

Міністерство аграрної політики та продовольства України
Полтавська державна аграрна академія

Кафедра патологічної анатомії та патофізіології

доктор ветеринарних наук, професор Замазій А.А.

Опорний конспект лекцій
з «Біотехнології у ветеринарній медицині»

Полтава – 2012 р.

Термін *"біотехнологія"* вперше використав Карл Ерекі в 1919 році для позначення робіт, в яких продукти одержували за допомогою живих організмів. У біологічному енциклопедичному словнику, виданому в 1986 р., біотехнологією називають використання живих організмів і біологічних процесів у виробництві.

Сучасна біотехнологія (біоінженерія) - це наука про генно-інженерні і клітинні методи та технології створення і використання генетично трансформованих (модифікованих) рослин, тварин та мікроорганізмів з метою інтенсифікації виробництва та одержання нових видів продуктів різного призначення.

РОЗДІЛ 1. МОЛЕКУЛЯРНІ ОСНОВИ СПАДКОВОСТІ

Нуклеїнові кислоти – матеріальні носії спадкової інформації. Хромосома являє собою нуклеопротейдну структуру (дезоксинуклеопротейд), до складу якої входить дезоксирибонуклеїнова кислота, основні білки-гістони, негістонові білки та невелика кількість рибонуклеїнової кислоти. Провідна роль у спадковості належить ДНК, яка є носієм спадкової інформації практично у всіх організмів, як прокариот, так і еукариот, за винятком деяких РНК-утримуючих вірусів.

Нуклеїнові кислоти були відкриті Фрідріхом Мишером (1844-1895 р.р.) в 1869 р. З ядер клітин людини він виділив речовину, названу їм нуклеїном (від лат. Nucleus -ядро). Надалі була вивчена будова та молекулярна структура нуклеїна та встановлено, що він представлений двома типами нуклеїнових кислот – ДНК-ой, яка локалізована переважно в ядрі та РНК-ой яка знаходиться в ядрі та в цитоплазмі.

Дезоксирибонуклеїнові кислоти – високомолекулярні сполуки; їх молекулярна вага коливається від 5 млн. до 40 млн. До складу ДНК входять: цукор – дезоксирибоза, 4 азотистих основи – похідні пурину (аденин та гуанін) та пиримідину (тимин і цитозин) і залишки фосфорної кислоти (фосфат). Аденина (А) утримується звичайно стільки, скільки тимина (Т), а кількість гуаніну (Г) дорівнює кількості цитозина (Ц).

Молекула ДНК складається з ланцюга молекул дезоксирибози, з'єднаних між собою фосфатними залишками. До кожної молекули цукру приєднана одна з основ – аденин, тимин, гуанін та цитозин, іноді метілцитозин. Другий ланцюг ДНК складається з аналогічних сполук, але основи в ній розташовані так, що напроти аденину в першому ланцюзі в другому перебуває тимін, напроти гуаніну – цитозин, причому аденин та тимин з'єднані подвійними водневими зв'язками, а гуанін і цитозин – потрійними (правило Чаргафа).

Кількість пуринових нуклеотидів (A+Г)= кількості пиримідинових (Ц+Т), тобто відношення (A+Г) : (T+Ц) = 1.

Реплікацією називають процес самокопіювання молекули ДНК із точним дотриманням порядку чергування нуклеотидов, властивого вихідним комплементарним ланцюгам. Відбувається це за участю спеціальних ферментів – дезоксирибонуклеази, яка розщеплює молекулу ДНК, та ДНК - полімерази, яка сприяє її синтезу.

Таким чином, ДНК здатна самовідтворюватися (реплікуватися, самокопіюватися) і зберігати спадкову інформацію, закодовану в ній у вигляді послідовності нуклеотидних основ, у безлічі поколінь клітин, які утворюються в онтогенезі багатоклітинного організму.

Рибонуклеїнова кислота по своїй будові трохи подібна до ДНК. Вона також має ланцюг із цукру рибози, об'єднаної фосфатними залишками; до молекул рибози приєднані основи - аденін, гуанін, цитозін, але замість тиміну тут включається інше похідне піримідину - ураціл. Молекула РНК одноланцюгова, злегка спіралеподібно вигнута. У клітині міститься РНК в основному трьох типів: інформаційна (матрична) - і-РНК (м-РНК), рибосомальна; р-РНК і транспортна - т-РНК.

1.2.Реалізація спадкової інформації. Спадкова інформація, закодована в молекулі ДНК, реалізується на всіх етапах життєдіяльності клітини та багатоклітинного організму в процесі біосинтезу. Дослідження показали, що кожний ген контролює синтез одного відповідного ферменту («один ген – один фермент») і реалізація спадкової інформації здійснюється в процесі синтезу. Ген, локалізований на певній ділянці молекули ДНК, контролює синтез первинної молекули білка, яка представляє собою поліпептидний ланцюг, специфічність якої залежить від порядку чередування в ній амінокислот.

Первина молекула білка являє собою ланцюжок, який складається з 100 – 300 різних амінокислот і більше, порядок чередування яких визначає специфічність даної молекули: кожна з 20 амінокислот може зустрічатися багаторазово, але місцезнаходження контролюється ДНК.

У цей час для багатьох молекул білка встановлена їх первина структура, тобто порядок чергування амінокислот у поліпептидному ланцюзі.

Вторинна структура білкової молекули залежить від первинної: амінокислоти в поліпептидному ланцюзі з'єднуються водневими зв'язками між NH– та CO– групами, у результаті чого вона звивається в так звану альфа-спіраль. Утворення великих альфа-спіральних ділянок характерно для фібрилярних білків. У молекулах ферментів спіралеподібних ділянок значно менше.

Третинна структура білкових молекул утворюється в результаті зв'язування так званими дисульфідними містками (S-S) двох цистеїнових залишків амінокислот. Це визначає специфічне просторове розташування поліпептидних ланцюгів.

Четвертинна структура білкових молекул характеризується тим, що вони складаються із двох-чотирьох різноманітних, стабільно

з'єднаних поліпептидних ланцюгів. Така структура характерна для глобулярних білків, у т.ч. для багатьох ферментів. Вторинна, третинна та четвертинна структури білкових молекул залежать від числа та порядку чередування амінокислот у поліпептидному ланцюзі, тобто від первинної структури.

Процес синтезу білка в клітині називається біосинтезом. Він здійснюється під контролем молекули ДНК, яка в такий спосіб реалізує закодовану в ній спадкову інформацію.

