Практическое занятие

Изучение методов получения клонированных и трансгенных животных, химер

Цель занятия: изучить методы получения клонированных и трансгенных животных, химер

Задачи:

1. Освоить методику клонирования, пересадки ядер, переноса генов и получения клонированных животных.
2. Освоить методику получения химерных животных разными способами.
3. Освоить методику трансгеноза - переноса генов и получения трансгенных животных.

Методические указания

1. Клон – это группа генетически идентичных клеток или организмов, которые получены в результате деления одной клетки-предшественника.

Клонирование. В 1952 году Р. Бриггс и Т. Кинг разработали метод пересадки ядер соматических клеток зародышей в энуклеированные яйцеклетки лягушек. В это время *Бесквит Р.* впервые выделил ген. Благодаря этому, стало возможным после *удаления гаплоидного* ядра из яйцеклетки лягушки, *введение* в неѐ *диплоидного ядра* соматической клетки, взятой из кишечной стенки головастика. После электростимуляции деления яйцеклетки получают нормальное развитие зародыша и потомство исходной особи. Дж. Гердон в 1962 году усовершенствовал технику пересадки ядер.

Работа по клонированию ведется по трем направлениям:

1. Пересадка ядер из соматических клеток в энуклеированную яйцеклетку.
2. Получение гомозиготных диплоидных потомков.
3. Создание партеногенетических животных.

Методы получения клонированных животных:

1. Пересадка ядра соматической клетки в яйцеклетку, из которой удалено собственное ядро.

2. Разделение эмбрионов крупного рогатого скота в возрасте до 7-8 дней, не имеющих дифференцированных клеток, на части (2-4) с последующей пересадкой реципиенту.

В 1997 году в Великобритании методом пересадки ядра соматической клетки в энуклеированную яйцеклетку была получена овца, которую назвали Долли.

Клонирование было проведено путем ядерного переноса. Реципиентная яйцеклетка одной овцы была подвергнута удалению ядра. У другой овцы, находящейся на четвертом месяце беременности, из клеток кожи вымени было выделено ядро с хромосомной ДНК, которое пересадили в реципиентную яйцеклетку без генетического материала. Было взято беременное животное потому, что в этом случае клетки вымени активно делятся. После слияния некоторые клетки начали активно делиться, после доращивания in vitro эмбрион был имплантирован овце-реципиенту. В результате на свет появился ягненок, названный Долли, она

была похожа на овцу, у которой взяли ядро для пересадки.

Задание 1. На основании рисунка написать основные этапы получения клонированных животных:

