

ЛЕКЦИЯ №3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ЖИВОТНЫХ

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 производства 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 геном 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 сыротделении для коагуляции молока.

Такой подход позволяют получать фермент в достаточных количествах, не используя сыворотки 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 гормон 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 мембранны. У трансгенных свиней такие белки заменены на человеческие.

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).

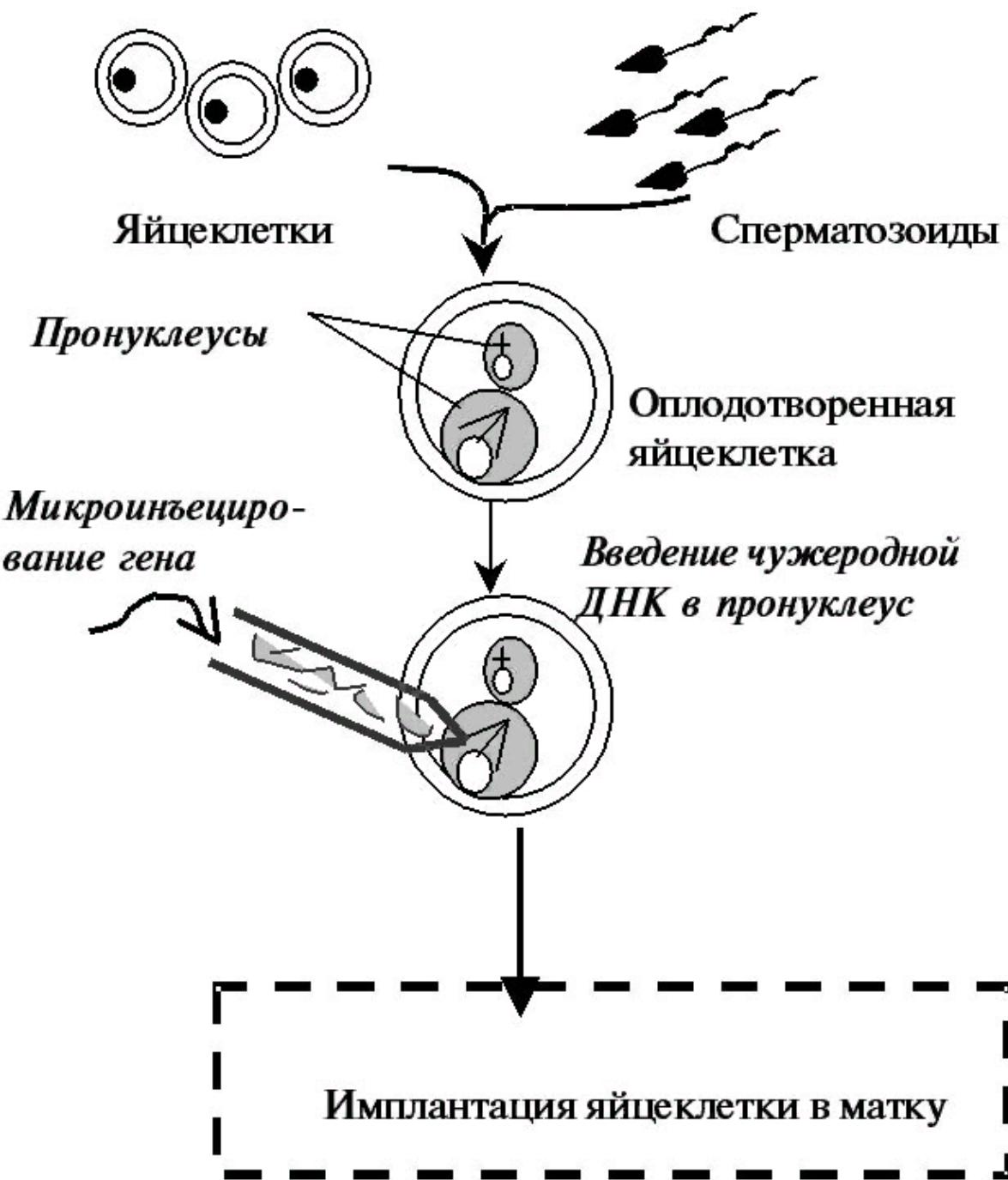


Рисунок 25 – Схема проведения микроинъекции ДНК для создания трансгенных животных

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 металлотионеина, 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 гормона роста крысы.

