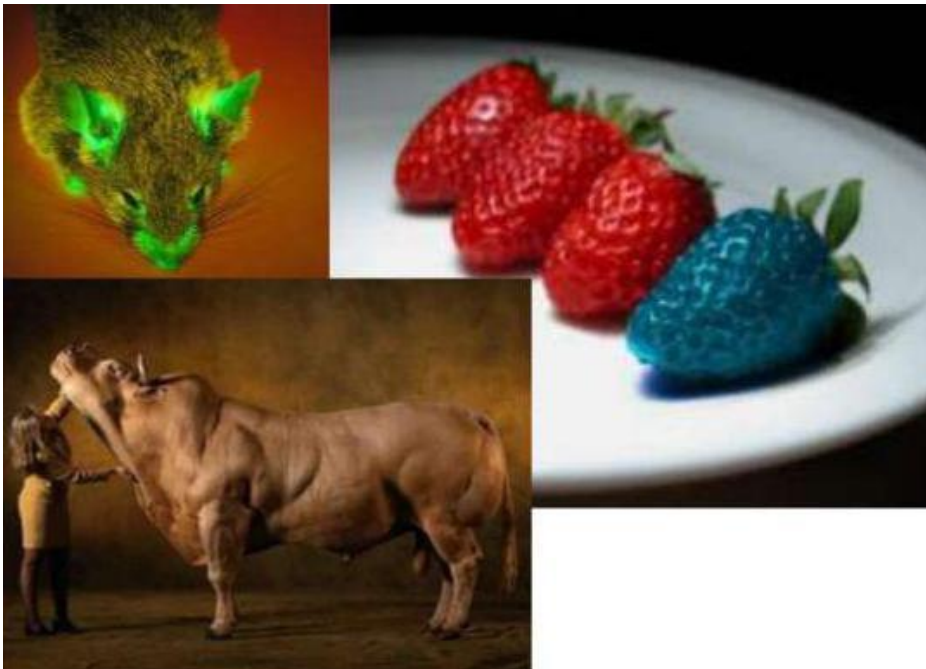


Молекулярное клонирование и трансгенные организмы



Туранов С.В.

ИНЦМБ ДВО РАН

Лаб. Молекулярной систематики

Осень 2021

Под **трансгенным организмом** (или **генетически модифицированным организмом, GMO**) принято понимать организм, который содержит **новый ген** (или **гены**), стабильно передающиеся потомству.

Трансген – ген, который был внесён в организм тем или иным способом. Должен включаться в заданное время, в нужном количестве и в соответствующем месте (органе, ткани) животного.

Ряд основных достижений в области трансгенеза животных

Год	Этапы трансгенеза	Страна
1985	Получение трансгенных кроликов, свиней и овец с помощью метода микроинъекций	США
1986	Клонирование эмбрионов овцы с помощью метода переноса ядер	Великобритания
1990	Синтез антитрипсина человека в молоке трансгенной мыши	Великобритания
1991	Получение трансгенных телят	Нидерланды
1991	Синтез антитрипсина человека в молоке трансгенной овцы	Великобритания
1992	Трансгенные свиньи, содержащие ген мыши, обеспечивающий устойчивость к вирусу гриппа	Германия
1994	Свиньи, синтезирующие ингибитор системы комплемента человека	США
1997	Клонирование овцы Долли с помощью переноса ядер в соматические клетки	Великобритания
1997	Трансгенные свиньи с мутациями в гене родопсина для моделирования пигментного ретинита человека	США
1998	Клонирование трансгенных телят	США
2000	Трансгенные овцы, полученные с помощью переноса ядер в соматические клетки	Великобритания
2001	Трансгенные свиньи (Enviro-pig™, «Экологически чистая свинья») с уменьшенным содержанием фосфора в навозе	Канада
2002	Трансгенные телята, продуцирующие иммуноглобулин человека	Япония
2003	Трансгенные коровы с увеличенным содержанием казеина в молоке	Новая Зеландия
2003	Получение свиней с нокаутом гена галактозилтрансферазы, участвующей в гипер-остром отторжении при ксенотрансплантации	США
2004	Получение коров с направленными нокаутами двух генов	США
2005	Трансгенные коровы, устойчивые к маститу, вызванному стафилококком	США

Многолетний искусственный отбор



watermelon



corn



banana



aubergine / eggplant



carrot



cabbage, kale, broccoli, etc.

Многолетний искусственный отбор



[<http://www.coolweirdo.com/huge-genetically-modified-bulls.html>]

Генетически модифицированные организмы



[<http://news.nationalgeographic.com/news/2010/03/100329-six-pack-mutant-trout-genetically-engineered-modified-gm/>]

Генетически модифицированные организмы



Эти атлантические лососи одного возраста, но...