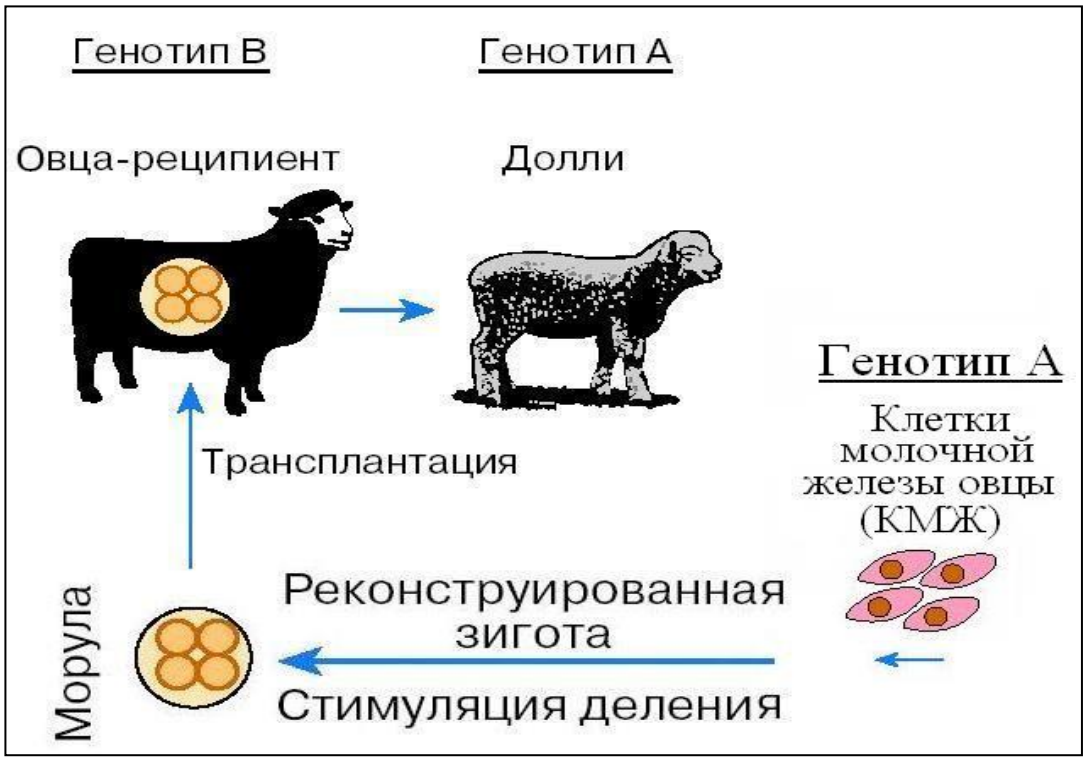

Рисунок 1 - Схема получения овцы Долли (по Вильмуту)

2. Х***имера*** (греч. Chimaira) означает составное животное.

Животные – химеры несут в одном организме признаки обоих эмбрионов, отличающихся между собой разными генотипами. В животноводстве известны искусственные химеры как внутривидовые, так и межвидовые.

<u>Способы получения химер:</u>

1. *<u>Инъекционный.</u>* Получение химерных животных путѐм объединения бластомеров из эмбрионов *одного вида.* С этой целью получают сложные химерные эмбрионы овец объединением 2-, 4-, 8-клеточных эмбрионов. Каждый сложный объединѐнный эмбрион состоит из равного числа бластомеров эмбрионов 2-8 родителей. Пересадку внутренней клеточной массы каждого донора (бластомеры) путѐм инъекции проводят внутрь бластоцисты реципиентов.

2. *<u>Агрегационный</u>*. Слияние клеточной массы двух или нескольких эмбрионов внутри одной зоны пеллюцида. Метод состоит в том, что 8-клеточные эмбрионы инкубируют в среде с протеолитическим ферментом, переваривающим оболочки яйцеклетки. Освобождѐнные от оболочек эмбрионы, соприкасаются между собой, в результате чего их клетки сливаются и перемешиваются.

Получены агрегационные химерные животные после соединения половинок 5- 6 дневных эмбрионов от коров-доноров швицкой и голштинской пород крупного рогатого скота, они сочетали в своѐм фенотипе характерную масть двух исходных пород – бурую и чѐрно-пѐструю.

Также получены химеры овцы пород рамбулье и финский ландрас.

Примером получения межвидовых химер в животноводстве служат *овцекозы,* сочетающие признаки овцы и козы, которые были получены в 1994 году.

Химерные животные не передают потомству характерную для них генетическую мозаичность, у потомков происходит расщепление, в результате чего нарушаются ценные генетические комбинации.

Задание 2. На основании рисунка 2 записать основные этапы получения химер:

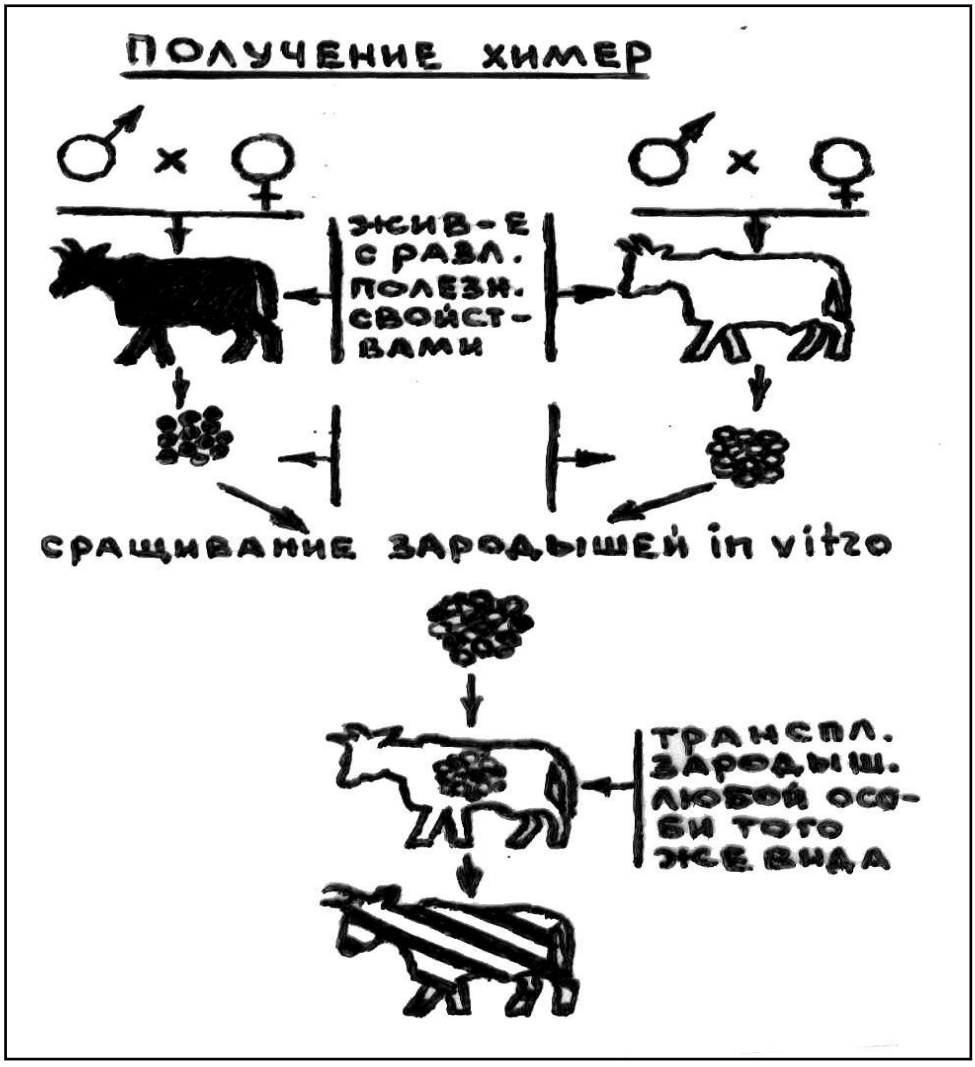

Рисунок 2 - Получение химер (генетических мозаиков)

3. Трансгеноз – это перенос генов.

Трансгенные животные – это животные, которые получены в результате переноса в их геном чужеродных генов от других видов животных или человека.

Гены, которые используются для переноса, выделяют из определенного генома или синтезируют искусственно.

В мировой практике уже получены трансгенные животные, продуцирующие с

молоком целый ряд лекарственных веществ:

- факторы свѐртываемости крови против гемофилии;
- тканевой плазменногенный активатор, применяемый при лечении венозных тромбов и поражении лѐгочной артерии;
- человеческий белок С для предотвращения образования тромбов;
- моноклональные антитела для лечения различных форм рака.

Основные направления исследований для получения трансгенных животных:

1. Создание новых пород с повышенным содержанием некоторых компонентов.
2. Создание животных, которые способны синтезировать несвойственные их виду белки. (*Например,* свиньи, которые могут продуцировать интерферон человека).
3. Создание трансгенных животных - доноров при трансплантации органов человеку.

