

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ВИТЕБСКАЯ ОРДЕНА «ЗНАК ПОЧЕТА» ГОСУДАРСТВЕННАЯ
АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Т. В. Видасова, О. А. Яцына

ГЕНЕТИКА С ОСНОВАМИ БИОМЕТРИИ. ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Рекомендовано учебно-методическим объединением
в сфере высшего образования Республики Беларусь по образованию
в области сельского хозяйства в качестве учебно-методического пособия
для студентов учреждений образования,
обеспечивающих получение специального высшего образования
по специальности 7-07-0841-01 Ветеринарная медицина

Витебск
ВГАВМ
2025

УДК 636.082.12
ББК 46-31
В42

Авторы:

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *Т. В. Видасова*;
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *О. А. Яцына*

Рецензенты:

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры кормления и разведения сельскохозяйственных животных *Д. С. Долина*;
заведующий лабораторией разведения и селекции молочного скота «НПЦ НАН Беларуси по животноводству», кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *Н. И. Песоцкий*

Видасова, Т. В.

В42 Генетика с основами биометрии. Основы биотехнологии : учебно-методическое пособие для студентов учреждений образования, обеспечивающих получение специального высшего образования по специальности 7-07-0841-01 «Ветеринарная медицина» / Т. В. Видасова, О. А. Яцына. – Витебск : ВГАВМ, 2025. – 52 с.
ISBN 978-985-591-220-1.

Курс лекций написан в соответствии с типовой учебной программой по дисциплине «Генетика с основами биометрии» для высших учебных заведений по специальности 7-07-0841-01 «Ветеринарная медицина» очной и заочной форм получения образования. Содержит сведения о теоретических основах биотехнологии.

УДК 636.082.12
ББК 46-31

ISBN 978-985-591-220-1

© УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Тема 1. Биотехнология: достижения и перспективы развития.	
Генная инженерия	5
1.1. Предмет и задачи биотехнологии	5
1.2. История возникновения и развития биотехнологии	7
1.3. Объекты, используемые в биотехнологии	11
1.4. Генная инженерия и ее задачи	16
1.5. Методы получения и клонирование генов	17
1.6. Технология получения рекомбинантной ДНК	19
1.7. Векторы и их свойства	20
1.8. Способы введения генов в клетку	22
1.9. Полимеразная цепная реакция	26
Тема 2. Клеточная инженерия	29
2.1. Клеточная инженерия: история развития	29
2.2. Понятие о культуре клеток. Выделение и культивирование клеток. Разновидности клеточных культур	31
2.3. Гибридизация соматических клеток, перспективы использования	34
2.4. Гибридомная технология получения моноклональных антител	35
2.5. Применение моноклональных антител	37
2.6. Понятие о стволовых клетках. Основные особенности, свойства и классификация стволовых клеток	38
2.7. Виды стволовых клеток	40
Тема 3. Получение клонированных и химерных животных	43
3.1. Основные понятия эмбриогенетической инженерии: «перенос чужеродных генов», «трансген», «трансгенный продукт», «трансгенез», «трансгенное животное»	43
3.2. Понятия о клонировании животных. Методы получения клонированных сельскохозяйственных животных	44
3.3. Перспективы использования клонированных животных	46
3.4. Понятие о химерных животных. Методы получения химер	48
Список рекомендуемой литературы	50

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время биотехнология является важнейшим приоритетным направлением современной биологии, которая возникла в конце XX века и стала одним из ведущих разделов науки и экономики. Достижения биотехнологии становятся реальной помощью народному хозяйству, когда на их основе создаются промышленные производства, которые направлены на получение полезных для человека веществ и продуктов.

В молекулярной биологии использование биотехнологических методов позволяет определить структуру генома, понять механизм экспрессии генов, смоделировать клеточные мембраны с целью изучения их функций и т.д. Конструирование нужных генов методами генной и клеточной инженерии позволяет управлять наследственностью и жизнедеятельностью животных, растений и микроорганизмов, создавать организмы с новыми полезными для человека свойствами, ранее не наблюдававшимися в природе.

Созданы перевиваемые культуры клеток животных, продуцирующие моноклональные антитела, широко применяемые для диагностики заболеваний. В биохимии, микробиологии, цитологии несомненный интерес вызывают методы иммобилизации как ферментов, так и целых клеток микроорганизмов, растений и животных.

Для животноводства биотехнология предлагает следующие разработки: получение трансгенных животных с новыми или усиленными свойствами и признаками; размножение животных путем клонирования; трансплантация эмбрионов; получение лекарственных и диагностических препаратов; переработка отходов и побочных продуктов животноводства; создание кормовых средств из растительной, микробной биомассы и отходов сельского хозяйства.

Перед ветеринарной медициной стоят важные задачи по разработке и внедрению в производство эффективных методов борьбы с наиболее распространенными и опасными заболеваниями сельскохозяйственных животных на промышленных комплексах и в животноводческих хозяйствах. Решение этих задач осуществляется как традиционными ветеринарными методами, так и с помощью новейших биотехнологий. Изменения, произошедшие за последние два десятилетия, породили серьезные проблемы в обеспечении эпизоотического благополучия и усилении ветеринарного контроля в животноводстве; охране людей от болезней, общих для человека и животных; производстве и наполнении рынка доброкачественными продуктами животного происхождения. Обеспечение безопасности продукции животного происхождения в ветеринарно-санитарном отношении является одной из основных задач науки и производства.

В ветеринарии широко используются такие биотехнологические методы, как культура клеток и зародышей, овогенез *in vitro*, искусственное оплодотворение. Поэтому при подготовке специалистов ветеринарного профиля для работы в разных областях животноводства немаловажную роль играет изучение раздела «Основы биотехнологии».

ТЕМА 1. БИОТЕХНОЛОГИЯ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

- 1.1. Предмет и задачи биотехнологии
- 1.2. История возникновения и развития биотехнологии
- 1.3. Объекты, используемые в биотехнологии
- 1.4. Генная инженерия и ее задачи
- 1.5. Методы получения и клонирование генов
- 1.6. Технология получения рекомбинантной ДНК
- 1.7. Векторы и их свойства
- 1.8. Способы введения генов в клетку
- 1.9. Полимеразная цепная реакция

1.1. Предмет и задачи биотехнологии

Биотехнология – от греч. *bio(s)* – жизнь; *techné* – искусство, мастерство; *logos* – учение.

Впервые термин «биотехнология» предложил в 1917 г. венгерский инженер *Карл Эреки* (1865-1933). Он предложил процесс крупномасштабного промышленного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы. При этом Эреке рассматривал превращение сырья в целевой продукт как ряд биотехнологических этапов. Этот процесс был назван им *биотехнологией*, так как целевой продукт получался в результате жизнедеятельности биологических систем. Он писал: «Биотехнология – это все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты».

Биотехнология – это совокупность промышленных методов, в которых используют живые организмы и биологические процессы для производства различных продуктов. Она базируется на совершенно несвязанных между собой разделах научных знаний: микробиологии, генетики, медицины, ветеринарии, анатомии растений и животных, биохимии, иммунологии, клеточной биологии, физиологии растений и животных, различных систематик, экологии, биофизики, математики и многих других областей естествознания.

Биотехнологию можно рассматривать как набор всевозможных технологий, которые могут найти применение во многих отраслях народного хозяйства. С помощью биотехнологии, происходит обеспечение определенных человеческих потребностей, например: разработка медицинских препаратов, модификация или создание новых видов растений и животных, что увеличивает качество пищевых продуктов, продолжительность жизни и продуктивность живых организмов.

Цель биотехнологии – дать будущему специалисту представление о современном состоянии и перспективах развития биотехнологии при использовании биообъектов и биомолекул в промышленном производстве, сельском хозяйстве, здравоохранении и окружающей среде.

Задачи биотехнологии:

- расширение исследований в области геномики человека, животных, растений и микроорганизмов;
- активация и поддержание обмена веществ клеток для производства запланированных продуктов при одновременном подавлении других реакций метаболизма у культивируемого организма;
- получение клеток или их составных частей, которые способны к направленному изменению других сложных молекул (например: рестриктазы, изомеразы);
- создание и совершенствование рекомбинантных ДНК, которые способны кодировать биосинтез особо ценных соединений в прикладных разработках;
- создание безотходных и экологически безопасных биотехнологических процессов;
- совершенствование и оптимизация аппаратного оформления биотехнологических процессов с целью получения максимального выхода продукции с измененной наследственностью методами генной и клеточной инженерии.

Основные направления и задачи биотехнологии

Выделяют шесть основных направлений биотехнологии: генная, клеточная и эмбриогенетическая инженерия, а также инженерную энзимологию, микробиологический синтез и традиционную биотехнологию.

Генная инженерия осуществляет широкое конструирование генетически модифицированных организмов (ГМО), в том числе микроорганизмов, растений и животных, возможно получение новых высокопродуктивных продуцентов белков и пептидов человека, антигенов, вирусов и др.

Основной задачей генной инженерии является получение животных с заданными свойствами. Основным подходом – конструирование *in vitro* (вне организма) рекомбинантных молекул ДНК с заданными свойствами.

Клеточная инженерия использует методы клеточной селекции и соматической гибридизации введения культур и клеток и их практического использования. Клеточная селекция основана на выращивании растительных и животных клеток (как в организме, так и вне его на специально подобранных средах в регулируемых условиях).

Включает культивирование и клонирование клеток на специально подобранных средах, гибридизацию клеток, пересадку клеточных ядер и другие микрохирургические операции по «разборке» и «сборке» (реконструкции) жизнеспособных клеток из отдельных фрагментов.

Эмбриогенетическая инженерия – это активная перестройка генома животных путем вмешательства в их развитие на самых ранних стадиях онтогенеза.

Основные задачи эмбриогенетической инженерии: клонирование животных, получение генетических химер, получение трансгенных животных, трансплантация животных.

Инженерная энзимология – это направление биотехнологии, базирующееся на использовании каталитических функций ферментов (или ферментных систем) в изолированном состоянии или в составе живых клеток для получения соответствующих целевых продуктов. Ее задачи заключаются в развитии прогрессивных методов выде-

ления ферментов, их стабилизации и иммобилизации; конструировании катализаторов с нужными свойствами и разработке научных основ их применения.

Микробиологический синтез – использование микроорганизмов для получения белков, ферментов, органических кислот, лекарственных препаратов и других веществ. Благодаря селекции удалось вывести микроорганизмы, которые вырабатывают нужные человеку вещества, в десятки, сотни и тысячи раз превышающие потребности самих микроорганизмов.

К *традиционной биотехнологии* относится производство молочнокислых продуктов, основанное на использовании молочнокислого брожения – разложения сахара до молочной кислоты молочнокислыми бактериями: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_3H_6O_3$. В зависимости от особенностей процесса, получают разные продукты (простокваша, ацидофилин, кефир, йогурт, сметана, творог, сыр).

Примером традиционной биотехнологии может служить и виноделие. Вино – продукт спиртового брожения виноградного или плодово-ягодного сока с помощью дрожжей: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$. Одним из самых древних биотехнологических производств считают хлебопечение, при котором используется спиртовое брожение, вызываемое одноклеточными грибами – дрожжами.

Кроме того, условно можно выделить следующие направления биотехнологии: биотехнология пищевых продуктов, препаратов для сельского хозяйства, лекарственных препаратов, средств диагностики и реактивов. Биотехнология также включает выщелачивание и концентрирование металлов, защиту окружающей среды от загрязнения, увеличение добычи нефти и т.д.

1.2. История возникновения и развития биотехнологии

Развитие современной биотехнологии связано с применением передовых методов генной и клеточной инженерии.

Бурному развитию прикладной и молекулярной биотехнологии способствовали открытия и разработки:

- доказательства роли нуклеиновых кислот в хранении и передаче наследственной информации в биологических системах;
- расшифровка универсального для всех живых организмов генетического кода;
- раскрытие механизмов регуляции функционирования генов в процессе жизнедеятельности организмов;
- изобретение метода полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- разработка новых и совершенствование существующих технологий культивирования микроорганизмов, а также клеток растений и животных;
- создание методов генетической и клеточной инженерии, с помощью которых искусственно создаются новые высокопродуктивные формы организмов, пригодные для использования в промышленных масштабах.

История возникновения и развития биотехнологии включает четыре периода:

Первый эмпирический период (от греч. *empeiros* – опыт) – зарождение биотехнологии с древних времен до конца XVIII в.

Насчитывает около 8 тыс. лет. Люди интуитивно использовали биотехнологические процессы для получения хлеба, пива, спирта, уксуса, квашеной капусты, кисломолочных продуктов, медовых алкогольных напитков, силосования кормов, кормовых дрожжей из углеводов, выделки кожи и т.д. В этот период налажена аэробная очистка канализационных сточных вод. Зарождение биотехнологии тесно связано с сельским хозяйством, переработкой растениеводческой и животноводческой продукции.

Этиологический период (от греч. *aitia* – причина). Этот период связан с началом бурного развития биологических наук: генетики, микробиологии, вирусологии, цитологии, физиологии, эмбриологии. Он охватывает вторую половину XIX и первую треть XX в.

Во второй половине XIX века с развитием химических наук были заложены основы органической химии. В этот период открыты многие органические кислоты, глицерин, глюкоза, первые аминокислоты, осуществлен синтез мочевины. В это время развивается учение о грибах (микология); созданы простые установки для очистки сточных вод и др.

Огромное влияние на создание научных основ микробиологических производств имели работы французского ученого Луи Пастера, который в 1857 году открыл микробную природу брожения, предложил оригинальный метод стерилизации – пастеризацию, создал научные основы вакцинопрофилактики. Его исследования послужили основой развития бродильного производства органических растворителей (ацетона, бутанола, этилового спирта и др.).

Немецкий микробиолог Роберт Кох в 1875 году разработал метод получения чистых культур микроорганизмов. В 1894 г. Японский ученый И. Такамина создал первый ферментный препарат, который получил из плесневого гриба, выращенного на влажном рисе.

В 70-80-е годы XIX столетия были заложены основы культивирования растительных клеток и животных тканей, начались эксперименты по сохранению жизнеспособности клеток и кусочков тканей в специфических условиях и средах.

В 1923 году организовано первое микробиологическое промышленное производство лимонной кислоты, а затем молочной и других органических кислот. Русские ученые Г.А. Надсон и Г.С. Филиппов установили возможность искусственного мутагенеза микроорганизмов (грибов) под влиянием рентгеновского облучения. Было отмечено появление аспорогенных форм, одна из которых отличалась еще и накоплением жира. В следующем году описаны мутанты у дрожжеподобных грибов *Sporobolomyces* и *Nadsonia* (Филиппов, 1926). При изучении индуцированной изменчивости у *Nadsonia* было показано, что облучение индуцирует изменение ферментативных свойств – появляются формы, не сбраживающие те или иные сахара (Надсон, Филиппов, 1928). В 30-е годы

XX века в СССР возникли предприятия, на которых с помощью микроорганизмов производились аминокислоты, витамины, органические кислоты, ферменты (рибофлавин В₂, эргостерин – провитамин D₂).

За данный период времени были решены основные задачи по конструированию, созданию и внедрению в практику необходимого оборудования для микробиологической очистки сточных вод, в том числе главных из них – биореакторов, которые используют и в настоящее время.