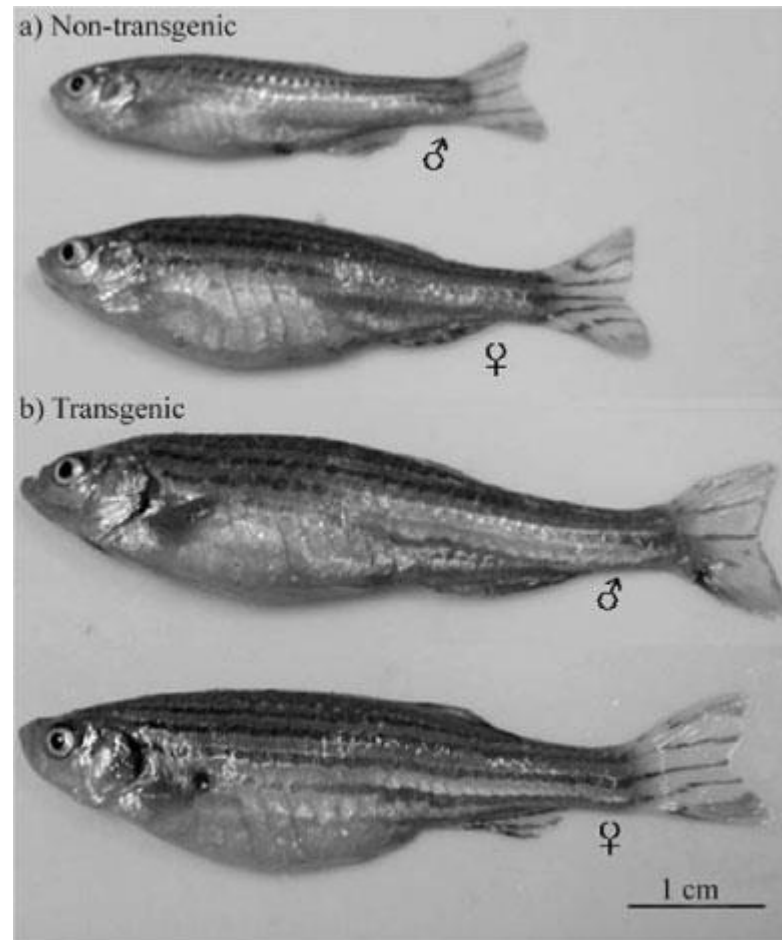
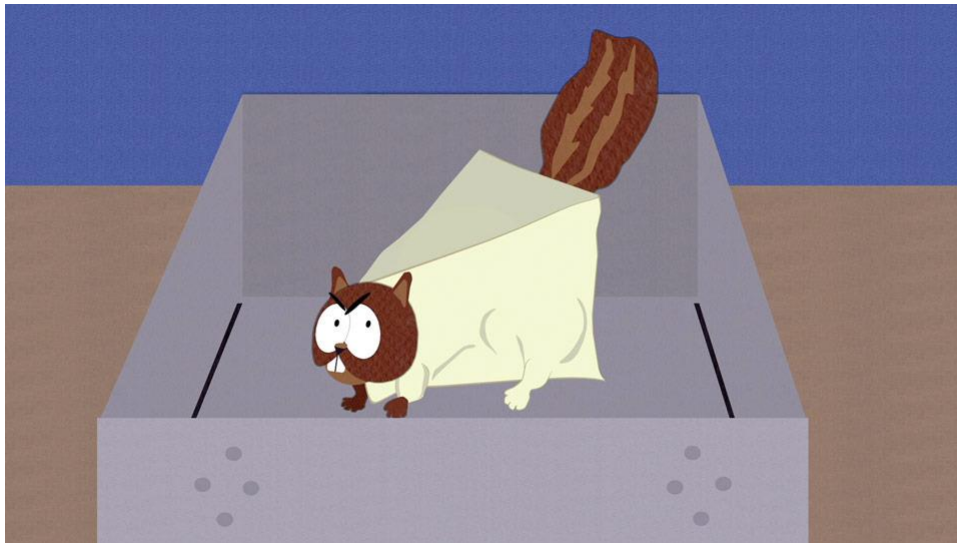
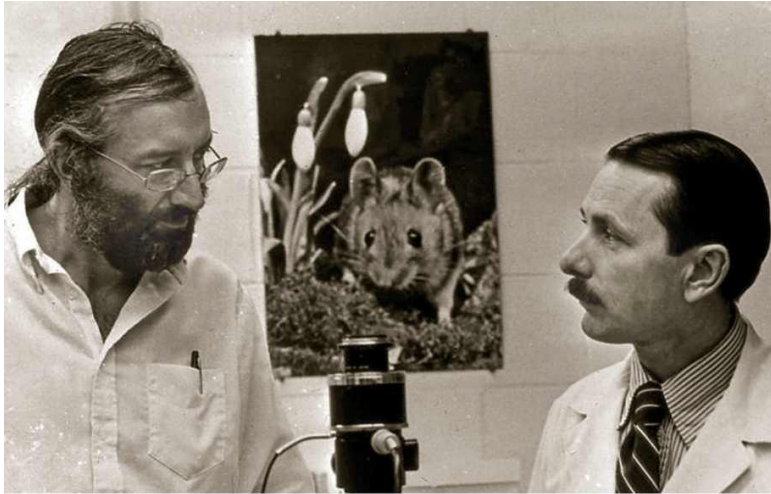


Figure 1 - Zebrafish (*Danio rerio*): (a) one-year old non-transgenic fish (average weight = 0.68 ± 0.13) and (b) one-year old G_0 transgenic fish (average weight = $1.79 \text{ g} \pm 0.37$).

Генетически модифицированные организмы –
увлекаться не нужно



1980-е гг. — первая трансгенная мышь (**Ричард Палмер, Ральф Бристер**, опухоль мозга).



Индукцирование и последующая экспрессия онкогенов в нормальных клетках в составе нормальных (здоровых) тканей может вызывать развитие опухоли.

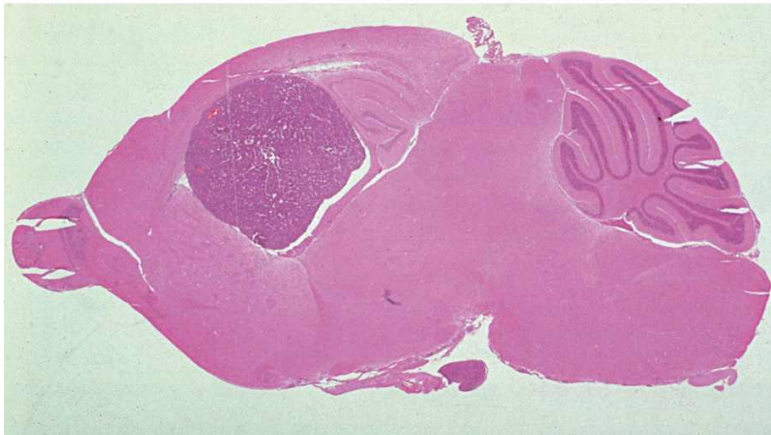
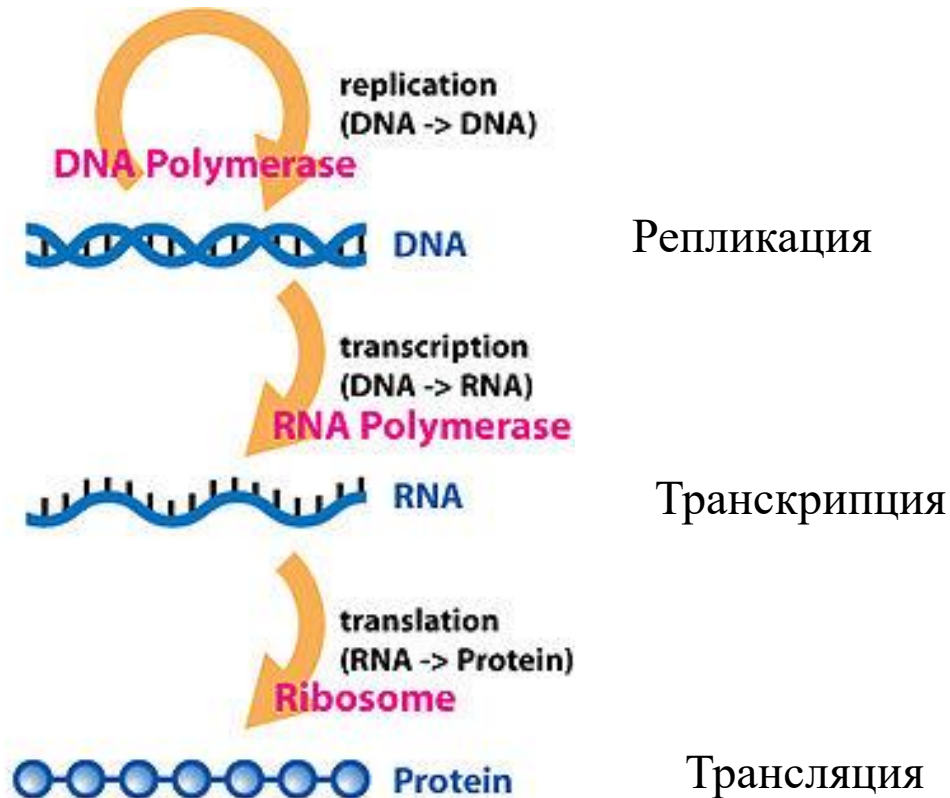
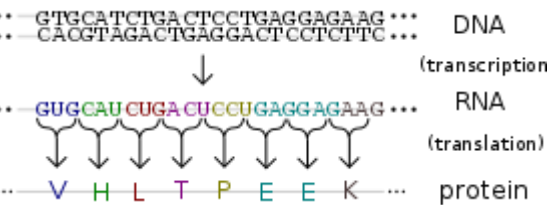
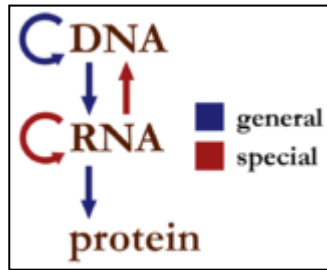


