

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ КОДИРУЮЩУЮ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ Г-КСФ ЧЕЛОВЕКА С РЕГУЛЯТОРНЫМИ ОБЛАСТЯМИ ГЕНА
β-ЛАКТОГЛОБУЛИНА КРС И РЕПОРТЕРНЫЙ ГЕН EGFP**

Езерский В.А., Колоскова Е.М., Трубицина Т.П., Максименко С.В., Рябых В.П.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных,
Боровск Калужской обл., Российская Федерация*

На основе ранее полученной авторами плазмиды *pβLgGCSF*, содержащей кодирующую последовательность гена гранулоцит-колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) человека под контролем регуляторных элементов гена β-лактоглобулина крупного рогатого скота и плазмиды *pGEMTcmvEGFP*, содержащий ген *EGFP* (модифицированного зелёного флуоресцентного белка) под промотором *cmv* (цитомегаловирус) с сайтом полиаденилирования гормона роста (*BGH polyA site*) КРС, сконструирована рекомбинантная плаزمида *pβLgGCSFcmvEGFP*.

Из плазмиды *pβLgGCSF* по сайту *XbaI* вырезали фрагмент *βLgGCSF*, и после очистки клонировали в гидролизованный по тому же сайту вектор *pBluescript II SK(-)*. Из плазмиды *pGEMTcmvEGFP* рестриктазой *BsmBI (Esp3I)* вырезали и очистили фрагмент *cmv-EGFP-PolyA site BGH (cmvEGFP)*, который клонировали в плазмиду *pβLgGCS* по сайту *NotI*. Конструкция *βLgGCSFcmvEGFP* была вырезана рестриктазой *ClaI* и использована для изучения интеграции трансгена на разных стадиях онтогенеза лабораторных и сельскохозяйственных животных.

Ключевые слова: генно-инженерная конструкция, структурный ген GCSF человека, ген β-лактоглобулина, зелёный флуоресцентный белок

Проблемы биологии продуктивных животных, 2018, 3: 35-44

Введение

Гены казеиновых и сывороточных молочных белков крупного рогатого скота (КРС) широко применяются в биотехнологических исследованиях, связанных с модификацией состава белков молока и при получении трансгенных животных (ТЖ) – продуцентов биологически активных веществ. Регуляторные последовательности этих генов определяют тканеспецифический характер экспрессии в клетках молочной железы (МЖ) и используются в качестве промоторов в генных конструкциях (ГК) при создании животных-продуцентов биологически активных белков. При целенаправленном переносе в геном таких ГК в случае их экспрессии в молочной железе ТЖ вместе с молоком могут выделяться целевые белки. МЖ трансгенных сельскохозяйственных животных в качестве биореактора может стать экономически выгодной альтернативой системам клеточного культивирования для получения фармакологически активных рекомбинантных белков (РБ). Количество РБ в молоке ТЖ может составлять от нескольких миллиграммов до граммов на один литр. Как правило, при создании таких ГК для экспрессии РБ с молоком используют регуляторные районы генов белков молока: α_{s1}-казеина (Ebert et al., 1991; Brem et al., 1994), β-казеина (Ko et al., 2000), β-лактоглобулина (Wright et al., 1991; Whitelaw et al., 1992), кислого сывороточного протеина (Gordon et al., 1987; Devinoy et al., 1994). Регуляторные районы гена β-лактоглобулина овец, коз и КРС часто используют в составе ГК: при включении геномной последовательности α₁-антитрипсина человека (hα₁AT) под контроль промотора гена β-лактоглобулина овцы в

молоке трансгенных овец был достигнут высокий уровень экспрессии РБ: от 1 до 5 мг/мл (Wright et al., 1991). Регуляторные элементы гена β -лактоглобулина КРС были использованы для получения трансгенных мышей и кроликов с экспрессией эритропоэтина человека в молоке (Korhonen et al., 1997).