Процес біосинтезу складний і включає ряд етапів - транскрипцію, сплайсинг та трансляцію.

Подальші дослідження показали, що в процесі транскрипції синтезується так звана про-мРНК- попередник зрілої м-рнк, що брали участь у трансляції. Про-мРНК має значно більші розміри й містить фрагменти, що не кодують синтез відповідного поліпептидного ланцюга. У ДНК поряд з ділянками, що кодують р-РНК, т-РНК і поліпептиди, є фрагменти, що не містять генетичної інформації. Вони одержали назви інтронов на відміну від фрагментів, що кодують, які називаються екзонами.

Транспортні РНК синтезуються в ядрі, але функціонують у вільному стані в цитоплазмі клітини. Одна молекула т-РНК містить 76-85 нуклеотидов і має досить складну структуру, що нагадує конюшиний лист.

Три ділянки т-РНК мають особливо важливе значення:

1) антикодон, якій складається з трьох нуклеотидів, який визначає місце прикріплення т-РНК до відповідного до комплементарного кодону (м-РНК) на рибосомі;

2) ділянку, що визначає специфічність т-РНК, здатність даної молекули прикріплюватися тільки до певної амінокислоти;

3) акцепторна ділянка, до якої прикріплюється амінокислота.

Центральне місце в трансляції належить рибосомам – рибонуклеопротейновим органіодам цитоплазми. Розміри рибосом у прокаріот у середньому 30 x 30 x 20 нм, у еукаріот – 40 x 40 x 20 нм.

Початок синтезу поліпептидного ланцюга називають ініціацією, ріст її елонгацією. Послідовність амінокислот у поліпептидному ланцюзі визначається послідовністю кодонів у м-РНК. Синтез поліпептидного ланцюга припиняється, коли на м-РНК з'являється один з кодонів - термінаторів - УАА, УАГ або УГА. **Закінчення синтезу даного поліпептидного ланцюга називається термінацією.**

1.3. Генетичний код.

Найбільш неясним у синтезі білків було питання про те, як т-РНК знаходить відповідну ділянку м-РНК, до якого повинна бути приєднана принесена нею амінокислота. Це залежить від послідовності нуклеотидів у ланцюзі молекули м-РНК, причому заздалегідь можна було стверджувати, що такого роду генетичний код не може складатися з одного або двох нуклеотидів, тому що останніх тільки чотири, комбінацій із двох нуклеотидів 16, а амінокислот 20. Отже, якби код включав навіть по два нуклеотиди, то це викликало б неминучу плутанину в синтезі певної білкової молекули. Звідси

було висловлене припущення, що генетичний код повинен включати не менш трьох нуклеотидів, тобто повинен бути триплетним.

Кодом спадковості або генетичним кодом називається процес перекладу триплетної послідовності нуклеотидов молекули ДНК у послідовність амінокислот у білковій молекулі. Одним з найважливіших властивостей генетичного коду є його **колінеарність - чітка відповідність між послідовностями кодонів нуклеїнових кислот і амінокислотами поліпептидних ланцюгів.**

1. Генетический код вирождений, тобто одна амінокислота може кодуватися декількома (від одного до 6) кодонів. Тільки дві амінокислоти кодуються одним триплетом - метіонін (АУГ) і триптофан (УГГ).

2. Генетичний код, що не перекривається. Нуклеотидна послідовність зчитується підряд в одному напрямку, триплет за триплетом, тобто молекула т-РНК, що несе одну амінокислоту, займає один триплет молекули м-РНК, друга сусідній і т.д.

3. Генетичний код універсальний - єдиний для всіх організмів (вірусів, бактерій, рослин, тварин і людини), т.е.у всіх організмів для певних амінокислот кодони однакові.

4.Код триплетний. Місце розташування кожної амінокислоти кодується комбінацією суворо певних трьох нуклеотидов у м-РНК, що утворюють один специфічний кодон.

5.Кодон А УГ, що перебуває на початку і-РНК є ініціатором синтезу поліпептидного ланцюга. Якщо даний кодон перебуває в середині м-рнк, то він кодує амінокислоту метіонін.

6.Кодони УАГ («амбер»), УАА («охра») і УГА («обпал») є термінаторами (стоп-сигналами) синтезу. Коли зчитування генетичної інформації в м-РНК доходить до одного із цих кодонів, подальший синтез припиняється й поліпептидний ланцюг відділяється від рибосоми.

1.4. Регуляція активності генів.

Вивчення хімічного складу клітин, отриманих з різних тканин одного багатоклітинного організму, показує, що кожна з них містить різний, невеликий набір білкових молекул, хоча всі вони мають однаковий набір хромосом, і, отже, єдину генетичну інформацію. Так, у бактерії *E.coli* в одній клітині в різні періоди її життєдіяльності комплекс ферментів буває різний. Усе це дало основу припустити, що в клітині є механізм, якій регулює активність генів, якій визначає, які гени в цей момент повинні бути активними і яким впливає перебуває в неактивному, репресованому стані.

Механізм регуляції генетичного коду був відкритий французькими вченими Ф Жакобом і Ж. Моно в 1961 р. на бактеріях *E. coli* і одержав назву механізму індукції – репресії. Було встановлено, що синтез відповідних білків - ферментів індукується речовинами, які слугують субстратом для даного ферменту та необхідним для нормальної життєдіяльності клітини.

По теорії Жакоба та Моно, гени, які впливають на синтез певного ферменту або білка, розташовані в молекулі ДНК послідовно один за одним у порядку їх впливу на хід реакції синтезу. Така група генів називається **опероном**, а гени, що безпосередньо кодуєть синтез відповідних ферментів, називають **структурними генами**. На початку кожного оперона перебуває спеціальний ген – **ген оператор**. На структурних генах одного оперона звичайно утворюється одна м-РНК, і ці гени бувають одночасно активні або неактивні. Як правило, структурні гени в опероне перебувають у стані репресії.

1.5. Сучасне уявлення про будову та функції гена.

В уявленні М. Менделя одиницею спадковості був фактор, якій контролював прояв у домінантному або рецесивному стані однієї ознаки. Надалі поняття про ген були розвинені в роботах Т. Моргана, який показав, що ген – це **локус (ділянка) хромосоми, яка займає в ній суворо певне положення**. У сучасному розумінні ген – це функціональна одиниця молекули ДНК, яка контролює послідовність амінокислот у кодуемому поліпептидному ланцюзі.