Схема получения трансгенных животных

1. Идентификация и конструирование трансгена. В некоторых случаях – изменение последовательности гена за счет мутаций.
2. Клонирование гена в подходящем векторе и трансформация бактерий (*E. coli*) для амплификации гена.
3. Проверка работы кассеты с клонированным геном в эукариотических клетках.
4. Введение гена в ядро оплодотворенной яйцеклетки.
5. Анализ детенышей, отбор тех, что содержат трансген (ПЦР).
6. Доказательство того, что трансген стабильно наследуется.
7. Доказательство того, что трансген правильно регулируется и экспрессируется.

Центральная догма молекулярной биологии



Обобщенное правило переноса информации в клетке в ходе *матричных процессов* (структура одного биополимера определяет структуру другого)

Матричный принцип передачи наследственной информации

Цепь рассуждений биологов разных времён:

- **Всё живое от живого** (Франческо Реди, XVII век)
- **Всякая клетка от клетки** (Рудольф Вирхов, 1859)
- **Хромосома от хромосомы** (В. Ру, Т. Бовери, начало XX века)
- **Митохондрия от митохондрии** (Ф. Мевес, начало XX века)
- **Молекула от молекулы** (Н.К. Кольцов, 1927 г.)



Н.К. Кольцов

Концепция дифференциальной экспрессии генов

Один из главных и общепризнанных догматов современной эмбриологии состоит в том, что, за исключением нескольких особых случаев, **все клетки данного организма, независимо от того какими они становятся в дифференцированном состоянии, содержат в геноме одну и ту же ДНК.** Тем не менее экспрессия генов в клетках одного типа явно отличается от их экспрессии в клетках другого типа. Дифференцированные клетки каждого типа обладают свойственной им одной морфологией и поддерживают свой собственный набор синтезируемых белков. Содержащиеся в клетках разного типа матричные РНК (мРНК) также неидентичны. На основе всех этих данных ученые пришли к единодушному мнению, высказанному, например, в 1976 г. Дэвидсоном (Davidson), что **дифференцировка обуславливается изменениями дифференциальной экспрессии генов в различных клеточных линиях развивающегося зародыша.**

Способы производства (или добычи) нужного нам белка:

1. Ткань донора с наработанным белком.



2. Химический синтез.

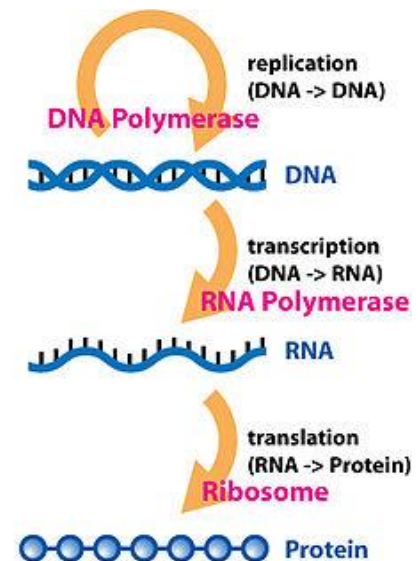


3. Разработать и запустить конструкцию в клетках *E. coli*.



Для создания и апробации *искусственной генетической конструкции*, производящей нужный нам *белок*, необходимо, чтобы она удовлетворяла нескольким условиям:

1. Она должна *поддерживаться в ряду поколений* (не элиминироваться после первого клеточного деления).
2. С неё должна *считываться соответствующая матричная РНК* (она должна экспрессироваться).
3. На основе этой матричной РНК должен *транслироваться белок*.



Как доставить чужеродную ДНК в клетку?

1. Трансформация (для бактериальных клеток или клеток дрожжей).
2. Инфекция (векторы-производные бактериофага).
3. Электропорация (клетки помещают в раствор, содержащий ДНК, и подвергают воздействию короткого электрического импульса — это приводит к временному образованию пор в клеточных мембранах).
4. Перенос генов с помощью липосом (липофекция). Слияние с клеточной мембраной и направленная доставка ДНК в цитоплазму.
5. **Микроинъекция** ДНК в ядро клеток животных.

Способы индивидуальны, и подбираются для разных групп организмов отдельно.