Гены гормона роста контролируются регуляторными элементами генов металлотионеина. В зиготу мышей была введена рекомбинантная ДНК, которая включала в себя промоторную часть – ген металлотионеана MT1 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 удается получить гомозиготные линии, так как вставка чужеродной ДНК может оказать на важнейшие жизненные важные 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).

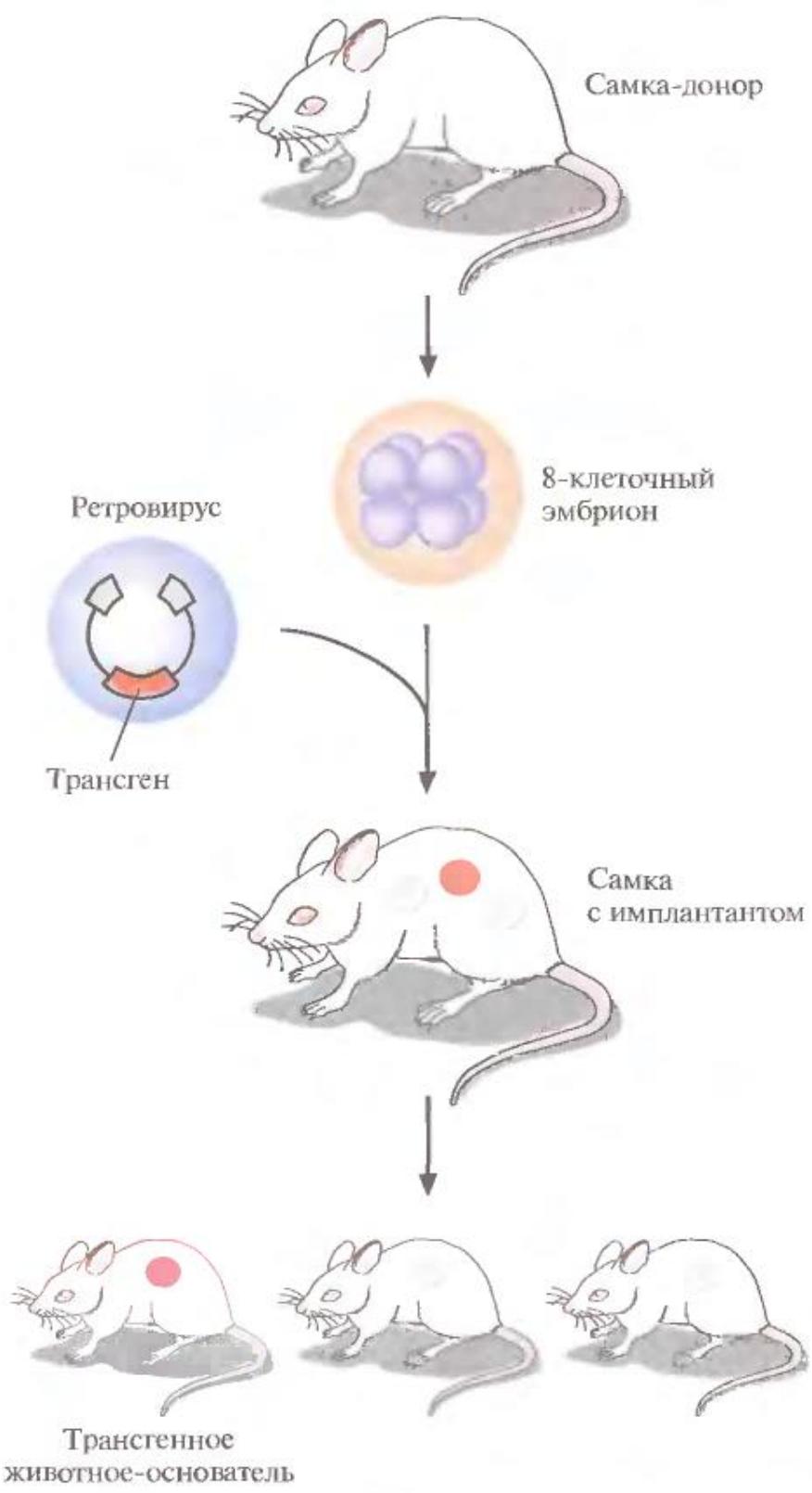


Рисунок 27 – Создание трансгенных мышей с использованием ретровирусов

Восьмиклеточную зиготу отделяют от оболочки и вносят в питательную среду с фибробластами, производящими 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.

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 pH среды. Если среда изменяет свой цвет на желтый, это свидетельствует о том, что в среде накопились кислоты и другие продукты обмена. Среду в этом случае заменяют, так культуры клеток и тканей предпочитают нейтральные значения pH.

