

**ІІТМО**

**О.В. Кригер**

**ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ**



**Санкт-Петербург  
2023**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

**О.В. Кригер**  
**ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО  
по направлению подготовки 19.03.01. Биотехнология  
в качестве учебного пособия для реализации основных профессиональных  
образовательных программ высшего образования бакалавриата

**ИТМО**

Санкт-Петербург  
2023

Кригер О.В., Основы генетической инженерии– СПб: Университет ИТМО, 2023. – 59 с.

Рецензент(ы):

Дышлюк Любовь Сергеевна, доктор технических наук, доцент, профессор, ФГБОУ ВО "Калининградский государственный технический университет";

Учебное пособие по дисциплине «Основы генетической инженерии» содержит изложение молекулярно-генетических основ получения рекомбинантных ДНК, применение методов генной инженерии в биотехнологии, медицине, сельском хозяйстве, этические аспекты генной инженерии.

Учебное пособие предназначено для студентов направления Биотехнология, а также оно может быть рекомендовано студентам, аспирантам, молодым исследователям, областью научных интересов которых являются получение организмов и целевых продуктов с новыми заданными свойствами.

The logo of ITMO University, consisting of the letters 'ITMO' in a bold, black, sans-serif font. The 'I' and 'T' are connected, and the 'O' is a solid circle.

**Университет ИТМО** – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 в 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Университет ИТМО, 2023  
© Кригер О.В., 2023

## Содержание

Введение .....	5
1. История генной инженерии .....	6
1.1 Основные этапы развития генетической инженерии.....	6
1.2 Достижения генетической инженерии .....	9
2. Методы генетических манипуляций и создания организмов с новыми свойствами .....	12
2.1 Получение изолированных генов.....	13
2.2 Разделение и идентификация ДНК .....	15
2.3 Конструирование рекомбинантных ДНК.....	19
2.4 Векторы генетической инженерии .....	21
2.5 Введение векторов в бактериальные клетки .....	24
2.6 Отбор трансформированных клеток.....	25
3. Генетическая инженерия в медицине .....	27
3.1 Получение человеческого инсулина .....	27
3.2 Получение генноинженерного интерферона.....	29
4. Генетическая инженерия растений .....	31
4.1 Строение и свойств T <sub>i</sub> -плазмид .....	31
4.2 Механизмы агробактериальной трансформации .....	33
5. Генетическая инженерия животных .....	37
5.1 Основные направления использования генетической инженерии в животноводстве .....	37
5.2 Способы получения трансгенных животных .....	38
5.3 Использование клеток и культур тканей животных .....	43
6. Генетическая инженерия человека .....	50
6.1 Генотерапия .....	50
6.2 Редактирование генома .....	52
6.3 Этические аспекты генно-инженерных исследований. ....	55
Список литературы .....	57

## ПРЕДИСЛОВИЕ

В учебном пособии представлены основные молекулярно-генетические методы получения рекомбинантных ДНК и практические аспекты применения методов генной инженерии в современной биотехнологии, медицине и сельском хозяйстве, освещаются этические проблемы и проблемы биобезопасности при проведении генно-инженерных исследований.

В первом разделе рассмотрены основные этапы развития и достижения современной генетической инженерии. Во втором разделе освещены этапы проведения генетического конструирования организмов. В третьем разделе изложены аспекты использования генетической инженерии при получении лекарственных средств и ДНК-диагностике. В четвертом разделе представлены основные методы получения трансгенных растений с использованием агробактериальной трансформации и соматической гибридизации. В пятом разделе рассмотрены способы создания трансгенных животных и особенности культивирования культур клеток и тканей животных. В шестом разделе приведены сведения о методах генотерапии и возможностях рекомбинации генома человека, анализируются этические аспекты, связанные с проведением генетических исследований.

Каждый раздел заканчивается вопросами для самоконтроля знаний.

Учебное пособие предназначено для студентов направления Биотехнология, а также оно может быть рекомендовано студентам, аспирантам, молодым исследователям, областью научных интересов которых являются получение организмов и целевых продуктов с новыми заданными свойствами при использовании методов генной инженерии.

Отдельные разделы учебного пособия могут быть использованы при изучении основ генетики, молекулярной биологии и биохимии, а также в качестве дополнительного источника литературы при изучении профильных дисциплин.

В качестве самостоятельной работы студентам рекомендуется изучение литературы с более подробным изложением основных методов генной инженерии.

## ВВЕДЕНИЕ

**Генетическая инженерия (генная инженерия)** – это современная область биотехнологических исследований, направленная на получение организмов с новыми заданными свойствами посредством рекомбинаций молекул ДНК.

Генная инженерия развивалась на достижениях таких наук, как биология, генетика, химия. Использование методов генетической инженерии позволило изучить геномы различных организмов и оказало большое влияние на развитие новых направлений научной и практической деятельности в медицине, сельском хозяйстве, животноводстве.

Для сельского хозяйства одной из важнейших задач является повышение продуктивности сельскохозяйственных растений и животных, получение растений и животных устойчивых к неблагоприятным факторам внешней среды, вредителям и насекомым. Использование генной инженерии позволило сократить применение инсектицидов (препаратов для уничтожения насекомых) на 40–60%.

С помощью генной инженерии пытаются решить и экологические проблемы. Так, уже созданы растения, способные поглощать различные загрязнения из почвы.

Все большее распространение получают методы генной терапии для лечения наследственных заболеваний. Однако при этом не стоит забывать об этической стороне вопроса, так как вариантов развития событий в области генной инженерии существует множество, и далеко не все они изучены и известны. Поэтому они должны быть последовательно зафиксированы и регламентированы.

Тем не менее эксперты убеждены, что в будущем генная инженерия будет оказывать все большее влияние на различные сферы жизнедеятельности человеческого общества.

Учебное пособие содержит информацию, необходимую для выполнения практических и домашних заданий, подготовки к зачету по дисциплине «Основы генетической инженерии».

# 1. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

## 1.1 Основные этапы развития генетической инженерии

Основы классической генетики были заложены в середине XIX века благодаря экспериментам чешско-австрийского биолога **Грегора Менделя**. Открытые им на примере растений *принципы передачи наследственных признаков* от родительских организмов к их потомкам в 1865 году, к сожалению, не получили должного внимания у современников, и только в 1900 году Хуго де Фриз и другие европейские ученые независимо друг от друга «переоткрыли» законы наследственности.

Параллельно с этим шел процесс формирования знаний о ДНК. Так, в 1869 году швейцарский биолог **Фридрих Мишер** открыл *факт существования макромолекулы*, а в 1910 году американский биолог **Томас Хант Морган** обнаружил на основе характера наследования мутаций у дрозофил, что гены расположены линейно на хромосомах и образуют группы сцепления.

В первой половине двадцатого столетия ученым удалось выяснить строение основных органелл клетки, в том числе строение молекулы ДНК, которая представляла собой последовательность нуклеотидов, в состав которых входят четыре азотистых основания, дезоксирибоза и остаток фосфорной кислоты (рисунок 1).



Рисунок 1 – Химический состав нуклеотидов

*Розалинд Франклин и Морис Уилкинс* в Кембриджском университете занимались рентгеноструктурными анализами молекулы ДНК. Сделанные Р. Франклин снимки со структурой молекулы (рисунок 2) послужили основой для дальнейших исследований *Джона Уотсона и Фрэнсиса Крика*, которые в 1953 году сделали открытие о молекулярной структуре молекулы ДНК.

### Рентгено-структурный анализ волокон ДНК

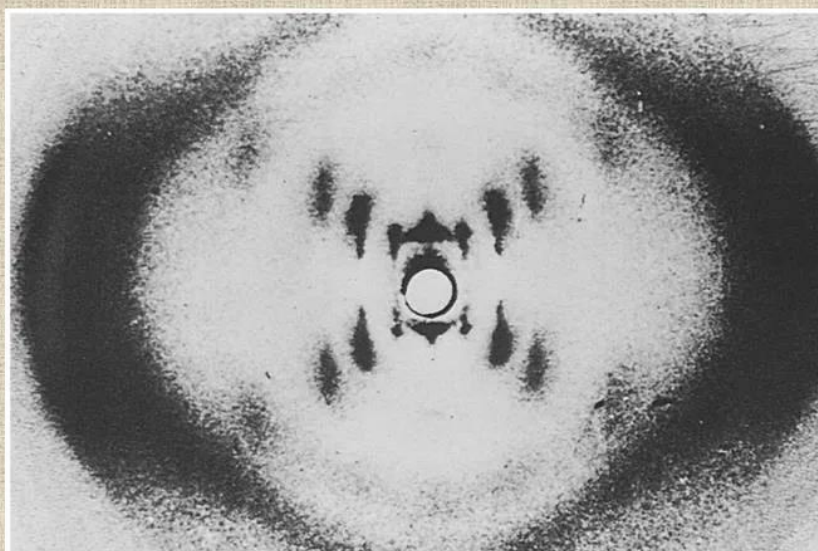


Рисунок 2 – Рентгенограмма В-формы молекулы ДНК, полученная Р. Франклин в 1952 г.

Согласно модели Д. Уотсона и Ф. Крика, молекула ДНК представляет собой две цепи дезоксирибозофосфата, соединенных водородными связями между азотистыми основаниями аденина с тиминном и гуанина с цитозином, напоминая ступеньки лестницы (рисунок 3).

Последовательности азотистых оснований в полинуклеотидной цепи служат матрицей для синтеза новых молекул ДНК. Репликация ДНК осуществляется посредством разъединения двух цепей молекулы в местах водородных связей, после чего каждая половина достраивается, образуя новую двухцепочную молекулу ДНК.





Рисунок 3 – Модель Уотсона-Крика

Открытие пространственной и химической структуры молекулы ДНК, а также установление ее роли в хранении и передаче наследственной информации считается одним из наиболее важных открытий в области биологии двадцатого века.

Дж. Уотсон, Ф. Крик и М. Уилкинс получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине 1962 года «за открытия в области молекулярной структуры нуклеиновых кислот и за определение их роли для передачи информации в живой материи».

В речи на презентации А. В. Энгстрем из Каролинского института охарактеризовал ДНК как «полимер, составленный из строительных блоков нескольких типов — моносахарида, фосфата и азотистых оснований... Моносахарид и фосфат — повторяющиеся элементы гигантской молекулы ДНК, кроме того, она содержит четыре типа азотистых оснований. Открытием является порядок пространственного соединения этих строительных блоков».

## 1.2 Достижения генетической инженерии

Достижения в области генетической инженерии оказали значительное влияние на развитие самых разнообразных отраслей промышленности и жизнедеятельности человека. Ее методы направлены на изменение свойств организма в нужном для человека направлении.

В отличие от традиционных методов селекции, генетическая инженерия позволяет проводить манипуляции с генами целенаправленно, осуществляя модификацию генома и клонирование ДНК.

Примерами использования генетической инженерии является создание высокопродуктивных растений и животных для сельского хозяйства. Первыми сельскохозяйственными культурами с модифицированным геномом были помидоры, устойчивые к вирусным заболеваниям. На сегодняшний день площади посевов, занимаемых генетически модифицированными растениями, составляют 191,7 млн га (рисунок 4).

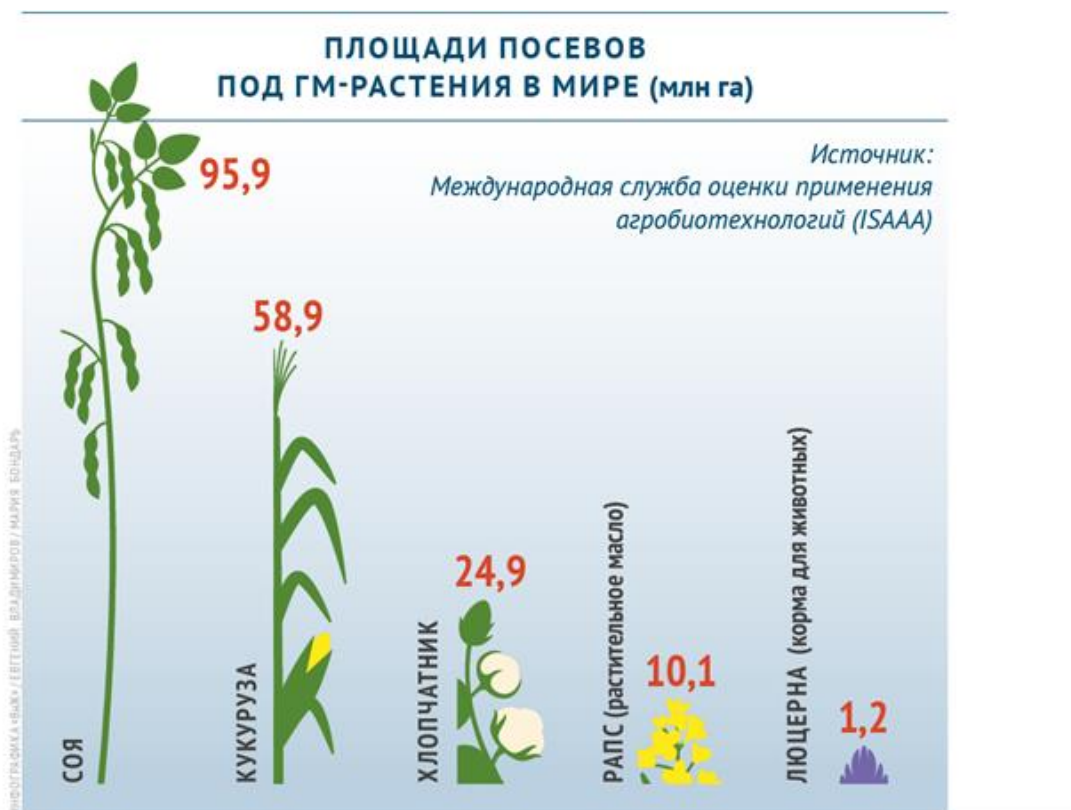


Рисунок 4 – Примеры выращиваемых ГМ растений

Важнейшим достижением генетической инженерии является создание генноинженерного *инсулина*, идентичного человеческому инсулину, производство *эритропоэтина* в культуре клеток животных, создание трансгенных животных для проведения лабораторных и клинических исследований. В настоящее время в клинической практике применяется более 350 препаратов, созданных с применением методов генетической инженерии.

Основой биотехнологических исследований является клетка. С помощью генетической инженерии созданы супер-продуценты биологически активных веществ: бактерии, продуцирующие аминокислоты сверх своих физиологических потребностей, продуценты антибиотиков, гормонов, органических кислот.

Создаются штаммы микроорганизмов, способных к биодеструкции нефти, органических промышленных и бытовых отходов, синтетических полимеров, а также микроорганизмы, способные существовать в экстремальных условиях повышенных или пониженных температур, что расширяет области промышленного использования биотехнологических процессов.

Хотя клетки микроорганизмов способны синтезировать самые разнообразные соединения, используемые в практической деятельности человека, тем не менее существует ряд веществ, которые могут образовываться только клетками растений или животных.

В этой связи ученые разработали комплекс методов, позволяющих выделять и культивировать изолированные клетки и ткани растительного или животного организма. Это очень перспективное и актуальное направление, позволяющее получать биологически активные вещества без использования целого организма в ограниченных условиях работы с биологическим материалом.

Во второй половине двадцатого века *Фредериком Сенгером и Уолтером Гилбертом* предложены методы, позволяющие изучать первичную структуры молекул ДНК.

Для успешного конструирования организмов с новыми заданными свойствами учеными разработаны методы синтеза и конструирования новых генов, введения их в клетку-реципиент, а также методы клонирования и идентификации рекомбинантных ДНК.

В настоящее время синтез нуклеотидных последовательностей автоматизирован и осуществляется с использованием специализированного оборудования и программного обеспечения.

Большое распространение получил *метод полимеразной цепной реакции*, позволяющий многократно увеличивать число определенных фрагментов ДНК при небольшой ее концентрации в объекте.

Метод ПЦР получил широкое распространение в медицинской диагностике, а также для идентификации и определения качества и безопасности продовольственного сырья.

Таким образом, генетическая инженерия на сегодняшний день – это инструмент, позволяющий производить необходимые манипуляции с генетическим материалом, что приводит к улучшению состояния жизни человеческого общества.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Какие открытия положили основу развития генетической инженерии?
2. Что такое мутация?
3. Кто является основоположником учения о наследственности и изменчивости?
4. В чем заключалось открытие Джона Уотсона и Фрэнсиса Крика?
5. Назовите структурные единицы ДНК.
6. Сформулируйте биологические функции ДНК.
7. Охарактеризуйте достижения генетической инженерии.

### **Список литературных источников для самостоятельного изучения**

1. Сингер М., Берг П. Гены и геномы: В 2-х томах. Том 1, 2 Пер. с англ. - М.: Мир, 1998. - 391 с.
2. Панчин А. Ю. Сумма биотехнологии. Руководство по борьбе с мифами о генетической модификации растений, животных и людей. — М.: АСТ. - 2015. - 432 с.

## 2. МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАНИПУЛЯЦИЙ И СОЗДАНИЯ ОРГАНИЗМОВ С НОВЫМИ СВОЙСТВАМИ

На различных этапах генно-инженерных исследований применяются определенные инструменты и методы, включающие в себя:

- получение изолированных генов, несущих требуемый признак;
- включение гена в вектор для переноса в клетку-реципиент;
- перенос вектора, содержащего требуемый ген, в модифицируемый организм;
- отбор генетически модифицированных клеток с требуемым признаком.

Схема создания генетически модифицированного организма представлена на рисунке 5.