**Как сделать так, чтобы ген чужеродной
ДНК «работал» клетке?**

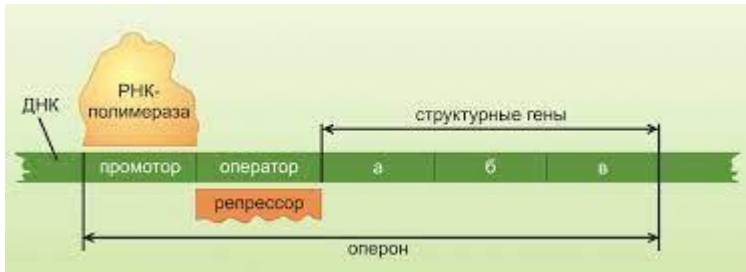
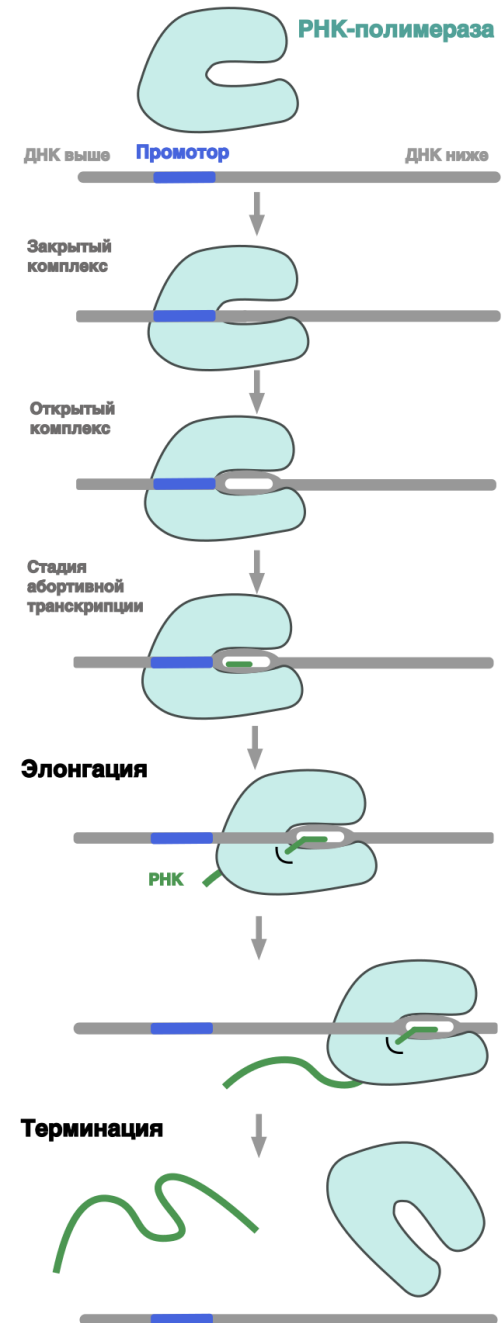


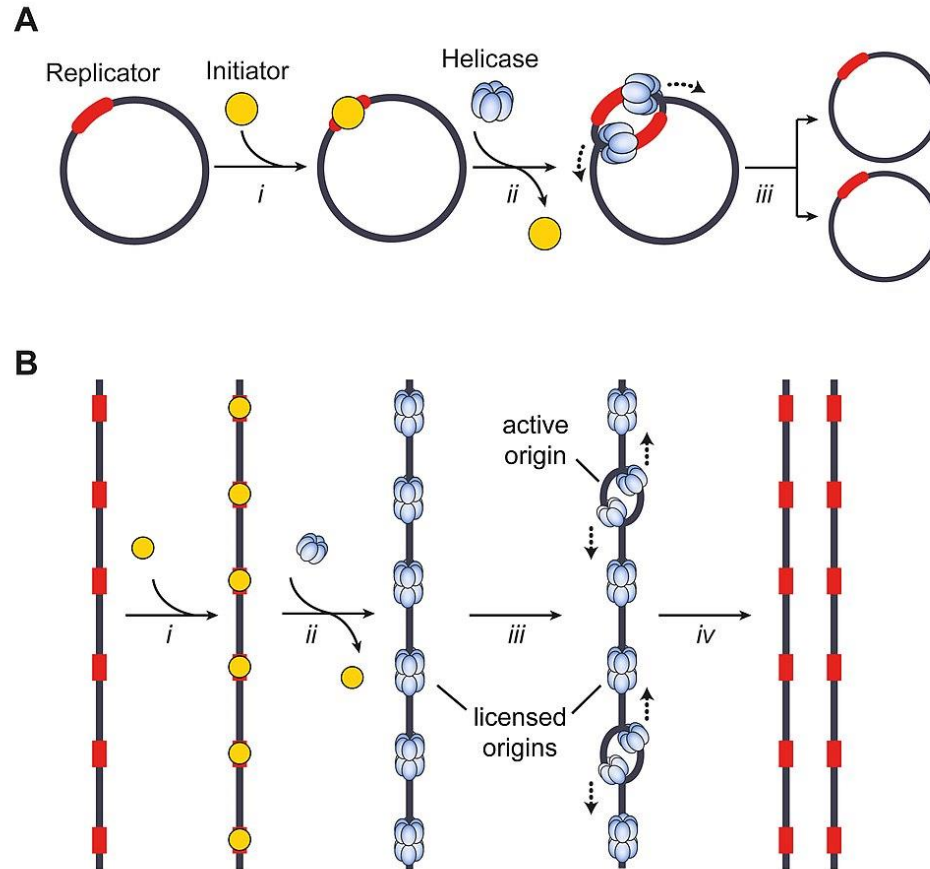
Схема оперона

Общая для про- и эукариот схема стадий транскрипции. Серым обозначен участок ДНК с синим промотором, зелёным — нарождающаяся РНК. (Википедия)

Инициация



Как сделать так, чтобы чужеродная ДНК реплицировалась в клетке?

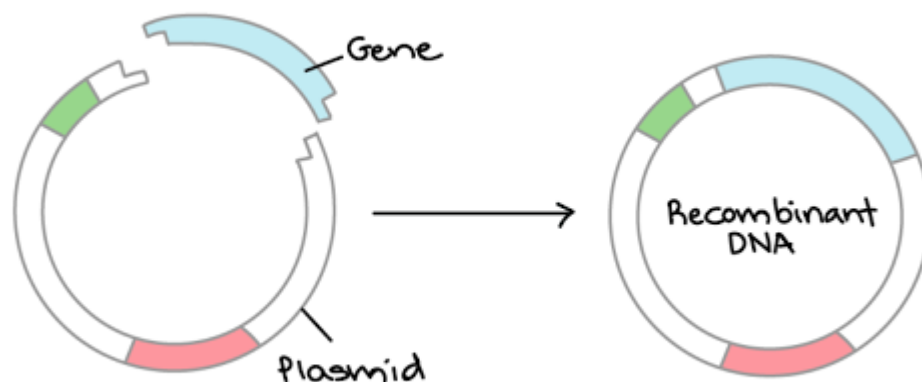


Модели инициации репликации ДНК бактерий (A) и эукариот (B). (Википедия)

