генетично модифікований. При цьому рекомбінантні ДНК стають складовою частиною генетичного апарату реципієнтного організму і повідомляють йому нові унікальні генетичні, біохімічні, а потім і фізіологічні властивості. Така генетична модифікація, що проводиться, як правило, в наукових або господарських цілях для отримання бажаних якостей змінюваного організму, відрізняється цілеспрямованою зміною генотипу організму, на відміну від випадкових змін, характерних для природного і штучного мутагенезу.

Слід зазначити, що, як і в будь-якій новій галузі науки, в молекулярній біотехнології в даний час існує деяка термінологічна невизначеність. Так, якщо впровадження рекомбінантної ДНК відбувається в хромосому, такий організм, як правило, називають трансгенним. Організми, що несуть рекомбінантну ДНК на позахромосомних елементах, наприклад плазмідах, визначаються як рекомбінантні. У той же час деякі автори не проводять відмінностей між трансгенними і рекомбінантними організмами, а багато хто просто використовують більш загальний термін «генетично модифіковані організми».

Основи генної інженерії, як частини комплексу біотехнологій, були закладені в 1972 р., коли П. Берг отримав перші рекомбінантні ДНК, а С. Коен і Г. Бойер розробили методику перенесення функціонально активних гібридних молекул ДНК в бактеріальну клітину. Таким чином, було вперше здійснено перенесення функціональної одиниці спадковості з одного організму в інший і перед людством виникли широкі перспективи конструювання нових форм життя з корисними функціями.

Можливість конструювати нові гібридні молекули ДНК *in vitro* виникла завдяки зробленим в середині ХХ ст. відкриттям, таким як встановлення

комплементарної структури ДНК, механізму її реплікації і репарації, розшифровка генетичного коду, встановлення механізму перенесення генетичної інформації в клітині, механізмів роботи і регуляція генів та ін. Одним з найбільш значних відкриттів, які дозволили розвинути генно-інженерні технології, було ідентифікація і виділення рестрикційних ендонуклеаз, що здійснюють сайт-специфічне розщеплення ДНК. До цього відкриття не існувало відтвореного методу фрагментації ДНК.

Однак одним з перших відгуків наукового світу на створення нової технології була заборона на деякі біотехнологічні експерименти, що вважалися потенційно небезпечними. Переважали побоювання, що при конструюванні рекомбінантних ДНК випадково можливе створення організму з небезпечними властивостями. Згодом, з прийняттям інструкцій щодо забезпечення безпеки генно-інженерних робіт, багато обмежень були зняті, але до цих пір дискусії про потенційну небезпеку ГМО залишаються в центрі уваги суспільства.

На відміну від рослин, отримання трансгенних тварин – дуже складний і тривалий процес, тісним чином пов'язаний з досягненнями в області молекулярних і репродуктивних біотехнологій. Проте, сучасні методи і процеси біотехнології дозволяють забезпечити високу специфічність внесення змін в геном тварин. Це виводить на новий рівень роботи зі створення тварин-продуцентів рекомбінантних білків, в т.ч. для потреб фармацевтичної промисловості.

У світовій практиці вже отримані трансгенні тварини, що продукують з молоком цілий ряд лікарських речовин:

- фактори згортання крові проти гемофілії;
- тканинний плазменно-генний активатор, застосовуваний при лікуванні венозних тромбів і ураженні легеневої артерії;
- людський білок для запобігання утворення тромбів;
- моноклональні антитіла для лікування різних форм раку.

Отримані миші з генами гормону росту щура, ген вводився у вигляді розчину і складався з 353 нуклеотидів, вектором була рекомбінантна плазміда.

В результаті був отриманий 21 нащадок, у 7 мишей був виявлений чужорідний ген, жива маса їх була в 1,8 рази більше, ніж звичайних. Також отримані трансгенні вівці, кролики, корови і свині, шляхом введення гена гормону росту людини. В Росії створено ціле стадо трансгенних овець з генами великої рогатої худоби, які продукують з молоком химозин великої рогатої худоби. Це фермент, який застосовується при виробництві твердого сиру. Зазвичай його отримували з екстракту тканини шлунка новонароджених телят.

3. Основні напрямки досліджень при отриманні трансгенних тварин:

1. Створення нових порід з підвищеним вмістом деяких компонентів (білків, ферментів і т. п.)
2. Створення тварин, які здатні синтезувати невласиві їх виду білки. (Наприклад, свині, які можуть продукувати інтерферон людини).
3. Створення трансгенних тварин-донорів для трансплантації органів людині.

Визначення.

Трансгенез (трансгеноз) – перенесення генів.

Трансгенні тварини – тварини, які отримані в результаті перенесення в їх геном чужорідних генів від інших видів тварин або людини.

Гени, які використовуються для перенесення, виділяють з певного геному або синтезують штучно.

4. Методи та технології отримання трансгенних тварин.

На відміну від рослин, де існує можливість отримання цілого фертильного організму з однієї трансформованої соматичної клітини і вегетативне розмноження, отримання трансгенних тварин – дуже складний і тривалий процес.

Отримання трансгенних тварин включає наступні технологічні стадії:

1. Створення генної конструкції. Вибір, отримання та клонування чужорідного гена.
2. Мікроін'єкція клонованого гена в ядро заплідненої яйцеклітини. Зазвичай ген вводять в чоловічий пронуклеус.

3. Трансплантація зиготи реципієнту. Запліднені яйцеклітини з екзогенною ДНК імплантують в реципієнтну жіночу особину, яка народжує трансгенний організм.

4. Селекція трансгенних організмів. Відбирають нащадків, що розвинулися з імплантованих зигот, які містять клонований ген у всіх клітинах.

5. Схрещують тварин, які несуть клонований ген в клітинах зародкової лінії, і отримують нову генетичну лінію.

Експерименти з генетичної модифікації багатоклітинних організмів шляхом введення в них трансгенів вимагають багато часу. Проте, трансгенез став потужним інструментом для дослідження молекулярних основ експресії генів ссавців і їх розвитку, для створення модельних систем, що дозволяють вивчати хвороби людини, а також для генетичної модифікації клітин молочних залоз тварин з метою отримання з молоком важливих для медицини білків. Був навіть запропонований новий термін "фармінг" (pharming), що відноситься до процесу отримання з молока трансгенних домашніх тварин автентичних білків людини або фармацевтичних препаратів. Використання молока доцільно тому, що воно утворюється в організмі тварини у великій кількості і його можна надоювати в міру потреби без шкоди для тварини. Новий білок, що виробляється молочною залозою і секретується в молоко, не повинен при цьому надавати ніяких побічних ефектів на нормальні фізіологічні процеси, що протікають в організмі трансгенної тварини, і піддаватися посттрансляційним змінам, які, принаймні, близькі до таких в клітинах людини. Крім того, його виділення з молока, яке містить і інші білки, не повинно становити великих труднощів.