Для структурних генів еукаріот характерна мозаїчна будова: ділянки молекули ДНК, які кодуєть амінокислоти в поліпептидному ланцюзі, – **екзони** чергуються з ділянками, які не мають цю здатність – **інтронами**.

РОЗДІЛ 2. ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ

Виникнення генетичної інженерії зв'язане, насамперед, з розвитком молекулярної біології. Наприкінці 60-х років багато дослідників вважали, що молекулярні механізми фундаментальних генетичних процесів – реплікація, транскрипція, трансляція, а також система їх регуляції в основному вивчені. Схема, яка показує сувро односпрямований потік генетичної інформації, ДНК–РНК–білок, була названа основною догмою молекулярної біології.

2.1. Ферменти генної інженерії. Ферменти генетичної інженерії – це ферменти, які дозволяють проводити різні маніпуляції з молекулами ДНК: розрізати в певних місцях, з'єднувати різні за походженням фрагменти, синтезувати нові послідовності, які не існують у природі.

ДНК-полімерази. Одним з найбільш часто використовуваних у генетичній інженерії ферментів є **ДНК-полімераза, яка виділена з E.coli або фага T-4. Він має здатність подовжувати ланцюг ДНК шляхом приєднання комплементарного нуклеотида.**

Використання специфічних термостабільних ДНК-полімераз, виділених з бактерій, які живуть у гейзерах, дозволило проводити **ампліфікацію** – збільшення кількості ДНК, числа копій гена методом полімеразно ланцюгової реакції. З деяких вірусів була виділена **РНК-залежна ДНК-полімераза, названа зворотною транскриптазою або ревертазою**. Ревертази здатні синтезувати комплементарний ланцюг ДНК на РНК-

матриці. За допомогою ревертаз можна одержувати к-ДНК – ДНК копії м-РНК.

ДНК-лігаза здійснює одну функцію – з'єднання фрагментів ДНК шляхом відновлення фосфодіефірних зв'язків між сусідніми нуклеотидами. Цей процес називається лігуванням. Найбільш часто для лігування використовують ДНК - лігазу фага Т-4.

Нуклеази – це велика група ферментів, яка каталізує реакцію гідролізу молекул нуклеїнових кислот. У результаті дії нуклеаз молекула ДНК або РНК розпадається на фрагменти або окремі нуклеотиди.

Рестриктази являють собою особливий клас ендонуклеаз, які гідролізують ДНК суворо по певних специфічних послідовностях нуклеотидів, які називаються сайтами рестрикції. Кожна з рестриктаз впізнає свій сайт рестрикції та розріже ДНК або всередині послідовності сайту рестрикції, або в безпосередній близькості від нього.

2.2.Конструювання й технологія рекомбінантних ДНК.

*Під рекомбінантними ДНК розуміють утворені об'єднанням *in vitro* (поза організмом) (у пробірці) двох або більше фрагментів ДНК, виділених з різних біологічних джерел. Певні фрагменти ДНК, у т.ч. і фрагменти, які містять гени, одержують із використанням рестриктаз. Рестриктази можуть утворювати фрагменти, як з «тупими», так і з «липкими» кінцями. Об'єднання фрагментів ДНК у єдину молекулу проводиться декількома методами, які залежать від кінців фрагментів ДНК.*

Технологія рекомбінантних ДНК або молекулярне клонування - це сукупність експериментальних процедур, які дозволяють здійснювати перенос генетичного матеріалу (ДНК) з одного організму в інший. Часто експерименти з рекомбінантною ДНК проводять за наступною схемою:

- з організму - донора потрібних генів екстрагують нашивну (чужорідну) ДНК; піддають її ферментативному гідролізу (розщеплюють, розрізають) і з'єднують (лигують, зшивають) з іншою ДНК (вектор для клонування) з утворенням нової рекомбінантної молекули (конструкція «клонуючий вектор - вбудована ДНК»);

-цю конструкцію вводять у клітину - хазяїна (реципієнт), де вона реплікується та передається нащадкам. Цей процес називається трансформацією;

-ідентифікують і відбирають клітини які несуть рекомбінантну ДНК (трансформовані клітини);

-одержують специфічний білковий продукт, синтезований клітинами - хазяями, які слугують підтвердженням клонування гена

У якості векторів використовують, як правило, плазміди, бактерії, фагі, віруси, косміди, мобільні елементи По профілю використання їх можна розділити на кілька типів.

1. Вектори для клонування використовують для збільшення кількості (ампліфікації) фрагмента ДНК, вбудованого в такий вектор, за допомогою реплікації (плазмідни та фагі).

2. Експресійні вектори. Їх використовують для аналізу конкретних послідовних генів і їх білкових продуктів, а також наробітку конкретного білка.

3. Вектори для трансформації. Використовують для введення чужорідного фрагмента ДНК у геном реципієнта.

Сучасні векторні системи часто бувають поліфункціональними, сполучаючи кілька функцій в одному векторі. До векторної молекули висувуються наступні основні вимоги:

- **вектор повинен містити унікальні сайти рестрикції для декількох рестриктаз, що дозволяє вмонтувати в нього фрагмент чужорідної ДНК;**
- **вектор повинен мати певну ємність і не абортувати вбудований фрагмент;**
- **вектор повинен реплікуватися в певних клітинах;**
- **вектор повинен містити послідовність маркерного гена, що полегшує селекцію клітин, які несуть векторну конструкцію.**

2.3. Синтез і виділення генів. Уперше хімічний синтез гена здійснив в 1969 р. працюючий у США індійський учений Х.Г.Корану зі співробітниками. Він синтезував ген (діянку молекули ДНК), що кодує синтез, аланінової т-РНК пікарських дріжджів. Цей ген складався з 77 пар нуклеотидів, послідовність яких була відома. В 1976 р. у лабораторії Х.Г.Корани був синтезований фрагмент супресорної тірозинової т-РНК довжиною 126 пар нуклеотидів, промотор, який складався з 52 пар нуклеотидів, і термінатор, який мав 21 пари нуклеотидів.

До кінців молекули ДНК були прикріплені так звані "липкі кінці", які складаються із ААТТ (один кінець) і ТТАА (інший кінець) нуклеотидів. Завдяки цьому даний ген був вбудований у геном фага та нормально в ньому функціонував. Таким чином, була показана можливість штучного синтезу генів. Метод дозволяє синтезувати відносно дрібні гени, які містять невелику кількість пар нуклеотидів.