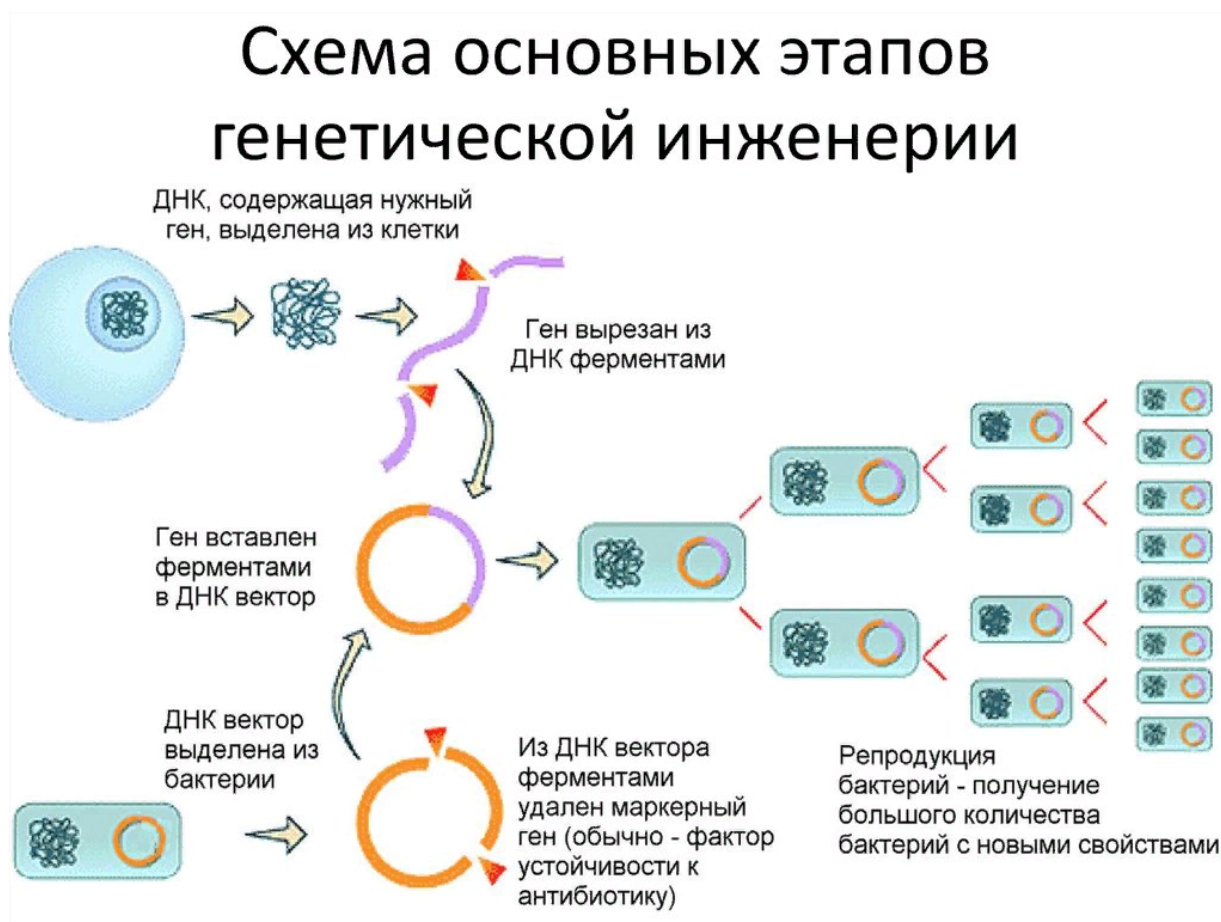


Рисунок 5 – Этапы проведения генно-инженерного исследования

## 2.1 Получение изолированных генов

Важнейшим методом генетической инженерии является извлечение необходимых генов из молекулы ДНК для дальнейшего конструирования рекомбинантной ДНК. Для этих целей используются **ферменты рестрикции**, которые *способны* разрезать молекулу ДНК в строго определенных нуклеотидных последовательностях.

Первые рестриктазы были получены в 50-70-е года двадцатого века, когда было замечено явление, при котором в среде чужеродная ДНК разрушалась специфическими ферментами бактерий, при этом собственная ДНК оставалась неизменной. Позднее ферменты, обладающие такой способностью, были названы *рестрикционными нуклеазами или рестриктазами*.

В 1978 году **Вернеру Арберу, Дэну Натансу и Гамильтону Смиту** была присуждена Нобелевская премия за получение первых рестриктаз, изучения их свойств и практического применения для картирования хромосом.

Рестриктазы разрезают молекулу ДНК в середине, в строго определенных участках, длиной от четырех до семи пар нуклеотидов, при этом они расщепляют участок узнавания внутри или вне его. Собственные ДНК бактерий защищены от рестриктаз посредством модификации (метиляции) азотистых оснований аденина и цитозина.

В зависимости от специфики сайтов узнавания рестриктазы разделены на три класса:

- Рестриктазы первого класса способны узнавать определенную последовательность нуклеотидов и разрезать молекулу ДНК в произвольном месте, недалеко от сайта рестрикции;
- Рестриктазы второго класса способны узнавать определенную последовательность нуклеотидов и разрезать молекулу ДНК в определенном месте, внутри сайта рестрикции; рестриктазы данного класса узнают *полиндромные* последовательности нуклеотидов, которые одинаково считываются в обоих направлениях;
- Рестриктазы третьего класса способны узнавать определенную последовательность нуклеотидов и разрезать молекулу ДНК, отступив несколько нуклеотидов от сайта узнавания. При это могут образовываться фрагменты ДНК с «тупыми» (ровными) или «липкими» (выступающими) концами. Ферменты этого класса могут узнавать несимметричные сайты (рисунок 6).

В настоящее время известно более 3000 ферментов рестрикции (рисунок 7) и более 600 коммерческих препаратов на их основе.

## Формы разрывов ДНК, образующихся под действием рестриктаз класса II

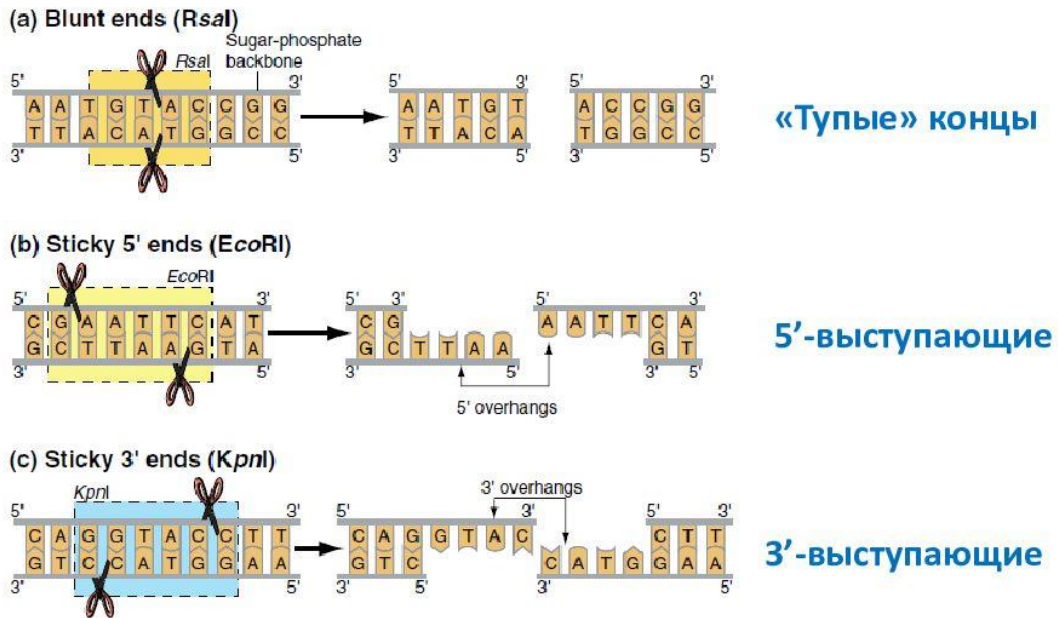


Рисунок 6 – Действие рестриктаз в различных сайтах узнаваний

### Рестриктазы в генной инженерии

<i>EcoRI</i>	( <i>E. coli</i> RY13)	5'...G <sup>▼</sup> AATTC...3' 3'...CTTAAG <sup>▲</sup> ...5'
<i>NdeI</i>	( <i>Neisseria denitrificans</i> )	5'...CA <sup>▼</sup> TATG...3' 3'...GTAT <sup>▲</sup> AC...5'
<i>BamHI</i>	( <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H)	5'...G <sup>▼</sup> GATCC...3' 3'...CCTAGG <sup>▲</sup> ...5'
<i>BglII</i>	( <i>Bacillus globigii</i> )	5'...A <sup>▼</sup> GATCT...3' 3'...TCTAG <sup>▲</sup> A...5'
<i>PmeI</i>	( <i>Pseudomonas mendocina</i> )	5'...GTTT <sup>▼</sup> AAAC...3' 3'...CAA <sup>▲</sup> TTTG...5'

Рисунок 7 – Представители рестриктаз и сайты рестрикции

Исследования в данной области по-прежнему продолжают, так как рестриктазы являются одним из важнейших инструментов генетической инженерии.

Для того чтобы получить новую молекулу ДНК, необходимо осуществить сшивание новых фрагментов ДНК в единую цепь. Для этих целей используется другой класс ферментов – *ДНК-лигазы*. Лигазы образуют фосфодиэфирные связи между фосфорильной и гидроксильной группами 5'- и 3'- концами молекулы ДНК. Так как ДНК имеет одинаковое строение у всех организмов, поэтому можно сшивать молекулы ДНК, полученных из самых разных клеток.

При разрезании молекулы ДНК для выделения из нее определенного фрагмента получают фрагменты различной длины. Для того, чтобы разделить фрагменты нуклеотидов друг от друга и идентифицировать необходимый участок, применяются различные методы.

## 2.2 Разделение и идентификация ДНК

Разделение фрагментов молекулы ДНК осуществляют при помощи *электрофореза* в агарозном или поликриламидном геле. Образец с фрагментами ДНК разной длины вносят в лунки электрофорезной камеры и помещают в электрическое поле.

Молекулы ДНК имеют отрицательный заряд и будут двигаться к аноду, соответственно, скорость их движения будет зависеть от длины молекулы. Чем длиннее молекула, тем меньше ее скорость передвижения в геле (рисунок 8).

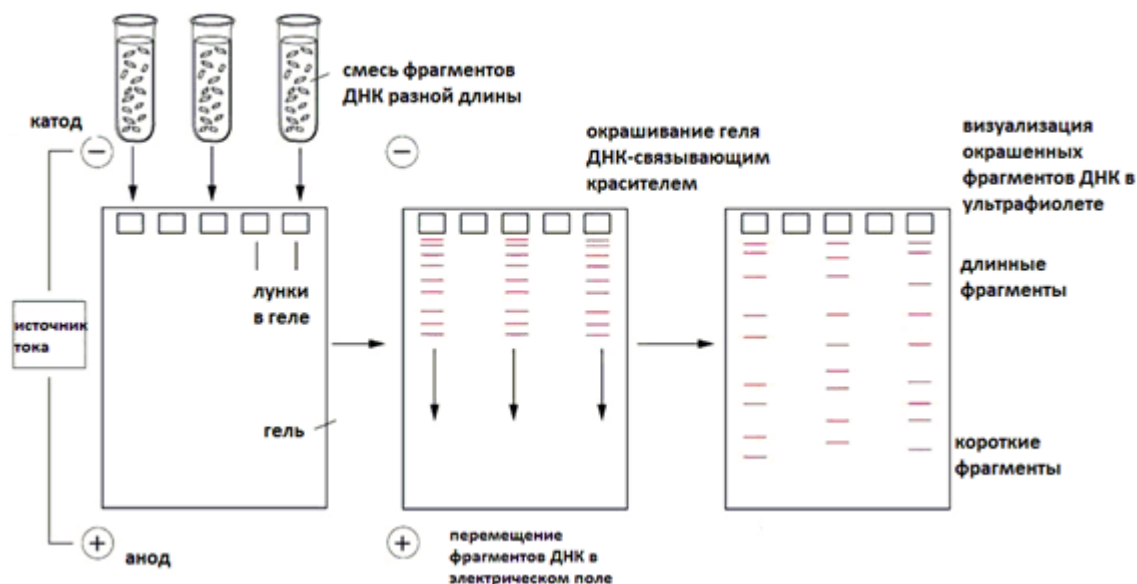


Рисунок 8 – Электрофоретическое разделение ДНК



По окончании процесса образуются полосы, соответствующие определенной длине молекулы, и с помощью соответствующих маркеров с известной длиной можно идентифицировать молекулы ДНК соответствующего размера (рисунок 9).

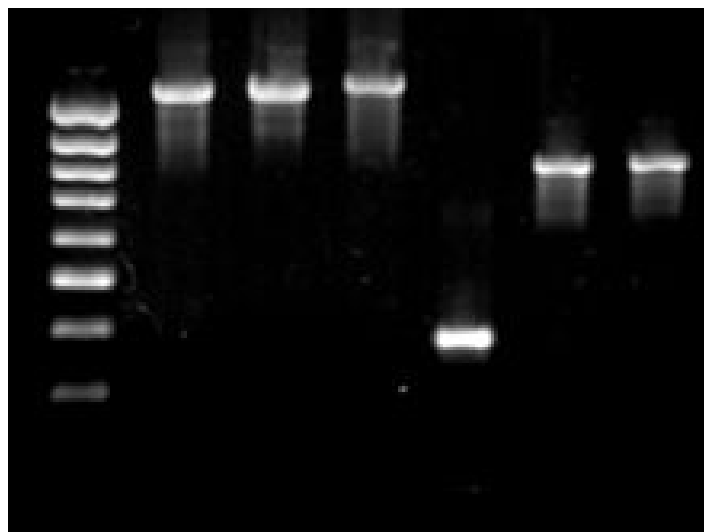


Рисунок 9 – Разделение ДНК в агарозном геле: левая дорожка – маркеры с известной длиной ДНК

Для визуализации результатов электрофореза применяют флуоресцирующие красители, которые взаимодействуют с ДНК. В качестве такого красителя применяют *бромистый этидий*, который флуоресцирует в ультрафиолетовых лучах (рисунок 10).

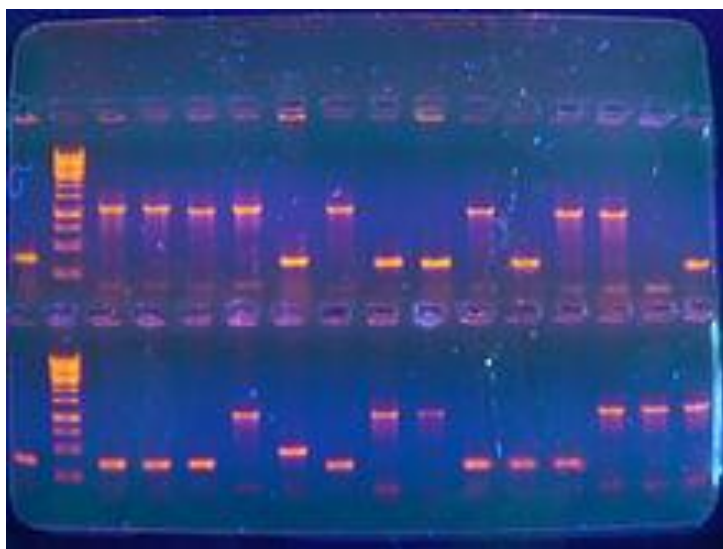


Рисунок 10 – Электрофоретическое разделение ДНК с бромистым этидием

Идентификацию последовательностей нуклеотидов осуществляют путем *гибридизации ДНК*, основанной на образовании водородных связей между комплементарными основаниями одноцепочечных молекул. Для этих целей синтезируют *ДНК-зонд*, который будет комплементарен искомой нуклеотидной последовательности.

ДНК-зонд представляет собой одноцепочечную молекулу ДНК со встроенной флуоресцирующей меткой или радиоизотопом для визуализации идентифицируемой последовательности. Этот метод получил название *Саузерн-блоттинга* или *перенос по Саузерну*, названного по фамилии английского биолога *Эдвина Саузерна* (рисунок 11).

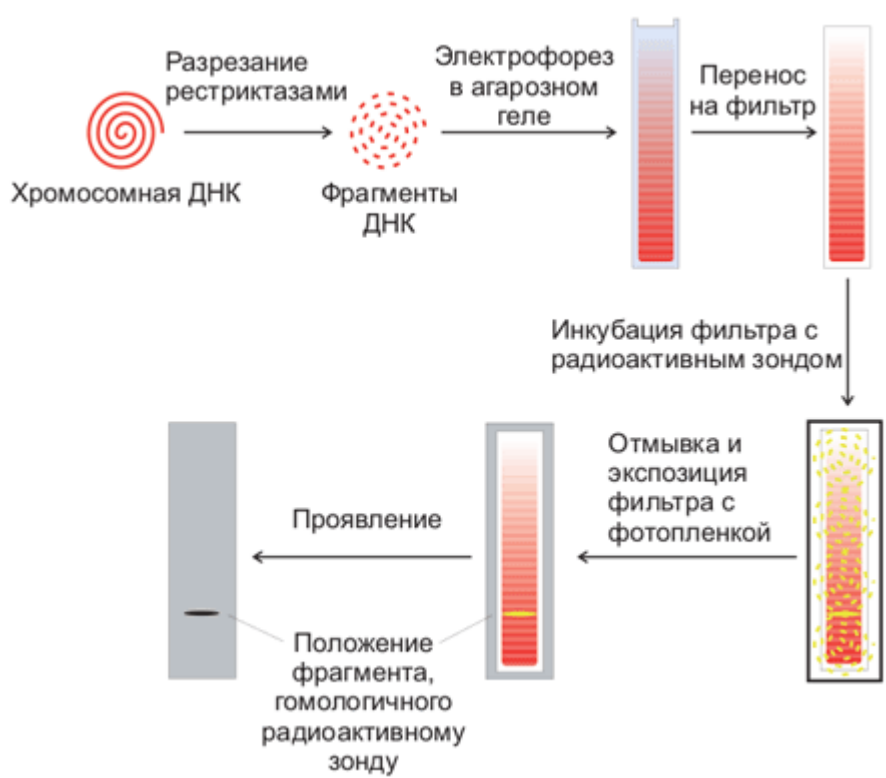


Рисунок 11 – Идентификация ДНК методом Саузерн-блоттинга

Сущность метода заключается в следующем.