Биотехнический период (1934-1971 гг.) ознаменовался развитием биотехнологии в различных направлениях с помощью методов генной и клеточной инженерии. В это время внедряется крупномасштабное герметизированное оборудование для проведения процессов в стерильных условиях; развивается производство антибиотиков, определены условия, необходимые для культивирования клеток растений, животных и человека и др. В военные годы (1941-1945 гг.) изучалась способность дрожжей накапливать белоксодержащую биомассу на непищевом сырье (древесные опилки, гороховая и овсяная шелуха), так как возросла потребность в дрожжах как источнике белковых веществ. В военной Германии биомассу дрожжей добавляли в колбасу и супы. В 1948 г. советский биохимик В.Н. Букин с помощью микроорганизмов получил витамин В₁₂, который не способны синтезировать растения и животные.

В 1940 году ученым удалось получить первый антибиотик – пенициллин путем глубинной ферментации. Это стало толчком к развитию промышленного производства лекарств, получению вирусных вакцин, и возникает целая отрасль фармацевтической промышленности, что представляет собой одну из ячеек современной биотехнологии.

С 1961 по 1970 гг. налажено производство аминокислот, бактериальных полисахаридов, получены очищенные ферментные препараты, в промышленном масштабе используются иммобилизованные ферменты. Введена анаэробная очистка канализационных вод и получение биогаза.

Генно-технический период (от греч. *genesis* – происхождение, возникновение, рождение) – приходится на последние 70 лет, когда начали развиваться ее новые направления, получившие внедрение в различных отраслях народного хозяйства.

Формальной датой рождения современной биотехнологии считается 1972 г., когда в США Бергом была создана первая рекомбинантная (гибридная) ДНК, путем встраивания в нее чужеродных генов. С середины 70-х годов данной проблемой интенсивно занимаются тысячи научных коллективов и промышленных компаний во всех странах мира. В этот период создан генно-инженерный инсулин; развивается хромосомная и клеточная инженерия; внедряются автоматизация и компьютеризация; развиваются новые направления (медицинская биотехнология, иммунобиотехнология, инженерная энзимология).

С возникновением генной инженерии появилась возможность направленно создавать для промышленности микроорганизмы с заданными свойствами.

Одно из направлений биотехнологии – производство белка. Здесь используется способность микроорганизмов превращать растительную биомассу с низким содер-

жанием белка в продукт с высоким его содержанием. В СССР в 80-х годах на биотехнологических производствах получали более 1 млн т кормового белка в год. Таким путем пытались решить проблему обеспечения животноводства кормами.

В 1982 г. поступил в продажу человеческий инсулин, выработанный кишечными палочками, несущими в себе искусственно встроенную генетическую информацию о данном гормоне. В настоящее время разрабатываются или уже выпускаются следующие генно-инженерные препараты: интерфероны, интерлейкины, соматотропин.

В 1983 г. американский ученый Кэри Мюллис получил Нобелевскую премию за революцию в диагностике – он изобрел генетический анализ полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР позволяет обнаружить участки ДНК в любом биологическом материале (слюне, крови, моче и т.д.), даже если инфекции протекают в скрытой форме. Сегодня с помощью ПЦР диагностируют гепатит С, туберкулез, ВИЧ и др.

Сегодня биотехнологии используются в пищевой промышленности, медицине, сельском хозяйстве и многих других сферах человеческой жизнедеятельности.

Таблица 1 - Основные этапы развития генетической инженерии

Год	Автор	Содержание открытия
1	2	3
1869	Ф. Мишер	Выделена ДНК из ядер клеток гноя
1953	Д. Уотсон, Ф. Крик	Сконструирована модель двойной спирали ДНК на основании результатов рентгеноструктурного анализа ДНК
1961	А. Мармур, П. Доти	Явление денатурации ДНК и установлены точность и специфичность реакции гибридизации нуклеиновых кислот
1962	В. Арбер	Впервые получены сведения о ферментах рестрикции ДНК
1965	М. Мезельсон, Е. Юань	Выделена первая рестриктаза
1966	М. Ниренберг, Е. Очоа, Г. Корана	Расшифрован генетический код
1967	М. Геллерт	Открыта ДНК-лигаза
1972-1973	Г. Бойер, С. Коэн, П. Берг	Разработана технология клонирования ДНК
1975-1977	Ф. Сэнгер, Р. Баррел, А. Максам, В. Гильберт	Разработаны методы быстрого определения нуклеотидной последовательности

Продолжение таблицы 1

1	2	3
1979	Г. Корана	Синтезирован ген тирозиновой супрессорной РНК
1981-1982	Р. Пальмитер, Г. Рубин, Р. Бринстер, А. Спрэдлинг	Получена трансгенная мышь. Получены трансгенные экземпляры дрозофилы
1993	Л. Эрнст, Г. Брем, И. Прокофьев	Получены трансгенные овцы с геном хемозина
2003	Стэндфордский и Калифорнийский университеты	Расшифрован геном человека
2004	Корейские ученые	Лечение травмы спинного мозга с помощью стволовых клеток
2006	У.Шинь-Чжи	Получены светящиеся поросята
2016	Р.Дилли	Метод удлинения теломер
2017	Немецкие ученые	ГМ искусственная кожа применяется для лечения буллезного эпидермолиза
2018	Корейские ученые	Клонированные обезьяны, использовались ядра эмбриональных фибробластов.
2018-2019	Корейские ученые	Родились первые в мире ГМ-люди (с отредактированными генами)
2022	Консорциум Telomere-to-Telomere	Была представлена полная последовательность генома человека, которая содержит 3,055 млрд пар оснований, включая 151 миллион пар оснований (Mb), или 8 % от всей длины человеческой ДНК, которые до сих пор оставались непрочитанными.
2022	И.Е. Рослон, А. Джапаридзе, Ф. Алижани	Записали звук, издаваемый бактериями
2022	Ученые Гренландии	Выделена ДНК возрастом более 2 млн лет
2023	Японские ученые	Появились мышата, полученные от двух самцов без генетического материала самок
2023	Макото Саито и соавторы	Обнаружили аналог бактериальной системы для редактирования генома <i>CRISPR-Cas</i> у эукариот
2023	Великобритания	Впервые в мире разрешила терапию на основе <i>CRISPR</i>

1.3. Объекты, используемые в биотехнологии

Объекты биотехнологии включают представителей как прокариот, так и эукариот. Они чрезвычайно разнообразны по своей структурной организации и биологическим характеристикам. К объектам биотехнологии относятся: вирусы, бактерии и цианобактерии, водные растения, лишайники, грибы – микромицеты и макромицеты, клетки (ткани) растений, животных и человека.

Однако в качестве биологических объектов чаще всего используют одно-

клеточные микроорганизмы, а также животные и растительные клетки. Выбор объектов обусловлен множественными причинами. Клетки быстро воспроизводятся, что позволяет за относительно короткое время искусственно получить на сравнительно дешевых и недефицитных питательных средах в промышленных масштабах огромные количества биомассы микробных, животных или растительных клеток. Клетки вырабатывают в процессе своей жизнедеятельности разнообразные ценные продукты (белки, жиры, углеводы, витамины, аминокислоты, антибиотики, гормоны, антитела, антигены, ферменты, спирты и др.). Биосинтез этих сложных веществ значительно экономичнее и технологически доступнее, чем получение их с помощью химического синтеза.

Простейшие относятся к числу нетрадиционных объектов биотехнологии. В настоящее время используются как продуценты биологически активных веществ. Биомасса простейших содержит до 50% белка. Его высокая биологическая ценность заключается в том, что он содержит все незаменимые аминокислоты, причем содержание свободных аминокислот на порядок выше, чем в биомассе микроводорослей, бактерий и в мясе. Это свидетельствует о широких возможностях применения свободноживущих простейших в качестве источника кормового белка.

Многие микроорганизмы – вирусы, бактерии, дрожжи, группа водоросли (сине-зеленые, зеленые, бурые, красные и др.), грибы, лишайники – используются в качестве реципиентов чужеродного генетического материала с целью получения рекомбинантных штаммов-продуцентов биотехнологической продукции. Получены рекомбинантные штаммы *E. coli*, продуцирующие интерфероны, инсулин, гормон роста, антигены вируса СПИДа; штаммы *B. subtilis*, вырабатывающие интерферон; штаммы дрожжей, продуцирующие интерлейкин-2, антиген вируса гепатита В; рекомбинантные вирусы осповакцины, синтезирующие антигены гепатита В, вируса бешенства, клещевого энцефалита и др.

Вирусы – занимают положение между живой и неживой природой, у них нет ядра, хотя имеется наследственный ядерный материал – рибонуклеиновая кислота (РНК) или дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Являются мельчайшими организмами (200-300 нм), невидимые в световой микроскоп, отличающиеся паразитическим способом существования. Находясь в клетках, ведут себя как живые существа – они реплицируются, и их генетический материал функционирует, по общим законам, присущим клеткам любого происхождения.

Вирусы широко используются в биотехнологии для получения многокомпонентных вакцин, а также для разработки различных векторов, например, для генной терапии или для экспрессии генов в культурах клеток.

Бактерии имеют клеточную организацию, и у них имеются нуклеиновые кислоты обоих типов – РНК и ДНК, из которых ДНК представлена в виде одиночной (кольцевидной) хромосомы. Большинство из них размножается на питательных средах (вне организма), а если среди бактерий и есть безусловные (облигатные) паразиты, приближающиеся по данному признаку к вирусам (хламидии, спироплазмы, риккетсии), то паразитизм их отличается по своему механизму.

Бактерии используются при производстве: пищевых продуктов, например, уксуса (*Gluconobacter suboxidans*), молочнокислых напитков (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*) и др., микробных инсектицидов (*Bacillus thuringiensis*), белка (*Methylomonas*), витаминов (*Clostridium*– рибофлавин), растворителей и органических кислот, биогаза и фотоводорода.

Бактерия *Escherichia coli* – один из наиболее хорошо изученных организмов. Это грамотрицательная непатогенная подвижная палочка длиной 1 мкм. Бактерия хорошо переносит введение в свою клетку чужеродных генов и во многих случаях способна синтезировать их продукты без вреда для себя. Белки, полученные таким способом, стали называть рекомбинантными, и теперь они широко используются в медицине и других практических задачах. Генетически модифицированную кишечную палочку широко используют для получения негликозилированных белков: инсулина, гормона роста, фрагментов антител и ферментов.

Создан ген, кодирующий термостабильную ДНК-полимеразу, которая используется в широко применяемой полимеразой цепной реакции (ПЦР). Этот ген был выделен из термофильных бактерий и клонирован в *E.coli*.

Ко второй группе микроорганизмов относятся, например, различные штаммы *Corynebacterium glutamicum*, которые были генетически модифицированы с целью повышения продукции промышленно важных аминокислот.

Биотехнологические функции грибов разнообразны. Их используют для получения таких продуктов, как: антибиотики (пенициллы, цефалоспорины); каротиноиды (астаксантин, придающий мякоти лососевых рыб красно-оранжевый оттенок, который добавляют в корм на рыбозаводах); белок (*Candida*, *Saccharomyces lipolitica*); сыры типа рокфор и камамбер (пенициллы); соевый соус (*Aspergillus oryzae*). К грибам относятся актиномицеты, дрожжи и плесени.

Дрожжи широко используют в хлебопечении, пивоварении, виноделии, получении соков, кормового белка, питательных сред для выращивания бактерий и культур животных клеток.

Из 500 известных видов дрожжей первым люди научились использовать *Saccharomyces cerevisiae*. Используются для изготовления алкогольных напитков и хлеба из-за своей способности превращать сахар в этанол и углекислый газ. Для получения полноценных эукариотических белков используют другие виды дрожжей: *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces diastaticus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*.

К дрожжам, сбраживающим лактозу, относится *Kluyveromyces fragilis*, который используют для получения спирта из сыворотки. *Saccharomycopsis lipolytica* деградирует углеводороды и употребляется для получения белковой массы. *Phaffia rhodozyma* синтезирует атаксантин – каротиноид, который придает мякоти форели и лосося, выращиваемых на фермах, характерный оранжевый или розоватый цвет.

Плесени вызывают многочисленные превращения в твердых средах, которые происходят перед брожением. Пищевые продукты на основе сброженных плесневыми грибами *Rhizopus oligosporus* соевых бобов или пшеницы содержат

в 5-7 раз больше таких витаминов, как рибофлавин, никотиновая кислота и отличаются повышенным в несколько раз содержанием белка. Плесени также продуцируют ферменты, используемые в промышленности (амилазы, пектиназы и т.д.), органические кислоты и антибиотики. Их применяют и в производстве сыров, например, камамбера и рокфора.

Водоросли используются в основном для получения белка. Наиболее перспективны в этом отношении культуры одноклеточных водорослей, в частности рода *Chlorella* и *Scenedesmus*. Их биомасса после соответствующей обработки используется в качестве добавки в рационы скота, а также в пищевых целях. В Средней Азии одноклеточные водоросли выращивают в условиях мягкого теплого климата в открытых бассейнах со специальной питательной средой. В течение 6-8 месяцев можно получить 50-60 т биомассы хлореллы с 1 га. Хлорелла содержит около 50% белка, а люцерна – лишь 18%. Помимо белка хлорелла также содержит 40% углеводов, 7-10% жиров, витамины А, В₂, К, РР и многие микроэлементы.

В ряде стран водоросли используют как весьма полезную витаминную добавку к кормам для сельскохозяйственных животных. Их прибавляют к сену или дают как самостоятельный корм для коров, лошадей, овец, коз, домашней птицы во Франции, Шотландии, Швеции, Норвегии, Исландии, Японии, Америке, Дании, на севере России. Животным скармливают в виде добавки также биомассу выращиваемых микроводорослей (хлорелла, сценедесмус, дуналиелла и др.).

В медицине и косметической промышленности используют гидролизаты белка зеленой водоросли *Scenedesmus*.

В сельском хозяйстве водоросли применяют в качестве удобрений. Биомасса обогащает почву фосфором, калием, йодом и значительным количеством микроэлементов, пополняет также ее бактериальную, в том числе азотфиксирующую, микрофлору. В почве водоросли разлагаются быстрее, чем навозные удобрения, и не засоряют ее семенами сорняков, личинками вредных насекомых, спорами фитопатогенных грибов.

Из красных водорослей получают агар, являющийся полисахаридом, присутствующий в их оболочках и состоящий из агарозы и агаропектина. Количество его доходит до 30-40% от веса водорослей. К ним относят водоросли лауренция и грацилярия, гелидиум.

Бурые водоросли являются единственным источником получения солей альгиновой кислоты, альгинатов. Альгинаты применяются в народном хозяйстве для изготовления высококачественных смазок для трущихся деталей машин, медицинских и парфюмерных мазей и кремов, не выцветающих со временем тканей, производства шелка, строительных материалов, пищевых продуктов – фруктовых соков, консервов, мороженого, стабилизаторов растворов, брикетирования топлива, литейного производства и многого другого.

Клетки животных и растений в процессе жизнедеятельности (ассимиляции и диссимиляции) образуют новые продукты и выделяют метаболиты, обладающие разнообразными физико-химическими свойствами и биологическим действием.

Из культур животных и растительных клеток можно извлечь более широ-

кий ассортимент продуктов. Но процесс культивирования растительных и животных клеток более трудоемкий и дорогостоящий.

Из культур тканей растений можно получать разнообразные соединения, используемые в медицине (алкалоиды, противовоспалительные вещества, противолейкозные и противоопухолевые, противобактериальные, сердечные и почечные средства, ферменты, витамины, опиаты и др.), сельском хозяйстве, химической и других отраслях промышленности.