Ферментативний синтез. Гени, які кодують ферменти або структурні білки, які складаються із тисячі та більше нуклеотидних пар більш раціонально створювати методом ферментативного синтезу за допомогою ферменту зворотної транскриптази (ревертази). За допомогою даного ферменту з м-РНК можуть бути отримані точні копії ДНК (кДНК).

Ферментативний синтез може бути схематично представлений у такий спосіб. У пробірку, що містить фізіологічне безклітинне середовище, вносять нуклеозиди чотирьох типів (А, Г, Т, Ц), фермент ревертазу, м-РНК, кодовану природним геном, копію якого планується одержати.

У якості "затравки" для прискорення реакції, вносять невеликі ділянки молекули ДНК, які містять 8-10 повторів тимину (короткі одноланцюгові олігонуклеотиди). Вони будуть утворювати за принципом комплементарності дволанцюгові ДНК-РНК-фрагменти, які будуть слугувати затравкою для початку ферментативної реакції.

На м-РНК зворотня транскриптаза синтезує комплементарну їй ланцюг ДНК. Потім на синтезованому ланцюзі ДНК будується другий комплементарний ланцюг ДНК. У результаті одержують фрагмент подвійної спіралі ДНК – точну копію того гена, з якого була транскрибована м-РНК.

Описаним способом були синтезовані гени, які кодують глобіни людини, кролика, миші, імуноглобулін миші, білок кришталика ока бика, яєчний білок та ін.

2.4. Генетична інженерія на рівні хромосом і геномів. Одним з розділів генетичної інженерії є розробка методів по експериментальному переносу з однієї клітини в іншу цілих хромосом. Метафазні хромосоми, виділені із клітини – донора, можуть вбудовуватися в клітину-реципієнта шляхом пікноцитозу. Хромосоми, які вбудувались чужорідну клітину, розпадаються на дрібні фрагменти; деякі з них зберігаються протягом декількох поколінь у цитоплазмі клітини - реципієнта. ДНК, яке міститься в цих фрагментах, може здійснювати синтез поліпептидів.

Так, наприклад, у клітини миші (*in vitro*) була перенесена 17-я хромосома людини, в якій містяться гени, що контролюють синтез *тімідінкінази та галактокінази*. При розмноженні в мишачих клітинах дані гени досить стабільно функціонували.

2.5. Гібридизація соматичних клітин. Однієї із проблем генетичної інженерії є гібридизація соматичних клітин. Уперше можливість гібридизації клітин, культивуємих поза організмом, встановив в 1960 р. французький біолог Ж.Панський. Він зі співробітниками, вирощуючи поза організмом у культурі тканини клітини двох ліній мишей, виявив у невеликій кількості третій тип клітин. Ці клітини виявилися гібридними й могли розмножуватися *in vitro*. По морфологічним та біологічним ознакам гібридні клітини були проміжними між вихідними батьківськими клітинами.

Однак, спонтанне злиття клітин у культурі тканини відбувається рідко, тому використання таких гібридних клітин для проведення біохімічних і генетичних експериментів утруднене.

2.6. Одержання аллофенних тварин.

Аллофенними називають химерні організми, які містять різні тканини, що походять із клітин, отриманих від різних родителів.

Б.Мінтц одержав аллофенних мишей шляхом утворення змішаної бластули із клітин чорних і білих мишей. У наступних дослідах з'єднували

бластомери тварин, які відрізнялися по інших ознаках – фарбуванню райдужної оболонки, довжині вух, хвоста й ін.

Для одержання аллоферних нащадків у вагітних мишей, які мали чітко виражені альтернативні ознаки, вимивали ембріони на стадії восьми бластомерів і за допомогою ферменту пронази відокремлювали бластомери. Комбінуючи бластомери від двох (і більш) ембріонів, створили в спеціальному поживному середовищі єдиний комплексний ембріон, який увели в матку миші, гормонально підготовленої до імплантації зародка. Мишенята, які народжувалися, являли собою мозаїків, у них проявлялися ознаки всіх батьківських форм.

Методика, розроблена на мишах, в останні роки використовується для одержання аллофенних овець.

РОЗДІЛ 3. ТРАНСПЛАНТАЦІЯ ЕМБРІОНІВ

3.1 Технологія трансплантації ембріонів. Трансплантація ембріонів сільськогосподарських тварин – біотехнологічний метод відтворення, якій дозволяє збільшити темпи відтворення та підвищити ефективність племінної роботи. Найбільш прийнятні для трансплантації ембріонів малоплідні види тварин: корови, коні, вівці. У світовій практиці тваринництва метод трансплантації ембріонів більшою мірою застосовується в молочному та м'ясному скотарстві. Використовуючи реципієнтів для пересадження ембріонів, отриманих від однієї відібраної корови-донора, можна збільшити кількість її нащадків у десятки та сотні раз. Теоретично від генетично видатної корови-донора за все її життя можна одержати не менше 500 телят.

Відбір донорів. У селекційних програмах відбору донорів надається величезне значення. Найбільш важливим критерієм на перших етапах відбору корів донорів слугує їх висока племінна цінність, тобто здатність передавати гени високої продуктивності своїм нащадкам. У більшості випадків в якості корів-донорів відбирають матерів потенційних племінних биків.

3.2. Проведення суперовуляції у донорів. При суперовуляції виходить більша кількість яйцеклітин, ніж при звичайній.

Суперовуляцію проводять в одноплідних тварин з метою збільшення кількості одержуваних ембріонів. *Для збільшення кількості дозріваючих фолікулів, у самок сільськогосподарських тварин використовують фолікулоstimулюючі гормони (простагландіни, естрофан, еструлін, матазін та ін.).* Метод викликання суперовуляції розроблений М.М.Завадовским. Він встановив, що при введенні **СЖК** (сироватки жеребних кобил) у самок зростає кількість дозріваючих фолікулів.

3.3. Одержання та оцінка ембріонів. Запліднені яйцеклітини від суперовулюючих корів-донорів можуть бути одержані трьома способами: після забою корови-донора, хірургічним і нехірургічним.

а) Одержання ембріона після забою корови-донора. Найпростішим і надійним способом одержання ембріонів є забій корови-донора.

б) Одержання ембріонів хірургічним способом. Одержання ембріонів хірургічним способом застосовували в 70-ті роки. Для трансплантації рекомендується використовувати бластоцисти, тому ембріони одержують між 7-ю – 8-ю добою після першого штучного запліднення.