Г-КСФ человека представляет большой интерес для медицины; этот белок относится к семейству гемопоэтических факторов роста и является одним из физиологических регуляторов, специфически и высокоэффективно стимулирующих пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических предшественников нейтрофилов. Г-КСФ увеличивает продолжительность жизни клеток костного мозга, усиливает функциональную активность зрелых нейтрофилов, используется для лечения анемий различной этиологии, повышает эффективность трансплантации костного мозга (Metcalf, Nicola 1995). Получение Г-КСФ с помощью биотехнологических приёмов началось в 80-х гг. Некоторые колониестимулирующие факторы человека были выделены и очищены из среды, кондиционированной плацентой человека, митоген-индуцированными Т-клетками или клетками опухолевых линий (Nicola et al., 1985; Gasson et al., 1984). Из опухоли ротовой полости человека были получены экспрессирующие чГ-КСФ клеточные линии СНУ-2, продуцирующие высококачественный белок (Nomura et al., 1986). В настоящее время в клинической практике используют препараты рекомбинантного Г-КСФ человека, полученные в системе клеток *Escherichia coli* (филграстим, в США применяется с 1991 г), или в системе клеток яичников китайских хомячков (СНО) (ленограстим, с 1993 г – в Европе и Японии). Гликозилированный ленограстим по сравнению с филграстимом более идентичен природному Г-КСФ. Детальный разбор свойств этих рекомбинантных препаратов приведен в обзоре (Авдеева и др., 2015).

Активно ведутся работы по получению трансгенных животных-биореакторов с геном Г-КСФ человека. В 2000 г. были получены козы с интегрированным геном Г-КСФ человека под промотором гена β -казеина козы (Ko et al., 2000), концентрация РБ в молоке не превышала 50 мкг/мл, и потомства от этих коз получено не было. С 5'-фланкирующей последовательностью гена α_{S1} -казеина КРС (длиной 721 п.н.) была собрана ГК; с её использованием были получены трансгенные мыши, концентрация Г-КСФ человека у которых варьировала от 0,008 до 1000 мкг/мл молока. Относительно короткий промоторный район не гарантировал трансгенных мышей от эктопической экспрессии трансгена, что вызывало нежелательную стимуляцию кроветворения у некоторых из них (Дворянчиков и др., 2005). С использованием ГК, содержащей 5'-регуляторную область гена α_{S1} -казеина козы (3387 п.н., в составе: 1-й экзон и интрон, часть 2-го экзона), и 3'-область гена α_{S1} -казеина КРС (1518 п.н., с некодирующими экзонами 18 и 19) были получены трансгенные мыши (Serova et al., 2012), у которых экспрессия чГ-КСФ была только в молоке. Параллельно с использованием этого же вектора (запатентованного как «pGoatcasGCSF», патент РФ №-2422529, 2010) бразильско-российским коллективом ученых были получены трансгенные по чГ-КСФ козы (Freitas et al., 2012), способные к передаче трансгена потомству, с высоким уровнем РБ в молоке.

Одной из самых больших проблем получения ТЖ является низкий процент интеграции чужеродной ДНК при микроинъекции в пронуклеус зиготы. Особенно важной эта проблема становится при работе с малоплодными крупными с/х животными (козы, овцы, коровы). Применение в составе ГК репортерных систем, подтверждающих наличие трансгена в эмбрионе на предимплантационной стадии, помогает существенно удешевить процесс получения крупных ТЖ. В настоящее время наиболее эффективными репортерными системами для отбора считаются системы с использованием GFP (зеленого флуоресцентного протеина), его модификаций или аналогов. Свойства GFP, впервые выделенного из *Pacific Northwest jellyfish (Aequorea victoria)* и флуоресцирующего при облучении ультрафиолетовым светом, делают его идеальным инструментом при изучении генной экспрессии *in vivo* (Chalfie et al., 1994; Amsterdam et al., 1996). Для флуоресценции GFP не требуются субстрат или

кофакторы (Heim et al., 1994), он термостабилен и устойчив к действию протеаз, не токсичен при использовании его в качестве селекционного маркера у предимплантационных эмбрионов млекопитающих – мышей (Ikawa et al., 1995; Takada et al., 1997; Kato et al., 1999), кроликов (Chrenek, Makarevich, 2011), КРС (Iqbal et al., 2009).

Таким образом, создание ГК, с одной стороны, способных эффективно экспрессировать искомые белки, а с другой – нести маркер интеграции в геном эмбриона в предимплантационный период, является важным этапом в технологии получения ТЖ, продуцирующих с молоком фармакологически ценные белки. Целью нашей работы было создание ГК, содержащей структурный ген Г-КСФ человека с регуляторными элементами гена β -лактоглобулина КРС и ген GFP под цитомегаловирусным промотором в качестве репортерного.