Животные клетки используют как для получения продукции, так и для выращивания в клетках вирусов с целью получения из них вакцин и диагностических препаратов. В настоящее время разработаны способы промышленного получения противовирусного белка интерферона из лимфобластов человека и моноклональных антител. Они основаны на том, что клетки-гибридомы образуются при слиянии лимфобластов человека (опухолевые клетки, способные к неограниченному росту) и моноклональных антител (которые вырабатывают лимфоциты). Именно такие гибридомы и способны синтезировать белок интерферон.

Помимо микроорганизмов, растительных и животных клеток биотехнология использует органы и ткани человека и животных.

Так, для получения инсулина используется поджелудочная железа крупного рогатого скота, гормона роста – гипофизы трупов человека, иммуноглобулинов – организм лошади и других животных, препаратов крови – кровь доноров и т.д. Клетки животных можно использовать для получения трансгенных животных, клонирования хозяйственно важных пород животных, гибридизации половых клеток для получения химерных особей.

Функции биообъекта заключаются в полном биосинтезе целевого продукта, включающем ряд последовательных ферментативных реакций или катализ лишь одной ферментативной реакции, которая имеет ключевое значение для получения целевого продукта.

Независимо от природы объекта, первичным этапом разработки любого биотехнологического процесса является получение *чистых культур* организмов (если это микробы), клеток или тканей (если это более сложные организмы – растения или животные).

Биообъекты для производства должны соответствовать определенным параметрам: способность размножения клеток на простых, дешевых питательных средах и репродукция вирусных частиц; высокая скорость роста и образования конечного целевого продукта; устойчивостью к изменению физико-химических условий среды (приобретается способность к росту в условиях повышенной температуры); минимальное образование побочных продуктов; активность и стабильность продуцента в отношении производственных свойств; отсутствии патогенности и токсичности продуцента и целевого продукта для человека и окружающей среды. Для поддержания стерильности и фагоустойчивости биообъекты должны быть устойчивы к инфекции.

Все вышеперечисленное обеспечивает значительное снижение затрат на производство целевого продукта.

1.4. Генная инженерия и ее задачи

Генетическая инженерия является наиболее интенсивно развивающейся областью. Это технологическая совокупность разных наук: генетики, биологии, химии, вирусологии, химической инженерии и так далее.

Развитие генной инженерии стало возможным благодаря тому, что генетики научились получать отдельные гены. Именно этот прогресс породил идею о манипулировании ими.

Эти эксперименты стали возможными благодаря: установлению универсальности генетического кода; успехам генетической энзимологии, которая предоставила набор ферментов, позволяющих получать в изолированном виде отдельные гены или фрагменты нуклеиновой кислоты, осуществлять *in vitro* синтез фрагментов нуклеиновых кислот и объединять их в единое целое.

Генетическая инженерия – технология получения новых комбинаций генетического материала путем проводимых вне клетки (*in vitro*) манипуляций с молекулами нуклеиновых кислот и переноса созданных конструкций генов из одного организма в другой, придавая ему новые уникальные свойства.

Целью генной инженерии является получение с помощью лабораторных приемов организмов с новыми, не встречающимися в природе, комбинациями генов.

Те или иные чужеродные для данного организма гены вводят в его клетки и встраивают в его геном с различными целями:

- изучения строения и функций генетического аппарата;
- эффективной наработки продукта данного гена (например, гормона или антибиотика);
- для придания организму-хозяину каких-либо желаемых свойств (например, сельскохозяйственных растений и животных – большей продуктивности или большей устойчивости к инфекциям или паразитам);
- замещения (компенсации) генов, дефекты которых вызывают наследственные заболевания, и др.

После того как в начале 70-х гг. 20 века был разработан метод получения рекомбинантных ДНК, чужеродные гены стали вводить в клетки бактерий, растений и животных. Такие организмы получили название *трансгенных*. Многие организмы, от бактерий до растений и животных, были генетически модифицированы для академических, медицинских, сельскохозяйственных и промышленных целей.

Задачи генной инженерии:

- 1.Получение изолированных генов.
- 2.Получение рекомбинантной ДНК.
- 3.Перенос трансгена в отдельные живые клетки для получения необходимого продукта.
4. Отбор генетически модифицированных организмов (ГМО) и устранение тех, которые не были успешно модифицированы.

1.5. Методы получения и клонирование генов

Чтобы синтезировать ген искусственно, необходимо знать его последовательность нуклеотидов. Эта последовательность должна соответствовать последовательности аминокислот в молекуле белка.

Обычно содержание в клетке какого-либо сегмента ДНК, например отдельного гена, очень незначительно. Поэтому для проведения экспериментов с фрагментами ДНК их необходимо многократно копировать (*клонировать*).

Зная эту последовательность и имея под рукой таблицу генетического кода, можно определить последовательность нуклеотидов в ДНК и м-РНК, которая должна при трансляции обеспечить синтез белковой молекулы именно с такой последовательностью аминокислот. Безусловно, искусственный ген не будет идентичен натуральному по той простой причине, что генетический код вырожденный: одной аминокислоте может соответствовать несколько сочетаний из трех нуклеотидов. Следует также иметь в виду, что гены высших организмов содержат некодирующие участки – интроны.

В условиях *in vitro* гены выделяют из природного вещества, содержащего ДНК, рестрикционным, химическим, ферментативным и химико-ферментативным методами.

Рестрикционный метод, или получение генов с помощью специфических эндонуклеаз – *рестриктаз*, которые вызывают гидролиз ДНК с образованием «липких концов». Эти ферменты открыты в 1953 г. у бактерий.

Они действуют на ДНК любых организмов, если в ней есть распознаваемые сайты (обычно распознают строго специфичные для каждого фермента участки длиной в 4-6 пар нуклеотидов). Эти участки называются палиндромными. (Имеется в виду, что две совершенно несхожих последовательности ДНК, например из клеток мыши и кошки, при обработке одной и той же рестриктазой можно эффективно сшить одну с другой.)

Могут разрезать обе цепи ДНК посередине или со смещением. В первом случае образуются ровные (тупые) концы, а во втором – стороны разрезаемых цепочек ДНК заходят одна за другую. Такие одноцепочные концы называются липкими концами, так как в силу комплементарности могут слипаться между собой.

К настоящему времени из разных микроорганизмов выделено более тысячи различных рестриктаз; в генетической инженерии используется около 500 способных разрезать ДНК примерно в 120 различных местах.

Для их обозначения используются сокращенные названия микроорганизмов - продуцентов.

В качестве примера рассмотрим *EcoRI* – рестриктазу, выделенную из *Escherichia coli*. Подобно многим другим рестриктазам, этот фермент расщепляет ДНК по палиндромной последовательности, т. е. короткому сегменту ДНК, в котором обе цепи при считывании в направлении 5'→3' имеют одинаковую последовательность. Для *EcoRI* это последовательность 5'-GAATTC-3'.

В данной методике клонирования ДНК используется способность клеток бактерий поглощать и реплицировать короткие кольцевые молекулы ДНК, из-

вестные как плазмиды. Сначала клонируемый фрагмент ДНК вырезается из исходной ДНК с помощью рестриктазы. На практике обычно используются два разных фермента. В качестве переносчика («вектора») служит плазида с единственным участком, узнаваемым рестриктазой. Кольцевая плазида смешивается с изучаемым фрагментом ДНК. Поскольку фрагмент и вектор имеют одинаковые липкие концы, некоторые из молекул будут гибридизоваться таким образом, что клонируемый фрагмент окажется интегрированным в структуру вектора. Затем концы линейной молекулы ковалентно сшиваются с помощью ДНК – лигазы с образованием новой (рекомбинантной) плазмиды.

Выделение гена с помощью рестриктаз имеет ряд недостатков:

- не всегда можно подобрать рестриктазы, позволяющие вырезать из ДНК именно тот участок, в котором содержится интересующий ген;
- в составе вырезанного фрагмента ДНК могут оказаться интроны, и рекомбинантные ДНК не смогут экспрессироваться в прокариотических клетках из-за отсутствия способности к процессингу и сплайсингу.

Синтез гена *химическим методом* впервые осуществил Х.Г. Корана с сотрудниками, работавшими в США в 1970 году. Генетик синтезировал участок молекулы ДНК пекарских дрожжей, состоящий из 70 пар нуклеотидов.

Сначала ученые соединяли мелкие фрагменты искусственно полученной ДНК, содержащие от 4 до 13 нуклеотидных пар, были соединены с помощью фермента лигазы в нужной последовательности. Однако полученный генетический элемент был не способен функционировать *in vitro*.

В 1976 году те же авторы синтезировали ген, кодирующий тирозиновую тРНК, состоящий из 126 пар нуклеотидов. Также были синтезированы регуляторные участки: промотор (52 пары нуклеотидов), терминатор (21 пара нуклеотидов) и «липкие концы», состоящие из чередования нуклеотидов ААТТ и ТТАА. Данный ген был встроен в геном мутантного фага Т4 и введен в живую клетку кишечной палочки. Ген оказался работоспособным. Своим открытием индийский биолог Хар Гобинд Корана доказал, что с помощью искусственных генов можно создать генетически модифицированные организмы.

Химический метод применен для получения небольших генов. Метод, разработанный Х.Г. Кораной, был затем применен для синтеза генов гормонов соматостатина и инсулина. Для синтеза гена соматостатина было использовано восемь, а для инсулина - 66 коротких одноцепочечных синтетических фрагментов ДНК, которые затем гибридизовали и получали двуцепочечные молекулы, стабилизированные водородными связями между комплементарными нуклеотидами.

Под *ферментативным синтезом гена* имеют в виду транскрибирование комплементарной нити ДНК (гена) на молекулах РНК в пробирке.

Система для синтеза представляет собой раствор, в котором содержатся все четыре нуклеотида, входящих в состав ДНК, ионы магния, фермент обратная транскриптаза (ее получают из онкогенных вирусов) и информационная (матричная) РНК, кодируемая геном, копию которого ставится задача снять. На иРНК обратная транскриптаза синтезирует комплементарную ей цепь ДНК,

а затем на ней при помощи этого же фермента синтезируется вторая цепь ДНК. В результате получается ген по структуре такой же, как и тот, на котором была синтезирована иРНК.

Достоинством данного метода является то, что ген получается без интронов и других нетранскрибируемых последовательностей. Кроме того, легче создать условия, когда клетка аккумулирует нужный вид иРНК, чем отбирать ген из смеси фрагментов ДНК.

С помощью этого метода в 1979 г. был получен ген соматотропина (гормона роста человека).

Химическим путем синтезируют олигонуклеотиды: линкеры, адаптеры, праймеры, промоторы, а гены синтезируют ферментативным методом.

Химико-ферментативный синтез генов применяется наиболее часто.

Химико-ферментативный синтез генов: *in vitro* синтезируют короткие (8-16) одноцепочечные фрагменты ДНК, которые затем соединяют с помощью лигаз и отжигают (дают возможность образоваться двухнитевым молекулам ДНК). Для этого метода ген должен быть секвенирован (расшифрована нуклеотидная последовательность).

Химико-ферментативный синтез позволяет точно воссоздать минимально необходимую последовательность нуклеотидов. Кроме того, существует возможность введения в гены участков узнавания различных рестриктаз, регуляторных последовательностей.

1.6. Технология получения рекомбинантной ДНК

Рекомбинантная ДНК – искусственно созданная молекула ДНК, имеющая форму кольца, включающая ген и вектор.

Технологию рекомбинантных ДНК можно использовать для манипуляций с фрагментами ДНК, выделенных из живых организмов или синтезированных искусственно.

Для конструирования рекомбинантной ДНК необходимы ферменты:

рестрикционные эндонуклеазы – находят и разрезают молекулы ДНК в сайтах с определенными последовательностями, которые узнают только определенные рестриктазы.

ревертаза – осуществляет синтез ДНК на матрице РНК.

ДНК-полимераза – катализирует синтез ДНК на матрице ДНК.

ДНК-лигаза – склеивает молекулы ДНК.

терминальная трансфераза – досинтезирует к концам ДНК пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды.

эндонуклеаза – отщепляет концы 3 – конца двойной спирали.

нуклеаза – сокращает с обоих концов двойную спираль ДНК.

Для получения рекомбинантных ДНК рестриктазы расщепляют молекулу ДНК и образуют на ней «липкие концы». На основе правила комплементарности липкие концы соединяются. Молекулу вектора и клонированной ДНК сшивают ДНК-лигазой. Иногда используются *линкеры*.

Основные элементы технологий:

1. Для внедрения в клетку – реципиента (принимающую клетку) используют небольшую молекулу ДНК, которая обладает способностью проникать в данную клетку. Такую молекулу называют *вектором*.
2. ДНК-вектор извлекают из клетки и разрезают в таком месте, куда можно встроить ген донора.
3. Из организма доноров нужных генов выделяют молекулу донорной ДНК, которая содержит необходимую последовательность генов.
4. Донорную ДНК гидролизуют ферментами в нужных местах, вырезая участок с необходимым геном и отделяя его от других частей молекулы ДНК-донора.
5. ДНК-вектор соединяют с вводимым геном донора. Образуется рекомбинантная ДНК.
6. Новая молекула ДНК содержит встроенный ген и вводится в клетку-реципиента. Для этого используется прогревание, добавление некоторых веществ и др.

Белки, полученные генно-инженерным способом, то есть транслируемые с рекомбинантных ДНК, также называются рекомбинантными.

Технология рекомбинантных ДНК оказала существенное воздействие на развитие современной биологии, позволив решать многие теоретические задачи, например, определять функции белков, изучать механизмы регуляции экспрессии генов. Рекомбинантные структуры нашли широкое применение в промышленной биотехнологии для производства ферментов, гормонов, интерферонов, антибиотиков, витаминов и многих других продуктов для фармакологии и пищевой промышленности. Методом рекомбинантных ДНК были получены генетически модифицированные растения и трансгенные животные, обладающие новыми полезными для человека свойствами.

1.7. Векторы и их свойства

Ключевой операцией в генной инженерии является введение в клетку и стабильное поддержание генетической информации, содержащейся в рекомбинантных молекулах ДНК. Это достигается при помощи так называемых векторных молекул, или векторов.

Для того чтобы рекомбинантная молекула ДНК стала составной частью генетического аппарата клетки, она должна либо встроиться в ее геном (интегрироваться в хромосому) и реплицироваться за ее счет, либо быть способной к автономной репликации.

Вектор – небольшая автономно реплицирующая молекула ДНК, которая обеспечивает размножение и работу встроенного в них определенного гена.

Выбор вектора для молекулярного клонирования зависит от выбора организма-хозяина, размера клонируемой ДНК и от того, должны ли экспрессироваться чужеродные молекулы.

В настоящее время создано большое число векторов, и по профилю использования их можно разделить на несколько типов.

Векторы амплификаторы. Используют для увеличения количества (амплификации) фрагмента ДНК до 1-3 тыс. копий на клетку, встроенного в такой вектор посредством репликации. В этом качестве наиболее часто используются бактериальные плазмиды и фаги.

Векторы для экспрессии – это векторы, которые содержат регуляторные элементы для эффективной транскрипции и трансляции клонированных генов.

Их используют для анализа конкретных последовательностей генов и их белковых продуктов, а также наработки конкретного белка. Существует огромное количество экспрессионных систем, особенно для прокариотических организмов. Есть также векторы для экспрессии генов в клетках дрожжей, растений и млекопитающих. Экспрессионные векторы для эукариотических организмов всегда содержат так называемую экспрессионную кассету, состоящую из промотора, способного работать в данном организме, и сайта полиаденилирования.