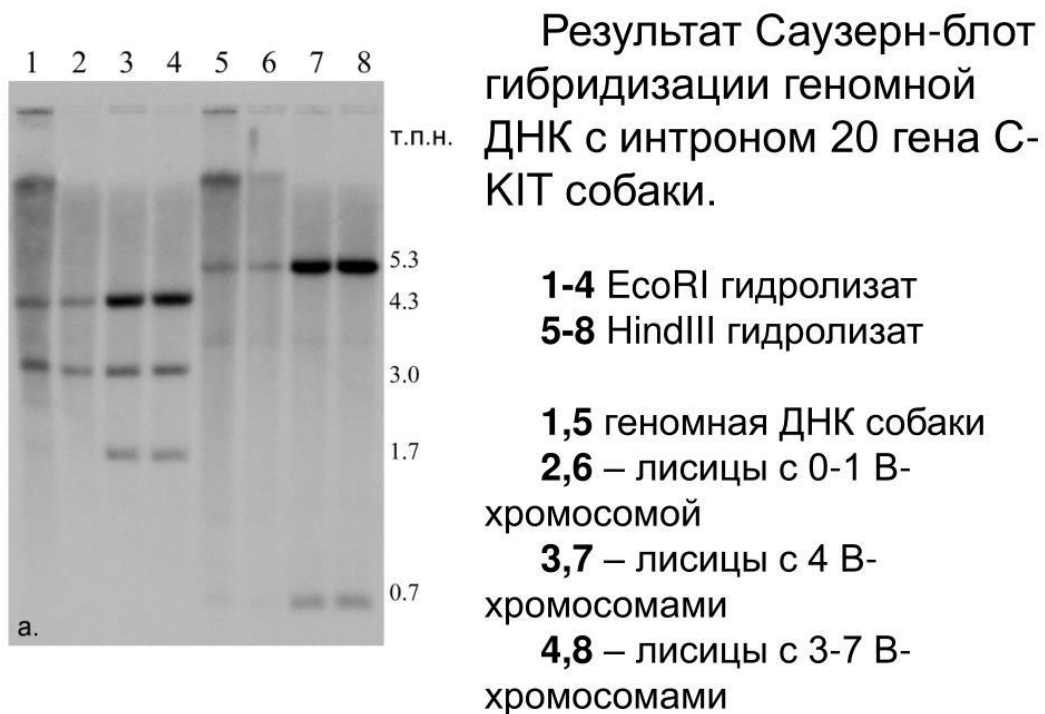
После разделения фрагментов ДНК методом электрофореза на агарозный гель кладут пластины нитроцеллюлозы или нейлона. Необходимо добиться плотного контакта между нитроцеллюлозой и гелем.

Под действием капиллярных сил осуществляется перенос фрагментов ДНК из геля на мембрану с нитроцеллюлозой. В результате ионообменных взаимодействий ДНК связывается с положительно заряженными молекулами нитроцеллюлозы.

Для более прочного закрепления ДНК на мембране с нитроцеллюлозой проводят ее нагревание при температуре 80°C в течение двух часов, в случае с нейлоновыми мембранами проводят ультрафиолетовую обработку. После этого нитроцеллюлозу снимают с геля и обрабатывают радиоактивным зондом, обладающим специфичностью к необходимой нуклеотидной последовательности.

Гибридизацию проводят в течение 24 часов при температуре 65°C. По окончании гибридизации мембрану тщательно отмывают от остатков зонда и несвязанных фрагментов ДНК.

Визуализацию осуществляют в зависимости от используемого зонда. Либо путем радиоавтографии при использовании радиоактивного ДНК-зонда, либо проводят оценку окраски мембраны в соответствии с цветом красителя (рисунок 12).



10

Рисунок 12 – Визуализация результатов Саузерн-блоттинга

Выделенные из ДНК гены содержат информацию о необходимом белке. Для реализации этой информации в новом организме необходимо встроить изолированный участок в состав вектора и получить *рекомбинантную ДНК* для ее переноса в клетку-реципиент.

### 2.3 Конструирование рекомбинантных ДНК

Одним из самых распространённых методов конструирования ДНК является *рестриктазно-лигазный метод*. Специфические эндонуклеазы класса II разрезают цепи ДНК в молекуле, из которой необходимо выделить соответствующий фрагмент, и в молекуле, куда этот фрагмент будет встраиваться на симметричные участки, образуя ступеньки («липкие концы»). Образовавшиеся фрагменты ДНК являются комплементарными друг другу и способны к ассоциации между соответствующими парами азотистых оснований. Для прочного сшивания молекулы в местах фосфодиэфирных связей используются фермент ДНК-лигаза (рисунок 13).

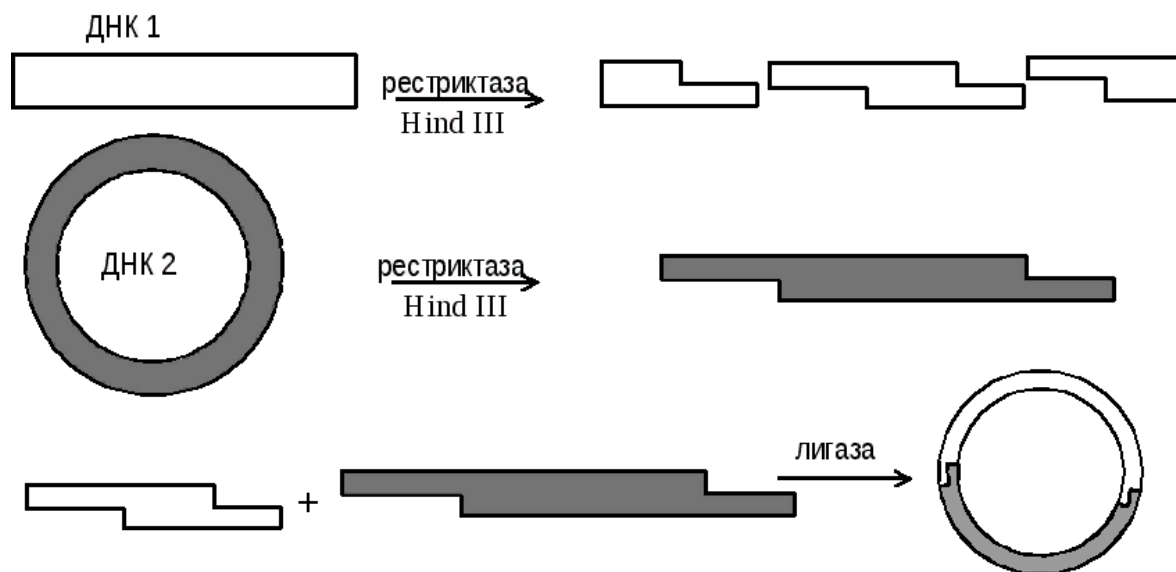


Рисунок 13 – Сшивка ДНК по «липким концам»

В том случае, когда требуемые фрагменты ДНК находятся на значительном расстоянии от сайта узнавания, для эндонуклеаз используют *линкерные молекулы*, которые представляют собой искусственно синтезированные фрагменты молекулы ДНК, содержащие соответствующие нуклеотиды для узнавания рестриктазами.

Модифицированный рестриктазно-лигазный метод с использованием линкерных молекул заключается в следующем:

- к тупым или липким фрагментам ДНК пришиваются короткие синтетические участки, содержащие необходимые для распознавания рестриктазами места;

- после присоединения линкерной молекулы цепь ДНК обрабатывается той рестриктазой, которая чувствительна к присоединенным олигонуклеотидам и образуются «липкие концы»;

- в дальнейшем происходит смешивание фрагментов двух молекул ДНК, и липкие концы комплементарно связываются, образуя рекомбинантную ДНК (рисунок 14).

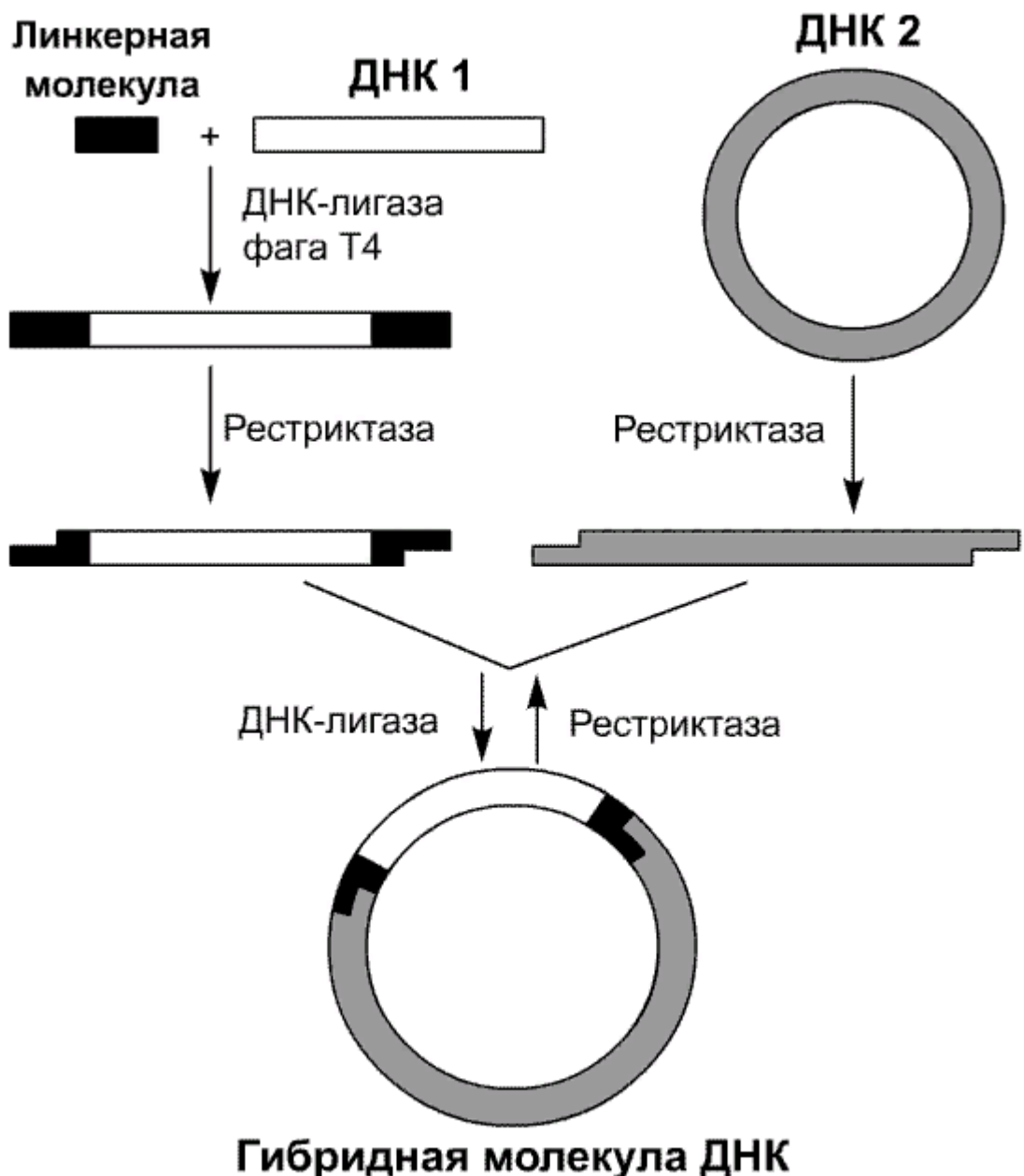


Рисунок 14 – Применение линкерных молекул для получения рекомбинантной ДНК

## 2.4 Векторы генетической инженерии

**Векторы** – это молекулы ДНК, способные к самостоятельной репликации, предназначенные для переноса чужеродной ДНК в клетку реципиента. Векторы применяют для создания рекомбинантных ДНК *in vitro* для последующего переноса их в клетки и клонирования новых генов.

Основные требования, предъявляемые к векторам:

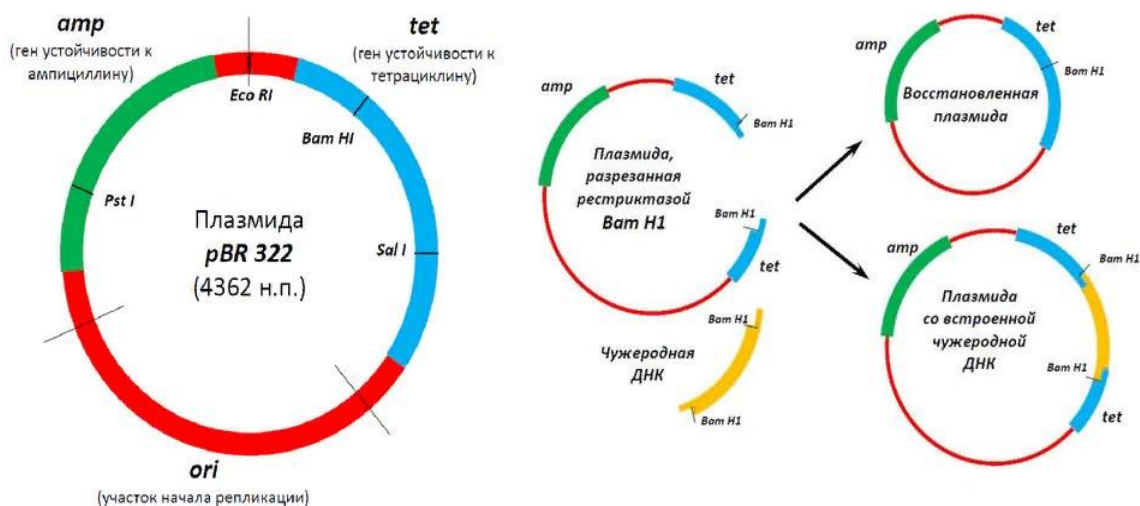
- быть репликоном;
- содержать селективный маркер (наиболее часто таким маркером является устойчивость к антибиотикам);
- иметь минимальное количество сайтов узнавания для ферментов рестрикции.

### Основные типы векторов, используемых в генетической инженерии

**Плазмиды.** В бактериальных клетках содержится большое количество небольших по размеру органелл, представляющих собой кольцевые молекулы ДНК длиной несколько тысяч пар оснований, которые называются *плазмидами* (рисунок 15). В плазмидах содержатся гены устойчивости к антибиотикам, ионам тяжелых металлов, гены, контролирующие метаболизм некоторых органических соединений. Плазмиды обладают многокопийностью.

## Генная инженерия

### Вектор (плазмида). Общие сведения



9

Рисунок 15 – Вектор на основе плазмиды

**Фазмиды** (от греч. φάγος — пожирающий и англ. plasmid, от греч. πλάσμα — нечто образованное, сформированное) — векторы, представляющие собой искусственные гибриды между фагом и плазмидой. Образованные фазмиды в зависимости от условий могут развиваться либо как фаги, либо как плазмиды (рисунок 16).



Рисунок 16 – Строение фазмиды

Фазмида представляют собой *плазмиду*, которая содержит *точку начала репликации*  $f1$  из фага  $f1$ . Она может быть использована для *клонирования* вектора в комбинации с *нитевидным бактериофагом M13*.

Фазмида может реплицироваться как плазида, а также может быть упакована в виде одноцепочечной ДНК в вирусные частицы. Фазмиды содержат начало репликации ( $Ori$ ) для двухцепочечной репликации, а также  $f1 Ori$  для включения одноцепочечной репликации и упаковки в фаговые частицы. Многие часто используемые плазмиды содержат  $f1 Ori$  и, таким образом являются фазмидами. Подобно плаздам, их используют для клонирования фрагментов ДНК при помощи таких методов, как трансформация и электропорация.

Инфекция бактериальной клетки-хозяина, содержащей фазмиду осуществляется фагом-помощником, например VCSM13 или M13K07, который обеспечивает синтез необходимых вирусных компонентов для того, чтобы одноцепочечная ДНК (оцДНК) реплицировалась и упаковывалась в фаговые частицы.

Фаг-помощник инфицирует бактерию, сначала прикрепляясь к её пиллям, а затем, после присоединения, транспортирует свой геном в цитоплазму клетки-хозяина. Внутри клетки геном фага инициирует выработку фазмидной одноцепочечной ДНК в цитоплазме. Эта фазмидная ДНК затем упаковывается в фаговые частицы.