Материал и методы

В работе использовали следующие ферменты и реактивы: FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, 1 ед/мкл; рестриктазы *Bsu15I* (*ClaI*), *BsmBI*, *NotI*, *XbaI* (10 ед/мкл); 10×Buffer Y⁺/ Tango, 10×Buffer O; T4 DNA Ligase (5 ед/мкл), 10×T4 DNA Ligase Buffer (Fermentas, ThermoScientific) <<http://www.thermoscientific.com/fermentas>>.

При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали смесь *dNTP* 2 мМ раствор (Fermentas), Taq-полимеразу 5 ед/мкл, 10×Taq-буфер с 25 мМ MgCl₂ (Силекс). Временные и температурные параметры ПЦР были подобраны в зависимости от структуры праймеров. Последовательности и описание праймеров, использованных в работе, приведены в табл. 1. Праймеры заказывали и синтезировали в ЗАО «Синтол» <<http://www.syntol.ru>>. Процедуру ПЦР проводили на амплификаторе ДНК «Герцик» («ООО ДНК-Технология», Москва).

Трансформацию компетентных клеток *E.coli* Dh5 α и Jm110 проводили по методике и с реагентами набора Transform-Aid Bacterial Transformation Kit. Трансформированные клетки высевали по 10-25 мкл на среду Лурия-Бертани (ЛБ), содержащую 100 мкг/мл ампициллина (Am⁺) и 1,5% агара. Выросшие клоны пересеивали на такую же агаризованную ЛБ-Am⁺ среду. ДНК из клонов для ПЦР-анализа выделяли с помощью лизирующей смеси с протеиназой К. Подходящий клон нарабатывали в 100 мл ЛБ-Am⁺ среды. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit или классическим методом щелочного лизиса.

Качество и количество выделенных плазмид, фрагментов рестрикции оценивали визуально в УФ свете после электрофореза образцов в агарозном геле (АГ). Электрофорез проводили в горизонтальном АГ в $\times 0,5$ Трис-боратном буфере (ТВЕ), pH 8,0, с бромистым этидием, используя набор оборудования фирмы Hoeffer (США). Препаративный электрофорез проводили в $\times 1$ Трис-ацетатном буфере (ТАЕ), pH 8,0, с бромистым этидием. ДНК из АГ выделяли с помощью набора Gene JET Gel Extraction Kit. Размер фрагментов ДНК в АГ оценивали, используя в качестве стандарта DNA Ladder Mix (Fermentas). Расщепление плазмидной ДНК рестриктазами проводили стандартными методами с учетом активности и условий работы каждого фермента, описанных в сертификатах анализа или справочных каталогах (“Fermentas”, “Invitrogen”).

Таблица 1. Последовательности и свойства использованных в работе праймеров

Праймеры	5'-3' последовательность	Направление	Введенный сайт рестрикции
cmvGFPE1	CGTCTCGGGCCAGATATACGCGTT G	F	BsmBI
cmvGFPE2	AGGCCCGAGACGATCGATCAGAAGCCATAGAGCCAC	R	BsmBI, ClaI
β LgE14	AAAGGCCGTGTCTCCAGT	F	
GC7	GATCTCACAGGGGCCCTTG	R	

Результаты и обсуждение

В качестве источника, содержащего структурный ген гранулоцит колониестимулирующего фактора человека с регуляторными областями гена β -лактоглобулина была использована плаزمиды *p β LgGCSF*, ранее созданная в нашей лаборатории на основе плазмиды *pUC18* (Езерский и др., 2007) (рис.1). По результатам рестриктоного анализа сайтов мультиклонирования потенциальных плазмид-векторов и фрагмента *cmvEGFP polyA bGH* для сборки итоговой генной конструкции была выбрана плазмиды *pBluescript II SK(-)*.

Плазмиду *p β LgGCSF* обработали рестриктазой *XbaI* и рестриктную смесь разделили препаративным АГ-электрофорезом (рис. 2.). Полосу, соответствующую фрагменту *5' β Lg-GCSF-3' β Lg* размером 6073 п.н., вырезали. Линейный фрагмент *5' β Lg-GCSF-3' β Lg* выделили из АГ и лигировали с *pBluescript II SK(-)* размером 2061 п.н., предварительно обработанной рестриктазой *XbaI*, дефосфорилированной щелочной фосфатазой и очищенной из АГ после препаративного электрофореза.