Векторы для трансформации. Используют для введения чужеродного фрагмента ДНК в геном реципиента. Обычно такие векторы содержат специфические последовательности, способствующие интеграции в геном.

Челночные (бинарные) векторы – это гибридные плазмиды, которые способны реплицироваться как в клетках *B. subtilis*, так и в клетках *E. coli*. Чужеродные гены первоначально клонируют в методически более простой системе *E. coli*, для которой детально разработаны приемы генной инженерии. В этой же системе проводят целенаправленные модификации генно-инженерных конструкций, а затем отобранные и модифицированные гибридные плазмиды переносят в клетки *B. subtilis*.

Используя данный тип векторов можно изучать функционирование одной и той же генетической конструкции в клетках различных типов. Более того, векторы, содержащие участки инициации репликации различных организмов, например, *E. coli* дрожжей и другие пары, способны реплицироваться в клетках бактерий и эукариот.

Фьюжн-векторы (fusion) – это векторы-химеры на основе плазмид или фагов, содержащие регуляторную часть одного гена, а структурную часть другого гена. Клонированный ген вводят в эти векторы так, чтобы регуляторная область бактериального гена оставалась неизменной, а встраивание происходило в его структурную часть. При совпадении рамки трансляции бактериального гена с рамкой трансляции встроенного гена синтезируется химерный белок, который обладает свойствами целевого экзогенного белка.

К числу векторов относят плазмиды, бактериофаги, вирусы животных.

Плазмиды – это внехромосомные автономно реплицирующиеся молекулы ДНК, не способные к самостоятельному существованию вне клетки.

Как правило, плазмиды имеют в своем составе гены устойчивости к антибиотикам, ионам тяжелых металлов (R-плазмиды), а также гены, контролирующие катаболизм некоторых органических соединений (плазмиды биodeградации, или D-плазмиды). Одна их наиболее часто употребляемых плазмид для клонирования pBR 322 создана на основе плазмид природного происхождения, выделенных из *E. coli*. Эта плазида содержит гены устойчивости к двум анти-

биотикам: ампициллину и тетрациклину, причем в генах устойчивости к этим антибиотикам имеются сайты рестрикции. Чем больше плазмида содержит уникальных участков узнавания для рестриктаз, тем она универсальнее.

Фаговые векторы (на основе фага λ). Это перекроенные ДНК бактериофагов двух типов. Их разнообразие невелико, и используют их гораздо реже плазмид, но чужеродные гены с их помощью проникают в бактериальные клетки эффективнее: в конце концов, у эволюции было время отшлифовать паразитарные таланты вирусов.

Существуют *гибридные векторы*, содержащие ДНК фага и плазмиды.

Космида – гибрид плазмиды и фага (вируса, который заражает бактерии). По сути дела, это просто плазмида, в которую добавлены сайты для связывания с белками оболочки фага (они называются *cos*-сайтами, и именно благодаря им космиды получили свое название). Белковая оболочка делает космиду стабильнее, благодаря чему в нее можно загружать более длинные вставки.

Векторные молекулы должны обладать следующими *характеристиками*:

- содержать *ori* репликации (*origin* – точка начала репликации) и обеспечивать репликацию чужеродного фрагмента ДНК;
- стабильно наследоваться клеткой-хозяином;
- содержаться в большом числе копий в клетке;
- обладать достаточной емкостью, позволяющей клонировать в их составе крупные гены;
- содержать уникальные (удобные) сайты рестрикции, что позволит встроить в него фрагмент чужеродной ДНК;
- содержать маркеры, по которым можно вести отбор клеток, воспринявших клонированный сегмент ДНК и сам маркер.

1.8. Способы введения генов в клетку

Прямое введение гена в клетку осуществляют несколькими способами:

Введение в клетку нуклеиновой кислоты вируса с последующим образованием вирусного потомства называется *трансфекцией*. Эффективность трансфекции выражается обычно количеством инфекционных центров (бляшек, негативных колоний), приходящихся на молекулу или на единицу массы нуклеиновой кислоты вируса. Вирусные клоны, полученные после трансфекции из отдельных бляшек, называют *трансфектантами*. Следует отметить, что нуклеиновые кислоты некоторых типов вирусов неинфекционны, т. е. неактивны в тесте трансфекции. Это обусловлено тем, что для инициации экспрессии генома данных вирусов необходимы определенные вирусспецифические белки, содержащиеся в вирусных частицах, но отсутствующие в препарате очищенной нуклеиновой кислоты.

Процесс, в результате которого экзогенная ДНК проникает в реципиентную клетку и вызывает у нее наследуемые изменения, называют *трансформацией*. Трансформацию клеток могут осуществлять как молекулы ДНК, реплицирующиеся в клетках внехромосомно (плазмиды), так и молекулы ДНК, ин-

тегрирующиеся в геном клетки (линейные и кольцевые молекулы ДНК). Генетически трансформированные клетки принято называть *трансформантами*.

Эффективность трансформации обычно выражают количеством клонов (колоний, образованных в результате делений исходно единичной клетки) трансформантов, приходящихся на молекулу или единицу массы донорной ДНК. Данную генетическую (биохимическую) трансформацию необходимо отличать от онкогенной трансформации эукариотических клеток.

Физиологическое состояние клетки, в котором она способна поглощать нуклеиновую кислоту из окружающей среды, называется *компетентностью*. Однако многие бактерии, а также дрожжи и культивируемые клетки животных и растений такой физиологической компетентностью не обладают. Поэтому восприимчивость к экзогенной ДНК у них индуцируют различными способами. Такую компетентность принято называть индуцированной. Наиболее просто она достигается путем определенного химического или физического воздействия на клетки. Разные типы клеток имеют свои особенности строения клеточных стенок и плазматических мембран, поэтому они могут различаться по способам индукции у них компетентного состояния.

Исторически первым подходом к получению компетентных для трансфекции (трансформации) клеток бактерий является ферментативный гидролиз клеточных стенок, приводящий к удалению физического барьера на пути проникновения молекул ДНК в клетку. Для этой цели можно использовать различные индивидуальные ферменты (например, лизоцим) или смеси ферментов (например, пищеварительный сок виноградной улитки). При ферментативной обработке клетки необходимо помещать в изотонический раствор (0,2 М сахараза; 1 М сорбит; 0,6 М КС1 и др.), имеющий примерно такое же осмотическое давление, какое характерно для цитоплазмы клетки. В этих условиях клетки, лишенные своего жесткого «панциря» (клеточной стенки), приобретают шарообразную форму и не лопаются от осмотического шока, наблюдаемого в гипотонической среде.

В том случае, когда после гидролиза полностью удаляется клеточная стенка и остается только плазматическая мембрана, ограничивающая содержимое клетки, возникает осмотически чувствительный *протопласт*. Если после ферментативного гидролиза на плазматической мембране остаются фрагменты клеточной стенки или сохраняется внешняя мембрана (что характерно для грамотрицательных бактерий), то такие клетки называют *сферопластами*.

Как и протопласты, они являются осмотически чувствительными и в изотоническом растворе имеют форму шара.

При получении протопластов и сферопластов большое значение имеет подбор условий, обеспечивающих в последующем эффективную регенерацию клеточных стенок. Процедуры получения протопластов и сферопластов, трансформации их молекулами ДНК, регенерации клеточной стенки и отбора колоний трансформантов многоэтапны, а результат зависит от многих параметров: состава растворов, способов обработки и др. Все это приводит к тому, что данные методики отличаются низкой воспроизводимостью, требуют высокой ква-

лификации исполнителя и весьма трудоемки. Поэтому по мере разработки более простых способов данный подход постепенно утратил свое значение.

На смену пришли методы обработки клеток растворами солей (см. 2.1).

В 1982 г. Т. Вонг и Е. Нейман с сотрудниками для введения молекул ДНК в культивируемые клетки мыши применили метод, получивший название *электропорация*. В последующие годы метод был усовершенствован, что позволило использовать его эффективно как для эукариотических, так и для прокариотических клеток.

Суть данного подхода состоит в том, что кратковременное воздействие (обычно 5-20 мс) электрического поля высокой напряженности (1-15 кВ/см) на клеточную мембрану приводит к образованию в ней пор (электропробой). Время существования и размер пор достаточны, чтобы такие макромолекулы, как ДНК, могли из внешней среды войти в клетку в результате действия осмотических сил. Объем клетки при этом увеличивается. Напряженность электрического поля и продолжительность его действия, концентрации трансформирующей ДНК и клеток-реципиентов для каждой системы клеток подбирают экспериментально, с тем, чтобы добиться высокой частоты поглощения ДНК выжившими клетками. Показано, что в оптимальных условиях электропорации количество трансформантов может достигать 80% выживших клеток.

Электропорация – физический, а не химический метод, и это, по-видимому, обуславливает его широкое применение. Электропорация может успешно использоваться для введения молекул ДНК в разные типы клеток, такие как культивируемые клетки животных, простейшие, дрожжи, бактерии и протопласты растений.

Трансформация – это внесение плазмид (и других невирусных векторов) в бактерии, а также клетки растений и грибов.

Трансфекция – то же самое, что и трансформация, но только в применении к клеткам животных. Однако эффективность проникновения экзогенной ДНК в клетку довольно низка. Поэтому среди бактерий, подвергшихся трансформации, только небольшая часть оказывается трансформированной.

И, наконец, *трансдукция* – это внесение в любые клетки вирусного вектора.

Но некоторые клетки так привередливы и капризны и не соглашаются принимать комплексы ДНК с переносчиком. Чтобы ввести в эти клетки генетический материал, ученым приходится прибегать к грубой силе – продырявливать мембрану и проталкивать ДНК в образовавшиеся отверстия. Этот жестокий подход называется *физической трансфекцией*; он очень травматичен для клеток, и только некоторые из них переживут столь не деликатное обращение. Поэтому применять данную методику стоит, только если вы точно уверены, что обладаете достаточным количеством клеток и можете пожертвовать большей частью из них. Ну и к тому же, вам потребуется довольно дорогое оборудование.

Наверное, самый распространенный способ продырявливания мембраны называется *электропорацией*. Дело в том, что у клеток, попавших в электрическое поле, в мембране возникают отверстия (которые получаются тем больше,

чем сильнее приложенное к клеткам поле). Если эти отверстия малы, то клетка сможет «залечить» их; если же они слишком велики, то клетка погибнет из-за необратимого нарушения целостности мембраны. Поэтому эмпирическим путем можно подобрать оптимальную величину поля для того, чтобы клетки, с одной стороны, продырявились, а с другой – остались в живых. А когда клетки продырявлены, то добавленный к ним вектор проникает сквозь отверстия и оказывается в цитоплазме.

Кроме электропорации, есть еще несколько способов – экзотических и не очень – сделать в мембране дырки. Например, с помощью:

Ультразвука (это называется сонопорация);

Лазера (оптическая трансфекция);

Нанопроволоки с пришитым к ней вектором, которая физически прокалывает мембрану (импалефекция);

Магнитных взаимодействий (магнитофекция или магнитная трансфекция). В этом случае вектор присоединяется к магнитным наночастицам, которые транспортируются внутрь клетки с помощью магнитного поля.

Микроинъекция. Метод введения ДНК с помощью микроинъекций был разработан в начале 70-х годов Дж. Андерсоном и Э. Диакумакосом. В принципе, при наличии хорошего оборудования можно за 1 час инъецировать 500-1000 клеток, причем в лучших экспериментах в 50% клеток наблюдается стабильная интеграция и экспрессия инъецированных генов. Преимущество описываемого метода заключается также в том, что он позволяет вводить любую ДНК в любые клетки, и для сохранения в клетках введенного гена не требуется никакого селективного давления.

Метод «мини-клеток». Получают путем блокирования донорных клеток в митозе колцемидом. При продолжительной обработке клеток колцемидом в них вокруг каждой хромосомы формируется новая ядерная мембрана. Обработка цитохалазином В и центрифугирование приводит к образованию мини-клеток, представляющих микроядра, инкапсулированные в цитоплазматическую мембрану. Полученные мини-клетки очень чувствительны к разного рода воздействиям, поэтому для слияния подбирают специальные мягкие условия. Метод трудный, капризный, эффективность низкая.

Упаковка в липосомы. Используется для защиты экзогенного генетического материала от разрушающего действия рестриктаз. *Липосомы* – сферические оболочки, состоящие из фосфолипидов. Получают их путем резкого встряхивания смеси водного раствора и липидов, либо обрабатывая ультразвуком водные эмульсии фосфолипидов. Липосомы, состоящие из фосфатидилсерина и холестерина наиболее пригодны для введения ДНК в клетки животных и растений. Системы переноса с помощью липосом низкотоксичны по отношению к клеткам.

Метод биологической баллистики (биолистики) является одним из самых эффективных на сегодняшний день методов трансформации растений, особенно однодольных. Суть метода заключается в том, что на мельчайшие частички вольфрама диаметром (0,6-1,2) мкм напыляется ДНК вектора, содержащего не-

обходимую для трансформирования генную конструкцию. Вольфрамовые частички, несущие ДНК, наносятся на целлофановую подложку и помещаются внутрь биолистической пушки.

Обычно клетки, располагающиеся непосредственно по центру, погибают из-за огромного количества и давления вольфрамовых частиц, в то время как в зоне (0,6-1,0) см от центра находятся наиболее удачно протрансформированные клетки. Далее клетки осторожно переносят на среду для дальнейшего культивирования и регенерации.

С помощью биолистической пушки были протрансформированы однодольные растения, такие, как кукуруза, рис, пшеница, ячмень. При этом были получены стабильные растения-трансформанты. Кроме успехов в получении трансгенных однодольных, биолистическая трансформация применяется для прямого переноса ДНК в эмбрионную пыльцу и дальнейшего быстрого получения трансгенных дигаметоидных растений, которые являются важным этапом в селекционной работе. В настоящее время этим методом была проведена трансформация растений табака и после регенерации гаптомидных растений получены стабильные трансформанты.

При баллистической трансфекции, основанной на обстреле органов и тканей, золото покрывают плазмидной ДНК. Микрочастицы проходят через клеточные слои и переносят генетическую конструкцию непосредственно в ядра клеток. Созданная для этой цели «генная пушка» (*genegun*) по своему устройству сходна со стрелковым оружием. Глубина проникновения микрочастиц, как правило, невелика – до 1 мм, поэтому метод используется преимущественно для трансфекции клеток кожи или подлежащего хряща. Однако при особых условиях обстрела микрочастицы могут проникать в ткань на глубину до 4-5 мм и переносить ген в волокна поперечно-полосатых мышц.

1.9. Полимеразная цепная реакция

Несмотря на то что методы исследования наследственного материала все время совершенствовались, тем не менее для анализа структуры ДНК требовалось определенное количество клеточного материала. Ситуация радикально изменилась благодаря появлению метода, который был разработан *Кэри Мюллісом*.

Этот метод получил название *полимеразной цепной реакции (ПЦР)* и стал неотъемлемой процедурой, освоенной во всех генно-инженерных лабораториях мира.

Использование методики ПЦР позволяет амплифицировать (размножить) ДНК или ее фрагмент *in vitro*, увеличивая количество копий в миллионы раз за несколько часов.

ПЦР осуществляют в пробирке с помощью специального термостабильного фермента ДНК-полимеразы (*Taq*-полимеразы), набора всех четырех нуклеотидов: А, Т, Г и Ц и коротких олигонуклеотидных затравок – праймеров.