Фаговые частицы, содержащие оцДНК, высвобождаются из бактериальной клетки во внеклеточную среду. Нитевидные фаги тормозят рост бактерий, но, в отличие от фага  $\lambda$  и фага T7, обычно не вызывают лизис. Фаги-помощники, как правило, разработаны таким образом, что упаковка ДНК в них идёт менее эффективно (за счёт дефектного сайта начала репликации), чем упаковка фазмид, так, чтобы полученные фаговые частицы содержали преимущественно фазмидную ДНК. Инфекция нитевидного фага F1 требует наличие пилей, таким образом, для получения фаговых частиц могут быть использованы только бактериальные хозяева, содержащие F-плазмиду или её производные.

Для клеток высших эукариот эффективные векторы созданы на основе хромосомной ДНК ретровирусов, вирусов SV40, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вируса осповакцины, вируса герпеса и др. Ретровирусные векторы используются особенно часто для переноса генов в клетки животных (рисунок 17).

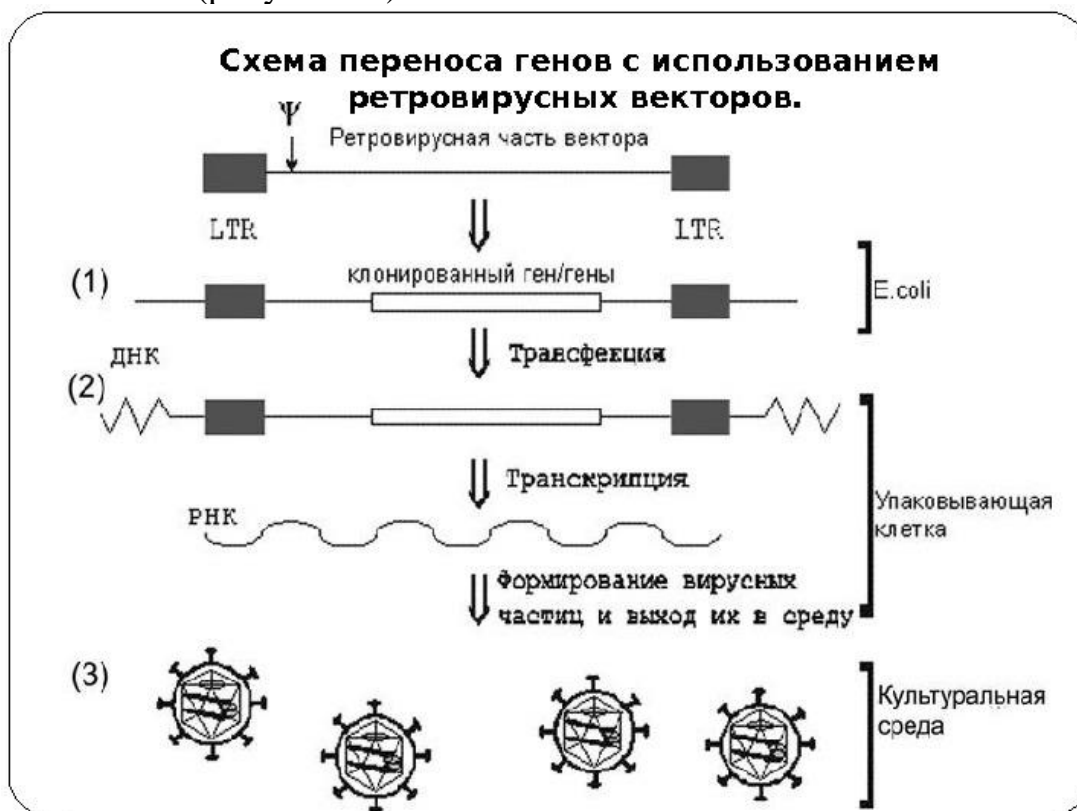


Рисунок 17 – Использование ретровирусных векторов для переноса генетической информации



Необходимо отметить, что при использовании вирусов в качестве векторов для животных клеток никогда не сохраняется нативный вирус – используются лишь некоторые регуляторные последовательности вируса для конструирования вектора.

## 2.5 Введение векторов в бактериальные клетки

**Трансформация** – поглощение рекомбинантной ДНК бактериальной клеткой, бактерии при этом приобретают новый признак, а при размножении получают многочисленное потомство - клоны (рисунок 18).

Для того, чтобы рекомбинантная ДНК смогла проникнуть в клетку, она должна стать проницаемой. Этого можно достигнуть в результате *электропорации*, в результате воздействия напряжения или под действием химических веществ, разрушающих клеточную мембрану, таких как хлорид кальция и других солей двухвалентных металлов.

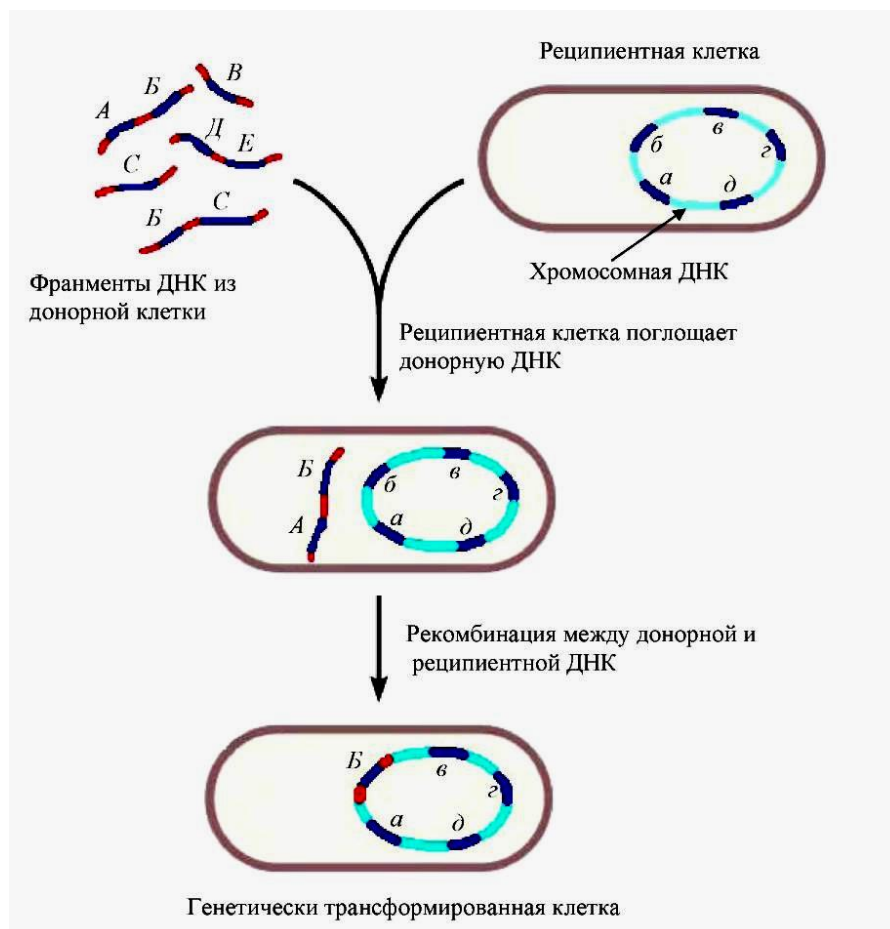


Рисунок 18 – Перенос генетической информации в процессе трансформации

## 2.6 Отбор трансформированных клеток

Результаты генетического эксперимента оцениваются количественно. Для этого определяют *частоту и эффективность трансформации*.

*Частота трансформации* – количество клеток в популяции, содержащих чужеродную ДНК к общему количеству клеток.

*Эффективность трансформации* - количество трансформированных клеток в пересчете на 1 мкг ДНК, используемой для трансформации.

Для идентификации трансформированных клеток подбирают селективные питательные среды, в зависимости от того какой маркер использован в векторе.

При клонировании рекомбинантных ДНК при помощи плазмидного вектора рВR322 для скрининга мутантов бактериальные культуры после трансформации пересевают на питательную среду, содержащую антибиотик тетрациклин (способность к синтезу антибиотика ампициллина была утрачена вследствие действия соответствующей рестриктазы на векторную молекулу) (рисунок 19).

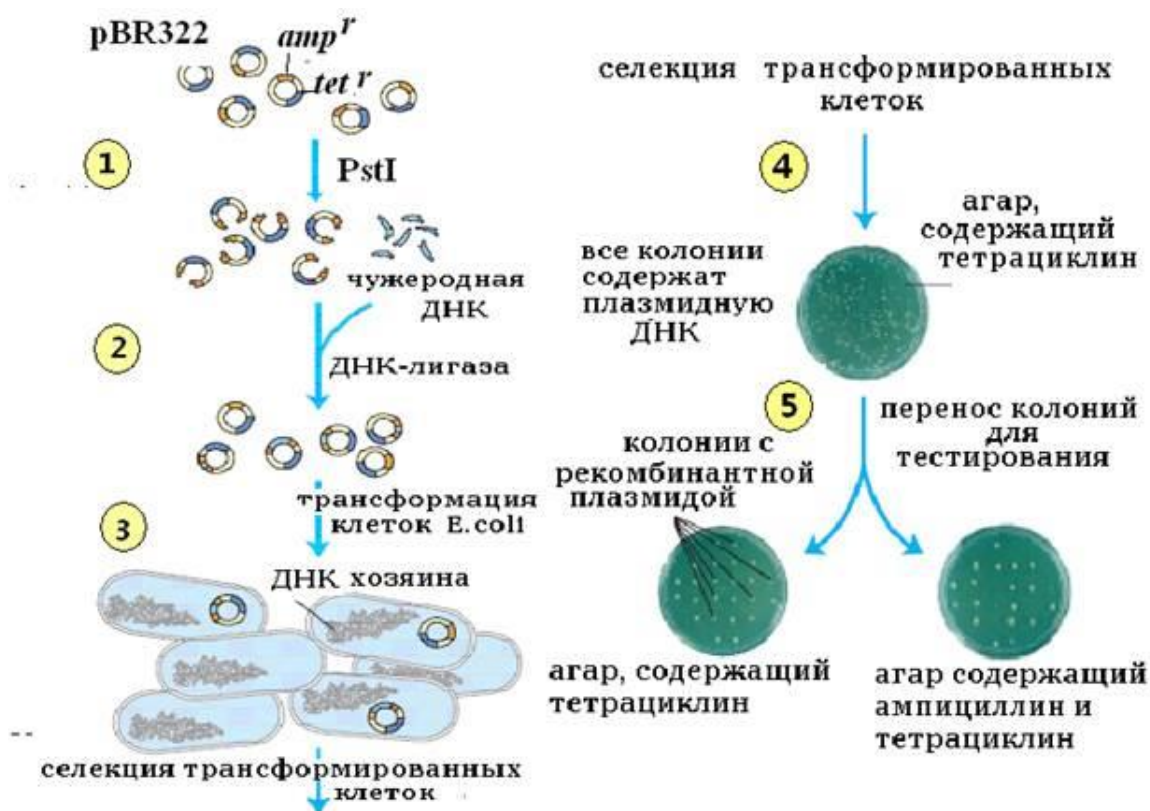


Рисунок 19 – Трансформация и идентификация *E. coli* с использованием вектора рВR322

На данном этапе на среде вырастут все клетки, в которых есть рекомбинантная ДНК, и ДНК вектора, в которую фрагмент донорской ДНК не встроился

На следующем этапе выросшие на питательной колонии пересевают на питательную среду с тетрациклином и на среду с ампициллином. Клетки, содержащие рекомбинантную ДНК, будут расти только на среде с тетрациклином, так как в результате генетической трансформации устойчивость к ампициллину у них была утрачена. Соответственно, клетки, где рекомбинантная ДНК отсутствует, а содержится ДНК вектора, растут на обоих вариантах сред.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Охарактеризуйте основные стадии проведения генноинженерного исследования.
2. Какие ферменты используются для генетических манипуляций, их назначение, строение и функции?
3. Каким образом осуществляется перенос рекомбинантных ДНК в клетку-реципиента и как осуществляется скрининг клеток с новыми свойствами?

### **Список литературных источников для самостоятельного изучения**

1. Патрушев Л. И. Искусственные генетические системы. Том1: Генная и белковая инженерия. - М.: Наука, 2004. - 530 с.
2. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия. — Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2010. – 496 с.

### 3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В МЕДИЦИНЕ

Генетическая инженерия оказывает большое влияние на развитие медицинских технологий. С помощью методов генетической инженерии разработаны диагностические средства, вакцины, препараты для терапии и лечения наследственных заболеваний.

Генетическая инженерия является единственным терапевтическим методом лечения первичного иммунодефицита. Перспективными направлениями использования генетической инженерии является трансплантология и редактирование генома человека.

Одним из наиболее значимых достижений генетической инженерии для медицины является крупномасштабное производство человеческого инсулина.

#### 3.1 Получение человеческого инсулина

Для крупномасштабного получения человеческого инсулина используются бактерии рода *E. coli*.

Инсулин представляет собой пептид, состоящий из 51 аминокислотного остатка. Две полипептидные цепи связаны дисульфидными мостиками (А- и В-пептиды)

Предшественником инсулина является *препроинсулин*, содержащий сигнальный пептид и соединительный пептид (С-пептид). В результате удаления сигнального пептида образуется *проинсулин*, состоящий из 86 аминокислотных остатков, цепи А и В соединены С-пептидом. В дальнейшем при отщеплении С-пептида образуется *инсулин*.

Ген INS, ответственный за синтез проинсулина, находится в 11 хромосоме. В результате синтеза комплементарной ДНК получена копия INS-гена, представляющего собой комплементарные цепи с «липкими» концами.

Полученный синтетический ген присоединяется к 3'-концу фермента  $\beta$ -галактозидазы и вводится в плазмиду pBR322 (рисунок 20). Комплементарные пары оснований липких концов плазмиды и ДНК, кодирующей информацию о проинсулине, соединяются, и плазида замыкается, образуя рекомбинантную ДНК.

Рекомбинантную ДНК, несущую в себе ген, необходимый для синтеза проинсулина, вводят в *E. coli*. Генно-модифицированные бактерии в результате своей жизнедеятельности синтезируют  $\beta$ -галактозидазный гибридный белок, соединенный с пептидной цепью инсулина через остаток метионина. При обработке бромцианом гибридный пептид отделяется. На следующей стадии от проинсулина в результате протеолиза отделяется С-пептид, превращая его в инсулин. Полученный инсулин подвергают очистке.

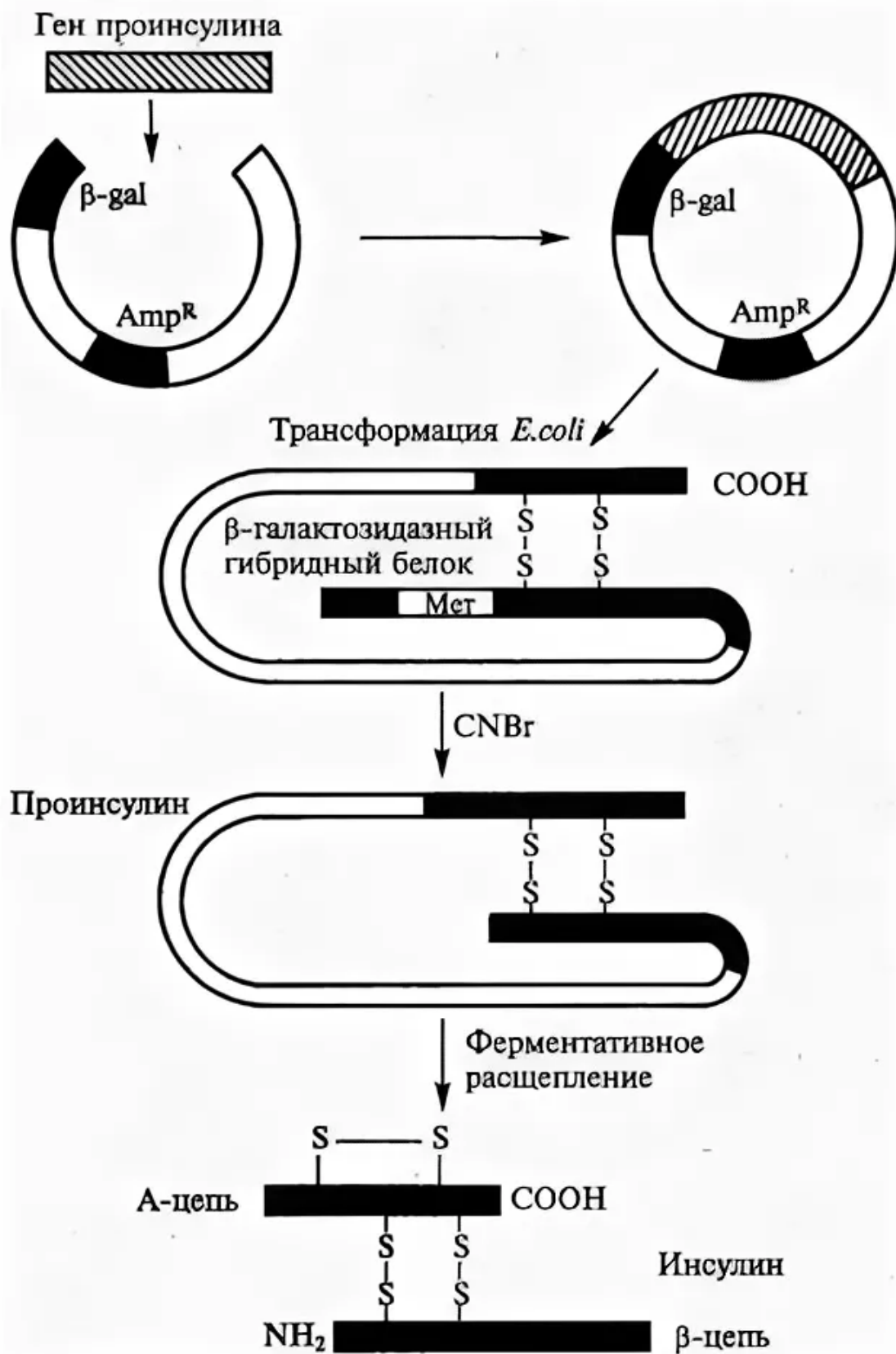


Рисунок 20 – Получение генноинженерного инсулина

Применение генноинженерного инсулина не приводит к аллергическим реакциям, как это наблюдалось при использовании инсулина, полученного из поджелудочной железы животных. Благодаря крупномасштабным объемам производства удается удовлетворять потребность в этом препарате большого количества людей.