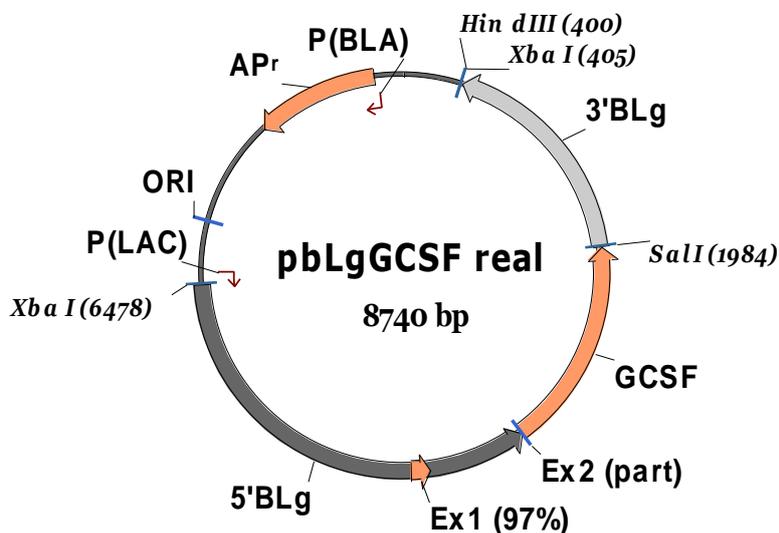


Рис. 1. Плазмиды *p β LgGCSF*, созданная на основе вектора *pUC18*, содержит структурный ген Г-КСФ человека (1486 п.н.) с регуляторными областями гена β -лактоглобулина крупного рогатого скота. 5'-Регуляторная область размером 3002 п.н. включает с себя 1-й экзон и часть 2-го экзона гена β -лактоглобулина, с сохранением рамки считывания для кодирующей последовательности гена рекомбинантного белка; размер 3'-последовательности – 1573 п.н.

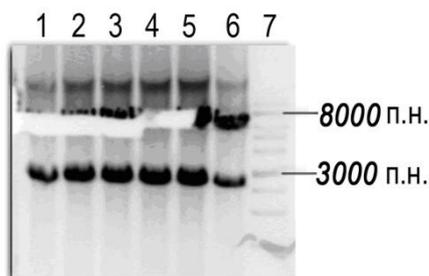


Рис. 2. Препаративный электрофорез плазмиды *p β LgGCSF*, гидролизованной рестриктазой *XbaI*. Вырезан кусок геля, содержащий линеаризированный фрагмент *5' β Lg-GCSF-3' β Lg*. Дор. 7 – маркер молекулярных масс ДНК.

Для лигирования брали 30 нг подготовленной *pBluescript II SK(-)*, 200 нг вставки 5'*βLg-GCSF-3'βLg*, 5 ед. Т4 ДНК лигазы в лигазном буфере (всего 10 мкл). Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки штамма *E. coli* DH5α, подготовленные по стандартной методике. Выросшие на Am⁺ среде клоны проверяли на наличие вставки *βLgGCSF* методом ПЦР с использованием праймеров *βLgE14 – GC7* (табл.1, рис. 3). Ожидаемый размер ампликона – 960 п.н. Один из положительных клонов использовали для наработки плазмиды, названной *pBlu βLgGCSF*.

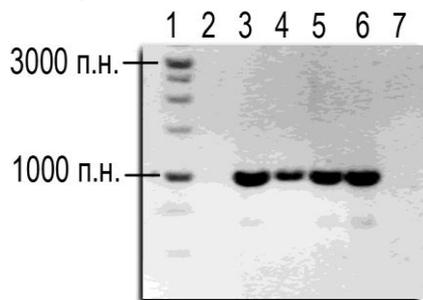


Рис.3. Электрофореграмма ампликонов фрагмента, ограниченного праймерами *βLgE14 –GC7* в 0,8% агарозном геле с 0,5×ТБЕ.

Дор. 1 – маркер молекулярных масс ДНК; 2 – отрицательный контроль (вода); 3 – K⁺ (положительный контроль, *pUC18βLgGCSF*);

4,5 – амплифицированные фрагменты размером 960 п.н.; 6 – контроль ингибирования (K⁺ плюс ДНК образца).