Праймеры – это короткие, длиной в 20-30 нуклеотидов, одноцепочные фрагменты ДНК, комплементарные 3'-концевым последовательностям копируемой ДНК-матрицы.

Благодаря праймерам ограничивается фрагмент ДНК, который будет скопи-

рован *Tag*-ДНК-полимеразой, присоединяющийся к 3'-концам праймеров и достраивающей их до заданной длины.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) протекает в три стадии.

1. *Денатурация.* Инкубационную смесь, в которой содержится образец нужной ДНК, нагревают до температуры 90°C. При этом в течении 15 секунд происходит разрушение слабых водородных связей между нитями ДНК, и из одной двухцепочной молекулы образуется две одноцепочные.

2. *Гибридизация праймеров.* Температуру снижают до 50°C. При этом происходит гибридизация цепей ДНК с праймерами. Эта стадия обычно протекает 30 секунд.

3. *Полимеризация.* Инкубационную смесь нагревают до температуры 70°C. При этой температуре *Tag*-полимераза удлиняет оба праймера с их 3'-концов. Праймеры дорастают до размеров матрицы. Этот процесс протекает в течение 90 секунд. В результате количество ДНК удваивается.

Фермент *Tag*-полимераза был выделен из термофильных бактерий, отличается устойчивостью к высокой температуре. При температуре 70°C *Tag*-полимераза способна работать с большой скоростью. За 20 циклов амплификации количество копий ДНК достигает величины 10^6 .

В последние годы удалось создать специальный прибор – амплификатор, с помощью которого все три стадии размножения ДНК производятся автоматически.

За разработку метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в 1993 г. Кэри Мюллис был удостоен звания лауреата Нобелевской премии.

Применение ПЦР-анализа:

1. *Клиническая медицина.*

– Анализ клинических образцов на наличие инфекционных агентов бактериальной и вирусной природы: ВИЧ, вирусов гепатита и герпеса, хламидий, хеликобактера, туберкулезных микобактерий и т.д.

– Диагностика лейкемии, лимфомы и других видов неоплазий, которые можно определить по мутациям в определенных генах. Мониторинг опухолевых заболеваний после терапии.

– Диагностика наследственных заболеваний, причина которых – мутации отдельных генов: серповидноклеточной анемии, бокового амиотрофического склероза, фенилкетонурии, муковисцидоза, мышечной дистрофии и т.п.

– Персонализированная медицина. Далеко не все лекарства одинаково действуют на всех людей. Одно и то же вещество может помогать одному пациенту и быть токсичным или аллергенным для другого из-за особенностей метаболических процессов у разных людей. Поэтому, сделав пациенту своеобразный «генетический паспорт» таких особенностей, можно на его основе подобрать правильное лечение.

– Тканевая типизация перед трансплантацией органов.

– Обнаружение хромосомных кроссинговеров, делеций, инсерций, транслокаций и инверсий в отдельных сперматозоидах до оплодотворения.

2. Криминалистика и судебная медицина.

- Установление личности преступников и жертв по ДНК из капель крови, волос и спермы с места преступления.
- Установление отцовства и иного родства.
- Расследование причин необъяснимой смерти («молекулярная аутопсия») – в комплексе с морфологическими и физиологическими данными.

3. Генная инженерия.

- Клонирование ДНК для исследования функций генов, их взаимодействия, создания синтетических ДНК, генетически модифицированных организмов и пр.
- Мутагенез, основанный на внесении изменений в ДНК посредством ПЦР.
- Создание гибридизационных зондов для различных видов блоттинга.
- Анализ экспрессии генов в тканях и отдельных клетках в разных условиях.

4. Антропология, палеонтология.

- Изучение взаимосвязей между видами в эволюционной биологии.
- Изучение вымерших животных и предков человека.
- Исследование ДНК исторических личностей, например, Николая II, английского короля Ричарда III, египетских фараонов и т.д.

5. Сельское хозяйство.

- Обнаружение патогенов (бактерий, грибов, вирусов) у растений и животных.
- Диагностика наследственных заболеваний домашних и сельскохозяйственных животных.
- Анализ пищевых продуктов на содержание генетических модификаций.
- Обнаружение X-хромосомы у животных, пол которых трудно определить невооруженным глазом: например, рыб, рептилий, попугаев.

Вопросы для проверки знаний:

1. Понятие о биотехнологии.
2. Этапы развития биотехнологии.
3. Что относится к объектам биотехнологии?
4. Цели и задачи генной инженерии.
5. Методы получения генов.
6. Рекомбинантная ДНК. Векторы и их свойства.
7. Методы введения генов в бактериальные клетки.
8. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ее применение в практике.

ТЕМА 2. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

2.1. Клеточная инженерия: история развития

2.2. Понятие о культуре клеток. Выделение и культивирование клеток.

Разновидности клеточных культур

2.3. Гибридизация соматических клеток, перспективы использования

2.4. Гибридная технология получения моноклональных антител

2.5. Применение моноклональных антител

2.6. Понятие о стволовых клетках. Основные особенности, свойства и классификация стволовых клеток

2.7. Виды стволовых клеток

2.1. Клеточная инженерия: история развития

Объектом биологических и молекулярно-биологических исследований являются живые организмы, но работа с ними довольно трудна. Во-первых, это дорого и долго. Во-вторых, изучать молекулярные механизмы в живом организме чрезвычайно сложно из-за колоссального числа взаимосвязанных компонентов и низкого разрешения методов анализа: очень сложно выделить эффекты одного изучаемого процесса из миллионов других событий, происходящих в том же организме в то же время. В-третьих, на самой интересной живой системе – человеке – эксперименты и вовсе запрещены. Поэтому ученым приходится исследовать организм по частям, что имеет несомненные преимущества, но и существенные ограничения.

Генетические манипуляции с изолированными клетками животных и растений осуществляют *in vitro*, а *главной целью* они имеют получение генотипов этих организмов с заданными свойствами, в первую очередь, хозяйственно полезными.

Под *клеточной инженерией* понимают метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции.

Культивирование – методы сохранения (*in vitro*) и выращивания в специальных питательных средах клеток, тканей, небольших органов или их частей.

Гибридизация – методы получения гибридов соматических клеток неродственных и филогенетически отдаленных видов.

Реконструкция – методы внедрения в соматическую клетку отдельных клеточных органелл (ядро, цитоплазма и др.).

Главным звеном биотехнологического процесса, определяющим его сущность, является *клетка*. Именно в ней синтезируется целевой продукт. Клетка представляет собой миниатюрный химический завод, работающий с колоссальной производительностью, с предельной согласованностью и по заданной программе. В ней ежеминутно синтезируются сотни сложнейших соединений, включая гигантские биополимеры, в первую очередь белки.

Стало осуществимым исследование таких спорных проблем, как взаимодействие клеток в тканях, клеточная дифференцировка, морфогенез, механизмы

появления раковых клеток и др. При решении практических задач основное внимание уделяется вопросам селекции, получения значительных количеств биологически ценных метаболитов растительного происхождения, в частности, более дешевых лекарств, а также выращивания оздоровленных безвирусных растений, их клонального размножения и др.

Как развивались клеточные технологии.

1665 г. – Р. Гук впервые наблюдает ячеистое клеточное строение растений.

1683 г. – А. Левенгук открывает одноклеточные организмы.

1839 г. – М. Шлейден и Т. Шванн создают клеточную теорию.

1909 г. – А. Максимов находит стволовые клетки.

1925 г. – Создается коллекция клеток ATCC.

1948 г. – Показана возможность производства вакцин в культуре клеток.

1951 г. – Получена линия клеток HeLa.

1961 г. – Л. Хейфлик обнаруживает предел числа делений человеческих клеток *in vitro*.

1968 г. – А. Фриденштейн находит мезенхимальные стволовые клетки.

1975 г. – Разрабатывается технология гибридом и производства моноклональных антител. Авторы открытия Мильштейн, Келер и Ерне – в 1984 г. получают Нобелевскую премию по физиологии и медицине.

1981 г. – Получены эмбриональные стволовые клетки мыши.

1996 г. – Клонирована овечка Долли путем переноса ядра между клетками (В. Рослин).

1997 г. – Получены эмбриональные стволовые клетки человека.

2006 г. – Получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, за что Ш. Яманака в 2012 г. получает Нобелевскую премию (вместе с Дж. Гордоном, который за несколько десятков лет до этого провел клонирование лягушки, заложив основу для последующих исследований).

2017 г. – В России принят закон «о биомедицинских клеточных продуктах», регулирующий применение клеток для терапии.

2018 г. – Впервые получены живые мышата от двух отцов. Этого удалось достичь за счет использования эмбриональных стволовых клеток.

2023г. – В Японии появились мышата, полученные от двух самцов без генетического материала самок. Биологи яйцеклетку вырастили прямо из клетки самца.

Задачи клеточной инженерии:

1. Получение и применение культур клеток животных, человека, растений и бактерий с целью создания вакцин, сывороток, диагностических препаратов.

2. Культивирование культур клеток для получения биологически активных веществ.

3. Получение моноклональных антител для использования в медицине и ветеринарии.

4. Генно-инженерные манипуляции с клетками для получения новых форм, новых культур клеток, биопрепаратов.

В настоящее время созданы и развиваются лаборатории клонального

микроразмножения, связанные с нуждами селекции, размножением декоративных, лекарственных и других растений. Кроме того, технология используется для размножения лучших экземпляров взрослых лесных деревьев, особенно хвойных, для сохранения редких и исчезающих видов растений.

2.2. Понятие о культуре клеток. Выделение и культивирование клеток. Разновидности клеточных культур

Наиболее распространенным модельным объектом биологических исследований в наше время являются **клеточные культуры**.

Клеточная культура – это клетки (растений, животных или человека, принадлежащие одной ткани), выращиваемые обычно в пластиковых флаконах, планшетах или чашках Петри на специальной питательной среде при контролируемых температуре, влажности и газовом составе воздуха.

Культура клеток – метод сохранения жизнеспособности клеток вне организма в искусственно созданных условиях жидкой или плотной питательных сред.

В основе культивирования растительных клеток лежит свойство *тотипотентности*, благодаря которому соматические клетки растения способны полностью реализовать наследственную информацию, то есть обеспечить развитие всего растения. Из таких изолированных от материнского организма клеток могут сформироваться целые организмы растений (по сути, *клоны*).

В отличие от клеток животных, *растительная клетка* предъявляет менее жесткие требования к условиям культивирования.

Источником клеток может быть любая ткань организма. В большинстве тканей клетки находятся внутри так называемого внеклеточного матрикса. *Внеклеточный матрикс (ВКМ)* – многокомпонентная субстанция, в которую погружены все клетки нашего организма.

Для выделения клеток необходимо разрушить внеклеточный матрикс и разорвать связи между клетками, после чего клетки «рассыпаются».

Фрагмент ткани, полученный прижизненно (*биопсией*) или после смерти, измельчают механически и обрабатывают *протеолитическими ферментами*, расщепляющими внеклеточный матрикс (трипсином, коллагеназой, гиалуронидазой, папаином или их комбинациями). В дополнение к ферментам используют кальций-связывающие соединения (хелаторы), которые забирают кальций у молекул клеточной адгезии и ослабляют их связь между собой и с внеклеточным матриксом. Добавление ДНКазы позволяет предотвратить склеивание клеток в тягучие сгустки за счет электростатических взаимодействий с высвободившейся из поврежденных клеток ДНК. После этого клетки отделяют от обломков матрикса (дебриса) центрифугированием или фильтрацией и высаживают в культуральные флаконы или чашки Петри.

Выделение и манипуляции с клетками обычно проводят в специальном стерильном боксе – ламинарном шкафу.

После выделения клетки в течение нескольких часов (до суток) восстанавливаются от стресса («ремонтируют» мембрану, восстанавливают отрезан-

ные ферментами рецепторы) и затем начинают приспосабливаться к новым условиям (прикрепляются к доступным поверхностям, переходят на новый режим метаболизма, изменяют форму и экспрессию генов и т.д.).

Следует различать первичные и вторичные культуры клеток.

Первичные культуры клеток – это клетки, приготовленные непосредственно из нормальных или опухолевых тканей организма человека или животного (эмбриональные: костно-мышечная ткань, амнион, легкое и т. д.; взрослые: кожа, почечная паренхима и т. д.). При этом чаще всего получают культуры эпителиальных клеток или фибробластов. Срок жизни таких культур ограничен. Число делений таких клеток критически зависит от условий культивирования, но редко составляет более 5-10 раз. Исключением являются стволовые и некоторые специализированные клетки, например, активированные Т- и В-лимфоциты.

Культура считается первичной, пока она не подверглась хотя бы однократному пассированию (микробиологическая операция – разделение клеток при посеве их на субстрат для дальнейшей культивации). В процессе пассирования первичные культуры превращаются в *клеточные линии*.

Вторичные культуры клеток – это клетки, способные к размножению вне организма неопределенно длительное время *in vitro*. В лабораториях их поддерживают путем пересевов из одного сосуда в другой (при условии замены питательной среды).

В лабораторной практике наиболее распространены *раковые клетки*. Они не имеют предела числа делений, будучи фактически бессмертными, что позволяет наращивать их в неограниченном количестве.

Раковые клетки даже в организме сильно отличаются от нормальных, а в культуре это отличие только увеличивается. Так, многие раковые линии имеют увеличенный набор хромосом (анеуплоидия), что делает их более устойчивыми к повреждению ДНК. Кроме этого, многие типы раков вызваны вирусными инфекциями, передающимися и клеточным культурам, что не позволяет использовать эти клетки в производстве вакцин.

Некоторым компромиссом между раковыми и нормальными являются *иммortalизованные клетки*: полученные из нормальной ткани, они приобрели способность к неограниченному числу делений. Такой переход к бессмертию может происходить либо спонтанно, либо в результате искусственного введения определенных генов или слияния с раковыми клетками, как в случае *гибридом*.

Культивирование изолированных клеток и тканей происходит в многокомпонентных *питательных средах*. Они могут существенно различаться по своему составу, однако в состав всех сред обязательно входит и компонентная *основа*, к которой добавляют необходимые растениям группы веществ: макро- и микроэлементы, углеводы, витамины и фитогормоны. Такой компонентной основой служит агар-агар – полисахарид морских водорослей, способный образовывать в воде гели, затвердевающие при +45°C. В питательную среду могут быть добавлены *эндоспермы* незрелых зародышей (кокосового ореха, конского каштана), *патока* некоторых деревьев, различные *экстракты* (солодовый, дрожжевой), томатный сок.

Введение их в среду дает положительный результат. Однако каждый действующий компонент имеет свойственные только ему технологические характеристики.

Типы клеточных культур. В зависимости от способа и условий культивирования существуют несколько типов культур клеток и тканей:

- каллусная культура;
- культура протопластов.

Если *культивирование* происходит *поверхностно* на *агаризованной питательной среде*, то образуется каллусная ткань. Она не имеет четкой структуры, но может различаться по плотности. Происхождение и условия выращивания определяют, будет ли каллусная ткань рыхлой, средней плотности или плотной.

Общие характеристики каллусных клеток. Каллусная клетка обладает рядом свойств, общих со всеми растительными клетками: онтогенез клеток, устойчивость к тем или иным неблагоприятным факторам внешней среды и другие свойства. Вместе с тем у каллусных клеток во время их культивирования появляются свои индивидуальные особенности, такие как физиологическая асинхронность, генетическая гетерогенность и некоторые другие.