### 3.2 Получение генноинженерного интерферона

Важнейшим препаратом для медицинских целей, полученным с использованием генетической инженерии, является интерферон. Исследования по переносу генов интерферона человека в бактериальные клетки были начаты еще в 70-х годах прошлого века сразу тремя научными лабораториями: Цюрихского университета, Института по исследованию рака в Токио, фирмы «Genentech» США.

В человеческом организме синтезируется несколько видов интерферонов:

- А-интерферон (лейкоцитарный);
- В-интерферон (фибробластный);
- G – интерферон (иммунный).

Интерфероны можно получать из крови человека, однако выход интерферонов при таком способе получения очень низким. Из 50 000 литров крови получается 0,1 г чистого интерферона.

Процесс получения интерферона заключался в следующем.

Клетки крови заражали вирусом Сендай и культивировали в течение 24 часов, после чего центрифугировали на суперцентрифуге. В надосадочной жидкости содержался интерферон. Очистку интерферона проводили хроматографически.

Стоимость такого препарата была очень высокая. Однако высокая фармакологическая эффективность интерферонов, в том числе в отношении онкологических заболеваний, заставляла исследователей и производителей искать новые способы получения интерферонов, а именно с использованием генетической инженерии.

На начальных этапах получения генноинженерного интерферона не удавалось добиться большого выхода, так как концентрация иРНК в лейкоцитах была очень маленькой. Получали 1–2 молекулы интерферона из одной бактериальной клетки.

В 1981 году фирмой «Genentech» удалось сконструировать рекомбинантную ДНК, содержащую ген G – интерферона, и внедрить ее в клетку бактерий, дрожжей и млекопитающих. Генно-модифицированные микроорганизмы продуцировали интерферон в количестве 1млн единиц интерферона в 1 л культуральной жидкости.

Современное производство генноинженерного интерферона включает в себя следующие стадии:

- Синтез и выделение и-РНК интерферона из лейкоцитов;
- Синтез ДНК комплементарной и-РНК интерферона лейкоцитов;
- Введение комплементарной ДНК в плазмиду;
- Перенос плазмиды в бактериальные клетки;
- Культивирование бактерий, содержащих рекомбинантную ДНК;
- Сепарирование биомассы бактерий;
- Дезинтеграция клеток и экстрагирование бактериальных клеток;
- Осаждение с последующим центрифугированием;
- Высаливание интерферона из надосадочной жидкости;
- Очистка осадка интерферона;
- Растворение интерферона и его очистка через колонку и иммуносорбентом;
- Вымывание интерферона с колонки и очистка на целлюлозном катионообменнике.

В качестве продуцента интерферона применяют штаммы *E. coli* SS5, полученные с помощью рекомбинантной плазмиды р SS5. Получение рекомбинантных интерферонов значительно удешевляет производство и предотвращает риски передачи инфекции от донорного организма.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. В чем преимущества использования генетической инженерии в медицине?
2. Какие виды интерферонов синтезируются в организме человека?
3. Какие органы и ткани используются для получения инсулина и интерферона?
4. Какие типы рекомбинантных интерферонов существуют, и в чем их основные особенности?
5. В чем заключается стратегия конструирования генно-инженерного интерферона?

### **Список источников литературы для углубленного изучения темы**

1. Введение в генетическую инженерию: Учебное пособие для самостоятельной внеаудиторной работы студентов по курсу «Генная инженерия» /З. И. Абрамова. - Казань: Казанский университет, 2008.- 169 с.
2. Основы генетической инженерии. Методическое пособие /Отв.ред. Л.В. Хотылева.– Гомель: УО «ГГУ им. Ф.Скорины», 2003. – 118 с.

## 4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

Растения обладают очень важным свойством регенерации *in vitro* позволяющим из недифференцированных соматических клеток формировать полноценное растение. Это свойство, называемое *тотипотентностью*, дает возможности генетическим инженерам изучать процессы функционирования новых генов, введенных в растительные клетки, и использовать в селекции растений.

Генетическая инженерия позволяет расширить методы традиционной селекции и направленно изменять свойства организма путем прямого введения соответствующего гена взамен длительного периода селекции путем скрещивания генов.

### 4.1 Строение и свойства Ti-плазмид

Отдельные представители почвенных бактерий рода *Agrobacterium* способны вызывать заболевания растений, формируя опухолевые образования, называемые *крончатыми галлами*, представляющими собой недифференцированные клетки, растущие в месте заражения (рисунок 21).

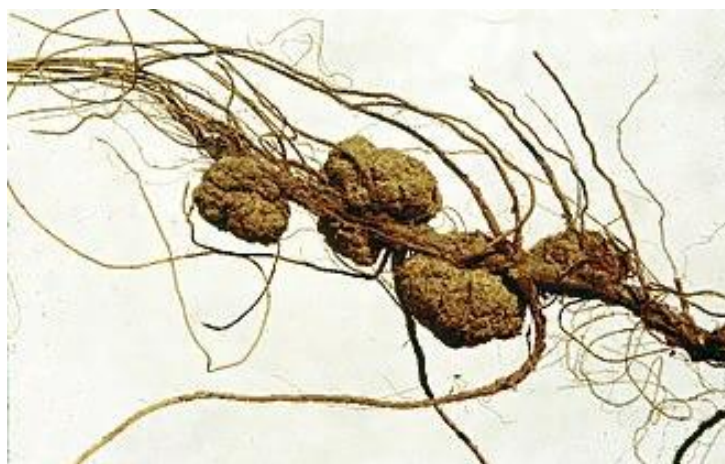


Рисунок 21 – Образование (галлы), вызванные бактерией *Agrobacterium sp.*

Эти клетки способны к неограниченному росту и при культивировании *in vitro* способны расти на питательных средах без специфических гормонов, необходимых обычным растительным клеткам. Изучение механизмов возникновения опухолей показало, что стимулирует образование крончатых галлов *Ti-плазида*, которая способна интегрироваться в хромосомы растений (рисунок 22).

В плазмиде находится область T-ДНК, она кодирует синтез фитогормонов и опинов.





Рисунок 22 – Строение Тi-плазмиды

Кроме того, в Тi-плазмиде содержится область вирулентности, ответственная за перенос Т-ДНК в клетку, гены, утилизирующие опины, и локусы, контролирующие размножение плазмиды. В области Т-ДНК локализовано шесть различных генов, отвечающих за синтез гормонов и образование опухоли.

В гене *iaaM* содержится информация о ферменте, триптофан-2-монооксигеназе, катализирующей превращение триптофана в индолилацетамид. Ген *iaaH* 2 ответственен за превращение индолилацетамида в гормон растений ауксин - индолил-3-уксусную кислоту. В результате у растений появляется не свойственный им путь образования ауксина, что приводит к изменению его количества в растении.

Содержащаяся в гене *ipt* изопентенилтрансфераза катализирует ранние стадии биосинтеза природного цитокинина. Все три гена являются онкогенами, катализирующих образование ауксина и цитокинина, отвечающих за деление клетки.

Ген 5 синтезирует метаболит, обладающий антиауксиновым эффектом. Ген *tml* 6 влияет на величину опухоли, осуществляя секрецию нопалина и октопина и

изменяя чувствительность растительных клеток к цитокинину, тем самым сохраняя клетки в недифференцированном состоянии. Таким образом четыре или пять генов и их ферментов подавляют дифференцировку клеток, переводя их в состояние деления, а шестой ген несет информацию о ферменте, катализирующий синтез опинов.

## 4.2 Механизмы агробактериальной трансформации

Процесс агробактериальной трансформации включает в себя четыре этапа:

- Присоединение бактерий к клеточной стенке растения;
- Проникновение Т-ДНК в растительную клетку;
- Внедрение Т-ДНК в геном растений;
- Экспрессия продуктов метаболизма в клетке растений.

Агробактериальная трансформация активизируется только в местах повреждения растений, где происходит выделение низкомолекулярных фенольных соединений, углеводов и снижение рН кислую сторону. За перенос Т-ДНК в клетку отвечают гены, локализованные в вирулентной области (рисунок 23).

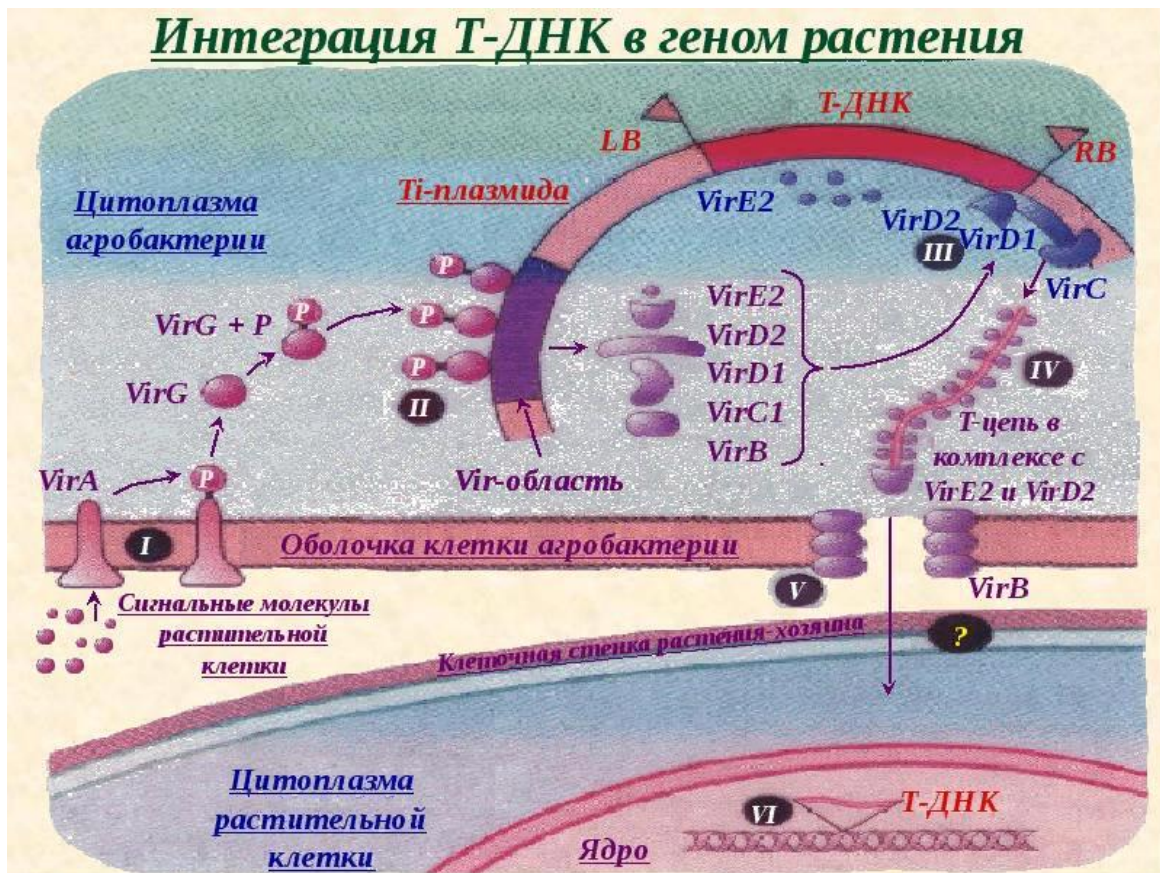


Рисунок 23 – Механизм агротрансформации растений

Сигналы о повреждении ткани растения воспринимают белки VirA и ChvE. Белок ChvE чувствителен к присутствию ацетосирингона, специфического соединения, образующегося при возникновении раны на растении.

Белок ChvE оказывает влияние на способность VirA белка воспринимать фенольные соединения. VirA представляет собой гистидиновою протеинкиназу и пронизывает клеточную мембрану в двух местах. Этот белок является донором фосфора для белка VirG, который, в свою очередь, активирует остальные гены Vir области Ti-плазмиды.

Синтез ферментов Vir- генов является обратимым процессом. В том случае, если организм хозяина – больной и нежизнеспособный организм, то перенос T-ДНК не осуществляется.

VirD кодирует несколько продуктов, в том числе синтез эндонуклеазы, которая разрезает Ti-плазмиду в строго определенных участках, расположенных по обе стороны от T-ДНК. Эндонуклеаза вырезает T-ДНК из Ti-плазмиды. Белки VirB и VirE транспортируют T-ДНК в растение, процесс занимает около 30 минут.

После встраивания в хромосому растения T-ДНК является частью его генома. Транскрипцию T-ДНК осуществляет РНК-полимераза II растения-хозяина. В геноме растения может содержаться несколько копий T-ДНК. Сами бактериальные клетки в растения не попадают, остаются снаружи в межклеточном пространстве и используют продукты метаболизма растения как источники азота и углерода.

### ***Существует два подхода для переноса генетической информации посредством T-ДНК Ti- плазмиды***

В первом случае *T-ДНК клонируют в составе плазмидного вектора* введенного в *E. coli*. На первом этапе T-ДНК вырезают из Ti-плазмиды и встраивают в стандартный плазмидный вектор для размножения в *E. coli*.

После того как в плазмиду внедрили T-ДНК она начинает реплицироваться, образуя множество копий, что приводит к увеличению числа копий T-ДНК. Бактерии, содержащие плазмиды с встроенным фрагментом Ti-плазмиды, размножают, после чего плазмиды выделяют из клеток. После этого, используя стандартные методы генетической инженерии, в T-ДНК встраивают чужеродный ген, несущий соответствующий признак для трансформации растений.

Рекомбинантную молекулу, содержащую T-ДНК и встроенный ген, вновь размножают в *E. coli*, а затем внедряют в клетки *Agrobacterium tumefaciens* с неизменённой Ti-плазмидой. В результате гомологичной рекомбинации между T-ДНК нативной и сконструированной плазмидой T – ДНК с встроенным геном замещает нормальную T-ДНК в Ti-плазмиде агробактерии.

Таким образом, клетки *Agrobacterium tumefaciens* будут содержать модифицированную Ti-плазмиду, несущую в себе нужный ген. На заключительном этапе происходит заражение растения агробактериями, в результате чего растение приобретает новый признак (рисунок 24).

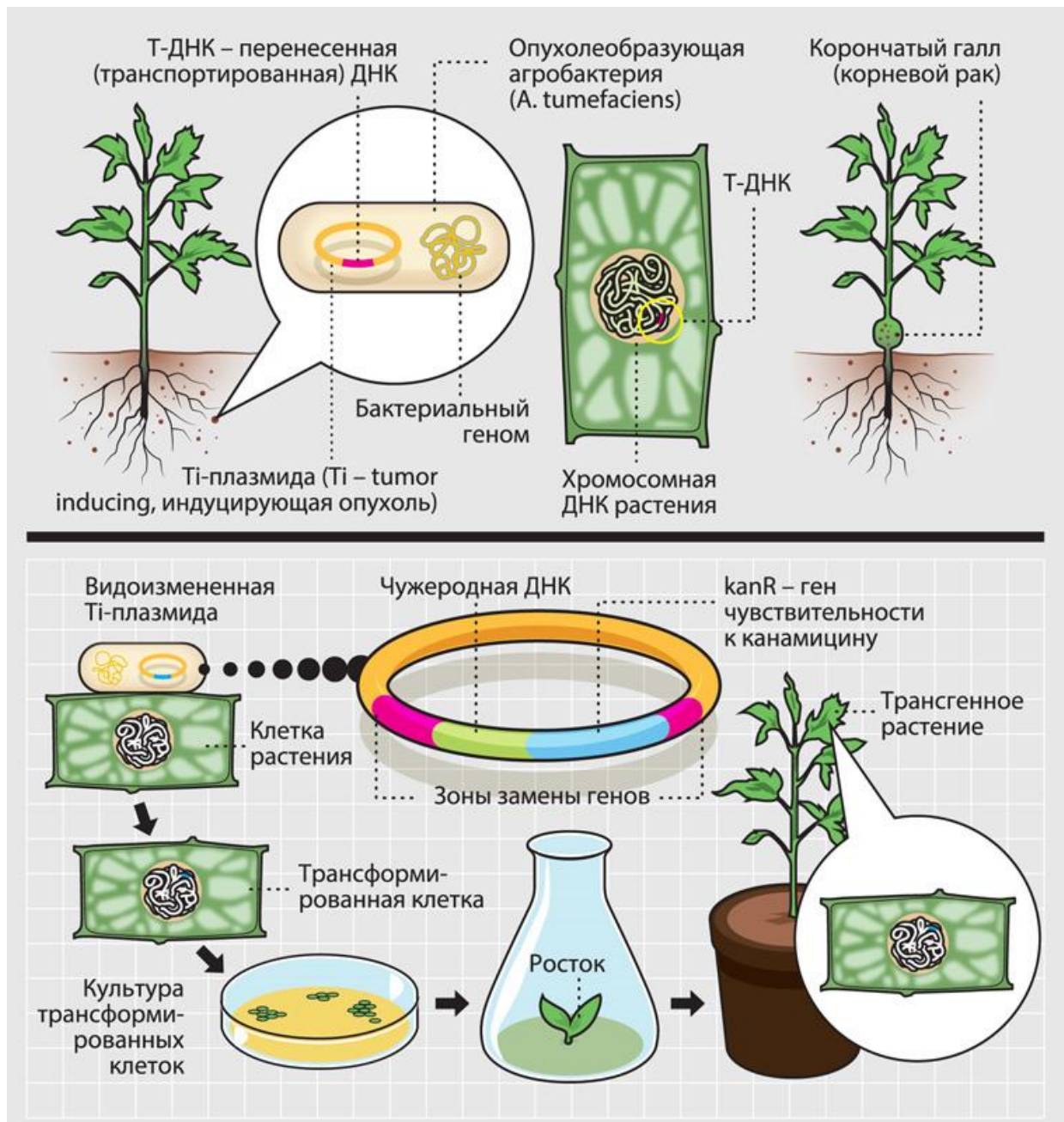


Рисунок 24 – Агробактериальная трансформация растений

Для упрощения процедуры агробактериальной трансформации используют **бинарные векторные системы**. В этом случае агробактерии содержат две модифицированные Ti-плазмиды.