в) Одержання ембріонів нехірургічним способом. Катетерний (нехірургічний) спосіб одержання ембріонів практично не викликає яких-небудь ускладнень в організмі тварини. Катетерним способом можна успішно одержувати ембріони у твариницьких приміщеннях. Ефективність способу висока, повторюваність – багаторазова. За допомогою катетерного способу одержують у середньому 4,3 ембріона від 86% корів-донорів.

Оцінка ембріонів. Перед пересадженням реципієнтові необхідно оцінити якість ембріона, визначити спосіб його пересадження. Оцінюють ембріони різними методами. Основними з них є: *морфологічний* та *метод фарбування ембріонів*. Вважається, що ступінь точності морфологічного методу може бути доведена до 90% і більш.

3.4. Пересадження ембріонів реципієнтам. У якості реципієнта відбирають гінекологічно здорових корів після двох-трьох нормальних статевих циклів з гарними відтворними якостями. Продуктивні, племінні та породні якості великої ролі не відіграють. Разом з тим у реципієнтів з поганою вгодованістю, низькою запліднюваністю після першого запліднення можуть погано приживлятися ембріони. У середньому на одного донора відбирають 5-6 реципієнтів. Більшість фахівців вважає, що в якості реципієнтів найбільш придатні тварини з гарними племінними кондиціями.

3.5. Кріоконсервація ембріонів. З моменту одержання ембріона й до його пересадження проходить від 2-3 до 20-24 год. Оптимальна температура короткочасного зберігання ембріонів 8–12°C, тривалість зберігання 3–4 доби. Швидкість охолодження повинна бути повільної, щоб виключити явище температурного шоку. Для короткочасного зберігання та культивування ембріонів використовують синтетичні середовища з різними білковими добавками: бичачий сироватковий альбумін, сироватку крові кнурів–кастратів і нормальну сироватку бичків–кастратів.

При зберіганні заморожених ембріонів (–196 °C) є ряд переваг, які дозволяють проводити пересадження в будь-який час, створювати «банк» ембріонів від високоцінних племінних тварин, генофонд нечисленних та зникаючих порід, транспортувати ембріони в будь-який час року, у будь-яку країну.

3.6. Вплив трансплантації ембріонів на генетичний прогрес популяції. Створення банків глибокозамороженої сперми та розробка методів штучного запліднення дозволили суттєво збільшити інтенсивність відбору биків і підвищити точність оцінки їх племінної цінності. На базі інтенсивного використання генетично цінних биків-виробників із застосуванням штучного запліднення корів глибокозамороженою спермою темпи селекції в популяції у порівнянні зі звичайними збільшуються в 2-3 рази.

РОЗДІЛ 4. ОДЕРЖАННЯ ТРАНСГЕННИХ ТВАРИН

4.1. Перенос генів.

Успішні експерименти по введенню чужорідних генів у клітини ссавців і можливість створення генетично ідентичних тварин шляхом переносу ядра з ембріональної клітини в яйцеклітину з вилученим ядром (перенос ядра, клонування) дозволили включити в хромосомну ДНК вищих тварин окремі функціональні гени або цілі їх кластери.

Дана стратегія полягає в наступному:

- *клонований ген вводять у ядро заплідненої яйцеклітини;*
- *запліднені яйцеклітини імплантують у реціпієнтну жіночу особину (оскільки успішне завершення розвитку ембріона ссавців в інших умовах неможливо);*
- *відбирають нащадків, які розвилися з імплантованих яйцеклітин і які містять клонований ген в усіх клітинах;*
- *схрещують тварин, які несуть клонований ген у клітинах зародкової лінії, і одержують нову генетичну лінію.*

Ідея генетичної зміни тварин шляхом введення генів у запліднені яйцеклітини була реалізована на практиці в 1980-х г.г. *Тварина, чій генотип був змінений шляхом уведення чужорідної (екзогенної) ДНК, була названа трансгенною, ДНК яке вводиться – трансгеном, а весь процес – трансгенною технологією, або трансгенезом.*

Для переносу генів ссавців використовують три методи:

- *мікроін'єкцію рекомбінантної ДНК у пронуклеус зиготи;*
- *використання ретровірусів у якості векторів;*
- *ін'єкцію трансформованих ембріональних стоволових клітин в ембріон.*

1. Одержання запліднених яйцеклітин. Для мікроін'єкції чужорідного гена необхідно мати запліднені яйцеклітини в стадії формування пронуклеусов. Перший гормон стимулює ріст і розвиток фолікулів, другий викликає овуляцію. Через 24-36 год донорів запліднюють.

2. Конструювання гена. Типовий ген еукаріот складається із двох основних частин: *регуляторної й інформативної (кодуючої або структурної)*. За допомогою методів генної інженерії видаляють усю регуляторну частину гена й замінюють її регуляторною ділянкою – промотором бактеріального гена. Така заміна приводить не тільки до структурних змін в еукаріотичному гені, але й підсилює його функціонування.

3. Приготування ін'єкційного розчину ДНК. Інекуємий розчин ДНК звільняють від партикулярних забруднень, здатних привести до засмічення ін'єкційної піпетки або ушкодженню зиготи.

4. Мікроін'єкція рекомбінантної ДНК у пронуклеус зиготи Для переносу чужорідних генів у пронуклеус зиготи сільськогосподарських тварин використовують інверсійний мікроскоп, два мікроманіпулятори, ін'єкційна посудина, ін'єкційну піпетку й піпетку - власник. Зиготу фіксують

піпеткою - власником. Ін'єкційну піпетку наповнюють розчином ДНК із ін'єкційної посудини. За допомогою прямого важеля ін'єкційну піпетку вводять через зону пеллюцида, плазматичну мембрану й мембрану ядра в чоловічий пронуклеус. Ін'єкція 1-2 пл. розчину ДНК приводить до збільшення обсягу чоловічого пронуклеуса до 50%.

4.2. Створення різних типів трансгенних тварин. Мрією багатьох дослідників - селекціонерів миру є розробка можливості не просто відбору тварин зі зміненою господарсько-корисною мінливістю, а навмисна зміна генотипу й спрямована створення бажаного типу тварин. Це залишалось мрією доти, поки не були зроблені відкриття – виявлення ДНК як носія генетичної інформації, поки не були закладені основи рекомбінантної техніки (відкриття рестрикційних ензимів, клонування ДНК і т.д.) або генної інженерії.

Трансгенні тварини стійкі до захворювань. Втрати, викликані захворюваністю в сільськогосподарських тварин, становлять більш 10% вартості продукції. Тому більш важливе значення набуває селекція тварин по резистентності до захворювань.