Физиологическая асинхронность заключается в том, что в каждый момент времени клетки находятся в разных фазах роста: одни делятся, другие растут, а третьи уже стареют, поэтому общее физиологическое старение всей популяции каллусных клеток принято оценивать по состоянию большинства клеток.

Генетическая гетерогенность заключается в наличии различий в геномах группы организмов.

Онтогенез каллусной клетки аналогичен развитию любой растительной клетки и включает в себя деление (*эмбриональная фаза*), рост растяжением (*фаза растяжения*), дифференцировку (*фаза дифференциации*), старение и гибель клетки.

Изолированные протопласты являются одним из наиболее ценных объектов в биотехнологии. Главное преимущество этого объекта состоит в том, что в изолированные протопласты достаточно легко вводить генетическую информацию из органелл и клеток других растений, клеток животных.

Получение и культивирование изолированных протопластов. Впервые протопласты были выделены Дж. Клернером в 1892 году при изучении плазмолиза в клетках водного телореза (*Stratiotes aloides*) при механическом повреждении ткани. Данный метод получил название механического, поскольку лист разрезают, а протопласты выходят из поврежденных клеток.

Современный метод выделения протопластов заключается в удалении клеточной стенки с помощью поэтапного использования ферментов разрушающих клеточную оболочку – целлюлазы, гемицеллюлазы, пектиназы. Изолированные протопласты можно культивировать, обычно для этого используются те же среды, на которых растут изолированные *клетки* и *ткани*. Сразу же после удаления ферментов у протопластов в культуре начинается образование клеточной стенки. Протопласт, регенерировавший клеточную стенку, ведет себя как изолированная клетка, способен делиться и образовывать клон клеток.

Возможности культуры изолированных клеток и тканей растений:

- 1) получение вторичных метаболитов, продуцируемых отдельными клетками и тканями некоторых полезных растений (алкалоидов, глюкозидов, стероидов и т.д.), используемых для производства лекарств;
- 2) ускоренное микроразмножение ценных и уникальных генотипов и поддержание жизнеспособности ослабленных клеток и тканей;
- 3) оздоровление посадочного материала от вирусной инфекции;
- 4) клеточная и тканевая селекция форм с полезными хозяйственными свойствами;
- 5) генетическое улучшение сельскохозяйственных растений;
- 6) сохранение генофонда в условиях криоконсервации.

2.3. Гибридизация соматических клеток, перспективы использования

Гибридизация соматических клеток – это направление клеточной инженерии, которое занимается слиянием соматических клеток, лишенных оболочек, и получением гибридных клеток с хромосомными наборами неродственных видов.

Нормальные клетки в естественных условиях крайне редко сливаются друг с другом. Слияние опухолевых клеток – довольно обычное явление, при этом опухолевые клетки *in vivo* иногда сливаются и с нормальными.

Предположение о том, что соматические клетки могут сливаться друг с другом, было высказано еще в начале 19 века в связи с открытием многоядерных клеток. В 1960 г. французский биолог Барский, выращивая вне организма в культуре ткани клетки двух линий мышей, обнаружил, что некоторые клетки по своим морфологическим и биохимическим признакам были промежуточными между исходными родительскими клетками. Эти клетки оказались гибридными. Такое спонтанное слияние клеток в культуре ткани происходит довольно редко.

В дальнейшем оказалось, что частота гибридизации соматических клеток повышается при введении в культуру клеток РНК-содержащего вируса парагриппа Сендай, который, как вообще все вирусы, изменяет свойства клеточных мембран и делает возможным слияние клеток.

Парагриппозный вирус Сендай инактивируют ультрафиолетовыми лучами или алкилирующим мутагеном, затем вносят в смешанную культуру двух типов клеток. Некоторые клетки при этом сливаются в одну с образованием двух ядер. После митотического деления из двуядерной клетки образуются две одноядерные гибридные соматические клетки, содержащие по одному набору хромосом каждого типа родителей. С помощью инаktivированного вируса Сендай удалось повысить выход гибридных клеток в несколько тысяч раз. Кроме вируса Сендай используют полиэтиленгликоль и электрическое поле.

Используя вирус Сендай, удалось получить гибриды между клетками животных, далеких по систематическому положению, например мыши и курицы, мула и мыши, коровы и норки, клетки человека могут сливаться с клетками курицы, мыши, крысы, китайского хомячка, мула, комара; растений – моркови и табака, ячменя и риса, картофеля и томата – помато, сои и табака, сои и лука.

При изучении межвидовых гибридных клеток были сделаны два очень важных наблюдения:

- в гибридах могут проявиться оба генома;
- в долгоживущих межвидовых гибридах элиминируются хромосомы одного вида.

С помощью межвидовых гибридов стало возможно *картирование хромосом у человека*.

Размножаясь делением, как обычные клетки, соматические гибриды в силу их митотической нестабильности в каждом делении теряют хромосомы одной из родительской клетки. Например, гибриды клеток человека и мыши через сто делений полностью утрачивают хромосомы человека (это примерно 3 месяца). Если с утратой гибридной клеткой какой-нибудь хромосомы человека перестает вырабатываться определенный фермент, то это указывает на то, что ген, контролирующий работу этого фермента, сцеплен с ушедшей хромосомой. Таким образом, была определена локализация многих генов в хромосомах.

Помимо картирования генов человека проводится картирование генов многих сельскохозяйственных и лабораторных животных, исследуется эволюция геномов.

Метод гибридизации соматических клеток открывает перед биотехнологией следующие перспективы:

1. Возможность скрещивания филогенетически отдаленных форм живого. Путем слияния клеток растений получены плодовые, фенотипические нормальные межвидовые гибриды табака, картофеля, капусты с турнепсом.

2. Получение асимметричных гибридов, несущих полный набор генов одного из родителей и частичный набор другого родителя. Асимметричные гибриды бывают устойчивее, плодovitее и жизнеспособнее, чем симметричные, несущие полные наборы генов родительских клеток.

3. Получение гибридов путем слияния трех и более родительских клеток.

4. Гибридизация клеток, несущих различные программы развития, – слияние клеток различных тканей или органов, слияние нормальных клеток с клетками, программа развития которых изменена в результате злокачественного перерождения. В этом случае получают так называемые гибридомы, наследующие от нормальной родительской клетки способность к синтезу того или иного полезного соединения, а от злокачественной – способность к быстрому неограниченному росту.

2.4. Гибридная технология получения моноклональных антител

Гибридомы образуются в результате слияния лимфоцитов, взятых от иммунизированных животных, с клетками миеломы костного мозга, культивируемыми *in vitro*.

Подобно раковым клеткам, они способны неограниченно долго делиться на искусственных питательных средах (т. е. они «бессмертны») и, подобно лимфоцитам, могут вырабатывать *моноклональные (однородные) антитела (МКА)* определенной специфичности.

Впервые была описана в 1975 году английскими учеными Георгом Клером и Цезарем Мильштейном. За разработку метода им была присуждена в 1984 году Нобелевская премия.

Методы получения гибридом:

1. Этапы получения гибридом на основе иммунизированных лимфоцитов и миеломных клеток:

а) получение миеломных клеток, погибающих при последующей селекции гибридомных клеток;

б) получение лимфоцитов, которые продуцируют антитела к заданным антигенам. Для этого лабораторные животные (млекопитающие, например, мыши, крысы) подвергаются иммунизации, обычно, путем нескольких инъекций антигена в течение 1-2 месяцев. Затем из селезенки получают клетки, из которых выделяют лимфоциты;

в) проводят слияние миеломных клеток с лимфоцитами. Слияние клеток производится с помощью нарушающего мембраны агента, такого, как полиэтиленгликоль, вирус Сендай или электрический импульс;

г) скрининг (селективный отбор) гибридных клеток;

д) проверка способности гибридомных клеток продуцировать моноклональные антитела к заданному антигену;

е) клонирование гибридомных клеток, которые проверены на образование моноклональных антител;

ж) массовое культивирование гибридомных клеток, выделение, концентрирование и очистка продуцируемых антител.

Размножение клонов гибридомных клеток происходит *in vitro* до необходимых размеров и служит источником получения антител.

2. Другой метод получения антител основан на инъекции полученной гибридомы в брюшную полость мыши или крысы.

Для этого гибридомы могут быть введены внутривбрюшинно мышам реципиентам. В результате в брюшной полости гибридомы реплицируются, вырастает солидная опухоль и накапливается асцитическая жидкость (скопления клеток, плавающих в жидкости, заполняющей брюшную полость), являющаяся источником моноклональных антител.

Асцитическая жидкость, выделенная из этой мыши, представляет суспензию, содержащую антитела. Клетки и белки, не относящиеся к МКА, удаляются. Оставшийся материал представляет собой антитела, которые и используют.

Достоинство метода: позволяет получать высококонцентрированные препараты антител.

Недостатки:

- массовое производство требует одновременного использования нескольких тысяч мышей;

- получаемый материал требует доочистки;

- дорогостоящий и трудоемкий процесс.

Поэтому в настоящее время предпочтение отдается первому способу с использованием культуры клеток.

2.5. Применение моноклональных антител

В наши дни биотехнология оказывает реальную помощь здравоохранению. Наиболее широко используются моноклональные антитела в медицинской диагностике. Если к антителами присоединить радиоактивные или магнитоактивные материалы и ввести их в живой организм, то можно выявить в нем патологические зоны. Такие моноклональные антитела присоединяются к пораженным болезнью клеткам организма, а соответствующие индикаторные материалы позволяют выяснить их местонахождение.

Моноклональные антитела (МАТ) сегодня применяются при лечении заболеваний, большинство из которых еще несколько десятков лет назад считались неизлечимыми. Это онкологические, аутоиммунные, сердечно-сосудистые и инфекционные заболевания, воспалительные реакции различного генеза, системный склероз, идиопатический фиброз легких, гепатит В, СПИД, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, аллергические реакции, мышечная дистрофия, болезнь Альцгеймера, астма, диабет и другие заболевания.

Препараты, изготовленные на основе моноклональных антител, относятся к новейшим в современной медицине. С середины 90-х годов до сегодняшнего дня на мировом фармацевтическом рынке одобрено более 30 лекарственных средств, имеющих в составе моноклональные антитела. Первоначально надежность методов и технологий производства моноклональных антител и безопасность их применения вызывали опасения у фармацевтических производителей. Однако сегодня научный и медицинский опыт показал возможность их эффективного и безопасного применения в медицине. Сейчас большинство фармацевтических компаний работают над разработкой новых препаратов и лекарственных средств на основе моноклональных антител. На этапе разработки в мире находится около 300 МАТ.

Примеры препаратов на основе моноклональных антител:

«Зенапакс» (даклизумаб) – для профилактики отторжения после трансплантации почки, «Герцептин» (трастузумаб) – для лечения рака молочной железы и рака желудка, «Ксолар» (омализумаб) – для лечения атопической бронхиальной астмы и сезонного аллергического ринита, «Раптива» (эфализумаб) – для лечения псориаза, а также многие другие.

В 2000-х годах усовершенствованные методы генной инженерии наконец позволили добиться долгожданного результата и получить человеческие МАТ. В настоящее время человеческие МАТ чаще всего получают с помощью технологии трансгенных мышей (мышей, выведенных с использованием фрагментов чужеродной ДНК) или фагового дисплея (особый метод генной инженерии с использованием вирусов-бактериофагов).

Например, сегодня для клинического применения одобрены такие препараты, созданные на основе человеческих МАТ, как «Бенлиста» (белимумаб) – для лечения красной волчанки, «Ервой» (ипилимумаб) – для лечения меланомы, «Симпони» (голимумаб) – для лечения ревматоидного артрита, псориазического артрита, болезни Бехтерева, а также другие препараты.

МКА используются и в процессах очистки веществ. Современные технологии основаны на присоединении антител к твердой матрице носителя. К ним

добавляют смесь молекул, содержащую искомым антиген. Затем комплексы антиген-антитело отмываются от примесей, не связанных с матрицей. После разрушения ковалентных связей антиген-антитело в растворе остаются свободные антигены.

Моноклональные антитела и «мишенная» лекарственная терапия. Предполагается, что большое разнообразие раковых заболеваний обусловлено активацией эндогенных генов, вызванной химическими агентами, внутренними хромосомными перестройками. Эти гены кодируют определенные белки, и поэтому раковые клетки могут содержать уникальные белки на поверхности клетки. Возможно, именно эти белки участвуют в супрессии роста здоровых клеток. Инактивируя эти белки, можно тормозить рост раковых клеток.

Благодаря высокой специфичности МКА широко используются в качестве зондов для точного определения природы молекул поверхности клеток и клеточных органелл. С их помощью также можно проводить детекцию активности ферментов.

Методы иммуноферментного анализа применяют в диагностике вирусных заболеваний растений. Это позволяет сократить время получения безвирусного посадочного материала, отбирать новые вирусоустойчивые сорта. При генноинженерных экспериментах можно быстро отбирать клоны – продуценты. Можно использовать МКА для определения пола у крупного рогатого скота на предимплантационной стадии развития, для построения антигенных карт вирусов, возбудителей болезней.

Моноклональные антитела – это новое и высокоперспективное направление в современной онкологии. Разработка современных, более совершенных технологий помогает решать имеющиеся проблемы и делает лечение пациентов эффективнее и безопаснее.

2.6. Понятие о стволовых клетках. Основные особенности, свойства и классификация стволовых клеток

Впервые термин «*стволовая клетка*» стал использоваться в научной литературе в конце 19 века, однако тогда его значение не было эквивалентным общепринятому сегодня. Термин «стволовая клетка» появился в 1868 г. в работах немецкого биолога Эрнста Геккеля, который употреблял его для обозначения древнего одноклеточного предшественника всех многоклеточных организмов (в филогенезе) и для обозначения оплодотворенной яйцеклетки (зиготы), дающей начало всем клеткам организма (в онтогенезе).

Стволовые клетки крови у взрослых птиц и млекопитающих (включая человека) описал выдающийся российский гистолог Александр Александрович Максимов. В своих работах 1902-1909 годов он выдвинул и развил идею о существовании общей стволовой клетки – предшественника форменных элементов крови. В статье 1909 г. он же впервые использовал термин «стволовая клетка».

Стволовой клеткой называются клетки, способные самообновляться, образуя новые стволовые клетки, делиться посредством митоза и дифференцироваться в специализированные клетки, то есть превращаться в клетки различных органов и тканей. Стволовые клетки могут становиться клетками крови, сер-

дечной ткани, кожи, мускулов, мозга и т.д.

Корнем иерархии стволовых клеток (да и всех остальных клеток организма тоже) является *зигота* – самая первая клетка, являющаяся продуктом слияния яйцеклетки и сперматозоида. Зиготу и несколько ее поколений (в течение первых нескольких дней эмбрионального развития) называют *тотипотентной клеткой*, то есть способной дать начало абсолютно любой ткани и органу, да и всему организму.

Источники стволовых клеток: кровь пуповины младенца, костный мозг и периферическая кровь (кровь, содержащаяся в артериях и венах). Этот тип клеток дает рост всем кровяным клеткам и является фундаментом нашей иммунной системы.

Стволовые клетки в небольшом количестве во всех органах и тканях сохраняются и функционируют и во взрослом организме, благодаря им может осуществляться обновление и восстановление тканей и органов. Именно последнее качество обусловило в настоящее время высокий интерес к стволовым клеткам, всплеск создания банков стволовых клеток и коммерческих центров по их медицинскому обслуживанию. Тем не менее, в процессе старения организма их количество уменьшается. С возрастом популяция стволовых клеток сокращается: если в эмбриональном развитии одна эмбриональная стволовая клетка приходится на 10000 дифференцированных клеток, то у человека 60-80 лет – уже одна стволовая клетка на 5-8 миллионов.