Незважаючи на те, що перші трансгенні сільськогосподарські тварини були отримані в 1985 р введенням екзогенної ДНК в пронуклеус зигот, до теперішнього часу не розроблено надійного та ефективного методу, який би міг бути використаний для створення генетично модифікованих тварин незалежно від виду і від цілей експерименту. Розробка нових ефективних методів перенесення генів в ембріональні і соматичні клітини тварин, а також

вдосконалення існуючих підходів залишається актуальним завданням.

Основні генно-інженерні методи перенесення генів.

Трансгенними називають тварин зі зміненою спадковістю, яка викликана включенням в їх геном чужорідних генів за допомогою різних генно-інженерних методів. Серед великої різноманітності **методів впровадження екзогенної ДНК в геном тварини** можна виділити основні:

- мікроін'єкція в пронуклеус зиготи;
- опосередкований ретровірусами перенесення генів;
- використання модифікованих ембріональних стовбурових клітин;
- перенесення трансформованих ядер генеративних і соматичних клітин, використання сперміїв і сперматогоніїв, як переносників ДНК (мимовільне поглинання екзогенної ДНК, введення ДНК в сперматозоїди, введення в насінні каналці дорослих тварин).

Серед інших методів доставки екзогенної ДНК в організм тварин можна відзначити використання ліпосом, аденовірусних векторів, а також метод високошвидкісної ін'єкції. Однак ці методи не знайшли широкого застосування внаслідок їх недостатньої стабільності, а також відсутності інтеграції трансгену в геном.

Мікроін'єкції рекомбінантної ДНК в запліднені ооцити багатоклітинних тварин поки залишаються найбільш популярним методом введення чужих генів в організм тварин. Незважаючи на те, що метод вимагає високої кваліфікації і дорогого обладнання, простота і надійність окупають всі його недоліки.

Першою і найбільш добре розробленою експериментальною системою для отримання трансгенних тварин стала миша. Донорних самок мишей з експериментальною суперовуляцією схрещують з самцями-виробниками, через 12 годин виділяють запліднені яйцеклітини і поміщають їх в культуру. Далі в більший з їх двох пронуклеусів (зазвичай чоловічий) ін'єктують рекомбінантну ДНК, рис. 1.

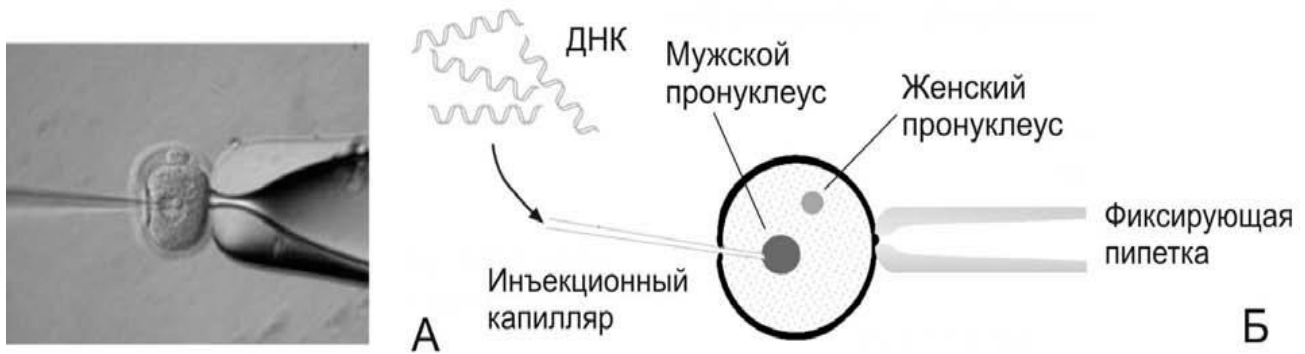


Рис. 1. Мікроін'єкція екзогенної ДНК в пронуклеус заплідненої яйцеклітини ссавців під мікроскопом (а) і схема експерименту (б).

Яйцеклітини, що пережили ін'єкцію, пересаджують самкам-реципієнтам. Тільки частина трансплантованих ооцитів продовжує розвиватися до народження мишат.

На частоту інтеграції екзогенної ДНК при використанні методу мікроін'єкції впливають такі фактори, як чистота зразка, що вводиться, форма і концентрація ДНК, склад буферного розчину для мікроін'єкції, якість ембріонів, а також спосіб пересадки ембріонів реципієнтам (нехірургічний, хірургічний, лапароскопічний). Трансгенних тварин в потомстві ідентифікують різними методами, найчастіше ПЛР, і схрещують для отримання трансгенних ліній. Деякі з трансгенних тварин виявляються мозаїчними (статеві клітини не містять екзогенної ДНК), тому при схрещуванні трансгенним виявляється менша частина потомства першого покоління, ніж розрахункові 50%. У ряді випадків гомозиготні лінії отримати не вдається, оскільки 5-15% трансгенних включень в гомозиготному стані летальні, так як включення іноді порушує життєво-важливі частини генома.

Точний механізм, що забезпечує інтеграцію ін'єктованої ДНК в хромосоми клітини-мішені, невідомий, проте аналіз структури вбудованої ДНК дозволяє виявити деякі моменти. Інтеграція відбувається випадковим чином в один хромосомний локус, який може містити від одного до декількох тисяч

тандемних копій інтегрованої ДНК. Близько 30% отриманих первинних трансгенних тварин, як правило, виявляють ту чи іншу ступінь мозаїчності, що може бути наслідком інтеграції екзогенної ДНК після завершення першого циклу реплікації.

Ступінь інтеграції екзогенної ДНК в геном, тобто число трансгенних тварин від загального числа народжених тварин, при використанні методу мікроін'єкції в залежності від виду тварин коливається в незначних межах 5-15%. Найбільш важливим з урахуванням витрат, що вимагаються для отримання однієї трансгенної тварини, є показник загальної ефективності трансгенезу, який розраховується як відношення числа отриманих трансгенних тварин до загального числа пересаджених ембріонів, виражене у відсотках. Величина цього показника для ссавців також відносно постійна і становить в середньому від ~0,5% у свиней і корів до ~2% у мишей.

Ретровірусні вектори також використовуються для отримання трансгенних тварин. Інфікування передімплантаційних ембріонів рекомбінантними ретровірусами – відносно нескладна ефективна процедура. Восьмиклітинну морулу звільняють від прозорої оболонки і поміщають в культуральну чашку з фібробластами, що продукують рекомбінантний ретровірус, рис. 2.