В одной плазмиде содержится только *vir* область, гены которой необходимы для разрезания и выделения Т-ДНК (плазмиды-помощницы). Вторая Тi-плазида содержит в своем составе Т-ДНК со встроенным геном для модификации растения.

Ферменты *vir* генов вырезают Т-ДНК как на собственной плазмиде, так и на соседней, то есть способны работать вне их местоположения. Таким образом, если агробактерия содержит Тi-плазмиду с участком *vir* и другую плазмидную Т-ДНК со встроенным геном, то эти бактерии смогут трансформировать растительные клетки.

Традиционным способом генетической трансформации растений с помощью Т-ДНК Тi-плазмиды является непосредственное нанесение *Agrobacterium tumefaciens* на повреждённое место в побеге. Кроме того, существуют и другие методы для переноса генетической информации для создания трансгенных растений, в том числе с применением специальных приборов, которые могут стрелять вольфрамовыми пулями, одетыми в молекулы ДНК.

На сегодняшний день создано около 40 видов трансгенных растений, обладающих производственно-ценными свойствами – сбалансированным составом аминокислот, устойчивых к заморозкам или засухе, вредителям. Многие из них нашли широкое применение у производителей сельскохозяйственной продукции.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Каким образом осуществляется перенос генетической информации в процессе агротрансформации?
2. В сущность явления тотипотентности?
3. Какие гены локализованы в Тi-плазмиде?
4. Каким образом осуществляется агробактериальная трансформация при помощи бинарной векторной системы?

### **Список источников литературы для углубленного изучения темы**

1. Основы генетической инженерии и биотехнологии: учеб.-метод. пособие / А.В. Вишневец [и др.]. – Витебск: УО «ВГАВМ», 2010. – 76 с.
2. Генетическая инженерия растений. / И.А. Лундовских, Е.А. Бессолицына. – Киров: ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011. – 95 с

## 5. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ЖИВОТНЫХ

### 5.1 Основные направления использования генетической инженерии в животноводстве

Основные направления использования трансгенных животных:

- повышение продуктивности сельскохозяйственных животных;
- повышение сопротивляемости болезням;
- повышение скорости роста;
- улучшение качественных характеристик сельскохозяйственной продукции;
- создание животных-биореакторов для продуцирования биологически активных веществ.

*Трансгенное животное* – животное, в организм которого введен ген, несущий определенный признак, отсутствующий в исходном организме.

*Трансген* – ген, внедренный в организм-реципиент.

При помощи методов *селекции* возможно закрепить новый ген в потомстве и создать *трансгенные линии* сельскохозяйственных животных.

Повышения продуктивности и скорости роста сельскохозяйственных животных удалось добиться путем использования рекомбинантного гормона роста (*rBGH* – рекомбинантный бычий соматотропин). Гормон вводили в виде микроинъекций молодняку крупного рогатого скота.

Показано, что ежедневное применение гормона роста приводило к увеличению суточных приростов молодняка на 20–30% при значительном сокращении затрат на корма. Менее значительный эффект наблюдался у свиней при кормлении модифицированным кормом с увеличенным содержанием белка. У овец увеличения привеса не наблюдалось, но отмечено снижение содержания жира.

В направлении повышения продуктивности животноводства ведутся исследования по уменьшению содержания лактозы в молоке крупного рогатого скота путем создания пород животных, в геноме которых внедрен ген, способствующий распаду лактозы. Таким образом, появляется возможность получения молока с низким содержанием лактозы для людей с непереносимостью молочного сахара.

Потери животных от заболеваний различной природы наносят большой ущерб животноводству. Имеются определенные успехи в создании животных, обладающих резистентностью к вирусу гриппа, лейкоза, аденовирусу. Исследования в этом направлении активно развиваются в двух направлениях:

- ✓ препятствие вторжения возбудителя в организм животного;
- ✓ изменение рецепторов

Группой ученых под руководством академика Л. К. Эрнста создана трансгенная линия овец, в молоке которых содержится *химозин* – фермент, используемый в сыроделии для коагуляции молока.

Такой подход позволят получать фермент в достаточных количествах, не используя сычуги молодых телят. Из трех литров молока трансгенных овец можно получить такое количество фермента, которого будет достаточно для выработки одной тонны сыра.

Другой пример получения трансгенных животных-биореакторов – коровы, продуцирующие с молоком эритропоэтин, используемый для лечения лейкозов.

Проводятся исследования по созданию других видов трансгенных животных для получения биологически активных веществ. Получены трансгенные коровы и козы, молоко которых содержит человеческий лактоферрин, альбумин, человеческий гомона роста, интерфероны. В Англии созданы породы овец, продуцирующих фактор свертывания крови.

Данный способ имеет преимущества перед биотехнологическими способами культивирования микроорганизмов-продуцентов, так как не требуется дорогостоящего оборудования для выращивания клеток микроорганизмов или клеточных культур растений и животных и очистки целевых продуктов.

Трансгенные животные быстро размножаются и имеют высокий выход биологически активных веществ в сравнении с продуцирующей способностью бактериальных культур. Еще одним направлением использования трансгенных животных является *ксенотрансплантация* – пересадка органов человеку.

Наиболее подходящими органами для трансплантации являются органы свиньи, так как имеют схожее анатомическое строение и сходство иммунологической системы. Одним из факторов отторжения пересаженных органов являются белки, расположенные на внешней стороне мембраны. У трансгенных свиней такие белки заменены на человеческие.

## 5.2 Способы получения трансгенных животных

Первые эксперименты по переносу генетической информации в организм животного были проведены *Джеймсом Гордоном* с сотрудниками на примере мышей путем введения в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки рекомбинантных ДНК, содержащих вирус герпеса.

Наиболее эффективным методом оказался *метод микроинъекций* рекомбинантных ДНК в более крупный мужской пронуклеус. Этот метод в настоящее время используется для создания трансгенных сельскохозяйственных животных (рисунок 25).

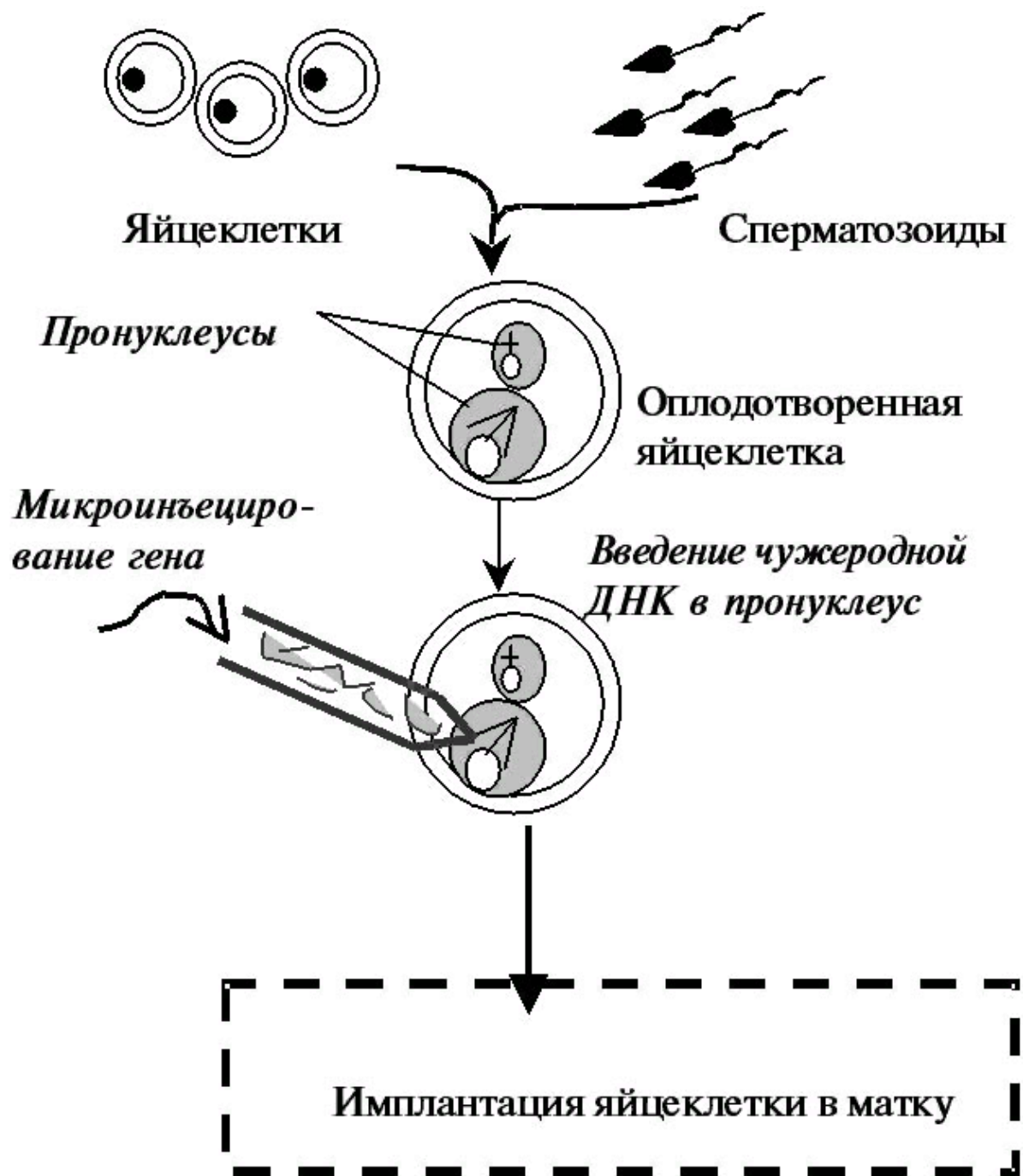


Рисунок 25 – Схема проведения микроинъекции ДНК для создания трансгенных животных

Основные этапы создания трансгенных животных включают в себя:

1. Получение и клонирование гена для введения в организм-реципиент.
2. Создание зигот и выбор пронуклеуса.
3. Микроинъекция определенного количества генов в пронуклеус.
4. Перенос зиготы в репродуктивные органы самки.



## 5. Оценка родившегося потомства по генотипическим и фенотипическим признакам.

На эффективность метода микроинъекций чужеродной ДНК оказывает влияние чистота, форма, концентрация выделенной ДНК, состав буферного раствора, качество эмбрионов, способ переноса эмбрионов в реципиентный организм.

Одной из сложнейших задач при создании трансгенных животных является экспрессия введенных генов. Удалось выяснить, что существует четыре промотора, способных активировать присоединенные гены – *гены металлотioneина, гены трансферрина, гены иммуноглобулина, гены эластазы*.

Первые опыты по получению генно-модифицированных животных были проведены на мышах **Ричардом Польмитером** с сотрудниками. В геном мышей были введены гены гомона роста крысы.

Гены гомона роста контролируются регуляторными элементами генов металлотioneина. В зиготу мышей была введена рекомбинантная ДНК, которая включала в себя промоторную часть – ген металлотioneана МТ1 мыши и структурную часть – ген гормона роста крысы, из которого собственный промотор и инициатор удалены.

Из 21 особи потомства у семи мышей была обнаружена экспрессия чужеродного гена. Живая масса потомства трансгенных мышей превышала в 1,8 раза контрольные экземпляры.

В среднем в геноме организма-реципиента мыши интегрируется 25–30% копий рекомбинантной ДНК. Благодаря созданию генетически-модифицированных мышей стало возможным изучение последовательностей ДНК, отвечающих за экспрессию генов.

Трансгенные мыши использовались также для изучения процессов клеточной трансформации и рака. Успешные опыты, проведенные по созданию генетически-модифицированных мышей, способствовали проведению исследований по получению других трансгенных животных (рисунок 26).

**Р. Хаммером и Г. Бремом** с сотрудниками были получены генетически-модифицированные кролики с гормоном роста человека. Трансгенные овцы, созданные в Австралии, в 1,5–2 раза превосходили по массе овец той же породы.

Предполагают вводить гены для увеличения роста шерсти, устойчивости к заболеваниям. Методами генной инженерии усовершенствованы породы крупного рогатого скота мясомолочного типа.

При работе с трансгенными животными применяют флуоресцентные методы окраски.

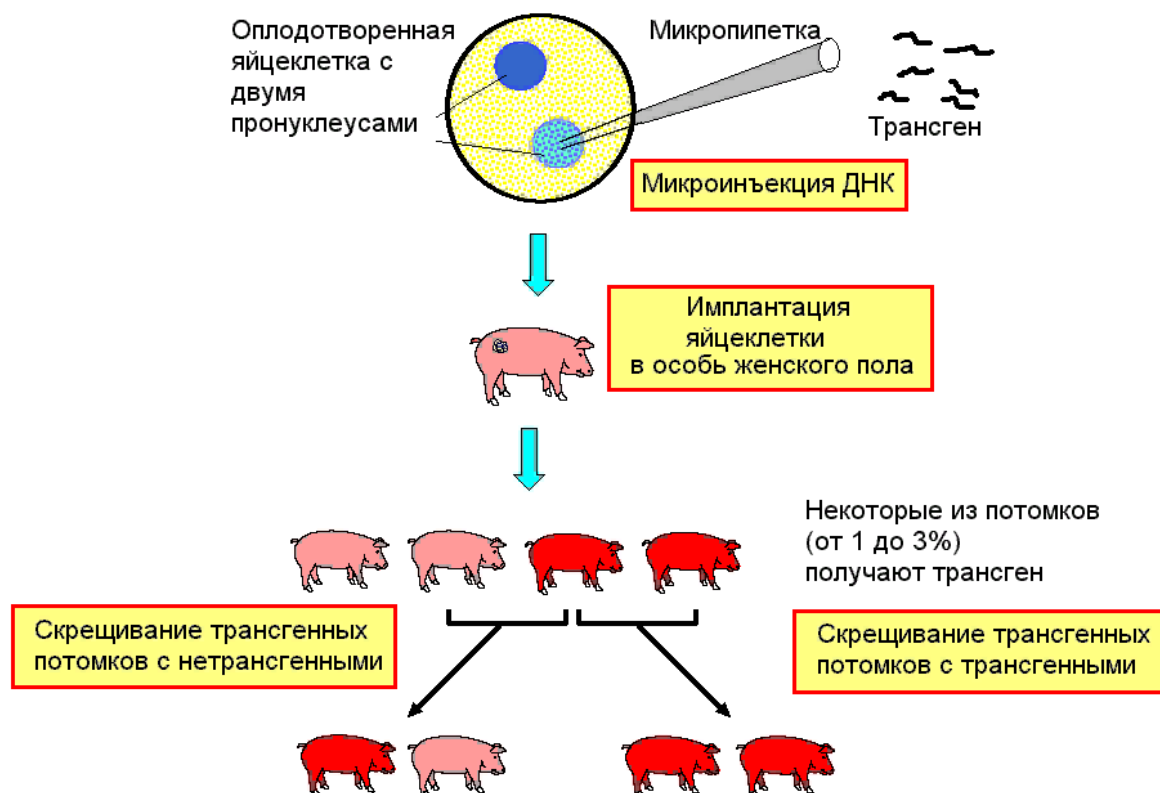


Рисунок 26 – Создание трансгенных животных микроинъекцией ДНК

Идентификацию трансгенных животных в потомстве осуществляют методом ПЦР, после чего их скрещивают для получения трансгенных линий. Среди потомства трансгенных животных могут оказаться *мозаичные* особи, не содержащие чужеродной ДНК.

Поэтому в первом потомстве при скрещивании трансгенными оказывается менее 50%. Иногда не удастся получить гомозиготные линии, так как вставка чужеродной ДНК может оказать на важнейшие жизненные участки генома.

При использовании метода микроинъекций степень интеграции чужеродной ДНК в геном составляет от 5 до 15 % в зависимости от вида животного. Важнейшей характеристикой эффективности трансгеноза является отношение количества полученных трансгенных животных к количеству пересаженных эмбрионов, выраженное в процентах. Величина этого показателя составляет 0,5 % у свиней и КРС и 2 % у мышей.

Для получения генетически модифицированных животных могут применяться *ретровирусы*. В этом случае происходит заражение пред имплантационных эмбрионов вирусом, несущим чужеродную ДНК (рисунок 27).