Для стволовых клеток характерны следующие основные свойства:

1. Стволовые клетки неспециализированны и недифференцированы (не имеют специфичных структур, позволяющих выполнять специализированные функции).

2. Пул (общий фонд) стволовых клеток способен к самообновлению (самосохранению, самовоспроизводству) и пролиферации на протяжении неопределенно длительного периода и продукции большого, потенциально не ограниченного числа клеток.

3. Стволовые клетки обладают способностью к дифференцировке в клетки специализированных типов.

4. Стволовые клетки способны к асимметричному делению, в результате которого образуются две дочерние клетки, одна из которых способна к дифференцировке в специализированные клетки, а вторая сохраняет все признаки стволовых клеток, что предохраняет общий фонд стволовых клеток от полного истощения.

Главное отличие стволовых клеток от дифференцирующихся клеток-предшественников заключается в том, что *клетки-предшественники* не способны к самообновлению, хотя могут пролиферировать и дифференцироваться в клетки разных, но узкоспециализированных типов.

Классификация стволовых клеток может быть основана на их локализации и на способности к дифференцировке.

1. По источнику происхождения и получения стволовые клетки подразделяют на *эмбриональные* (СК внутренней клеточной массы предимплантационного эмбриона – бластоцисты) и *тканеспецифические* (региональные, «взрос-

лые»), т.е. СК различных тканей взрослого организма.

2. По способности к дифференцировке СК делят на:

– *тотипотентные* (способные полностью воссоздавать ткани и органы всего организма. Например – оплодотворенная яйцеклетка (зигота), а также бластомеры (включая ранние этапы формирования морулы). Тотипотентность зиготы обеспечивает развитие как самого эмбриона, так и внезародышевых органов и тканей – плаценты, амниотического мешка, пуповины);

– *плюрипотентные* (формируют ткани всех трех зародышевых листков – эктодермы, энтодермы и мезодермы. Например, ЭСК из внутренней клеточной массы бластоцисты);

– *мультипотентные* (способные дифференцироваться в специализированные клетки нескольких типов в пределах одного зародышевого листка. Например, гемопоэтические СК);

– *унипотентные* (дифференцирующиеся только в специализированные клетки одного определенного типа. Например, сперматогониальные СК).

Стволовые клетки разделяют также на *генеративные* (клетки зародышевого пути, способные превращаться в гаметы) и *соматические*, дающие остальные клетки тела. Генеративные СК есть у всех групп животных. Соматические СК некоторые животные во взрослом состоянии утрачивают.

2.7. Виды стволовых клеток

Стволовые клетки, в зависимости от способа их получения, бывают: 1. Эмбриональными, 2. Фетальными и 3. Постнатальными.

1. *Эмбриональные стволовые клетки* составляют основу эмбриобласта, который имеется у зародыша на стадии эмбриона. Эти клетки относятся к плюрипотентным. У них имеется важная особенность, в соответствии с которой у эмбриональных клеток имеется преимущество перед другими типами стволовых клеток. Так, эмбриональные стволовые клетки не имеют *HLA* – антигенов тканевой специфичности, определяющих принадлежность к конкретным индивидам. Именно соответствие этих антигенов у донора и реципиента является определяющим в определении показаний к пересадке клеточного материала. Чем больше соответствие *HLA*, тем ниже вероятность развития реакции трансплантата.

В ряде опытов по пересадке эмбриональных стволовых клеток мышам с тяжелым иммунодефицитом нередко развиваются опухоли – тератомы, имеющие высокий риск озлокачествления.

2. *Фетальные стволовые клетки*. Источник фетальных стволовых клеток – плодный материал, полученный после аборта (на сроке 9-12 недель). Исследования, проводимые с этими клетками, становятся причиной большого количества проблем, связанных с моральными принципами. Изучается применение фетальных стволовых клеток при лечении ишемических поражений головного мозга.

Также эти клетки могут быть использованы в качестве источника печеночной ткани и гемопоэтических клеток.

3. *Постнатальные стволовые клетки* имеют меньшую потентность в

сравнении с эмбриональными и фетальными стволовыми клетками. Их применение вызывает гораздо меньше этических проблем.

Взрослые стволовые клетки, согласно функциональной активности, принято делить на три группы: *гемопоэтических*; *мультипотентных мезенхимальных* и *тканеспецифических прогениторных*.

Гемопоэтические стволовые клетки костного мозга и эритроциты.

Клетки, преобладающие в крови (лимфоциты, лейкоциты, макрофаги и эритроциты) и стволовые клетки костного мозга тесно связаны в функциональном отношении. Они лежат в основе образования пяти зрелых ростков, или субпопуляций: эритроцитарной; гранулоцитарной; лимфоцитарной; моноцитарной; макрофагальной.

У новорожденных, взрослых и пожилых гемопоэтические стволовые клетки (предшественники эритроцитов, гранулоцитов, лимфоцитов, мегакариоцитов и других клеток крови) сосредоточены в красном костном мозге, который расположен внутри тазовых костей, ребер, эпифизов длинных трубчатых костей и тел позвонков. Однако у плода источником гемопоэтических клеток становится мезодерма желточного мешка, после чего кроветворная функция переходит к печени и селезенке. Лишь через два месяца начинается окостенение с образованием костного мозга (с первоначальной локализацией в ключице). Также, после формирования клеток иммунной системы, происходит их миграция в специализированные органы.

За воспроизводство эритроцитов отвечают стволовые клетки миелоидного ряда, которые принято считать *мультипотентными*. Регулирование их деятельности, как и других стволовых клеток костного мозга, осуществляется благодаря синтезу цитокинов. Как правило, по мере дифференцировки, значительно теряется потентность клеток.

Если по тем или иным причинам поражается костный мозг, содержащий стволовые клетки, эритроциты и другие клетки крови некоторое время остаются на нормальном уровне за счет депо (как правило, не все клетки крови одновременно циркулируют в кровотоке). Однако, после истощения пула зрелых клеток, происходит резкое снижение необходимых для жизнедеятельности организма эритроцитов, тромбоцитов и клеток иммунной системы. Это проявляется системной гипоксией, рецидивирующими кровотечениями и выраженным иммунодефицитом, который нередко становится причиной летального исхода.

Мультипотентные стволовые клетки. Мезенхимальные стволовые клетки являются источником стромы большинства тканей тела человека. Эти клетки для последующего использования могут быть выделены из: плаценты; жировой ткани; легких; костного мозга; крови пуповины; периваскулярной ниши пульпы зуба; периодонтальной связки.

В большом количестве исследований было выявлено иммуносупрессивное действие мезенхимальных стволовых клеток на фоне выработки цитокинов. Также изучалась вероятность применения этих клеток для регенерации мышечной ткани после ее травматического повреждения. Однако, в связи с высокой вероятностью отторжения трансплантата, а также медленной скоростью их роста, их применение существенно ограничено.

Тканеспецифические прогениторные клетки. Обладают низкой потенциальностью и способны к воспроизведению только тех тканей, в которых они локализуются. Главная их роль в организме – замена старых клеток.

В соответствии с тканями, в которых у детей, взрослых и пожилых обнаруживаются тканеспецифические стволовые клетки организма:

Гемопоэтические стволовые клетки можно найти в красном костном мозге и крови пуповины плода. Они являются основой для синтеза всех клеток крови.

Стволовые клетки молочных желез являются основой для увеличения груди при половом созревании и во время беременности. Также эти клетки играют решающую роль в процессе канцерогенеза рака молочной железы.

Желудочно-кишечного тракта. Стволовые клетки тканей пищеварительной системы непрерывно делятся на протяжении всей жизни человека и обеспечивают обновление эпителия, выстилающего желудочно-кишечный тракт. Как правило, считается, что именно эти клетки являются источником большинства видов рака тонкого и толстого кишечника.

Мезенхимальные клетки обладают способностью: к дифференцировке в различные клетки; осуществлять трофическую поддержку; модулировать иммунный ответ.

Эндотелиальные стволовые клетки относятся к одним из трех типов мультипотентных клеток костного мозга. Эти стволовые клетки способны обеспечивать выстилку сосудов.

Нервные стволовые клетки локализуются в тканях центральной и периферической нервных систем. Эти клетки имеют много общего с гемопоэтическими стволовыми клетками. Кроме того, при экспериментальном введении нервных стволовых клеток в кровь они нередко дифференцируются в различные типы клеток иммунной системы.

Обонятельные стволовые клетки локализуются в слизистой носа (в верхних отделах) и принимают участие в рецепции запахов. Важность их отдельного выделения связана с тем, что при помещении обонятельных стволовых клеток в определенные условия их качества приближаются к эмбриональным стволовым клеткам.

Тестикулярные стволовые клетки человека могут быть выделены у мужчин. Они нужны для воспроизведения сперматозоидов. В настоящее время учеными из Германии, США и Великобритании доказано, что потенциал к дифференцировке этих клеток при соблюдении определенных условий может соотноситься с эмбриональными стволовыми клетками.

Вопросы для проверки знаний:

1. История развития и области применения клеточной инженерии.
2. Понятие о культуре клеток.
3. Сущность гибридизации соматических клеток.
4. Использование соматической гибридизации для картирования хромосом.
5. Технология получения гибридом.
6. Использование моноклональных антител.
7. Стволовые клетки и их использование.

ТЕМА 3. ПОЛУЧЕНИЕ КЛОНИРОВАННЫХ И ХИМЕРНЫХ ЖИВОТНЫХ

3.1. Основные понятия эмбриогенетической инженерии: «перенос чужеродных генов», «трансген», «трансгенный продукт», «трансгенез», «трансгенное животное»

3.2. Понятия о клонировании животных. Методы получения клонированных сельскохозяйственных животных

3.3. Перспективы использования клонированных животных

3.4. Понятие о химерных животных. Методы получения химер

3.1. Основные понятия эмбриогенетической инженерии: «перенос чужеродных генов», «трансген», «трансгенный продукт», «трансгенез», «трансгенное животное»

Для выведения улучшенных пород домашних животных и птиц (коров с более высокой молочной продуктивностью, овец с качественной шерстью, кур с более высокой яйценоскостью и т. д.) проводят множество этапов скрещиваний и отбора, каждый раз используя в качестве производителей животных с наилучшими характеристиками. В результате со временем можно получать более или менее чистые линии высокопродуктивных пород животных.

Стратегия скрещивания и отбора, требующая больших временных и материальных затрат, оказалась успешной, и сегодня почти все аспекты биологических основ выведения новых пород сельскохозяйственных животных могут быть к ней сведены.

Однако после того как эффективная генетическая линия получена, вводить новые признаки методом скрещивания и отбора становится все труднее. Так, линия с новым «ценным» геном может нести также и «вредные» гены, вследствие чего потомки могут оказаться менее продуктивными. Идея генетического изменения животных путем введения генов в оплодотворенные яйцеклетки была реализована на практике в 1980-х годах прошлого столетия. Как и во многих других новых областях науки, для упрощения обмена информацией между учеными был введен ряд новых терминов.

Перенос генов – это пересадка *in vitro* рекомбинантной конструкции гена (рекомбинантной ДНК) в клетки другого животного вне зависимости от его видовой принадлежности.

Если рекомбинантная конструкция гена встроилась в геном другого животного, то такой ген обозначается как *трансген*.

Кодируемый трансгеном белок носит название *трансгенного продукта*.

Животное, которое содержит в своем геноме трансген, называется *трансгенным*.

Под *трансгенезом* понимают процесс переноса и интеграции чужеродной генетической информации в геном животных.

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

Трансгенез стал мощным инструментом для исследования молекулярных основ *экспрессии генов* млекопитающих и их развития, для создания модельных систем, позволяющих изучать болезни человека, а также для генетической модификации клеток молочных желез животных с целью получения с молоком важных для медицины белков.

Был даже предложен новый термин «*фарминг*» («*pharm*»), относящийся к процессу получения из молока трансгенных домашних животных аутентичных белков человека или фармацевтических препаратов. Использование молока целесообразно потому, что оно образуется в организме животного в большом количестве и его можно надаивать по мере надобности без вреда для животного.

Вырабатываемый молочной железой и секретируемый в молоко новый белок не должен при этом оказывать никаких побочных эффектов на нормальные физиологические процессы, протекающие в организме трансгенного животного, которые близки к таковым в клетках человека. Кроме того, его выделение из молока, которое содержит и другие белки, не должно составлять большого труда.

3.2. Понятия о клонировании животных. Методы получения клонированных сельскохозяйственных животных

Исследования по клонированию были начаты не так давно. Лишь несколько десятилетий назад ученые научились выращивать из одной взрослой растительной клетки целое растение. Первые клонированные амфибии появились в 70-х годах XX столетия. В практической ветеринарии уже несколько десятилетий проводится микрохирургическое разделение ранних эмбрионов с последующей подсадкой их самкам-реципиентам. Осуществляется также введение ядра соматической (неполовой) клетки в оплодотворенную яйцеклетку, в которой заранее удалено собственное ядро для обеспечения последующего эмбрионального развития. Таким образом, получение клонов животных имеет достаточно длительную историю и разработанные технологии.

Под *клоном* понимают многочисленное потомство одной исходной особи, имеющее идентичный генотип. Способ клонирования, или генетического копирования особи, позволяет создавать животных, которые в точности наследуют генотип исходного родителя.

Клонированием называют метод создания клонов (организмов или клеток, генетически идентичных одной родоначальной клетке) путем переноса генетического материала из одной (донорской) клетки в энуклеированную яйцеклетку, из которой удален ядерный материал.

Первые успешные опыты по клонированию животных были проведены в 1960-е годы английским эмбриологом Дж. Гордоном (*J. Gordon*) в экспериментах на шпорцевой лягушке. В этих первых опытах для пересадки использовались ядра клеток кишечника головастика. Они были подвергнуты критике, так как в кишечнике головастика могли сохраниться первичные половые клетки. В 1970 году удалось провести опыты, в которых замена ядра яйцеклетки на генетически помеченное ядро из соматической клетки взрослой лягушки привела

к появлению головастика и взрослых лягушек. Это показало, что техника трансплантации ядер из соматических клеток взрослых организмов в энуклеированные (лишенные ядра) ооциты позволяет получать генетические копии организма, послужившего донором ядер дифференцированных клеток. Результат эксперимента стал основанием для вывода об обратимости эмбриональной дифференцировки генома, по крайней мере, у земноводных.

В настоящее время предложено два способа клонирования живых существ: *близнецовое деление* и *пересадка клеточного ядра*.

Первый способ состоит в разделении бластомер, т.е. клеток первичного эмбриона, на ранней стадии его развития (2, 4 или более клеток), поскольку эти клетки являются *тотипотентными*, т.е. способными произвести все типы клеток организма. Этот тип клонирования похож на естественное образование однояйцевых близнецов и широко используется в современном животноводстве.

Другим методом клонирования является пересадка клеточного ядра. Пересадка-подсадка ядра яйцеклетки стоит намного ближе к настоящему клонированию, поскольку не ограничивается строго определенными делениями эмбриона и может быть распространена на многие индивидуумы.

Решающие достижения в этом направлении были сделаны при помощи метода, впервые использованного *Willadsen* в 1986 году. Совершенно нормальных телят и овец получали путем пересадки единичных бластомер, полученных из 8- и 16-клеточных эмбрионов, в неоплодотворенные яйцеклетки, из которых прежде было удалено клеточное ядро. Бластоциты, полученные таким образом, хорошо сформированные и организованные, затем имплантировали в матку самок-кормилиц для последующего развития плодов.