Резистентність - це спадкова генетично обумовлена несприйнятливність тварин до певних мікроорганізмів, вірусів, паразитів або токсинів. На жаль, спроби вести селекцію на стійкість до різних захворювань не дали радикальних результатів, хоча відомі окремі позитивні приклади. Створені, зокрема, популяції великої рогатої худоби з домішкою крові зебу, які стійкі до ряду кровопаразитарних захворювань.

Застосування техніки трансгеноза для поліпшення складу молока. Одним з найбільш ефективних шляхів зниження вартості виробництва молочних продуктів і розширення ринку може бути поліпшення складів молока шляхом одержання трансгенних тварин. У результаті генетичної селекції в останні десятиліття молочна промисловість досягла значного поліпшення якості молочної продукції.

Трансгені сільськогосподарські тварини - продуценти біологічно активних речовин і медичних препаратів. Трансгенних сільськогосподарських тварин використовують для продукування людського інсуліну. *Інсулін - білковий гормон, вироблюваний підшлунковою залозою. Недолік його в організмі приводить до цукрового діабету.* Використовуючи методи генної інженерії, інсулін можна синтезувати в мікроорганізмах.

Експериментально було показано, що ген інсуліну людини, уведений у геном миші, функціонують у мишачих клітинах підшлункової залози. Інакше кажучи, ген інсуліну людини проявляє себе в організмі миші, як його власний.

4.3. Одержання трансгенних сільськогосподарських тварин.

Одержання трансгенних кролів. У дослідях по одержанню трансгенних кролів була використана конструкція чужорідної ДНК, що полягає із протомора металотіонеїну миші й структурної частини гормону росту

людину. Частота інтеграції гена гормону росту людини склала 12.8%. Вона виявилася більш ніж у два рази нижче, чим у мишей, де частота інтеграції чужорідного гена гормону росту людини була на рівні 27%.

Одержання трансгенних овець. В 1986 р. австралійськими вченими була отримана трансгенна вівця. У цьому експерименті використовували овечий ген гормону росту з металлотіонеїновим промотором. Через 5 тижнів після народження трансгенному ягнятї в раціон увели невелику дозу цинку, який включив у роботу ген, що активує регуляторну послідовність рекомбінантної ДНК. Це додаткове приймання привело до більш інтенсивного синтезу гормону росту. Через 3 року після народження трансгенна вівця в 1, 5 рази перевершувала по масі однолітків тієї ж породи. Ціль таких досвідів - створення інтенсивне зростаючих трансгенних овець із високою шерстю продуктивністю.

Одержання трансгенних свиней. Для візуалізації пронуклеусів у зиготах свиней застосовують центрифугування. Після такої обробки зигот проводять мікроін'єкцію генів у пронуклеуси зигот. Встановлено, що після мікроін'єкції рекомбінантної ДНК 10-20% ін'єкованих зигот продовжують розвиватися до стадії бластоцисти й 6-11% після пересадження реципієнтам дають трансгенних свиней. У середньому частота інтеграції чужорідного гена у свиней становить 10%.

Одержання трансгенної великої рогатої худоби. У великої рогатої худоби зиготи містять велику кількість включень, тому важко провести візуалізацію пронуклеусів. Використання центрифугування яйцеклітин дозволяє визначити гранули, які покривають пронуклеуси.

Уперше в чоловічій пронуклеус зиготи корови ін'єкували рекомбінантну ДНК, яка складалась з *гена MT-1 миші й гена тімідінкінази вірусу герпеса*. Через 24 год. після ін'єкції ДНК в 30% ранніх ембріонів був виявлений високий рівень активності гена вірусу герпеса.

РОЗДІЛ 5. КЛОНУВАННЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН

5.1. Пересадження ядер соматичних клітин в енуклеювану яйцеклітину.

Нові комбінації генів, що виникають на основі механізмів кроссінговера, редукційного розподілу, випадкового розподілу гамет при мейозі та злитті яйцеклітини та спермія, проявляються в процесі дозрівання гамет і їх запліднення. При цьому розподіл генів по гаметах у процесах дозрівання останніх відбувається випадково й підкоряється закону менделівського розщеплення.

Таким чином, механізм статевих процесів спрямований на підтримку необхідної генетичної різноманітності в популяції тварин. У той же час статеві процеси, забезпечуючи збереження й еволюцію популяції генетична різноманітність, перешкоджає точному відтворенню й розмноженню генетично цінних тварин, створюваних у результаті цілеспрямованої

багаторічної селекційної роботи. Такі видатні тварини не передають нащадкам цінні генетичні комбінації. Тому в селекції та розведенні тварин виникає важлива проблема – розробка методів одержання нащадків, які були б точною генетичною копією видатних тварин, їхніми клонами.

Під клоном розуміють генетично однорідних нащадків однієї вихідної особини, що утворюються в результаті безстатевого розмноження.

Численні нащадки вихідної особини мають ідентичний генотип. Однак, потрібно мати на увазі, що тварини, отримані в результаті клонування, не можуть утворювати чисті лінії, у яких, як відомо, відсутня генетична мінливість, і селекція не дає ефекту. Клони тварин відрізняються від чистих ліній у першу чергу тим, що при однаковій в обох випадках фенотипічній однорідності в чистих лініях усі її гени гомозиготні, тоді як у клонах вони в сильному ступені гетерозиготні.

Для створення генетичних копій сільськогосподарських тварин на базі клітинної інженерії розробляються методи клонування: *пересадження ядер соматичних клітин в енукейовані яйцеклітини; індукування партеногенезу, що дозволяє повністю передавати нащадкам генотип одного з батьків.* Найбільш перспективне клонування сільськогосподарських тварин шляхом трансплантації одержаних із соматичних клітин ядер в енукейованні яйцеклітини. Будь-яка диференційована соматична клітка містить повний набір генів, властивих даній тварині. Встановлено, що каріотип диференційованих клітин не відрізняється від каріотипу заплідненої яйцеклітини - зиготи, з якої вони одержані.

В 1952 р. американські дослідники Р.Бриггс і Т.Кинг, розробивши нову техніку пересадження, здійснили трансплантацію ядер соматичних клітин зародків в енукейовані яйцеклітини жаб. Суть проведених експериментів зводилася до того, що за допомогою мікропіпеток з яйцеклітин шпорцевої жаби видаляли ядра, а замість них пересаджували ядра із клітин ембріонів, які перебувають на різних стадіях розвитку. Було продемонстровано, що ядра ранніх ембріонів у стадіях пізньої бластули й навіть ранньої гастрული мають тотіпотентні властивості, що забезпечуює нормальний розвиток ембріонів, а надалі й дорослих жаб.