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 клони. Рассмотрим основные типы культур клеток.

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

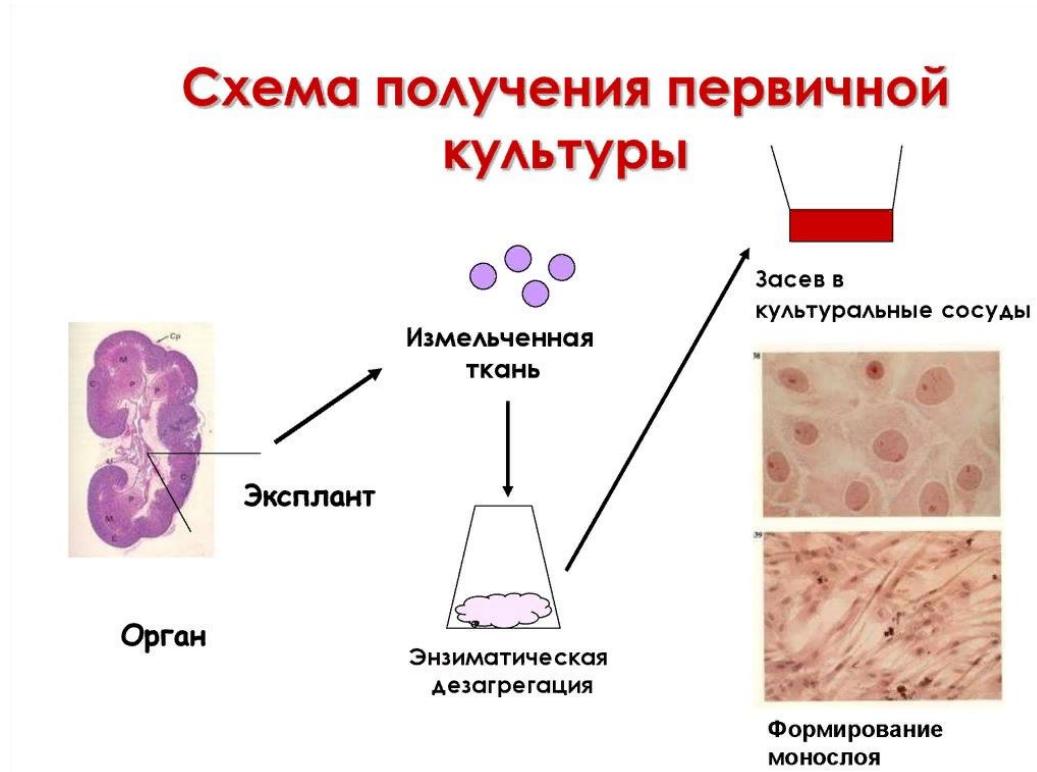


Рисунок 29 – Получение первичной культуры тканей

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 (органская 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 монослоя.

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 часовного 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 некоторыми 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 миллипоровых 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 зародышей 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 культуры 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; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2010. – 90 с