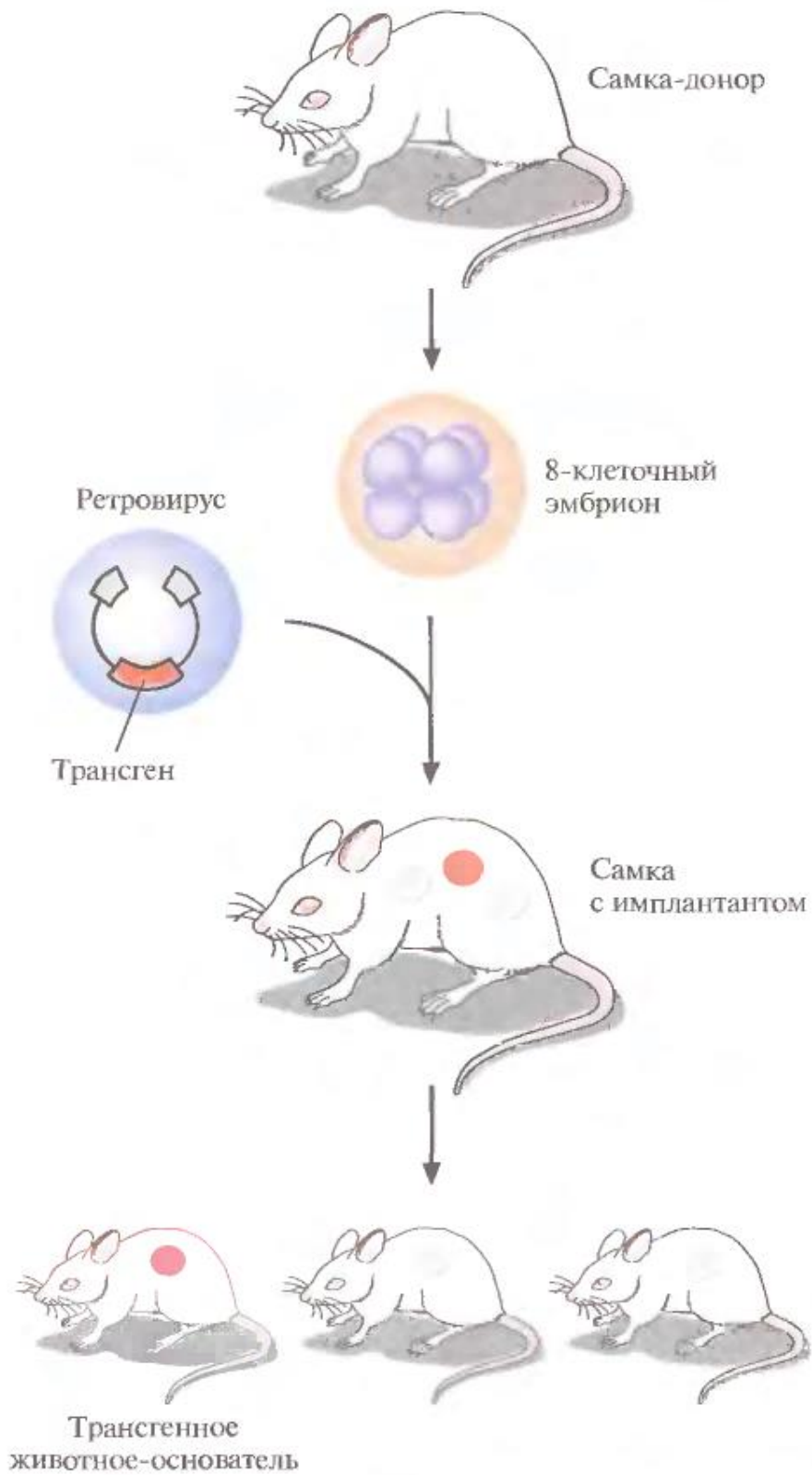


Рисунок 27 – Создание трансгенных мышей с использованием ретровирусов

Восьмиклеточную зиготу отделяют от оболочки и вносят в питательную среду с фибробластами, продуцирующими рекомбинантный ретровирус. Зараженные эмбрионы на стадии формирования бластулы переносят в организм самки.

В результате формируется организм с новым генетическим признаком. В дальнейшем для получения чистых линий трансгенных животных проводят масштабные скрещивания между неродственными особями.

Недостатком применения ретровирусов для трансгеноза является ограниченное число нуклеотидных пар основания для вставки. Вследствие этого трансгенный организм может оказаться без регуляторных последовательностей, необходимых для экспрессии новых генов в организме-реципиенте.

### 5.3 Использование клеток и культур тканей животных

В зависимости от целей и задач экспериментальных исследований существует два направления использования клеток животного организма:

- культуры клеток;
- культуры тканей и органов.

Первая линия культивируемых животных клеток *in vitro* была получена в 1951 году. Она представляет собой опухолевые клетки человека. На сегодняшний день она используется в исследовательских лабораториях по всему миру и имеет название *Hela*.

Одной из основных проблем, связанных с культивированием культур клеток и тканей в условиях *in vitro* является точное воспроизведение условий культивирования и результатов, так как применяемые питательные среды имели природное происхождение и нестабильный состав.

#### *Характеристика питательных сред*

Первая стандартизованная питательная среда для культивирования клеток млекопитающих была получена *Гарри Иглом* в 1955 году. Сейчас она носит название *среда Игла*.

Среда имеет сложный состав и содержит 28 компонентов, включая различные аминокислоты, витамины, антибиотики, глюкозу. Кроме ростовых факторов, в состав среды входит индикатор *феноловый красный* для идентификации жизнедеятельности культивируемых клеток.

Исходная среда имеет красный цвет. В процессе жизнедеятельности клетки выделяют различные продукты своего метаболизма, изменяя рН среды. Если среда изменяет свой цвет на желтый, это свидетельствует о том, что в среде накопились кислоты и другие продукты обмена. Среда в этом случае заменяют, так культуры клеток и тканей предпочитают нейтральные значения рН.

На сегодняшний день существуют различные модификации среды Игла, а также ряд других питательных сред для культивирования определённых клеток млекопитающих: *среда Дубелько DME* и *DMEM* (двойная модификация среды Игла), *среда Искова IMDM* (модификационная среда Дубелько), *Среда 199* (имеет в своем составе 66 компонентов) и другие.

### *Источники получения тканей*

Для получения культур тканей обычно используют эмбрионы или организмы взрослых животных. Все ткани, полученные от животных в постнатальном периоде, могут рассматриваться как зрелые (рисунок 28).



Рисунок 28 – Ткани животного организма

Материал, полученный из взрослых животных, необходимо подвергнуть специальной обработке, чтобы обеспечить его стерильность перед культивированием. Обработка обычно заключается в применении антибиотиков и фунгицидных препаратов.

Опухолевые ткани, изолированные из органов взрослых животных, ведут себя во многом как нормальные зрелые ткани, отличаясь от последних более быстрым ростом в течение первых дней культивирования.

Эмбриональные ткани стерильны, поэтому, чтобы получить стерильный материал, достаточно вести работу в асептических условиях. Эмбриональные и взрослые ткани животных могут быть получены из разных источников.

Наиболее доступны эмбриональные ткани цыпленка, мыши, крысы. Среди взрослых тканей классическими объектами для культивирования служат центральная нервная система, подкожные фибробласты, костный мозг.

### ***Типы культур клеток и тканей***

У животных различают культуру клеток и культуру тканей. В культуре тканей выращивают сообщества связанных между собой клеток, которые находятся в непосредственном контакте между собой.

Эмбриональные ткани являются более предпочтительными для получения культур, так как имеют лучшую выживаемость и скорость роста по сравнению со зрелыми тканями. В культуре клеток одиночные клетки растут, образуя клоны. Рассмотрим основные типы культур клеток.

*Первичная культура* — небольшая популяция свежесыведенных клеток, полученных из органа взрослого животного организма. Для ее приготовления кусочки ткани органа обрабатывают трипсином, который разрушает ткань с образованием отдельных клеток (рисунок 29).

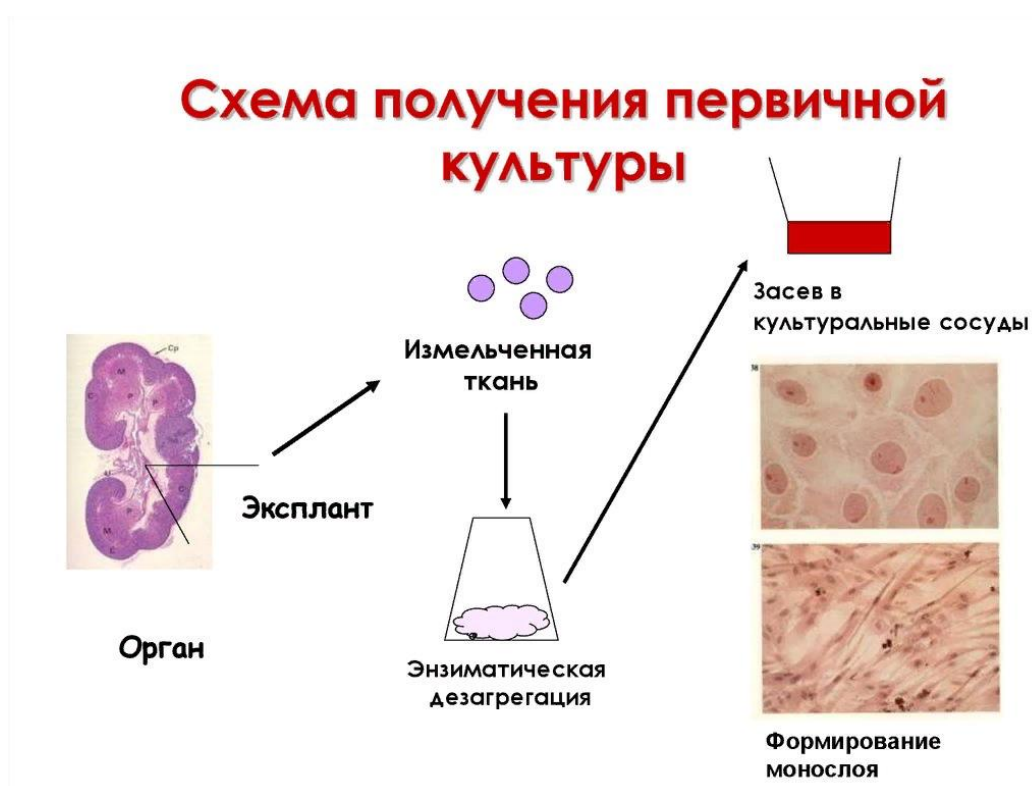


Рисунок 29 – Получение первичной культуры тканей

Клетки переносят на питательную среду. Время их жизни ограничено 2–3 неделями. В первичной культуре клетки, как правило, гетерогенны и характеризуются низкой пролиферацией.

Многие зрелые ткани в культуре растут с большим трудом, и проходит несколько дней, прежде чем рост становится заметным. Так, изолированные фибробласты растут очень слабо. Однако другие типы клеток, например эпителиальные клетки зрелых тканей, развиваются в культуре хорошо.

Развитие клеток при пассировании, которое обеспечивает продление жизни и сохранение свойств клеток, получение более однородных популяций, клонирование и исследование клетки, может идти в двух направлениях. После нескольких пересевов клеточная линия может погибнуть или превратиться в постоянную клеточную линию

Нормальные клетки, превращаясь в постоянную линию, не становятся злокачественными. Обнаружить появление постоянной линии клеток можно по ряду морфологических и физиологических признаков (уменьшение размера, округление, увеличение ядерно-плазменного отношения, снижение времени удвоения клеток в культуре и т. д.).

*Диплоидная культура* — культура клеток, источником которых являются эмбриональные ткани человека и животных. Эта культура растет на питательной среде дольше — примерно 2 месяца.

Характерной чертой диплоидных культур является постоянство их биологических свойств, например диплоидного набора хромосом. Клетки сохраняются без изменений в течение приблизительно 50 пассажей.

Культуры, выращенные из эмбриональных тканей, отличаются лучшей выживаемостью, более активным ростом, легче поддаются выращиванию, быстрее мигрируют по сравнению с соответствующими тканями, выделенными из взрослых организмов. Это объясняется низким уровнем дифференцировки эмбриональных тканей и присутствием в них клеток-предшественников. Дифференцировка нормальных клеток в культуре сопровождается обычно полным прекращением пролиферации клеток.

*Стабильная (перевиваемая) культура* — культура опухолевых клеток и клеток с аномальным числом хромосом. Размножение этих культур ничем не ограничено. Даже при частичной дифференцировке, которая возможна в культурах опухолевых клеток, их способность к делению сохраняется. Они полностью адаптированы к существованию вне организма.

Культуры клеток лишены структурной организации, не взаимодействуют между собой, и восстановить эти взаимодействия достаточно трудно, так же трудно, как контролировать изменения свойств культивируемых клеток. В связи с этим в фундаментальных исследованиях часто отдают предпочтение культурам тканей, клеточным системам, которые сохраняют структурную организацию ткани.

*Культура тканей или органов (органный культура)* характеризуется сохранением взаимосвязей между клетками, и в этом ее принципиальное отличие от культуры клеток. Все биохимические, физиологические, морфологические процессы в данной культуре приближены к тем, которые происходят в целом организме. Наибольшее сходство отмечено у эмбриональных тканей. Недостаток культур тканей состоит в том, что они не способны к размножению.

### **Способы и условия культивирования**

*Культура клеток.* Для культивирования животных клеток используют *непроточные культуры и проточные культуры.*

*Непроточные культуры* характеризуются тем, что клетки выращиваются в постоянном объеме питательной среды. Со временем изменяется состав этой среды, что требует ее периодической замены.

*Проточные культуры* характеризуются добавлением новой питательной среды с одновременным удалением равного объема отработанной. Этот способ культивирования применяют для выращивания суспензионных культур и монослойных культур на микроносителях.

Среда с питательными веществами постоянно обновляется, что позволяет поддерживать неизменный состав и концентрацию питательных веществ, количество клеток в культуре, а также выводить продукты их жизнедеятельности. Существуют *два типа* клеточных культур: монослойные культуры и суспензионные культуры.

*Монослойные культуры* образуются в результате пролиферации прикрепленных клеток. Частота деления клеток в культуре возрастает с увеличением степени их прикрепления и распластывания на поверхности субстрата.

В суспензии клетки не прикреплены к твердой поверхности, имеют округлую форму, делятся очень плохо либо почти никогда не делятся. Вероятно, распластанные на субстрате клетки вследствие увеличения своей удельной поверхности могут поглощать питательные вещества и фактор роста с большей интенсивностью.

Деление клетки зависит и от возможности ее вступать в контакт с субстратом, как бы ни мала была площадь этого контакта. Такие точечные контакты не дают клетке возможности распластаться, но служат местами взаимодействия внутриклеточных актиновых филаментов с субстратом.

При выращивании в культуре клетки одного типа ткани характеризуются согласованной скоростью деления для поддержания определенной плотности популяции, так же как это наблюдается в тканях целого организма. На поверхности питательных сред эпителиальные клетки, или фибробласты,



«приклеиваются» к ней, распластываются и делятся до тех пор, пока не образуют сплошной монослой.

*Монослойные культуры характеризуются рядом особенностей:*

- легкое манипулирование культурой (промывание клеток, замена питательной среды и т. д.);
- создание культуры на основе любого типа клеток;
- создание высокой плотности клеток, увеличение выхода необходимого продукта их жизнедеятельности и т. д.

Суспензионные культуры удобны для получения метаболитов и увеличения выхода клеток.

*Культура тканей.* Существует несколько методов культивирования животных тканей. Метод, известный под названием «техника часового стекла», был предложен в 1929 году. В качестве субстрата для культивирования обычно используют сгусток плазмы крови цыпленка с добавлением эмбрионального экстракта кур.

Часовое стекло с культурой во избежание высыхания помещают в замкнутое пространство (чашка Петри), а затем в термостат при температуре 37,5°C. Это классический метод для морфогенетического анализа эмбриональных органов.

Однако он обладает несколькими недостатками. Во-первых, сложный состав питательной среды затрудняет проведение биохимических исследований. Во-вторых, при культивировании питательная среда разжижается, в результате чего тканевой эксплант оказывается в растворе, что мешает нормальному росту тканей, органов или их фрагментов.

Следующие два метода позволяют успешно решить данную проблему.

Технология выращивания культуры тканей на плотной агаризованной среде. Основой для таких сред служат жидкие питательные среды определенного состава, солевые растворы с добавлением агара в концентрации от 1 до 4%.

Другой метод заключается в выращивании тканей и органов на поверхности металлической сетки. Края сетки загибают по углам как ножки столика, после чего его погружают в питательную среду так, чтобы поверхность сетки была вровень или чуть выше поверхности питательной среды. При культивировании мягких тканей на сетку укладывают кусочки миллиметровых фильтров, а уже затем ткани. По технологии этот метод похож на методы «кормящего слоя» и «кондиционирования среды» для культивирования одиночных клеток растений.

### ***Использование культур клеток и тканей животных***

Культуры клеток и тканей служат прекрасным объектом для фундаментальных общебиологических и медико-биологических исследований.

С помощью культур клеток можно изучать процессы наследования генов, регуляцию их активности, процессы клеточной дифференцировки.

Культуры клеток позволяют исследовать действие на клетку физических, химических и биологических факторов. Широкое применение получили культуры фибробластов при изучении диагностики и патогенеза некоторых заболеваний, в том числе наследственных.

Культуры тканей используют для таких исследований, как взаимоотношения клеток в тканях и самих тканей, дифференцировка клеток, закономерности размножения клеток, их трансформации. Культуры органов применяют для изучения закономерностей развития зачатков в норме и при различных воздействиях.