Фрагмент *cmv-EGFP-PolyA site BGH* выделили из ранее полученной авторами промежуточной плазмиды *pGEMTcmvEGFP*, из которой после обработки рестриктазой *BsmBI* (*Esp3I*) выщепляется фрагмент *cmv-EGFP-PolyA site BGH* (*cmvEGFP*) с липкими концами, комплементарными концам, получаемым при гидролизе рестриктазой *NotI*. Рестриктную смесь разделили в препаративном АГ-электрофорезе. Участок геля, содержащий фрагмент размером 1800 п.н., вырезали, выделили и очистили конструкцию *cmvEGFP*.

Плазмиду обработали рестриктазой *NotI*, дефосфорилировали щелочной рестриктазой. Для лигирования использовали 40 нг подготовленной *pBlu βLgGCSF*, 120 нг вставки *cmvEGFP* и 10 ед. Т4 ДНК лигазы в лигазном буфере (всего 10 мкл). Лигазной смесью трансформировали 200 мкл компетентных клеток штамма *E. coli* Jm110. В отличие от штамма DH5α, в штамме Jm110 мутированная аденинметилаза *dam* не метилирует аденин, имеющийся в последовательности GATC, входящей в состав сайтов рестрикции для нескольких рестриктаз. В нашем случае один из сайтов для *ClaI* (положение 8604, рис. 6?), будет разрезаться только в том случае, если он не метилирован. С этой целью и был использован штамм *E.coli* Jm110.

Выросшие на селективной среде клоны проверили на наличие ГК *βLgGCcmvEGFP* методом ПЦР с использованием двух пар праймеров: *βLgE14 –GC7* (размер ампликона 960 п.н.) и *cmvGFPE1 - cmvGFPE2* (1815 п.н.) (рис. 4).

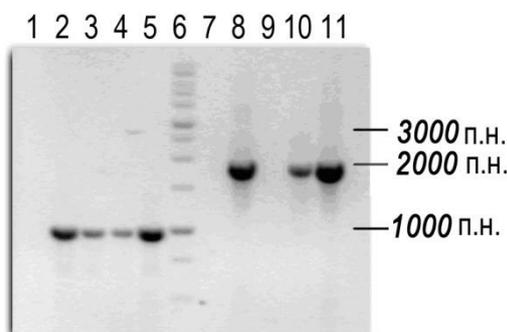


Рис. 4. Электрофореграмма ампликонов фрагментов, ограниченных праймерами *βLgE14 –GC7* (дор. 1-5) и *cmvGFPE1 - cmvGFPE2* (дор. 7-11) в 0,8% агарозном геле с 0,5×ТБЕ.

Дор. 6 – маркер молекулярных масс ДНК; 1,7 – отрицательные контроли; 2,8 – положительные контроли, *βLgGCSF* (2) и *pGEMTcmvEGFP* (8); 5,11 – контроли ингибирования (положительный контроль плюс ДНК образца);

4,10 – клон 2, содержащий ГК.

Клон 2 наработали и выделили плазмиду *βLgGCcmvEGFP*. Гидролиз полученной плазмиды рестриктазой *ClaI* показал, что из неё вырезается фрагмент размером 7919 п.н. (рис.

5А). С использованием препаративной рестрикции с последующим разделением смеси АГ-электрофорезом, участок геля, содержащий ГК, вырезали (рис. 5Б), из него выделили и очистили нуклеотидную последовательность $\beta LgGCcmvEGFP$, содержащую иен Г-КСФ человека под контролем регуляторных элементов гена β -лактоглобулина КРС и ген $EGFP$ под цитомегаловирусным промотором. Схема и описание $p\beta LgGCcmvEGFP$ представлены на рис. 6.