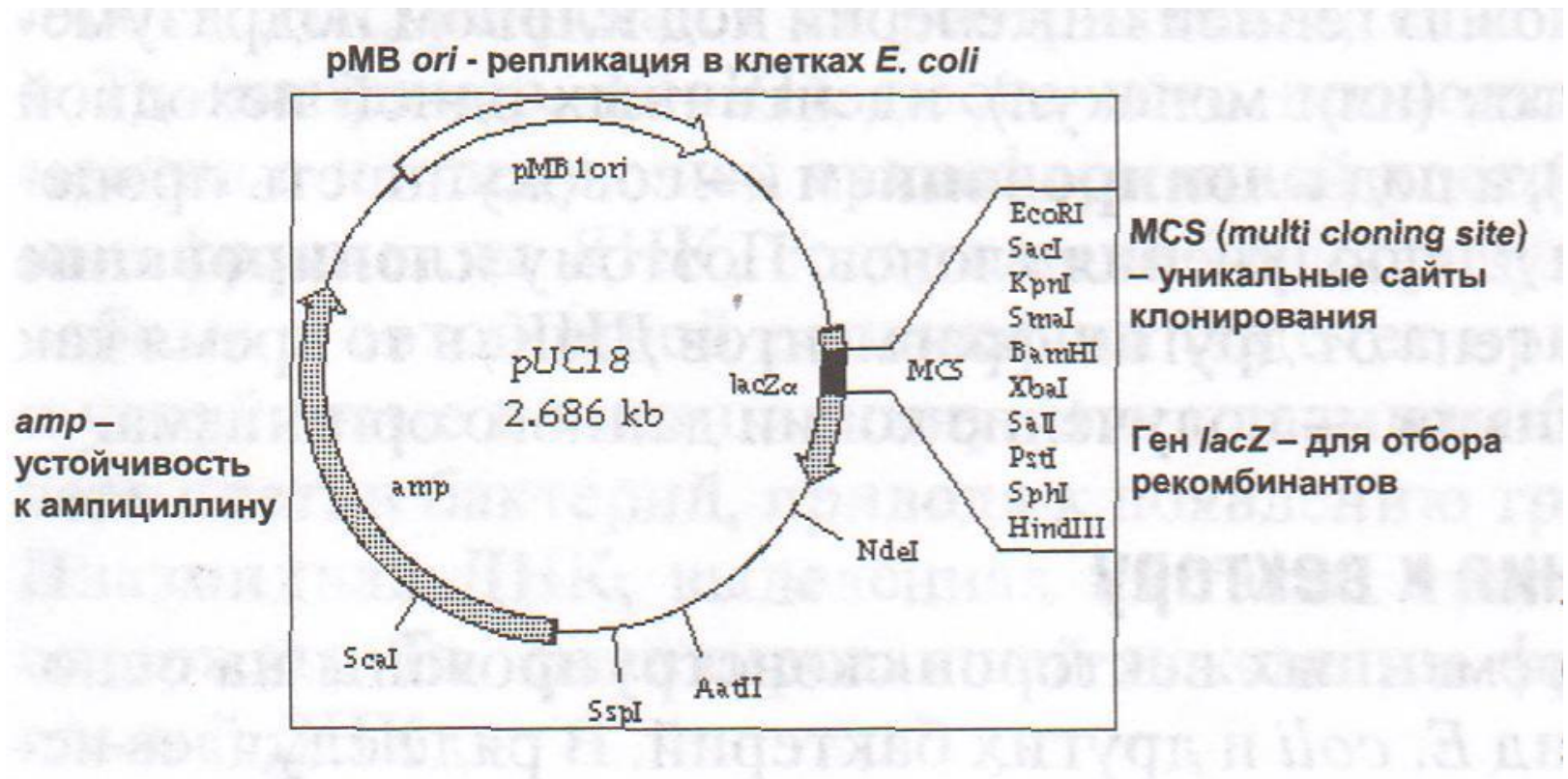
Клонирование

В генной инженерии под **клоном** подразумевают популяцию клеток (или молекул), идентичных одной исходной клетке.

Клонирование гена – отделение гена от других фрагментов ДНК.



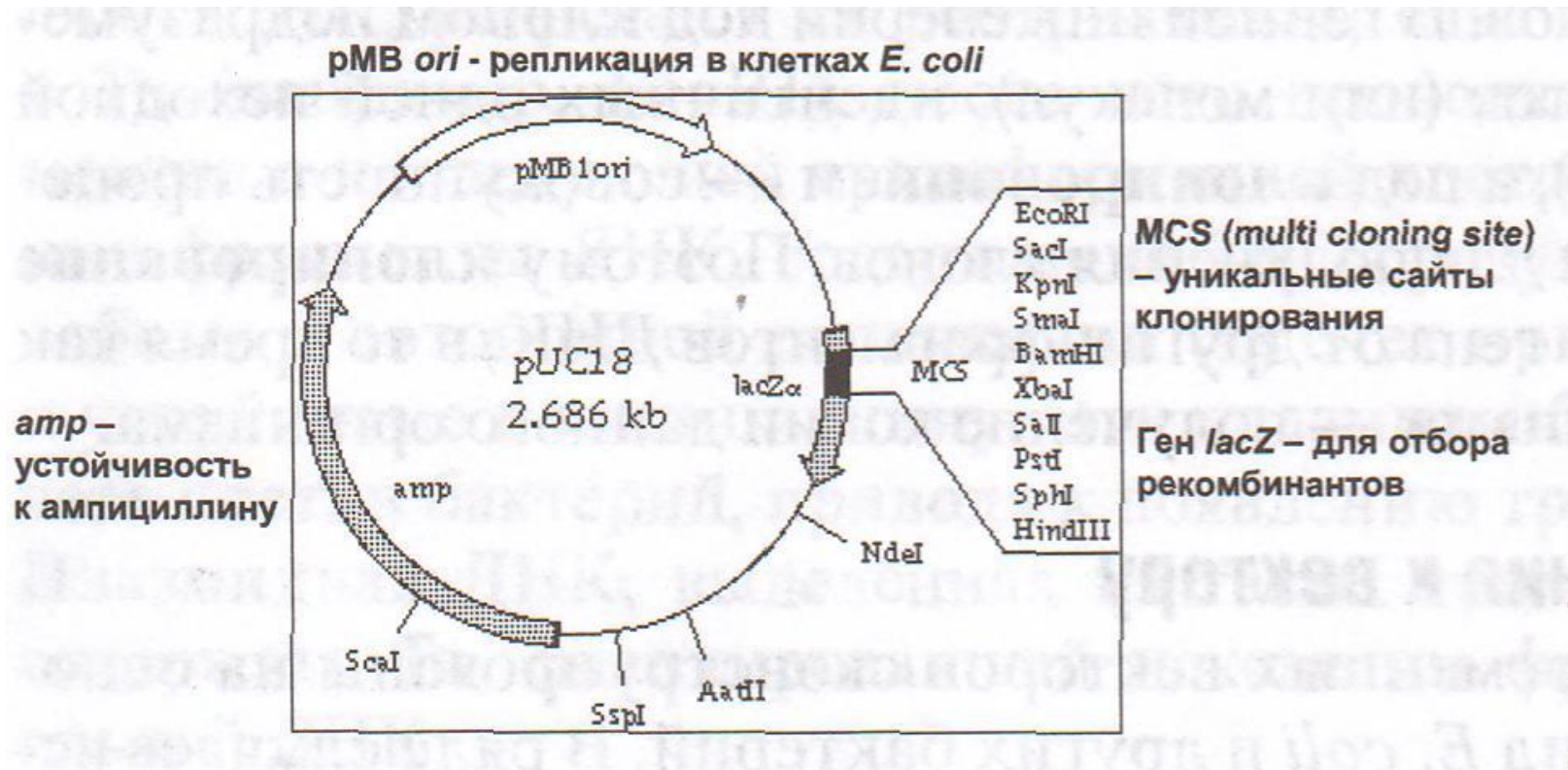
Основные элементы бактериального вектора на примере плазмиды pUC18