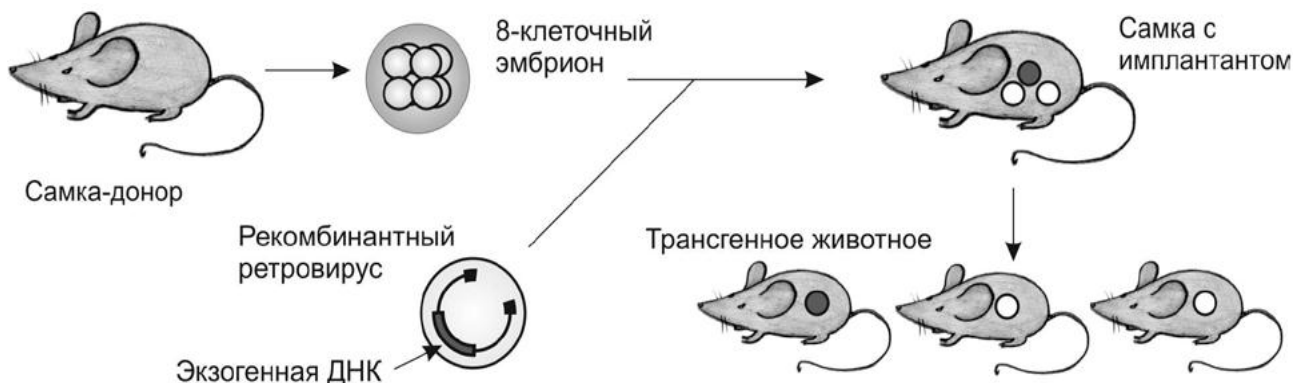


Рис. 2. Схема отримання лінії трансгенних мишей з використанням ретровірусних векторів.

Інфіковані ембріони, які досягли стадії бластоцисти, імплантують псевдовагітним самкам. В результаті формуються трансгенні організми, мозаїчні по числу і локалізації вбудованих рекомбінантної ДНК в геном. Тому для отримання чистих ліній далі необхідний масштабний аутбридинг. Недоліком методу є обмеження розміру вставки екзогенної ДНК, внаслідок чого трансген може виявитися позбавленим прилеглих регуляторних послідовностей, необхідних для його експресії, а в деяких випадках інтеграція у вихідний локус нестабільна.

Нові лентивірусні вектори (лентивіруси належать сімейству ретровірусів) показали дуже високу ефективність при доставці ДНК в ооцити і зиготи. Ін'єкція рекомбінантних лентивірусних конструкцій в перивітелліновий простір свинячих зигот і коров'ячих ооцитів призвело до появи потомства з найвищою на даний момент часткою трансгенних особин. У той же час лентивірусні вектори володіють усіма недоліками ретровірусних: малий розмір вставки екзогенної ДНК і множинна інтеграція в хазяйський геном, яка може привести до таких небажаних побічних ефектів, як активація онкогенів і інсерційний мутагенез. Крім того, для лентивірусних векторів спостерігається високий ступінь мозаїчності одержуваного трансгенного потомства і окремі факти сайленсінга (інактивації) лентивірусних рекомбінантних послідовностей в отриманих трансгенних лініях.

Використання ретровірусних векторів має і ще один великий недолік. Хоча ці вектори створюються так, щоб вони були дефектними по реплікації, геном штаму ретровірусу (вірусу-помічника), який необхідний для отримання великої кількості векторної ДНК, може потрапити в те ж ядро, що і трансген. Незважаючи на всі вжиті заходи, ретровіруси-помічники можуть реплікуватися в організмі трансгенної тварини, що абсолютно неприпустимо, якщо цих тварин передбачається використовувати в їжу або як інструмент для отримання комерційного продукту. І оскільки існують альтернативні методи трансгенезу, ретровірусні вектори рідко використовуються для створення трансгенних тварин, що мають комерційну цінність.

Модифіковані ембріональні стовбурові клітини можуть бути також використані для отримання трансгенних тварин. Клітини, виділені з мишачих ембріонів на стадії бластоцисти, можуть проліферувати в культурі, зберігаючи здатність до диференціювання в будь-які типи клітин, в тому числі і в клітини зародкової лінії, при введенні в інший ембріон на стадії бластоцисти, рис. 3.

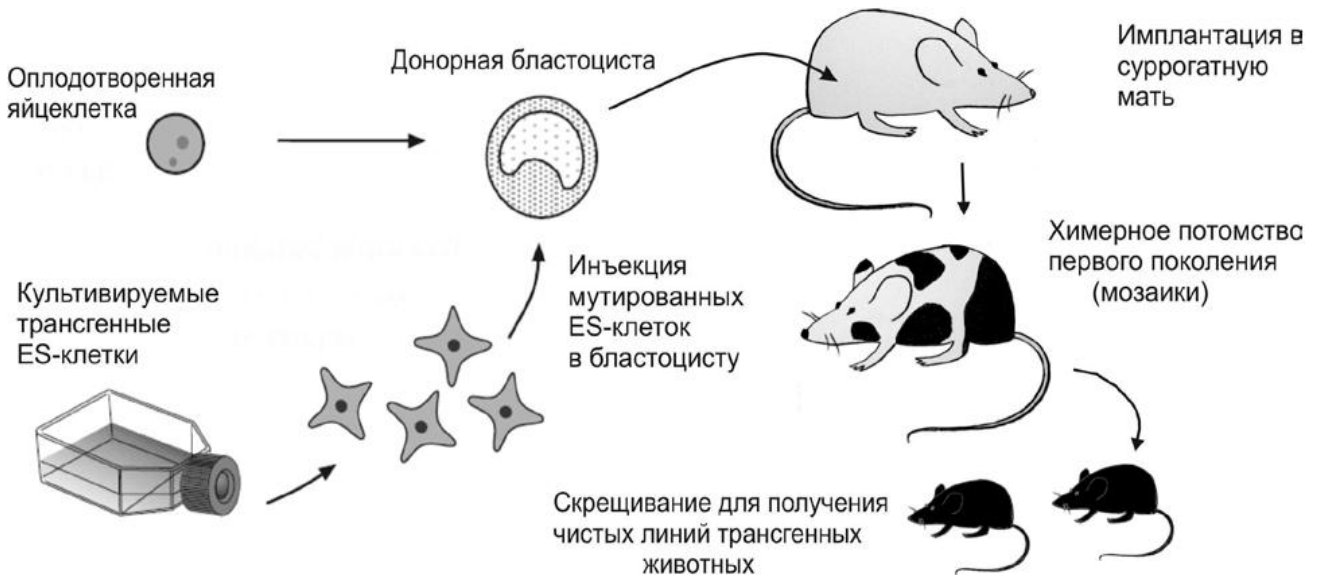


Рис. 3. Отримання трансгенних мишей методом реконструкції ембріонів за допомогою генетично модифікованих ембріональних стовбурових клітин (ES-клітин).