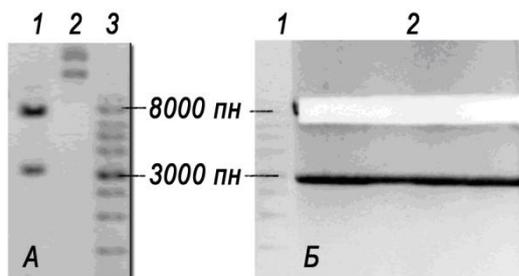


Рис. 5. Электрофореграммы продуктов гидролиза рестриктазой *ClaI* плазмиды $p\beta LgGCcmvEGFP$ (А), препаративной рестрикции и электрофореза (Б). Дор. А3, Б1 – маркер размеров ДНК; дор. А2, Б2 – $p\beta LgGCcmvEGFP$ с рестриктазой *ClaI*; дор. А1 – $p\beta LgGCcmvEGFP$

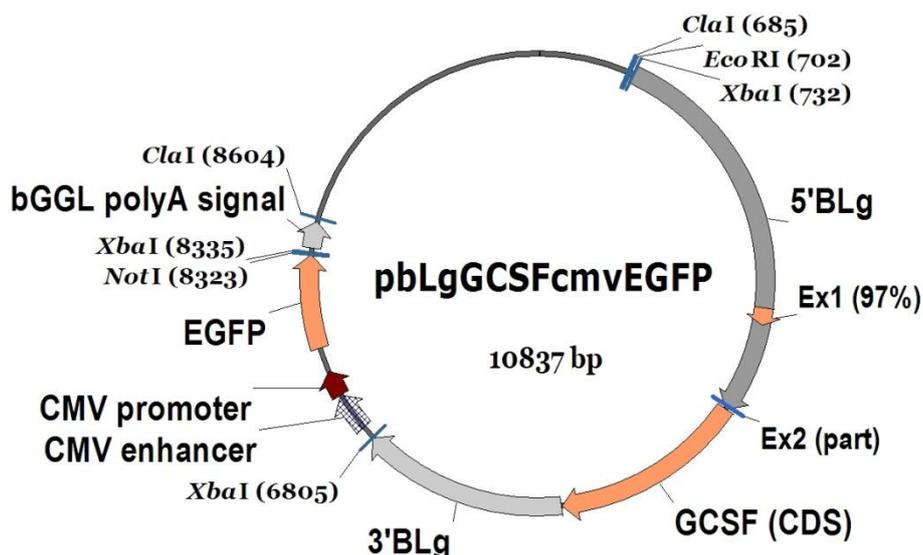


Рис. 6. Плазмида $p\beta LgGCcmvEGFP$, созданная на основе вектора *pBluescript II SK(-)*, содержит структурный ген Г-КСФ человека (1486 п.н.), фланкированный регуляторными областями гена β -лактоглобулина крупного рогатого скота, и репортерный ген $EGFP$ под цитомегаловирусным промотором, терминированный сигналом полиаденилирования бычьего гормона роста.