Некоторые общие свойства плазмид:

- обнаружены у самых разных бактериальных видов;
- экстрахромосомные единицы, ведут себя, как независимые генетические единицы, реплицирующиеся и наследуемые независимо от бактериальной хромосомы;
- часто содержат гены, кодирующие ферменты, обеспечивающие селективное преимущество хозяйской клетке (устойчивость или синтез антибиотиков, продукция ферментов рестрикции и модификации и т.д.).

Основные элементы бактериального вектора на примере плазмиды pUC18



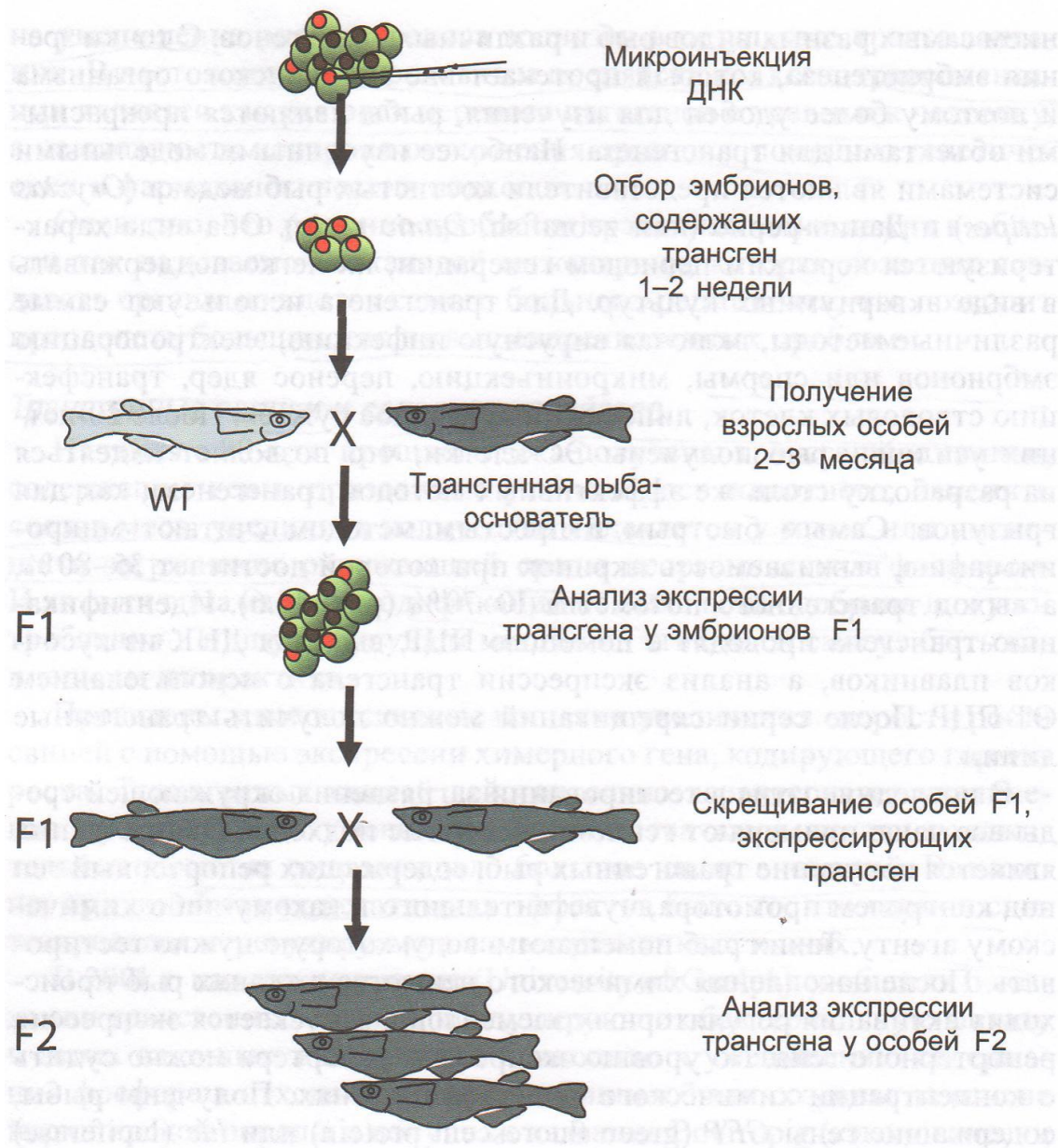
Вектор (в генетике) — молекула нуклеиновой кислоты, чаще всего ДНК, используемая в генетической инженерии для передачи генетического материала внутрь клетки, в том числе в клетку живого многоклеточного организма *in vivo*.

Вектор на основе **бактериальной плазмиды** должен удовлетворять следующим требованиям:

- быть стабильным в клетке-хозяине и в клетках *E. coli*;
- обеспечивать репликацию в клетках *E. coli*;
- выдерживать вставку чужеродной ДНК;
- обладать уникальными сайтами клонирования;
- содержать селективными маркерами;
- достаточно легко передаваться в клетку-хозяина.

Получение трансгенных рыб

Рыбы являются прекрасными объектами для **трансгеноза**, потому как эмбриогенез у них (у большинства из них) протекает вне материнского организма и более удобен для изучения.



Получение трансгенных рыб с помощью метода микроинъекций ДНК. Показаны основные этапы трансгенеза, анализ экспрессии трансгена (красный) у особей F1 и F2 осуществляют с помощью ПЦР.

Микроинъекции. Оборудование.



Figure 11.3 Microinjection equipment includes a stereozoom dissection microscope (6–100 \times) on a base with transmitted light and adjustable mirror, two micromanipulators attached to magnetic stands on a steel base, and an external light source. At the right is the gas-driven microinjector. This configuration allows for optimal manipulation of illumination intensity and focus to assist in positioning the microinjection needle.