Такі клітини називаються **плюрипотентними** ембріональними стовбуровими клітинами (ES). ES-клітини отримують з внутрішньої клітинної маси бластоцисти миші. В ES-клітині в культурі можна ввести цільовий трансген різними методами (трансфекція, електропорація, ретровірусна інфекція і т.д.) без порушення їх плюрипотентності. Практична перевага цієї схеми полягає в тому, що вона дає великі можливості для проведення селекції клітин за певним параметром. Це може бути число копій трансгену, його локалізація або характер експресії. Знаючи послідовності, що оточують конкретний сайт для бажаної інтеграції, можна сконструювати вектор для

вбудовування цільової ДНК шляхом гомологічної рекомбінації. Наприклад, замінити який-небудь ген, який кодує ознаку, що легко ідентифікується, з метою селекції, прибравши або відновивши його функцію в отриманій трансгенній клітині. Таким же чином отримують так званих нокаутних мишей – (knock out) - мишей з направлено інактивованим певним клітинним геном для дослідження його функцій. Для здійснення гомологічної рекомбінації вектор конструюють з фрагментів цільового гена, який планується інактивувати, частина цільового гена при цьому замінюється яким-небудь селективним маркером для проведення відбору клітин з інтегрованою конструкцією. Відібрані трансгенні ES-клітини можна культивувати і використовувати для отримання трансгенних тварин. Це дозволяє уникнути випадкового вбудовування трансгену, характерного для методу мікроін'єкцій і ретровірусних векторних систем. Всі одержувані за такою схемою тварини є мозаїками, тому необхідна селекційна робота по отриманню чистих ліній. Проблему мозаїчності первинних трансгенних тварин можна подолати пересадкою ядер трансформованих ES-клітин в енуклеовані ооцити, які потім продовжують свій нормальний розвиток. В результаті в кожній клітині отриманого тваринного буде міститися трансген. На жаль, плюрипотентні ES-клітини, аналогічні мишачим, поки не виявлені у інших ссавців і птахів, але пошуки тривають.

Перенесення ядер трансформованих генеративних і соматичних клітин в яйцеклітину, або соматичний ядерний перенесення, ще один спосіб, який використовується в практиці трансгенезу. Було показано, що ядра ембріональних клітин різних тварин при перенесенні в енуклеювану (без ядра) яйцеклітину іноді здатні забезпечувати розвиток цілого нового організму. Після нетривалого культивування навіть ядра з деяких диференційованих клітин здатні забезпечувати розвиток до життєздатної особини. Так, наприклад, знаменита овечка Доллі була клонована в 1997 р. злиттям культивованих (3-6 пасажів) клітин епітелію молочної залози (вимені) дорослої шестирічної тварини з позбавленою ядра яйцеклітиною, рис. 4.

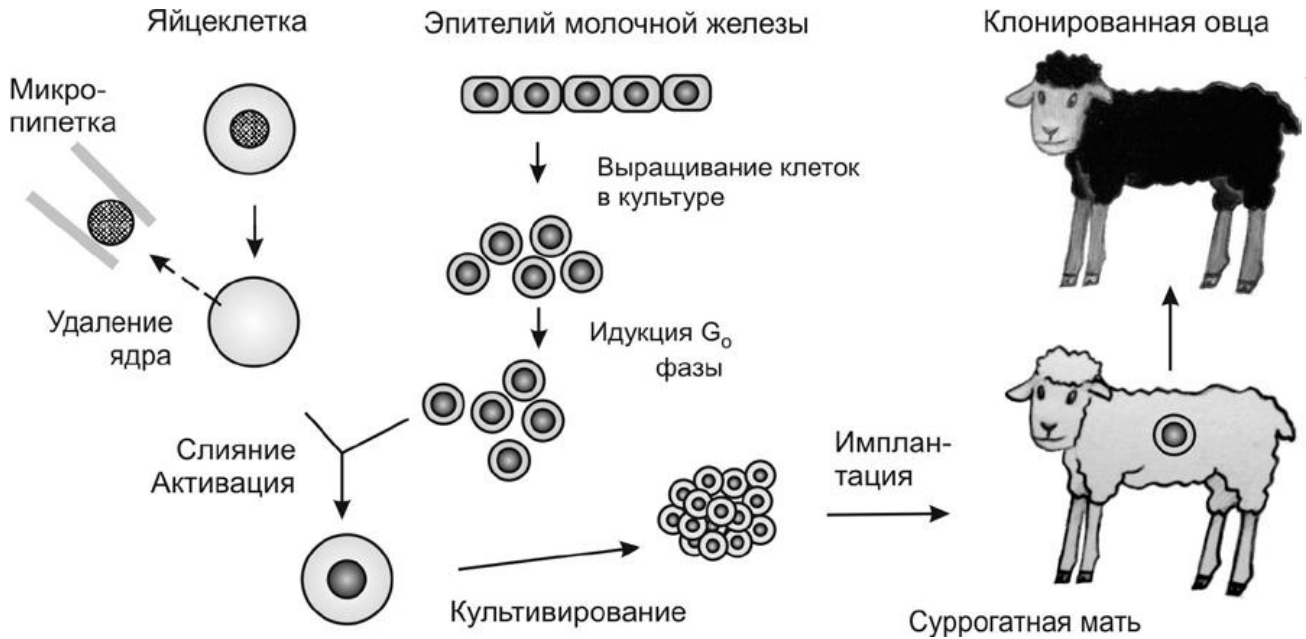


Рис. 4. Клонування вівці методом перенесення ядра.

Епітеліальні клітини молочної залози в культурі індукують для переходу в фазу G₀ (стадія, на якій знаходиться яйцеклітина). Потім здійснюють злиття такої клітини з енукейованою яйцеклітиною і вирощують ембріони до ранніх стадій ембріогенезу. Після чого ембріони імплантують в матку сурогатної матері, де відбувається подальший розвиток.

В експерименті Я. Вілмута (I. Wilmut) з клонування Доллі було проведено 277 злиттів без'ядерних яйцеклітин з клітинами молочної залози в фазі G₀. З 29 ембріонів, що вижили, тільки один розвинувся до життєздатного організму. Клонування Доллі з ядра диференційованої клітини і трьох інших овець з ядер ембріональних клітин вдалося здійснити завдяки перенесенню ядер з клітин, що знаходяться в стадії спокою (G₀), і, можливо, особливостям ембріогенезу цієї тварини. У зиготах овець протягом перших трьох поділів, що займають кілька діб, відбувається тільки реплікація ДНК, жоден з генів не експресується. Передбачається, що за цей час введена ДНК звільняється від специфічних для клітини регуляторних білків, а відповідні гени ембріонального розвитку зв'язуються з ініціаторними ембріональними білковими факторами з

цитоплазми яйцеклітини.