На початку 80-х років був запропонований новий метод злиття клітинних фрагментів з метою пересадження ядер у зиготи миші. Він складався з комбінації двох методів – мікрохірургічного видалення пронуклеусів із заплідненої яйцеклітини й введення чужорідних пронуклеусів або ядер 2-80 клітинних зародків після їх короткочасного культивування з *інактивованим вірусом Сендай.*

Перші експерименти по клонуванню овець були проведені в 1986 р. Загальна схема клонування овець на основі пересадження ядра ембріонів в енукейованну яйцеклітину включає наступні етапи:

- ***одержання бластомерів з 8-16 клітинного ембріону;***
- ***поділ яйцеклітини - реципієнта на ядроутримуючий та без'ядерний фрагменти;***

- злиття без'ядерного фрагмента яйцеклітини з одержаним бластомером – донором за допомогою вірусу Сендай або електричного поля;
- перенесення реконструйованої зиготи в агаровий циліндр;
- культивування ембріонів у лігатований яйцепровід вівці - посередника до стадії бластоцисти;
- пересадження бластоцисти кінцевому реципієнтові.

Як показали результати експериментів, розвиток реконструйованих ембріонів в 40% випадків проходило до стадії бластоцисти. Усього було отримано після пересадження бластоцист реципієнтам три живі генетично ідентичні ягняти.

Останнім часом приділяється велика увага поділу 8- добових ембріонів, які перебувають на стадії бластоцисти. У середньому з 10 відібраних ембріонів придатним для одержання ідентичних близнюків вважається тільки один ембріон.

У Німеччині для поділу використовували 7-добові ембріони на стадіях пізньої морули або ранньої бластоцисти. Розділені половинки ембріонів культивували протягом 2 год, потім їх трансплантували нехірургічним методом коровам–реципієнтам. Тільність корів–реципієнтів від пересаджених половинок ембріонів становила 71%.

На думку фахівців, поділ ембріонів на половинки збільшує кількість нащадків від генетично цінних корів–донорів. У практичних умовах розподіл ембріонів може бути проведений в пересувній лабораторії. Одержані ембріони доставляють у лабораторію для оцінки та поділу. Половинки ембріонів гарної якості трансплантують коровам–реципієнтам.

РОЗДІЛ 6. ОДЕРЖАННЯ ХИМЕРНИХ ТВАРИН.

6.1.Методи створення експериментальних химер. Термін «химера», або генетичний мозаїк, використовується головним чином для одержання організмів, які складаються із генетично різних клітинних популяцій більше ніж від однієї заплідненої яйцеклітини. З вузькогенетичної точки зору химери – це продукти об'єднання двох і більш ранні ембріонів, внаслідок чого вони мають складний комбінований генотип.

По класифікації К. Форда, розрізняють первинний і вторинний химеризм. При первинному химеризму генетично різні популяції клітин співіснують із моменту запліднення яйцеклітини або раннього ембріогенезу. Первинні химери із у край низькою частотою можуть виникати, наприклад, коли два або більше спермій запліднюють одну яйцеклітину. Первинних химер можна одержувати штучно.

При вторинному химеризмі відбуваються комбінації одного- або двох видів тканин від двох або більш зародків після початку глибокого клітинного диференціювання. Вторинний химеризм характерний для химер природнього походження.

У сучасній біотехнології для одержання химер використовують категорію первинного хімеризму. Суть такої технології полягає в штучнім об'єднанні двох або більш генетично різних раних ембріонів або введенні клітин внутрішньої клітинної маси бластоцисти донора в бластоцель зародка - реципієнта. Отримані химери несуть властивості різних генотипів і у своєму походженні будуть мати чотирьох батьків і більш.

На химерах можна виявити процеси диференціювання тканин і механізми розвитку тварину, починаючи від раних ембріональних стадій; особливості експресії генів на клітинному рівні; міжклітинні взаємодії й плейотропний ефект генів.

Химер відносять до вегетативних гібридів, отриманих у результаті об'єднання геномів без мейозу. Вони не передають нащадкам характерну тільки для них генетичну мозаїчність. Химери зберігають ознаки й властивості вихідних форм лише в одному поколінні. Химери можуть поєднувати коштовні в господарській відношенні ознаки, які відсутні у звичайних тварин або слабо виражені. Це стосується антагоністичних ознак, як, наприклад, молочна й м'ясна продуктивність великої рогатої худоби, якість вовни й м'ясна продуктивність овець і т.д. Створення ін'єкційних химер методом введення в раних ембріон певних ліній клітин дозволить поліпшити імунну систему й підвищити резистентність тварин до хвороб.

Існують два основні методи одержання химер - *агрегаційний та ін'єкційний*. Уперше ці методи були розроблені на лабораторних мишах і пізніше використані для різних видів сільськогосподарських тварин.

Агрегаційний метод. Він використовується для об'єднання ембріонів, які дробляться. Метод розроблений В.Тарковским і Минц Б. (1961-62 г.г.) для одержання химерних мишей. Для ідентифікації агрегатованих химер мишей, отриманих з різних ліній, застосовують символ <->. Так, наприклад, А <-> В означає, що химера отримана на основі агрегації ембріонів мишей, що відносяться до ліній А і В.

Суть методу полягає в наступному. З яйцепроводів самок одержують ембріони, які різняться генотипами на стадії 8-12 бластомерів. Зону пелюцида, яка покриває ембріони, видаляють механічно або ферментативно проназою. Після звільнення із зони пелюцида морули з різними генотипами зближають за допомогою скляної мікроголки або мікропіпетки. Зближення й агрегацію ембріонів проводять у краплі середовища, покритої шаром парафінового масла в культуральному посуді столі якій обігривається.

Після агрегації ембріони культивують протягом 24-48 год у поживних середовищах при $t^{\circ} - 37^{\circ}C$. Для культивування застосовують поживне середовище Брінстера (яке складається із забуференого бікарбонатом сольового розчину типу Кребса-Рінгера з додаванням джерел енергії - піруват, лактат, глюкози, бичачого сивороткового альбуміну, пеніциліну й стрептоміцину). При культивуванні *in vitro* химерні зародки досягають стадії бластоцисти, і їх імплантують у матку миші - реципієнта, яку за 2,5 - 3 дня до цього спаровують зі стерильним (вазоектомованим) самцем.