Получение трансгенных животных включает следующие стадии:

1. Создание генной конструкции (выбор, получение и клонирование чужеродного гена).
2. Внедрение ее в геном организма путем микроинъекции гена в мужской пронуклеус, трансплантация зиготы реципиенту.
3. Селекция модифицированных организмов.

Методы переноса генов:

1. Метод микроинъекции в пронуклеус зиготы.
2. Метод использования липосом и ретровирусов в качестве векторов.
3. Метод прокалывания и высокоскоростной механической инфекции.
4. Метод использования сперматозоидов (самопроизвольное поглощение экзогенной ДНК, введение ДНК в сперматозоиды, введение в семенные канальцы взрослых животных).
5. Метод использования трансформированных эмбриональных стволовых клеток.

Получены мыши с генами гормона роста крысы, ген вводился в виде раствора и состоял из 353 нуклеотидов, вектором была рекомбинантная плазмида. В результате был получен 21 потомок, у 7 мышей был обнаружен чужеродный ген, живая масса их была в 1,8 раза больше, чем обычных.

Также получены трансгенные овцы, кролики, коровы и свиньи, путем введения гена гормона роста человека.

В России создано стадо трансгенных овец с генами крупного рогатого скота, которые продуцируют с молоком ***химозин*** крупного рогатого скота. Это фермент, который применяется при производстве твердого сыра. Обычно его получали из экстракта ткани желудка новорожденных телят.

Задание 3. Составить схемы получения трансгенных животных (рис. 3 и рис. 4):

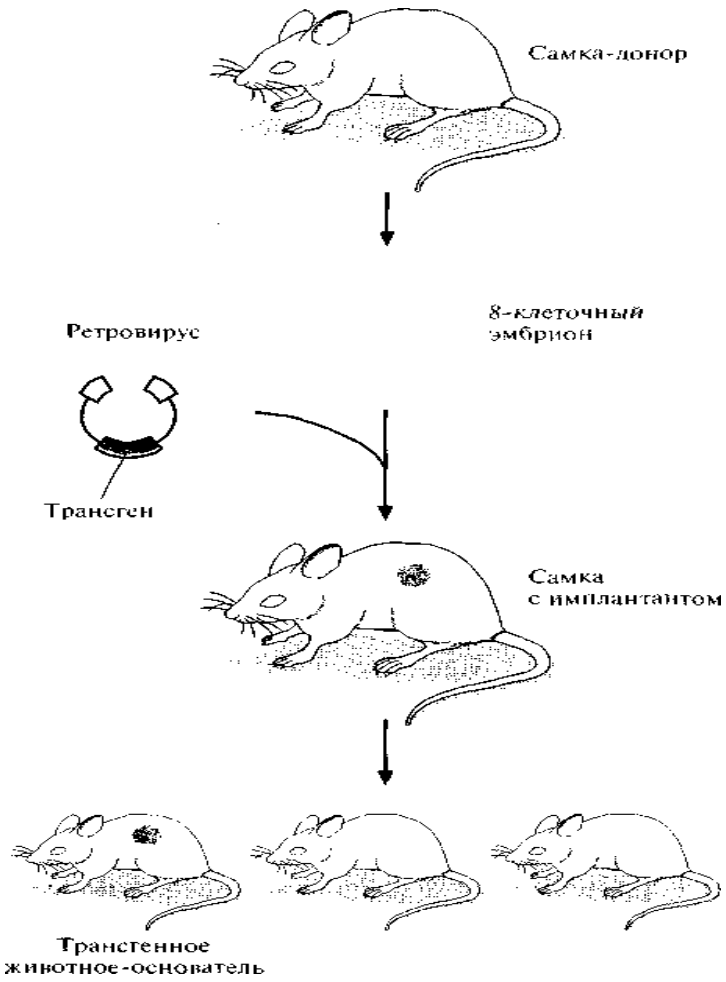

Рисунок 3 - Получение линии трансгенных мышей с использованием ретровирусных векторов