Хоча технологіям клонування ще дуже далеко до досконалості - клонована Доллі виявляла багато ознак передчасного старіння, це дуже багатообіцяюча технологія отримання трансгенних тварин. Навіть якщо є різні проблеми з першим поколінням, швидше за все, друге покоління не матиме недоліків, придбаних внаслідок використання «старого» ядра для яйцеклітини. Основна проблема, яку потрібно вирішити для того, щоб створення будь – яких трансгенних тварин за допомогою методу перенесення ядер стало реальним, - це збереження плюрипотентності клітин в безперервній культурі. В даний час ведуться активні пошуки факторів репрограмування диференційованих клітин для індукції плюрипотентності. Якщо це вдасться, то генетична зміна таких клітин і створення трансгенних організмів шляхом соматичного ядерного перенесення стане майже рутинною процедурою, а поки це поодинокі вдалі експерименти.

Штучні хромосоми людини (ШХЛ), містять цілком імуноглобуліновий локус людини з важкими і легкими ланцюгами, були впроваджені в бичачі фібробласти, які потім використовували для соматичного ядерного перенесення. Отримані транс-хромосомальні телята, що експресували імуноглобуліни людини в своїй крові. Ця система стала важливим кроком у напрямку тваринної продукції терапевтичних поліклональних антитіл людини. Подальші спостереження за трансгенними тваринами показали, що рекомбінантні ШХЛ підтримувалися в більшості особин першого покоління протягом декількох років. Чи будуть отримані штучні хромосоми відповідним чином розділятися в процесі мейозу і успадковуватися, ще тільки належить з'ясувати.

Незважаючи на розроблений широкий спектр методик отримання трансгенних тварин, в даний час поки відсутня надійна і ефективна технологія трансгенезу тварин. Найбільші проблеми пов'язані з безладним вбудовуванням екзогенної ДНК в геном при використанні більшості існуючих методів. Так що подальші якісні поліпшення технології необхідні в області розробки прицільної

модифікації клітинних генів і точного вбудовування екзогенної ДНК в геном. Тим більше, що геноми більшості господарсько важливих організмів до теперішнього часу повністю секвеновані і можна планувати майбутню структуру трансгенного організму. Поєднання повністю розшифрованих послідовностей геномів з методами адресної доставки екзогенної ДНК дозволить проводити цілеспрямоване конструювання трансгенних геномів із заздалегідь заданими властивостями.

5. Застосування трансгенних тварин.

Щодо застосування трансгенних тварин можна розділити на п'ять основних категорій:

- наукові моделі;
- моделі для вивчення хвороб людини;
- джерела для виробництва фармацевтичних препаратів;
- джерела ксенотрансплантантів (пересадки органів);
- джерела їжі.

Більшість з областей комерційного застосування трансгенних тварин в даний час знаходяться на ранніх етапах досліджень і розробки, за деякими винятками. Так, з 2004 р. в зоомагазинах деяких країн (США, Тайвань, Китай, Малайзія) продаються декоративні трансгенні рибки, забарвлення яких обумовлено присутністю флуоресцентних білків з коралів.

Важливою віхою в історії застосування трансгенних тварин став 2006 р., коли Європейське медичне агентство (the European Medicines Agency (EMA)) видало перший дозвіл на комерційне використання першого рекомбінантного білка з молока трансгенної тварини. Ним став рекомбінантний антитромбін III з комерційною назвою ATryn, який призначений для профілактичного лікування пацієнтів з вродженою антитромбіновою недостатністю.

Наукові моделі. Складність геному ссавців, тривалі періоди дорослішання і розмноження, труднощі вивчення великої кількості індивідуальних тварин з урахуванням варіювання ознак роблять генетичний аналіз цих систем скрутним. Трансгенна технологія несе в собі великі

можливості, в першу чергу, для фундаментальних досліджень принципів функціонування геномів і окремих генів. Наприклад, лінії нокаутних мишей, гомозиготних по спрямовано інактивованим генам, дозволяють вивчати детерміновані даними генами властивості на рівні організму. Регульовані системи експресії трансгенів дають можливість досліджувати тонкі механізми впливу продуктів того чи іншого гена на фізіологію і ембріональний розвиток тварин.

Модельні системи для вивчення хвороб людини. Використовуючи цілих тварин, можна моделювати виникнення патології, досліджувати її розвиток і способи лікування. І хоча дані, отримані на трансгенних моделях, не завжди можна екстраполювати на людину в медичних аспектах, вони дозволяють виявити ключові моменти етіології складної хвороби, її молекулярні основи і підказати шляхи лікування. В даний час на мишах змодельовані такі захворювання людини, як СНІД, хвороба Альцгеймера, артрит, м'язова дистрофія, гіпертонія, утворення пухлин, нейродегенеративні порушення, дисфункція ендокринної системи, серцево-судинні захворювання і багато інших. Отримана дрозофіла з хворобою Паркінсона.

Джерела для виробництва фармацевтичних білків. Існуючі методи отримання в культурах клітин рекомбінантних людських протеїнів для медичних цілей мають ряд істотних недоліків і жорстких законодавчих обмежень. Однією з особливостей таких медичних препаратів є їх вкрай висока ціна, обумовлена в тому числі високою вартістю клітинного культивування. Долаючи ці обмеження, велику кількість білків можна отримувати з молока трансгенних тварин, що несуть людські гени, відповідальні за вироблення певного протеїну, під контролем промоторів, специфічних для молочних залоз. Передбачається, що вихід може скласти до 35 г білка з одного літра молока при відносно невисокій вартості виробництва і очищення. Людські білки, секретовані в молоко, глікозилуються відповідним чином і володіють активністю, близькою до нативних білків людини.

Експресія трансгенів в клітинах молочних залоз овець і кіз не чинила

ніяких побічних дій ні на самок в період лактації, ні на відгодовуване потомство. В даний час численні білки отримані у великих кількостях ефективною секрецією в молоко трансгенних мишей, кроликів, овець, свиней, кіз і корів.

Таблиця. Терапевтичні білки з молока трансгенних тварин

Продукт	Компанія	Тварина
АТруп, рекомбінантний анти-тромбін III людини	GTC Biotherapeutics	Коза
С1 естеразний інгібітор	Pharming	Кролик
ММ-093 (AFP), альфа-фетопротеїн	Merrimack and GTC Biotherapeutics	Коза
Альфа-глюкозидаза	Pharming	Кролик
Людський гормон росту	BioSidus	Корова
Альбумін GTC	Biotherapeutics	Корова
Фібриноген	Pharming	Корова
Колаген	Pharming	Корова
Альфа-1-антитрипсин	Pharming	Корова
Лактоферрин	GTC Biotherapeutics	Коза
Малярійна вакцина	GTC Biotherapeutics	Коза

Першим препаратом з молока став АТруп (людський антитромбін III), який в 2006 р. після 3-ї фази клінічних випробувань був зареєстрований як ліки в Європейському Союзі. Успішна реєстрація препарату АТруп продемонструвала правильність такого підходу до продукції терапевтичних білків і полегшила шлях на ринок іншим рекомбінантним препаратам з молока трансгенних тварин, а також стимулювала наукову і комерційну активність в даній області.