Химери, отримані агрегаційним методом, можуть відбуватися не тільки від двох цілих ембріонів. Є випадки одержання химер шляхом об'єднання 16 ембріонів.

Слід особливо зазначити слабку імплантацію в стінку матки реципієнта пересаджених химерних бластоцист, а також значну їх загибель під час пренатального періоду. Частота народження химерних мишенят становить 3-6% від числа трансплантованих агрегаційних бластоцист.

2. Ін'єкційний метод. Метод більш трудомісткий, але з використанням мікроманіпуляційної техніки й мікрохірургічного втручання дозволяє вирішувати проблеми, які нерозв'язні на агрегаційних химерах. Він запропонований Р. Гарднером.

Суть цього методу полягає у введенні клітин внутрішньої клітинної маси бластоцисти донора в бластоцель ембріона реципієнта. Бластоцисту утримують всмоктувальною піпеткою й, використовуючи мікроманіпулятори, трофобласт розрізають разом із зоною пеллюцида й розтягують двома скляними голками. В утворений в трофобласті отвір вводять третю голку й з її допомогою отвір розширюють, надаючи трикутну форму, через яке вводять внутрішню клітинну масу донорського зародка в бластоцель ембріона реципієнта.

Ін'єкційний метод одержання химер використовують у тих випадках, коли агрегаційний метод не дає результатів. Наприклад, у деяких видів тварин після видалення зони пеллюцида подальшого ембріонального розвитку не відбувається.

6.2. Маркери химер. Цінність химер для вивчення реалізації генетичної інформації в процесі онтогенезу багато в чому визначається наявністю маркерів. У ссавців клітини в онтогенезі мігрують і взаємодіють один з одним, що створює складності при аналізі клітинних родоводів.

Відомо, що в здоровішої тварини кожна клітка оточена клітками ідентичного генотипу, тому питання клітинної автономії вирішувати дуже важко. Однак, при вивченні химер можна з'ясувати чи детермінується фенотип клітини власним її генотипом або ж оточенням сусідніх клітин. Тому метод експериментальних химер може служити інструментом для вивчення експресії генів і генетичного контролю клітинних взаємодій в онтогенезі. Так, на химерах було обґрунтована клональна теорія розвитку. Суть її полягає в тому, що будь-який спеціалізований тип клітин складається з певного числа клітинних клонів, що утворюються в результаті розмноження родоначальних клітин. Для ідентифікації химер або окремих компонентів химери застосовують різноманітні маркери.

Генетичні клітинні маркери. За допомогою генетичних клітинних маркерів можна ідентифікувати клітини різного генотипу, з яких сформовані тканини химер.

В 80-е роки стали використовувати ефекти мутантних генів, що порушують будову, функцію або міграцію певних клітинних систем. Такі

маркери, що локалізуються в клітці, мають цитоавтономністю, внутрішньоклітинною локалізацією, мають трохи спадково детермінованих варіантів і легко виявляються на гістологічних зрізах без складної обробки. Найбільше відповідає пропонованим вимогам пігмент меланін, локалізований у волосяному покриві й клітинах ретинального пігментного епітелію. Мутантний ген, що викликає в гомозиготному стані порушення або блокаду синтезу меланіна меланоцитами, широко використовується в якості генетичного маркера в експериментах з химерами ссавців, особливо лабораторних тварин.

У ролі генетичних маркерів виступають антигени, генетична різноманітність яких величезна, але їх важко виявити. За допомогою імунологічних методів виявлена безліч антигенів. Так, у багатьох видів ссавців були ідентифіковані головні антигени або головні генетичні локуси гистосовместимости.

Антигени цього головного комплексу вивчені найбільше повно в мишей. Система гистосовместимости в мишей, названа *генами H-2*, включає два локуси більш ніж із двадцятьма аллелями 17 хромосоми. Установлене, що гени H-2 комплексу експресуються цитоавтономно на ранніх стадіях у всіх клітинах ембріона миші. Тому H-2 антигени визнані найбільш надійними маркерами клітинних популяцій у химер.

У якості генетичних клітинних маркерів використовують також хромосомні відмінності між лініями або популяціями клітин, що становлять тканини химер. Серед хромосомних маркерів особливо виділяють різні типи хромосомних транслокацій, окремі ділянки хромосом, обумовлені методом диференціального фарбування, кількість перичентрического хроматину й полові хромосоми.

Однак, хромосомні маркери мають недоліки. Хромосомний аналіз можливий тільки для клітин, що діляться, і не дає інформації про просторовий розподіл клітин у тканинах химер.

Біохімічні маркери. Для ідентифікації клітинних популяцій у химер використовують біохімічні маркери: *гемоглобін, сироваткові білки, ферменти* **Особливе місце відведене ізоферментам (ізоцитратдегідрогеназа, глюкозофосфатизомераза й фосфоглицераткиназа), виділюваним за допомогою електрофореза.**

Фенотипические меркеры. При створенні химер сільськогосподарських тварин, що відбуваються від фенотипически контрастних порід або видів, широко використовують морфологічні маркери. Породи й особливо види сільськогосподарських тварин виділяють по якісних або кількісним ознакам. У більшості випадків у тваринництві породи класифіковані по масті, екстер'єру, напрямку продуктивності й іншим ознакам. Найбільше часто в міжпорідних і міжвидових генетичних химер, отриманих від контрастних форм, для ідентифікації химер використовують прості морфологічні ознаки, що мають моногенну або олигогенну природу.

6.3. Міжвидові й міжпорідні химери. Одержання химер лабораторних ссавців. Першими створеними й генетично ідентифікованими химерами

минулого химери мишей ліній фарбування агути й чорної. Химери були краплистими, причому агути (кремовий колір) і чорний колір дали офарблення, що не зустрічається в жодного виду мишей.

Було доведено, що химеризм може проявлятися не тільки по всім волосяному покриву, але й в окремих волоссях. Так, у химер з пігментованою і непігментованою лінією одні волосся були повністю пігментовані, інші позбавлені пігменту, а треті виявилися плямистими. Для вовни химер агути <-> не агути виявлений різний ступінь проміжної експресії генів, що відповідає, очевидно, волосяним фолікулам з різною часткою складових генотипів.

Якщо химеризм торкається кілька локусів, що впливають на фарбування вовни, то при утворі пігменту виникають фенотипические взаємодії клітинних популяцій. При цьому синтез пігменту визначається генотипом меланоцитів, а розподіл пігменту у волоссі залежить від клітин волосяного фолікула.