Микроинъекции. Оборудование.

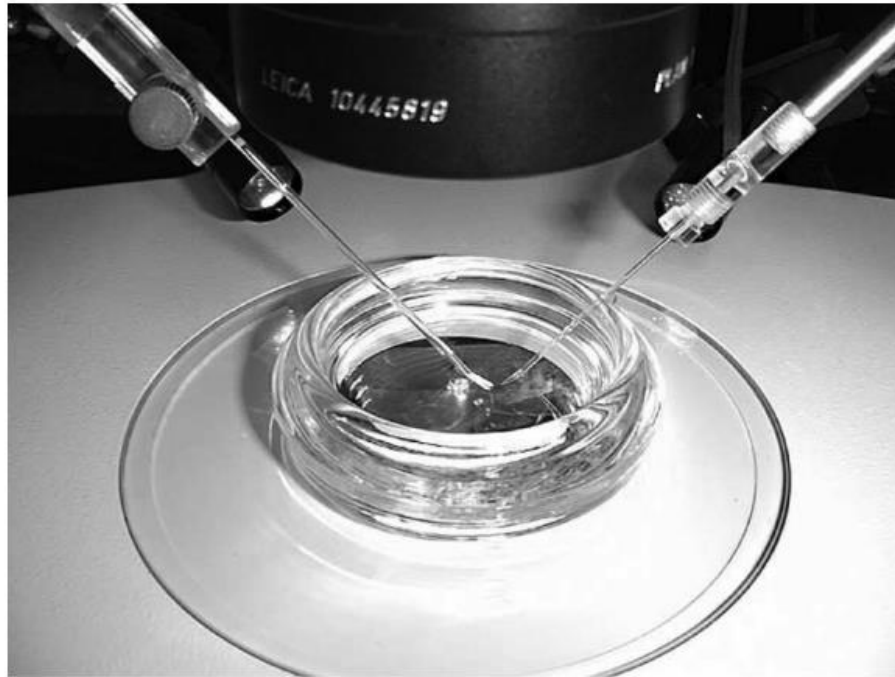


Figure 11.4 Microinjection setup. Eggs are placed in a watch glass filled with a salt solution (18 ppt). The holding pipette (capillary) is on the left and the microinjection needle is on the right.

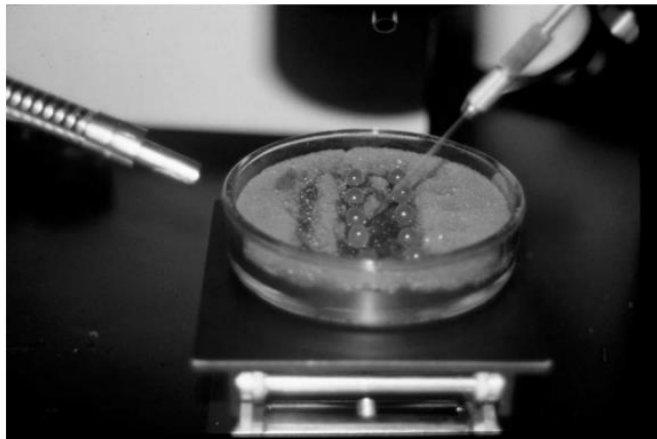


Figure 11.6 Microinjection of salmon eggs held in place in a matrix.

Source: Photo by Robert Devlin.

Микроинъекции. Процесс.