Іншим джерелом продукції рекомбінантних білків є кров трансгенних тварин. Отримані трансгенні бички, що продукують біспецифічні антитіла людини в своїй крові. Ці антитіла після очищення з сироватки були дуже

стабільні і відповідним чином стимулювали Т-клітинне знищення ракових клітин.

Отримання трансгенних курчат відкрило можливість використовувати яйця, що містять чимало запасних білків для накопичення потрібних рекомбінантних білків – активних компонентів лікарських засобів. В цьому випадку білки можна отримувати у великих кількостях, а їх виробництво буде дешевим, так як сировиною для цього є всього лише пташиний корм.

В Інституті Рослін, де була клонована Доллі, розроблені 2 лінії трансгенних курей з перспективою на комерційне застосування. Одна з ліній несе яйця з антитілами в яєчному білку, за допомогою яких можна буде лікувати злоякісну меланому – форму раку шкіри, інша виробляє людський інтерферон, який може бути використаний для зупинки внутрішньоклітинного розмноження вірусів. Дозвіл на клінічні випробування препарату проти раку на основі курячих яєць вже отримано. В даний час тривають роботи по збільшенню виходу рекомбінантних білків, як на стадії виробництва, так і на стадії очищення.

Щоб забезпечити рекомбінантні продукти, керівництво, розроблене в США та Європейському Союзі для отримання ГМ-тварин, вимагає контролювати здоров'я трансгенних тварин, перевіряти коректність отриманих трансгенних конструкцій, характеризувати очищений рекомбінантний білок, а також провести нову трансгенну лінію через кілька поколінь. У Росії та інших країнах також ведуться розробки в області отримання трансгенних тварин для біопродукції важливих білків. Наприклад, існує державна програма, націлена на створення фармакологічного виробництва людського лактоферину шляхом секреції в молоко кіз. Сильні антибактеріальні властивості лактоферину, що міститься в грудному молоці, захищають новонароджених дітей від інфекцій, тому отримання молока з лактоферрином у великих кількостях може стати новою галуззю виробництва дитячого харчування.

Трансгенні тварини як джерела ксенотрансплантантів для людини.

Хронічний дефіцит людських органів для трансплантації змушує вчених

шукати інші альтернативні джерела тканин. Тільки в США в базі даних на 2006 р. зареєстровано понад 80 тис. чол., які потребують пересадки органів. Вирішенням цієї проблеми могла б бути пересадка людині органів тварин. Так, наприклад, органи свині підходять людині за своєю будовою, розміром і багатом біохімічними показниками, але такі пересадки неможливі, так як ці органи будуть негайно відторгнуті імунною системою пацієнта.

В даний час ряд дослідницьких центрів працюють над виведенням генетично модифікованих свиней, органи яких можуть бути використані для трансплантації. Необхідними умовами для успішної ксенотрансплантації є:

- 1) подолання імунологічних бар'єрів (гістосумісність),
- 2) недопущення перенесення патогенів від донорної тварини людині,
- 3) анатомічна і фізіологічна сумісність донорного органу з людським.

За допомогою соматичного ядерного перенесення отримані тварини, у яких супресований поки перший імунологічний бар'єр – реакція відторгнення негайного типу (гіперактивне відторгнення). ГМ-свині синтезували людські регулятори комплементу та/або не мали генів, що кодують фермент, відповідальний за вироблення на поверхні клітин свині вуглеводних антигенів, які призводять до гіперактивного відторгнення. Перші експерименти з пересадки свинячих трансгенних нирок і серця нелюдським приматам (павіани) з імунною супресією показали відсутність реакції відторгнення негайного типу, але виживання пересаджених органів становила всього 2-6 місяців. Роботи з отримання свиней-ксенотрансплантерів з множинними трансгенами, критичними для подолання інших імунологічних бар'єрів, тривають.

Недавні дослідження показали, що ризик передачі людині свинячих ретровірусів надзвичайно малий, це відкриває шлях для доклінічних випробувань свинячих ксенотрансплантантів. Крім того, цей факт дозволяє використовувати свинячий ендогенний ретровірус як вектор для ефективної доставки екзогенної ДНК в клітини. Після селекції такі клітини можуть стати родоначальниками трансгенних свиней-ксенотрансплантерів, отриманих соматичним ядерним перенесенням. Також в рамках програми отримання

свиней для трансплантації кілька компаній займаються виведенням порід свиней з розмірами органів, близькими до людських. Слід зазначити, що, незважаючи на багаторічні дослідження, пересадка людині органів свині все ще є віддаленим проектом.

Трансгенні тварини, що служать джерелом їжі, ще далекі від комерційного використання, хоча дуже багато різних варіантів вже створено. Наприклад, в геном свиней вдалося вбудувати кілька генів, що прискорюють зростання, які також впливають на якість м'яса, роблячи його більш пісним і ніжним. Ця робота розпочата більше 10 років тому, проте в силу певних негативних морфологічних і фізіологічних змін, що спостерігалися у тварин, цей варіант не був комерціалізований. Швидше за все, негативні зміни в даних трансгенних свинях були обумовлені недосконалістю використаної генетичної конструкції, так що роботи в цьому напрямку тривають.

Запропоновано також велику кількість модифікацій молока великої рогатої худоби, що полягають в додаванні нових білків або в маніпуляціях над ендогенними протеїнами. Наприклад, були створені тварини, що продукують молоко для дитячого харчування, за своїм складом максимально наближене до материнського молока людини. Інший приклад - нещодавно вчені з Нової Зеландії отримали корів з підвищеним вмістом в молоці казеїну. Використання такого молока має підвищити продуктивність сироварного виробництва. Ще кілька груп дослідників працюють над зниженням вмісту в молоці лактози. Кінцевою метою є створення молока, придатного для вживання в їжу людьми з лактозною непереносимістю.

Поки ближче всіх на шляху до комерціалізації знаходяться фітазні трансгенні свині (екосвині), метою створення яких було різке зменшення гнойового забруднення навколишнього середовища. Ця лінія несе ген бактеріальної фітази під транскрипційним контролем тканеспецифічного промотору слинних залоз. Секретована рекомбінантна фітаза дозволяє свиням розщеплювати рослинні фітати (інозитол гексафосфат, ІГФ – найбільш поширена нерозчинна форма органічного фосфору ґрунту), що зменшує вихід

забруднюючих навколишнє середовище фекальних токсичних сполук фосфору (до 75 %). Очікується вихід цих свиней на ринок в наступні кілька років.