Недавнее создание овцы Долли – лишь обновленный вариант разрабатывавшейся ранее методики. Значимость же открытия *I. Wilmut и K. Campbell* состоит не в технологии получения овцы-близнеца, а в доказательстве еще одной способности клетки, а именно возможности зрелой взрослой клетки развиваться до эмбриональной стадии и продуцировать новое живое существо с тем же генетическим набором, что и у исходной клетки. Разработанный ими процесс клонирования можно разделить на пять этапов.

Первый этап: манипуляции с донорской клеткой. Взрослые соматические клетки, взятые из эпителия вымени овцы Финн-Дорсет, помещали в культуральную среду с низким содержанием питательных веществ. Заторможенные таким образом клетки перестают делиться, их гены утрачивают активность.

Второй этап: манипуляции с яйцеклеткой. В то же время у другой овцы – Блэкфейс – забирали неоплодотворенную яйцеклетку, из которой удаляли ее ядро (и соответственно ДНК), оставляя нетронутой цитоплазму яйцеклетки со всеми действующими механизмами, необходимыми для обычного развития эмбриона.

Третий этап: слияние донорской клетки и безъядерной яйцеклетки. Обе клетки от овец Финн-Дорсет и Блэкфейс помещали рядом друг с другом в сосудах с культуральной средой и с помощью электрического разряда вызывали их слияние. В результате ядром клеточного гибрида стало ядро донорской взрос-

лой клетки, а цитоплазма обоих типов клеток слилась воедино. Действие второго электрического разряда заставляет «работать» механизм естественного оплодотворения, использовать весь потенциал яйцеклетки.

Четвертый этап: спустя 6 дней сформировавшийся эмбрион, прошедший через ряд клеточных делений, перенесли в матку овцы Блэкфейс.

Пятый этап: в результате завершения беременности овцы Блэкфейс у нее родилась овечка Долли – генетическая копия исходной овцы Финн-Дорсет.

В эксперименте с овечкой Долли в 277 опытах удалось получить только 29 эмбрионов, выживших более 6 дней, а до дня рождения удалось дойти только Долли. У многих клонированных животных обнаружены пороки развития, в том числе и у Долли. 14 февраля 2003 года погибло это самое известное в мире клонированное животное – овца Долли. У животного развилась опухоль легких и артрит, вследствие чего оно пало. За период своей жизни она стала матерью 6 ягнят, которые появились на свет методом естественного спаривания с самцом.

В настоящее время тучило погибшей овцы Долли выставлено в национальном музее Шотландии. Ученые до сих пор изучают клонированное животное. Исследования дали основание утверждать, что у Долли указанные болезни развились из-за того, что клон получен в геноме взрослого организма и на момент развития опухоли легких и артрита овце было не 5 лет, а 11.

Научная новизна данного эксперимента заключается в том, что впервые ученым Шотландии удалось заставить соматическую клетку животного превратиться в зародышевую.

Описанный эксперимент по клонированию Долли может быть применен в принципе к любому другому виду млекопитающих, включая человека. В настоящее время этим методом получено достаточно большое количество клонов различных видов животных: мыши, овцы, козы, свиньи, быка, лошади, кошки и др.

3.3. Перспективы использования клонированных животных

Клонирование крупного рогатого скота на основе трансплантации диплоидных соматических клеток в энуклеированную зиготу остается наиболее перспективным направлением биотехнологии. Оно открывает возможность клонирования животных с ценными генотипами и создания на этой основе высокопродуктивных линий и популяций животных ускоренными темпами.

Немаловажное значение имеет и то обстоятельство, что отпадает необходимость проверки эмбрионов по полу, так как трансплантация диплоидного ядра из соматической клетки в зиготу автоматически связана с регуляцией пола.

Начата работа по получению крупных трансгенных животных, в частности коров, продуцирующих с молоком человеческий альбумин.

Разрабатывается программа получения трансгенных животных, продуцирующих с молоком моноклональные антитела. С использованием технологии получения моноклональных антител можно тонко регулировать множество важных биологических процессов организма, определять присутствие широкого спектра возбудителей с высокой точностью, избирательно воздействовать на

определенные группы клеток организма, в частности раковые. Такие системы позволяют революционизировать клиническое лечение раковых заболеваний.

Ведутся работы по получению трансгенных животных – доноров органов и тканей по пересадке человеку. Путем пересадки соответствующих генных конструкций в зародыши животного уже получены трансгенные особи, у которых подавлены реакции отторжения органов и тканей при трансплантации их человеку. Ученые считают, что на первом этапе эта технология будет применяться для замены инсулинотерапии у больных диабетом пересадкой человеку тканей островков Лангерганса.

С учетом низкой себестоимости препаратов, полученных с использованием новой технологии, эти разработки будут иметь не только огромный экономический эффект, но и большое социальное значение, так как открывают доступность ценных лекарственных средств для широких слоев населения.

Получение гомозиготных диплоидных потомков. Если методом пересадки ядер из соматических клеток в энуклеированную зиготу получают гетерозиготных диплоидных потомков, то на основе удаления мужского или женского пронуклеусов из зиготы и последующей диплоидизации оставшегося пронуклеуса получают диплоидных потомков полностью гомозиготных по всем генам одного из родителей.

Сущность данного метода состоит в том, что из зиготы, находящейся на стадии двух пронуклеусов, микрохирургическим способом удаляют мужской или женский пронуклеусы, в результате чего в ней остается один гаплоидный набор хромосом – мужской или женский.

Так, при удалении из зиготы мужского пронуклеуса развитие зародыша с гаплоидным набором хромосом происходит до стадии поздней морулы или бластоцисты. Однако для развития зиготы, содержащей гаплоидный набор хромосом, требуется ее активация и восстановление диплоидного набора. С этой целью проводят кратковременную инкубацию гаплоидной зиготы в растворе с цитохалазином В. Как только произошло деление ядра, зародыш отмыывают от цитохалазина В, чтобы не происходило увеличение числа наборов хромосом. В 1977 году был использован этот метод для получения эмбрионов, находящихся на стадии развития бластул с диплоидным набором хромосом. Этот метод клонирования позволяет получать только женских особей.

Создание партеногенетических животных. Под партеногенезом понимают развитие эмбриона из женской гаметы без участия мужской половой клетки. Партеногенетические особи в хромосомах содержат только гены матери. Таким образом, партеногенез принимает форму бесполого размножения у животных с половым способом воспроизведения.

Фундаментом современных и будущих исследований в области любого партеногенетического исследования в животном мире является исследовательская работа Б. Астаурова в 1974 году (тутовый шелкопряд). Данный метод дал начало управлению цитогенетическими процессами раннего развития организма. Была выявлена возможность искусственного вызывания развития посредством прогревания яйца, предварительно извлеченного из брюшка бабочки.

Методика партеногенеза в скотоводстве. Ооциты, находящиеся на разных стадиях созревания, стимулировались к партеногенетическому развитию холодовым шоком при температуре 0-4°C в течение 15-30 мин. Затем клетки прогревают в течение 5 мин. при температуре 37°C в обычной среде культивирования. Продолжительность культивирования, при их активировании ФСГ, проводится до стадии метафаза II. С помощью клонирования можно ускоренными темпами создавать популяции идентичных особей с нужными генотипами для эффективного производства молока и мяса в промышленном скотоводстве.

3.4. Понятие о химерных животных. Методы получения химер

Одним из перспективных направлений микроманипуляций на ранних эмбрионах является искусственное получение *химер*, или генетических *мозаиков*.

Понятие *химера* (греч. *Chimaira*) означает составное животное. Сущность биотехнологического метода получения химер заключается в искусственном объединении с помощью микрохирургических манипуляций эмбриональных клеток двух (и более) животных, относящихся к разным породам и даже видам. Таким образом, животные-химеры несут в одном организме признаки обоих эмбрионов, отличающихся между собой разными генотипами.

Принято считать, что успешная пересадка эмбрионов может быть осуществлена только между самками одного вида. Пересадка эмбрионов, например, от овец к козам и наоборот, сопровождается их приживляемостью, но не завершается рождением потомства. Во всех случаях межвидовых беременностей непосредственной причиной аборт является нарушение функции плаценты по причине иммунологической реакции материнского организма на инородные антигены плода. Эта несовместимость может быть преодолена получением химерных эмбрионов с помощью микрохирургии.

Первый подход по получению химер основан на получении химерных животных путем *объединения бластомеров из эмбрионов одного вида*. С этой целью получали сложные химерные эмбрионы овец объединением 2-, 4-, 8-клеточных эмбрионов. Каждый сложный объединенный эмбрион состоял из равного числа бластомеров эмбрионов 2-8 родителей. Пересадку внутренней клеточной массы каждого донора (бластомеры) *путем инъекции* переносили внутрь бластоцисты реципиентов.

При этом общее число клеток колебалось от четырех до восьмикратного увеличения нормального числа клеток. Эмбрионы вводили в перевязанные лигатурой яйцеводы овец до развития до стадии бластоцисты. Нормально развивающиеся бластоцисты пересаживали реципиентам и получали живых ягнят, большинство из которых оказались химерными по данным анализа крови и внешним признакам.

Второй подход по получению химер основан на *слиянии клеточной массы двух или нескольких эмбрионов внутри одной зоны пеллюцида* (верхняя протейновая оболочка яйцеклетки). Этим методом можно получать *агрегационные химеры*. Метод состоит в том, что 8-клеточные эмбрионы инкубируют в среде с

протеолитическим ферментом, переваривающим оболочки яйцеклетки. Освобожденные от оболочек эмбрионы соприкасаются между собой, в результате чего их клетки сливаются и перемешиваются.

Искусственное получение химер началось с середины 70-х годов (М. Ларен, 1976). В животноводстве известны искусственные химеры как внутривидовые, так и межвидовые.

В Германии получены агрегационные химерные животные после соединения половинок 5-6-дневных эмбрионов от коров-доноров швицкой и голштинской пород крупного рогатого скота. Из семи полученных телят у пяти отсутствовали признаки химеризма, а два сочетали в своем фенотипе характерную масть двух исходных пород – бурую и черно-пеструю.

Животные-химеры несут в себе признаки обоих эмбрионов, то есть являются потомками не двух, а четырех родителей. В 1993 году такой четырехродительский химерный теленок был получен в результате слияния эмбрионов двух подвидов крупного рогатого скота *Bos Taurus* и *Bos indicus*. Но при иммунологическом анализе у него был обнаружен эритроцитарный антиген, характерный для подвида *Bos Taurus*.

В университете штата Калифорния получены химеры овцы пород рамбулье и финский ландрас (1985). Однако из 15 полученных ягнят только у 5 методом анализа групп крови подтвердился химеризм.

Свои особенности наблюдаются и при получении межвидовых гибридов. Межвидовые химеры – эмбрионы после пересадки эмбрионов приживляются лишь в 10% случаев. Примером получения межвидовых химер в животноводстве служат овце-козы, сочетающие признаки овцы и козы (1994). Ученые отмечают, что химерные животные не передают потомству характерную для них генетическую мозаичность. Подобно гетерозиготным или гибридным животным у потомков происходит расщепление, в результате чего нарушаются ценные генетические комбинации.

Хотя химерные животные поддерживают ценные хозяйственно полезные признаки лишь на протяжении одного поколения в скотоводстве, они могут представлять большой практический интерес. Он заключается в создании животных, сочетающих важные хозяйственно полезные признаки, как, например, мясную и молочную продуктивность, которые являются антагонистами и труднсовместимы в одном животном.

В ближайшей перспективе упрощение биотехнологии получения химер существенно расширит возможность трансплантации эмбрионов и поднимет ее на новую, более качественную ступень.

Вопросы для проверки знаний:

1. Основные понятия эмбриогенетической инженерии.
2. Клонированные животные.
3. Методы получения клонированных животных.
4. Дать определение «химера», «химерное животное».
5. Методы получения химер.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Литература основная:

1. Биотехнология в животноводстве : учебник / Е. Я. Лебедько, П. С. Катмаков, А. В. Бушов, В. П. Гавриленко. – Санкт-Петербург ; Москва ; Краснодар : Лань, 2020. – 159 с.
2. Галиуллин, А. К. Ветеринарная биотехнология : учебное пособие / А. К. Галиуллин, Р. Я. Гильмутдинов, В. И. Плешакова. – Санкт-Петербург ; Москва ; Краснодар : Лань, 2023. – 239 с.
3. Основы биотехнологии в животноводстве : учебно-методическое пособие по дисциплине «Биотехнология» для студентов по специальности «Ветеринарная медицина» / С. Е. Базылев, С. Л. Карпеня, А. В. Коробко [и др.]; Витебская государственная академия ветеринарной медицины, кафедра генетики и разведения сельскохозяйственных животных им. профессора О. А. Ивановой. – Витебск: ВГАВМ, 2018. – 32 с.
4. Чхенкели, В. А. Биотехнология : учебное пособие для студентов высших аграрных учебных заведений, обучающихся по направлению «Зоотехния» и специальности «Ветеринария» / В. А. Чхенкели. – Санкт-Петербург : Проспект науки, 2014. – 335 с.

Дополнительная литература:

1. Основы генетической инженерии и биотехнологии : учебник для студентов учреждений высшего образования по специальности «Зоотехния» / Ю. А. Горбунов, Г. Ф. Медведев, Н. Г. Минина [и др.] ; редактор Ю. А. Горбунов. – Минск : ИВЦ Минфина, 2016. – 344 с.
2. Редактирование генов и геномов / Институт цитологии и генетики СО РАН, Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. Е. Н. Мешалкина, Новосибирский государственный университет ; редактор : С. М. Закиян [и др.]. – Новосибирск : Издательство СО РАН, 2016. – 419 с.
3. Технология создания трансгенных лабораторных животных по генам противоишемных белков человека : (методические рекомендации) / Национальная академия наук Беларуси, Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству ; разработчик : А. И. Будевич [и др.]. – Жодино : Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству, 2018. – 85 с.
4. Шмид, Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия = Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik : пер. с нем. / Р. Шмид ; переводчик: А. А. Виноградова, А. А. Синюшин ; редактор: Т. П. Мосолова, А. А. Синюшин. – Москва : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 324 с.
5. Якупов, Т. Р. Молекулярная биотехнология : учебник / Т. Р. Якупов, Т. Х. Фаизов. – 3-е изд. стер. – Санкт-Петербург ; Москва ; Краснодар : Лань, 2021. – 158 с.

Учебное издание

**Видасова Татьяна Викторовна,
Яцына Ольга Алексеевна**

ГЕНЕТИКА С ОСНОВАМИ БИОМЕТРИИ. ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск Т. В. Видасова
Технический редактор Е. А. Алисейко
Компьютерный набор О. А. Яцына
Компьютерная верстка Е. В. Ковалевская
Корректор Т. А. Никитенко

Подписано в печать 21.03.2025. Формат 60х90 1/16.
Бумага офсетная. Ризография.
Усл. печ. л. 3,25. Уч.-изд. л. 3,22. Тираж 120 экз. Заказ 2549.

Издатель: учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной медицины».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/ 362 от 13.06.2014.
Ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026, г. Витебск.
Тел.: (0212) 48-17-70.
E-mail: rio@vsavm.by
<http://www.vsavm.by>

ISBN 978-985-591-220-1



9 789855 912201