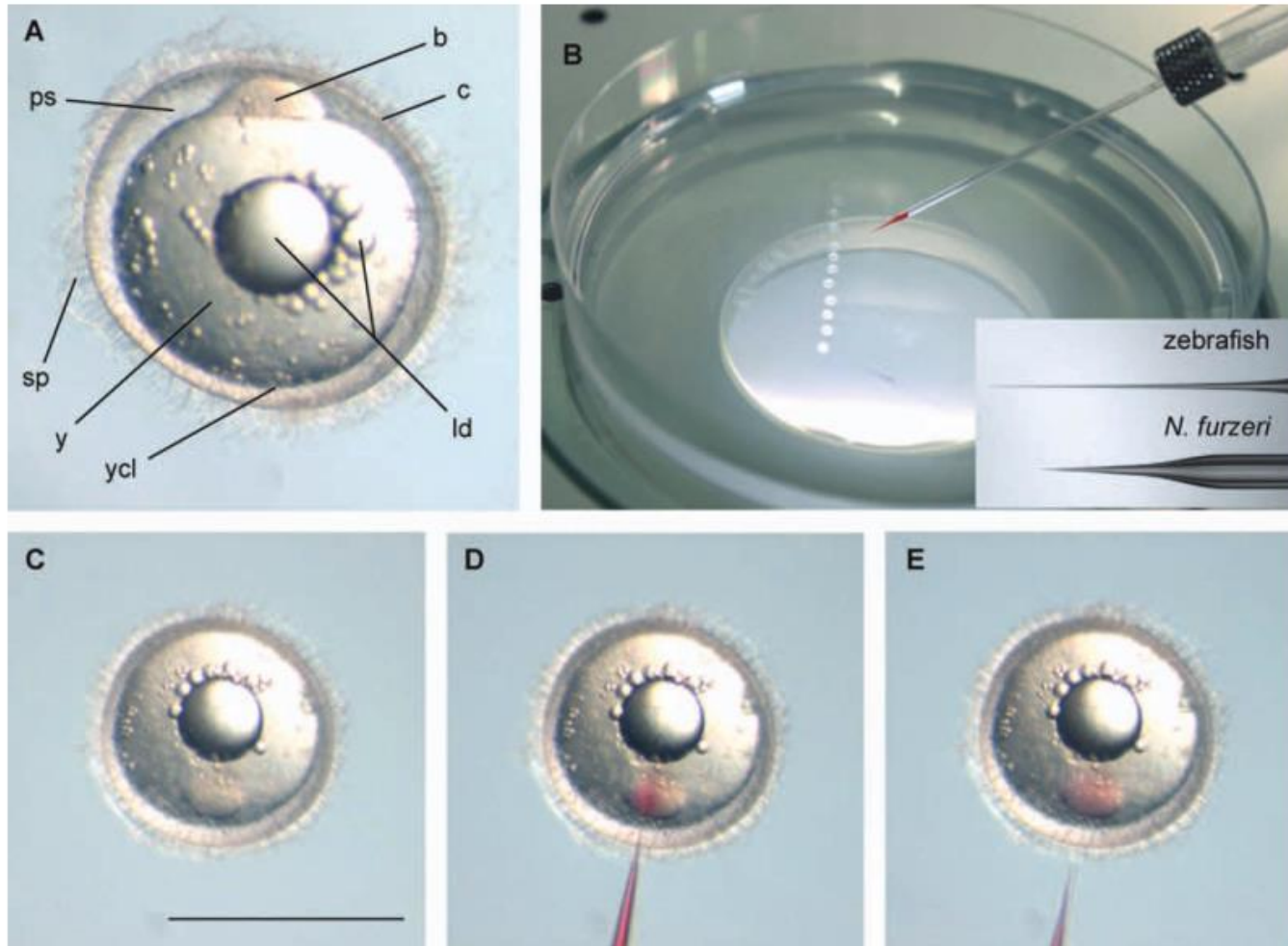
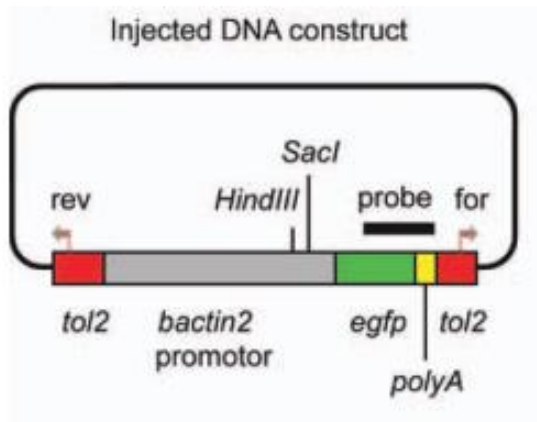
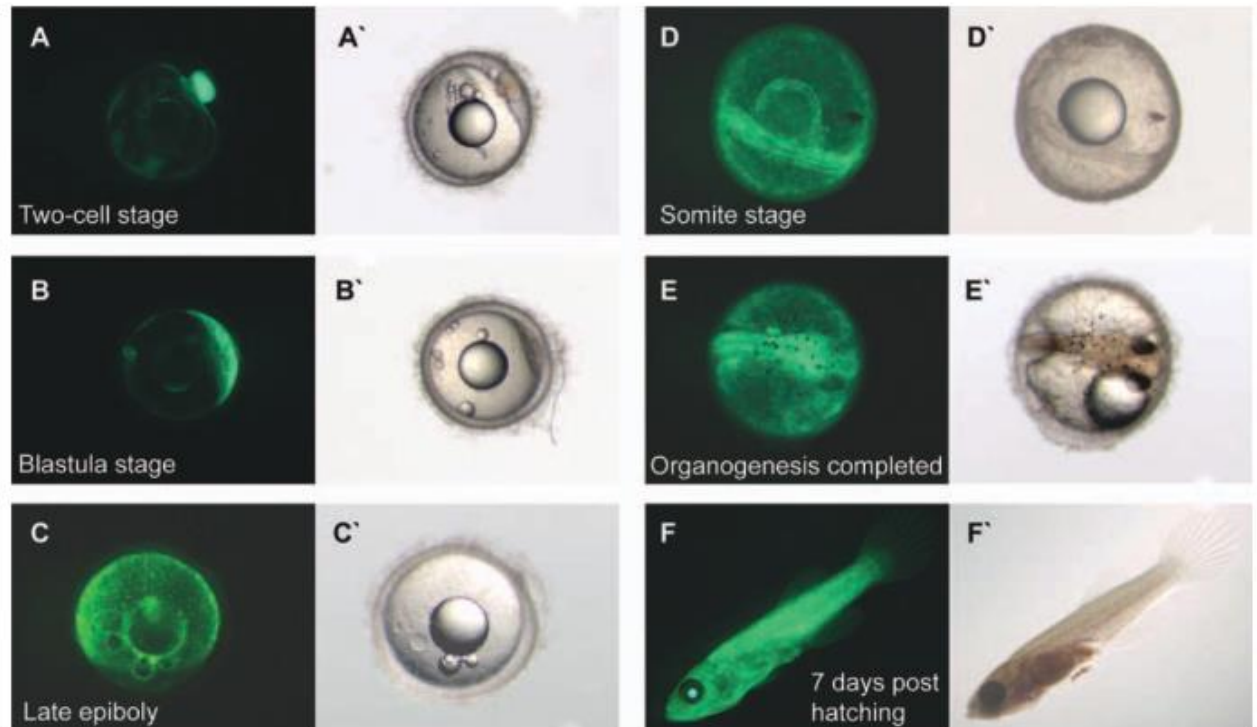


Fig. 1. Microinjection procedure in *N. furzeri*. **A:** Fertilized eggs are allowed to develop for 2 hr. During this time, the blastodisc or one-cell stage develops. **B:** Embryos at the one-cell stage are embedded in 1% low melting agarose for fixation and are oriented with the blastodisc facing the injection needle. Glass needles for zebrafish have a longer and thinner tip, whereas needles for *N. furzeri* have a shorter and more robust tip to penetrate through the hard chorion of the eggs (inset). **C–E:** Correct microinjection into the cytoplasm of the blastodisc is visualized by injecting a solution containing phenol red dye. Scale bar = 1 mm. b, blastodisc; c, chorion, ld: lipid droplets, ps: perivitelline space, sp: surface projections of the chorion, y: yolk, ycl: yolk cytoplasmic layer (adapted from Carter and Wourms, 1991).

Проверка вставки инъецируемой конструкции в оплодотворённую икринку хозяина



Зелёный флуоресцентный белок (ЗФБ) (англ. green fluorescent protein, **GFP**) — белок, выделенный из медузы *Aequorea victoria*, который флуоресцирует в зелёном диапазоне при освещении его светом от синего до ультрафиолетового диапазона.



Направления трансгенеза у рыб

- рост;
- цвет;
- устойчивость к заболеваниям (вставка вектора с цекропином — антибактериальным белком);
- устойчивость к воздействию тяжелых металлов;
- выживаемость в условиях пониженной температуры и т.д.

Литература:

1. Dunham, R.A.; Winn, R.N. (2014). "Chapter 11 - Production of transgenic fish". In Pinkert, C.A. Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook. Elsevier. ISBN 9780323137836.
2. Журавлева Г.А. Генная инженерия в биотехнологии — Спб.: Эко-Вектор, 2016. - 328 с.

Ресурсы:

Курс «Биотехнологии: генная инженерия» <https://stepik.org/course/94/info>

<https://biomolecula.ru/articles/12-metodov-v-kartinkakh-gennaia-inzheneriia-chast-i-istoricheskaiia>

<https://biomolecula.ru/articles/12-metodov-v-kartinkakh-gennaia-inzheneriia-chast-ii-instrumenty-i-tehniki>