Це також стосується багатьох важливих біомедичних продуктів, таких як фактори згортання крові та антитіла, які в даний час не мають іншої альтернативи, ніж продукти в тваринних клітинах. Підтвердженням необхідності трансгенних організмів є бурхливе зростання біотехнологічних ринків в останні роки. У майбутньому очікується велика кількість протипухлинних препаратів у поєднанні зі значною незадоволеною потребою в них.

Таким чином, створення трансгенних тварин може вирішити багато проблем сучасного суспільства.

6. Завдання для практичної роботи.

1. Намалювати різні схеми отримання трансгенних тварин

(рис. 5, рис. 6):

2. На підставі малюнків 5 і 6 пояснити дані способи отримання трансгенних тварин.

3. Вивчити та доповісти методику отримання трансгенних тварин із заданими ознаками:

1. Вибір і клонування гена для трансгенезу.

2. Ін'єкція клонованого гена в ядро заплідненої яйцеклітини.

3. Культивування яйцеклітини до стадії передімплантаційного ембріона.

4. Трансплантація ембріона в реципієнтну жіночу особину.

5. Відбір нащадків, що розвиваються з ембріонів, які мають клонований ген у всіх клітинах.

6. Схрещування тварин, що несуть клонований ген в клітинах зародкової лінії.

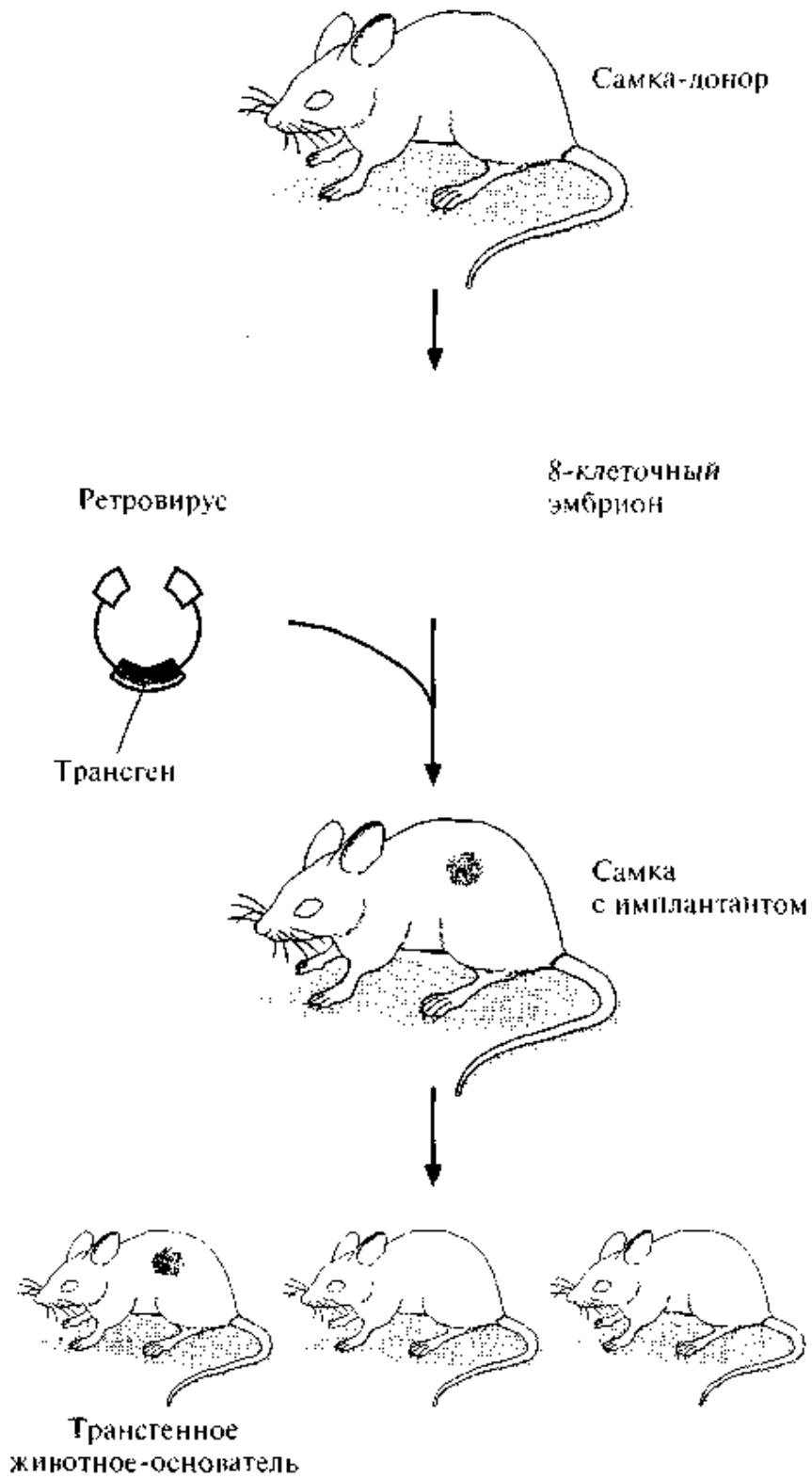


Рис. 5. Отримання трансгенних мишей з використанням ретровірусних векторів.