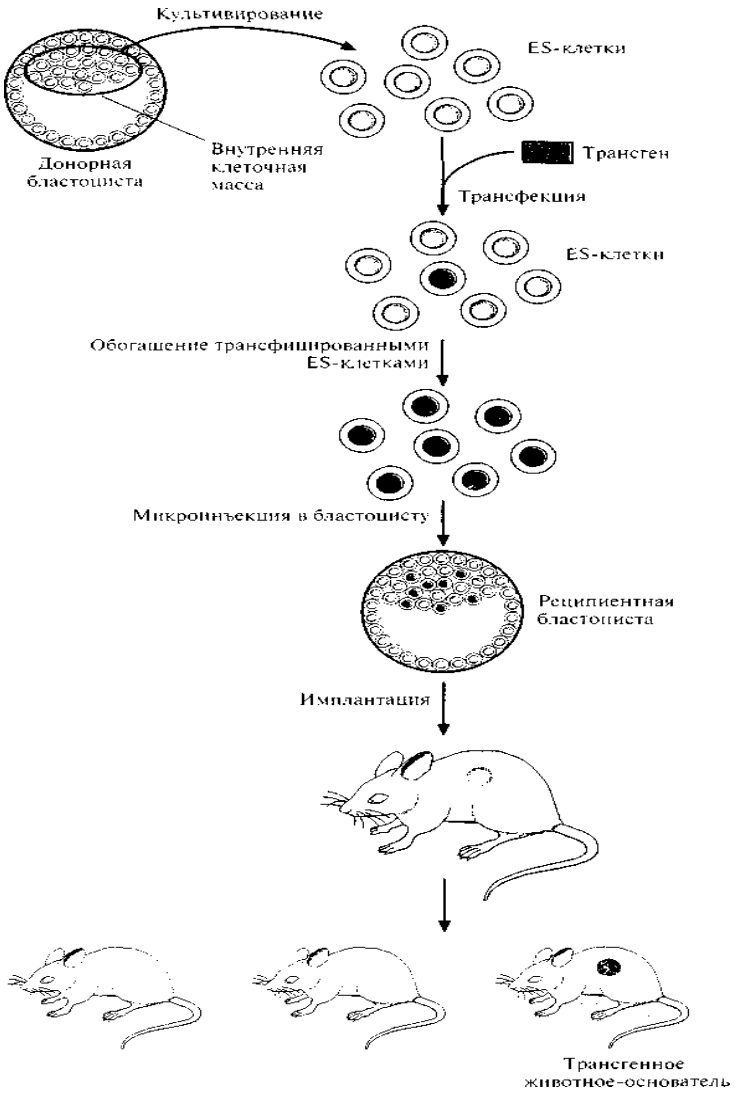

Рисунок 4 – Получение трансгенных мышей с помощью генетической модификации эмбриональных стволовых (ES) клеток

Задание 4. На основании рисунков 3 и 4 объяснить различные способы получения трансгенных животных.

Задание 5. Изучить методику получения трансгенных животных с заданными признаками:

1. Выбор и клонирование гена для пересадки.
2. Клонированный ген вводят в ядро оплодотворенной яйцеклетки.
3. Инокулированные оплодотворенные яйцеклетки имплантируют в реципи- ентную женскую особь.
4. Отбирают потомков, развивающихся из имплантированных яйцеклеток, которые имеют клонированный ген во всех клетках.
5. Скрещивание животных, несущих клонированный ген в клетках зародышевой линии.

Контрольные вопросы

1. Дать определения понятиям «клон», «клонирование», «тотипотентность».
2. Клонирование эмбрионов. Дисекция эмбрионов.
3. Клонированные животные.
4. Перспективы использования клонированных животных.
5. Дать определение «химера», «химерное животное».
6. Способы получения внутривидовых и межвидовых животных-химер.
7. Перспективы использования химерных животных.
8. Дать определение понятиям: «трансгеноз», «трансгенное животное».
9. Способы получения трансгенных животных.
10. Перспективы использования трансгенных животных.