Большое практическое значение культуры клеток, в частности культуры клеток беспозвоночных, имеют в вирусологии, где они используются для диагностики вирусов, а также служат субстратом для получения живых противовирусных вакцин.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Перечислите основные направления использования трансгенных животных.
2. Какие существуют методы создания трансгенных животных?
3. Какие питательные среды используются для культивирования культур и клеток животных?
4. Какие источники используются для получения культу тканей животных?

### **Список источников литературы для углубленного изучения темы**

1. Шамарина А.В., Дадашев А.А., Канукова Ж. О., Жидков Р. С. Генная инженерия в животноводстве как социокультурный факт // Экономика и социум. 2020. №12–2 (79).
2. Четвертакова, Е.В. Биотехнология: курс лекций/ Е. В. Четвертакова; Красноярск. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2010. – 90 с

## 6. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ЧЕЛОВЕКА

### 6.1 Генотерапия

**Генотерапия** — совокупность генноинженерных (биотехнологических) и медицинских методов, направленных на внесение изменений в генетический аппарат соматических клеток человека в целях лечения заболеваний. Генотерапия ориентирована на исправление дефектов, вызванных мутациями в структуре ДНК, поражением ДНК человека вирусами или придания клеткам новых функций.

Концепция генотерапии появилась сразу открытия явления трансформации у бактерий и изучения механизмов трансформации клеток животных опухолеобразующими вирусами. Такие вирусы могут осуществлять стабильное внедрение генетического материала в геном клетки хозяина, поэтому было предложено использовать их в качестве векторов для доставки желаемой генетической информации в геном клеток. Предполагалось, что такие векторы могут в случае необходимости поправлять дефекты генома.

Реальностью генная коррекция соматических клеток стала возможной после 1980-х годов, когда были разработаны методы получения изолированных генов, созданы эукариотические экспрессирующие векторы, стали обычными переносы генов у мышей и других животных.

Исторически генная терапия нацеливалась на лечение наследственных генетических заболеваний, однако поле её применения, по крайней мере теоретически, расширилось. В настоящее время генную терапию рассматривают как потенциально универсальный подход к лечению широкого спектра заболеваний, начиная от наследственных, генетических, и заканчивая инфекционными.

#### **Методы генотерапии**

Новые подходы к генной терапии соматических клеток можно поделить на две большие категории: *генная терапия ex vivo* и *in vivo*. Разрабатываются специфические лекарственные препараты на основе нуклеиновых кислот: РНК-ферменты, модифицированные методами генной инженерии олигонуклеотиды, корректирующие генные мутации *in vivo* и т. д.

Использование при имплантации ген-активированных материалов, модифицированных геннотерапевтическими препаратами, позволяет обеспечить отложенное и продолжительное высвобождение препарата *in situ*.

Разработка таких мощных инструментов для генной модификации как *CRISPR/Cas9* предоставили человечеству возможность в ближайшем будущем с помощью *генной модификации* успешно устранять причины

наследственных заболеваний и повысить устойчивость организма к старческим заболеваниям.

Существует несколько способов введения новой генетической информации в клетки млекопитающих. Это позволяет разрабатывать прямые методы лечения наследственных болезней — методы генотерапии.

Используют два основных подхода, различающихся природой клеток-мишеней:

- фетальная генотерапия, при которой чужеродную ДНК вводят в зиготу или эмбрион на ранней стадии развития; при этом ожидается, что введённый материал попадёт во все клетки реципиента (и даже в половые клетки, обеспечив тем самым передачу следующему поколению);

- соматическая генотерапия, при которой генетический материал вводят только в соматические клетки, и он не передаётся половым клеткам.

### ***Генная терапия ex vivo***

- Основные условия:

1. Отсутствие отторжения терапевтической конструкции

2. Эффективный перенос конструкции

3. Стабильная экспрессия терапевтического гена (ТГ)

- Использование собственных клеток пациента – аутологичных клеток – гарантирует, что после инфузии не разовьётся иммунный ответ

*Процедура включает:*

- 1) Получение от пациента клеток с генным дефектом

- 2) Культивирование изолированных клеток

- 3) Трансфекцию терапевтической конструкции в изолированные клетки

- 4) Отбор, выращивание и тестирование трансфицированных клеток

- 5) Инфузия трансфицированных клеток пациенту

Генную терапию *ex vivo* используют для лечения заболеваний, связанных с трансплантацией костного мозга – это основное направление. Терапевтический эффект связан со стволовыми клетками костного мозга, которые могут дифференцироваться в различные типы клеток: В- и Т-лимфоциты, макрофаги, эритроциты, тромбоциты и остеокласты. Например, если нарушена функция макрофагов, трансплантация костного мозга обеспечит реципиенту запас макрофагов из популяции модифицированных стволовых клеток.

Разрабатывают системы доставки на основе неаутологичных клеток. Неаутологичная генная терапия *ex vivo* также включает выделение тканеспецифичных клеток и их генетическую модификацию с помощью терапевтического гена. Рекомбинантные клетки заключают в искусственную мембрану, через которую рекомбинантный белок выходит в клетку. Мембрана неиммуногенна и не вызывает отторжения. Доклинические испытания на животных показали, что инкапсулированные рекомбинантные клетки могут пролиферировать и длительное время производить рекомбинантный белок.

### ***Генная терапия in vivo.***

Генная терапия *in vivo* — это доставка терапевтического гена в клетки определенной ткани пациента.

Идеальная система доставки должна обеспечить:

- высокую эффективность поглощения терапевтического гена;
- сохранность при транспортировке;
- поддержание экспрессии для облегчения состояния больного.

Процедура включает:

1. Клонированный терапевтический ген (ГенХ) кодирует белок, корректирующий генетический дефект.
2. Ген доставляют к клеткам определенной ткани пациента, где он экспрессируется.
3. Промотор р, под контролем которого осуществляется транскрипция, тканеспецифичен.

## **6.2 Редактирование генома**

***Редактирование генома***, или геномная инженерия, или редактирование генов, — это вид генной инженерии, при котором ДНК вставляется, удаляется, модифицируется или заменяется в геноме живого организма.

Основным механизмом, участвующим в генетических манипуляциях с помощью программируемых нуклеаз, является распознавание целевых геномных локусов и связывание эффекторного ДНК-связывающего домена (DBD), двухцепочечных разрывов (DSBs) в ДНК-мишени эндонуклеазами рестрикции (FokI и Cas) и репарация DSBs посредством рекомбинации, направленной на гомологию (HDR) или негомологичное соединение концов (NHEJ).

Редактирование генома впервые появилось в 1990-х годах, до появления распространенных современных платформ редактирования генов на основе нуклеаз, однако его использование было ограничено низкой эффективностью редактирования.

Редактирование генома с помощью инженерных нуклеаз, то есть всех трех основных классов этих ферментов — *цинковых пальцевых нуклеаз (ZFNs), эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALENs), и инженерных мегануклеаз* - были выбраны Nature Methods в качестве метода 2011 года. Система CRISPR-Cas была выбрана наукой как Прорыв 2015 года.

### ***Мегануклеазы***

Мегануклеазы, открытые в конце 1980-х годов, представляют собой ферменты семейства эндонуклеаз, которые характеризуются способностью распознавать и разрезать большие последовательности ДНК (от 14 до 40 пар

оснований). Наиболее распространенными и наиболее известными мегануклеазами являются белки семейства LAGLIDADG, которые обязаны своим названием консервативной аминокислотной последовательности.

Мегануклеазы, обычно встречающиеся у видов микроорганизмов, обладают уникальным свойством иметь очень длинные последовательности распознавания (> 14 п.н.), что делает их естественно очень специфичными. Однако практически нет шансов найти точную мегануклеазу, необходимую для воздействия на выбранную конкретную последовательность ДНК.

Чтобы преодолеть эту проблему, были использованы методы мутагенеза и высокопроизводительного скрининга для создания вариантов мегануклеазы, которые распознают уникальные последовательности. Другие исследователи смогли объединить различные мегануклеазы и создать гибридные ферменты, которые распознают новую последовательность.

Еще один подход включает использование компьютерных моделей, чтобы попытаться как можно точнее предсказать активность модифицированных мегануклеаз и специфичность распознанной нуклеиновой последовательности.

Создан большой банк, содержащий несколько десятков тысяч белковых единиц. Эти единицы могут быть объединены для получения химерных мегануклеаз, которые распознают целевой сайт, тем самым предоставляя инструменты для исследований и разработок, которые отвечают широкому спектру потребностей (фундаментальные исследования, здравоохранение, сельское хозяйство, промышленность, энергетика и т. д.).

К ним относится промышленное производство двух мегануклеаз, способных расщеплять ген ХРС человека; мутации в этом гене приводят к пигментной ксеродерме, тяжелому моногенному заболеванию, которое предрасполагает пациентов к раку кожи и ожогам всякий раз, когда их кожа подвергается воздействию ультрафиолетовых лучей.

Преимущество мегануклеаз в том, что они вызывают меньшую токсичность в клетках, чем такие методы, как цинковая пальцевая нуклеаза (ZFN), вероятно, из-за более строгого распознавания последовательностей ДНК; однако конструирование специфичных для последовательности ферментов для всех возможных последовательностей является дорогостоящим и трудоемким, поскольку никто не извлекает выгоду из комбинаторных возможностей, которые используют такие методы, как ZFNs и слияния на основе TALEN.

### ***Цинковые пальцевые нуклеазы***

В отличие от мегануклеаз, концепция ZFNs и технологии TALEN основана на неспецифическом каталитическом домене для разрезания ДНК, который затем может быть связан со специфическими пептидами, распознающими последовательность ДНК, такими как цинковые пальцы и эффекторы, подобные

активаторам транскрипции (TALEs). Важнейшим этапом является подбор эндонуклеазы, у которой сайт распознавания ДНК и сайт расщепления отделены друг от друга, что является несвойственным для ферментов рестрикции.

У необходимого фермента отделяют его расщепляющую часть, затем эта часть связывается с пептидами, распознающими ДНК-последовательность, что может привести к очень высокой специфичности.

Мотивы цинкового пальца встречаются в нескольких транскрипционных факторах. Ион цинка, содержащийся в 8% всех белков человека, играет важную роль в организации их трехмерной структуры. В факторах транскрипции он чаще всего располагается в сайтах взаимодействия белок-ДНК, где он стабилизирует мотив. С-концевая часть каждого пальца отвечает за специфическое распознавание последовательности ДНК.

Распознанные последовательности - короткие, состоят примерно из 3 пар оснований, но путем объединения 6–8 цинковых пальцев, сайты распознавания которых были охарактеризованы, можно получить специфические белки для последовательностей из примерно 20 пар оснований. Таким образом, можно контролировать экспрессию определенного гена.

Было продемонстрировано, что эта стратегия может быть использована для стимулирования процесса ангиогенеза у животных. Также возможно объединить белок, сконструированный таким образом, с каталитическим доменом эндонуклеазы, чтобы вызвать целевой разрыв ДНК и, следовательно, использовать эти белки в качестве инструментов геномной инженерии.

Обычно для этого используется метод связывания двух ДНК–связывающих белков, каждый из которых содержит от 3 до 6 специально выбранных цинковых пальцев, с каталитическим доменом эндонуклеазы FokI, которые должны димеризоваться для расщепления двухцепочечной ДНК. Два белка распознают две последовательности ДНК, которые находятся на расстоянии нескольких нуклеотидов друг от друга.

Связывание двух белков цинкового пальца с их соответствующими последовательностями сближает два домена FokI. FokI требует димеризации, чтобы обладать нуклеазной активностью, и это означает, что специфичность резко возрастает, поскольку каждый партнер-нуклеаза распознает уникальную последовательность ДНК. Для усиления этого эффекта были сконструированы нуклеазы FokI, которые могут функционировать только как гетеродимеры.

### **6.3 Этические аспекты развития генноинженерных исследований в биотехнологии**

Расширение сферы влияния биотехнологии, с одной стороны, преследует благородные цели, поскольку с ее помощью стало возможным преодоление бесплодия, лечение многих наследственных и приобретенных заболеваний, а

также решение продовольственных и экологических проблем современности. С другой стороны, активное вторжение современных технологий в медицину не может не настораживать, поскольку это сопряжено с операциями с клетками и тканями человека.

Например, не совсем ясно, почему по американским законам при искусственном оплодотворении берутся две донорские яйцеклетки, но пересаживается только одна из них, тогда как вторая замораживается, помещается в специальный банк и не выдается родителям даже по специальному запросу.

Большинство стран законодательно ограничило эксперименты по клонированию человека, в основном по этическим соображениям, поскольку они направлены не просто на воспроизведение человека, но и на последующее использование клеток, тканей и органов зародыша для экспериментов, а также в качестве их донора. В связи с этим во всем мире активно обсуждается вопрос о допустимости подобных действий. Не прибавляет оптимизма и возможное клонирование каких-либо диктаторов, например Гитлера или ныне живущих известных личностей.

В ряде случаев попытки клонирования наталкиваются и на религиозные запреты, поскольку бездетность, как и различные заболевания, считаются промыслом Божиим, а их преодоление — святотатством.

Применение генных технологий в создании новых сортов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов также вызывает некоторые опасения, поскольку их попадание в окружающую среду может вызвать неконтролируемое распространение, например, раковых генов, и привести к необратимым последствиям для жизни и здоровья человека. Так, опыление пыльцой трансгенных растений генетически немодифицированных сортов и видов может стимулировать появление сверхустойчивых к химическим и биологическим средствам борьбы сорняков.

Особую опасность представляет внесение новых генов в сбалансированный геном, откуда они могут быть исключены в любой момент, что может привести к появлению каких-либо вирусоподобных организмов.

Потребление продуктов, полученных с использованием генетически модифицированных организмов, по некоторым данным, приводит к существенным нарушениям в репродуктивной сфере человека, а в перспективе может угрожать и самой жизни, поскольку мутировавший лишь по одному нуклеотиду ген устойчивости картофеля к поеданию колорадским жуком кодирует белок, смертельно опасный уже и для человека. И хотя это является маловероятным, поскольку ДНК потребляемых нами продуктов должна расщепляться в кишечнике, все же такая вероятность существует, и сбрасывать ее со счетов не приходится.



Сравнительно слабая изученность проблем клонирования и применения генных технологий заставляет многие правительства принимать решения по ограничению сферы их применения и специальной маркировке продуктов питания, полученных таким способом, с целью информирования.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Что такое генотерапия?
2. В чем заключается концепция генотерапии?
3. Для чего предназначена генная терапия?
4. Какие существуют методы генной терапии?
5. В чем заключается сущность метода *ex vivo*?
6. Какие механизмы лежат в основе редактирования генома?
7. В чем заключается преимущество мегануклеаз как инструментов для редактирования генома?
8. Какие достижения в области генно-инженерных исследований способствуют развитию биотехнологии и смежных отраслей промышленности?
9. В чем заключаются основные риски применения генноинженерных исследований?
10. Какие существуют законодательные ограничения, связанные с применением генетической инженерии?
11. Какое существует мнение в мире о проведении клонирования?
12. Какие предполагают риски для здоровья человека, связанные с употреблением генно-модифицированных продуктов?

### **Список источников литературы для углубленного изучения темы**

1. Мохов, А. А. Использование технологии геномного редактирования: достижения и перспективы / А. А. Мохов, А. А. Чапленко, А. Н. Яворский // Биомедицина. – 2019. – Т. 15, № 2. – С. 34–42.
2. Молекулярные подходы к безопасной и контролируемой Т-клеточной терапии / Р. С. Калинин [и др.] // Acta Naturae. – 2018. – Т. 10, № 2. – С. 17–25.
3. Буйнякова, И. С. «Дизайнерские младенцы» социально-этические проблемы биотехнологического проектирования будущих детей / И. С. Буйнякова // Научные ведомости. – 2017. – Т. 40, № 9. – С. 130–139.

## Список литературы

1. 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. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. – (Современные проблемы и методы биотехнологии: УМКД № 1323–2008 / рук. творч. коллектива Т. Г. Волова).
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Д. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
3. Жимулев, И. Ф. Общая и молекулярная генетика / И. Ф. Жимулев // Новосибирск: Наука, 2003. – 479 с.
4. Патрушев, Л. И. Искусственные генетические системы / Л. И. Патрушев. – М.: Наука, 2005. – Т. 1. – 530 с.
5. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия / С. Н. Щелкунов; Новосиб. гос. ун-т. – Новосибирск, 2004. – 496 с.
6. Кузьмина, Н. А. Основы биотехнологии [Электронный ресурс] / Н. А. Кузьмина. – Режим доступа: [www.biotechnolog.ru](http://www.biotechnolog.ru)
7. Гончаренко Г. Г. Основы генетической инженерии. Методическое пособие / Отв. ред. // Л. В. Хотылева. – Гомель: УО «ГГУ им. Ф. Скорины», 2003. – 118 с.
8. Молекулярная биология / Кригер О. В., Сухих С. А., Бабич О. О., Зимина М. И., Дышлюк Л.С. // Кемерово, 2017. – 93 с.
9. Введение в генетическую инженерию: Учебное пособие для самостоятельной внеаудиторной работы студентов по курсу «Генная инженерия» / З.И.Абрамова. - Казань: Казанский университет, 2008.- 169 с.
10. Основы генетической инженерии и биотехнологии: учеб.-метод. 0–75 пособие / А.В. Вишневец [и др.]. – Витебск: УО «ВГАВМ», 2010. – 76 с.

Кригер Ольга Владимировна

## **Основы генетической инженерии**

**Учебное пособие**

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе

**Редакционно-издательский отдел**  
**Университета ИТМО**  
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49, литер А