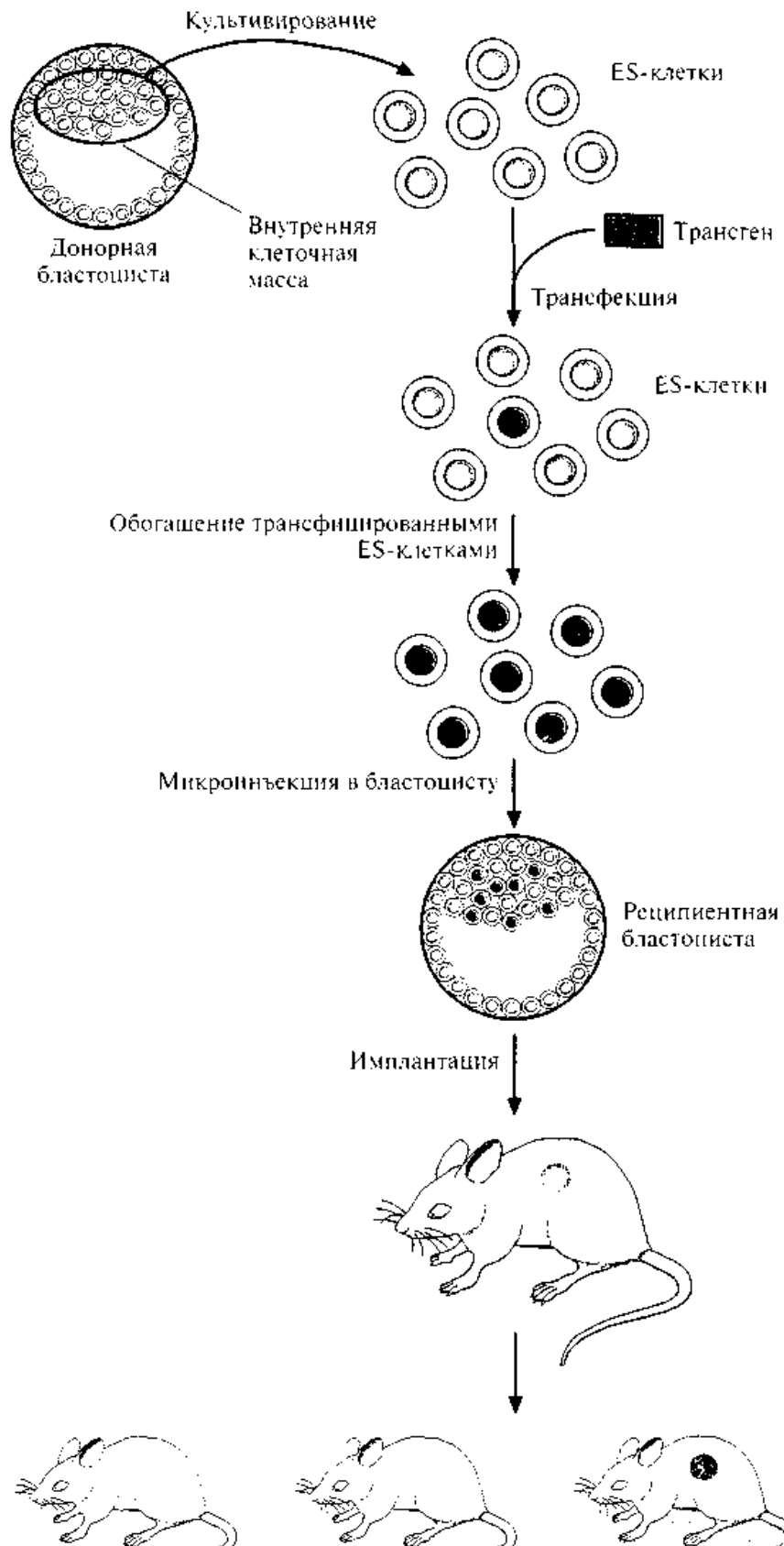


Рис. 6. Отримання трансгенних мишей за допомогою генетичної модифікації ембріональних стовбурових (ES) клітин.

Завдання для самоконтролю:

1. Охарактеризувати методи отримання трансгенних тварин. Їх переваги та недоліки.
2. Напишіть послідовність і основні стадії створення трансгенних тварин.
3. Записати процедуру отримання трансгенних тварин методом мікроін'єкції. Замалювати спрощену схему.
4. Перерахувати біологічні особливості, характерні для трансгенних тварин.
5. Записати процедуру отримання трансгенних тварин з використанням ретровірусів.
6. Перерахуйте основні методи отримання трансгенних тварин.
7. Вкажіть переваги генної інженерії над традиційною селекцією при вдосконаленні порід сільськогосподарських тварин.

Питання для самоконтролю:

1. Які біологічні властивості характерні для трансгенних тварин?
2. Для яких цілей отримують трансгенних тварин?
3. Яких тварин називають трансгенними?
4. Які переваги мають трансгенні тварини в порівнянні з рекомбінантними мікроорганізмами в отриманні цінних фармакологічних речовин?
5. Які недоліки використання ретровірусних векторів?
6. Які переваги використання ретровірусних векторів?
7. У чому суть методу мікроін'єкції?
8. У чому суть використання ембріональних стовбурових клітин для трансгенезу?

Рекомендована література

1. Герасименко, В.Г. Биотехнология / В.Г. Герасименко. – Киев: Выща школа, 1989. – 324 с.
2. Завертяев, Б.П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота / Б.П. Завертяев. – Москва: Агропромиздат, 1989. – 255 с.
3. Основы генетической инженерии и биотехнологии / Ю. А. Горбунов [и др.] – Гродно, 2009. – 646 с.
4. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха [и др.] – М.: Высшая школа, 2003. – 709 с.
5. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Д. Пастернак. – М. : Мир, 2002.
6. Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К., Брем Г. Трансгенные животные и возможности их использования: молекулярно-генетические аспекты трансгенеза в животноводстве // Дубровицы, 2003, 128 с.
7. Niemann, H. Transgenic farm animals: an update / H. Niemann, W. Kues // *Reproduction, fertility and development*. – 2007. – V. 19. – P. 762–770.
8. Бондарук В.В., Захарченко В.И., Беляева Р.Х. и др. // Генноинженерные сельскохозяйственные животные, Москва, 2005, 165с.
9. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс] : электрон. учеб. пособие / Н. А. Войнов, Т. Г. Волова, Н. В. Зобова и др. ; под науч. ред. Т. Г. Воловой. – Красноярск : ИПК СФУ, 2009.

Додаткові джерела

1. Жимулев, И. Ф. Общая и молекулярная генетика / И. Ф. Жимулев // Новосибирск : Наука, 2003.
2. Патрушев, Л. И. Искусственные генетические системы / Л. И. Патрушев. – М. : Наука, 2005. – Т. 1.
3. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия / С. Н. Щелкунов ; Новосиб. гос. ун-т. – Новосибирск, 2004. – 496 с.
4. Никитин В.А. Методы введения веществ и органелл в клетку в

технологиях клеточной инженерии // Цитология. – 2007. – Т. 49. – № 8. – С. 631–641.

5. Кочетов А. В. Генная инженерия растения // Природа. – 2007. – № 6.

6. Кузьмина, Н. А. Основы биотехнологии [Электронный ресурс] – Режим доступа : www.biotechnolog.ru.

7. Семенова, М.Л. Зачем нужны трансгенные животные // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7. – № 4. – С. 13–20.

8. Kind, A. Animal pharming, two decades on / A. Kind, A. Schnieke // Transgenic research. – 2008. – V. 17(6). – P. 1025–1033.

9. Protocols and applications guide. Chapter 12: Transfection [Электронный ресурс], 2007. – Режим доступа : www.promega.com.

**БІОІНЖЕНЕРНІ МЕТОДИ ОТРИМАННЯ І ЗАСТОСУВАННЯ
ТРАНСГЕННИХ ТВАРИН**

**Методичні вказівки
до виконання практичної роботи**

ШИГИМАГА Віктор Олександрович

Формат 60x84/16. Гарнітура Times New Roman
Папір для цифрового друку. Друк ризографічний.
Ум. друк. арк. 1,55 _____
Наклад 100 пр.
Державний біотехнологічний університет
61002, м. Харків, вул. Алчевських, 44