Заключение

Создана плазмида, из которой рестриктазой *ClaI* вырезается линейная ГК $\beta LgGCcmvEGFP$ размером 7919 п.н., содержащая последовательность гена Г-КСФ человека с регуляторными областями гена β -лактоглобулина КРС (5'- и 3'-фланкирующие последовательности), а в качестве репортерного гена – ген $EGFP$ под цитомегаловирусным промотором, обеспечивающим высокий уровень экспрессии в клетках эукариот. Полученная ГК может быть использована для отбора трансгенных эмбрионов лабораторных и сельскохозяйственных животных на предимплантационной стадии с целью повышения эффективности трансгенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеева Ж.И., Солдатов А.А., Алпатов Н.А., Киселевский М.В., Лысикова С.Л., Бондарев В.П., Медуницын Н.В., Мосягин В.Д., Меркулов В.А., Миронов А.Н. Биоаналоговые (биоподобные) лекарственные препараты рекомбинантного гранулоцит-колониестимулирующего фактора // Оценка качества. Биопрепараты. – 2015. – № 1. – С. 4-14.
2. Дворянчиков Г.А., Серова И.А., Андреева Л.Е., Диас Л.П.Б., Азеведо С., Серов О.Л. Секреция биологически активного гранулоцит колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) человека в молоке трансгенных мышей // Генетика. – 2005. – Т. 41. – С. 1330-1337.
3. Езерский В.А., Иванова Л.Б., Шевченко В.Г. Создание генно-инженерной конструкции, содержащей структурный ген *GCSF* человека под контролем регуляторных элементов гена β -лактоглобулина крупного рогатого скота // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2007. – Т. 1. – С. 123-131.
4. Серова И. А., Дворянчиков Г.А., Андреева Л. Е., Серов О.Л. Генно-инженерная конструкция рGoatcasGCSF, обеспечивающая продукцию гранулоцит-колониестимулирующего фактора человека в молоко трансгенных животных. – Патент RU 2422529C1, 2010.
5. Amsterdam A., Lin S., Hopkins N. The Aequorea Victoria green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos // Dev. Biol. – 1995. – Vol. 171. – P. 123-129.
6. Brem G., Hartl P., Besenfelder U., Wolf E., Zinovieva N., Pfaller R. Expression of synthetic cDNA sequences encoding human insulin-like growth factor-1 (IGF-I) in mammary gland of transgenic rabbits // Gene. – 1994. – Vol. 149. – P. 331-355.
7. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression // Science. – 1994. – Vol. 263. – P. 802-805.
8. Chrenek P., Makarevich A.V. Analysis of transgenic rabbit vitrified embryos carrying EGFP gene // Slovak J. Anim. Sci. // 2011. – Vol. 44. – No. 1. – P. 1-5.
9. Devinoy E., Thepot D., Stinnakre M.-G., Fontaine M.-L., Grabowski H., Puissant C., Pavirani A., Houdebine L.-M. High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland // Transg. Res. – 1994. – Vol. 3. – No. 2. – P. 79-89.
10. Ebert K.M., Selgrath J.P., DiTullio P., Gordon K. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression // Bio/Technol. – 1991. – Vol. 9. – P. 835-838.
11. Freitas V.J.F., Serova I.A., Moura R.R., Andreeva L.E., Melo L.M., Teixeira D.I.A., Pereira A.F., Lopes-Jrd E.S., Diase L.P.B., Nunes-Pinheirof D.C.S., Sousa F.C., Albutara-Neto A.S., Albuquerque E.S., Melo C.H.S., Rodrigues V.H.V., Batista R.I.T., Dvoryanchikov G.A., Serov O.L. The establishment of two transgenic goat lines for mammary gland hG-CSF expression // Small Ruminant Research. – 2012. – Vol. 105. – P. 105-113.
12. Gasson J.C., Weisbart R.H., Kaufman S.E., Clark S.C., Hewick R.M., Wong G.G., Golde D.W. Purified human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: direct action on neutrophils // Science. – 1984. – Vol. 226. – No. 4680. – P. 1339-1342.
13. Gordon K., Lee E., Vitale J.A., Smith A.E., Westphal H., Hennighausen L. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk // Nature Biotechn. – 1987. – Vol., 5. – P. 1183-1187. DOI: 10.1038/nbt1187-1183
14. Heim R., Prasher D.C., Tsien R.Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1994. – Vol. 91. – P. 12501-12504.
15. Ikawa M., Kominami K., Yoshimura Y., Tanaka K., Nishimune Y., Okabe M. A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP) // FEBS Lett. – 1995. – Vol. 375. – P. 125-128.
16. Iqbal K., Barg-Kues B., Broll S., Bode J., Niemann H., Kues W.A. Cytoplasmic injection of circular plasmids allows targeted expression in mammalian embryos // BioTechniques. – 2009. – Vol. 47. – P. 959-968. DOI: 10.2144/000113270
17. Kato M., Yamanouchi K., Ikawa M., Okabe M. Efficient selection of transgenic mouse embryos using EGFP as a marker gene // Mol. Reprod. Dev. – 1999. – Vol. 54. – P. 43-48.
18. Ko J.H., C.-S. Lee, K.H. Kim, M.-G. Pang, J. Koo. Production of biologically active human granulocyte colony stimulating factor in the milk of transgenic goat // Transgenic Research. – 2000. – Vol. 9. – P. 215-222.

19. Korhonen V.P., Tolvanen M., Hyttinen J.M., Uusi-Oukari M., Sinervirta R., Alhonen L., Jauhiainen M., Janne O.A., Janne J. Expression of bovine beta-lactoglobulin/human erythropoietin fusion protein in the milk of transgenic mice and rabbits // *Eur. J. Biochem.* – 1997. – Vol. 245. – P. 482-489
20. Metcalf D., Nicola N.A. The hematopoietic colony-stimulating factor // In: *From Biology to Clinical Applications.* – Cambridge: Cambridge University Press. – 1995. – P. 44-55.
21. Nicola N.A., Begley C.G., Metcalf D. Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukaemic cells // *Nature.* – 1985. – Vol. 314. – No. 6012. – P. 625-628.
22. Nomura H., Imazeki I., Oheda M., Kubota N., Tamura M., Ono M., Ueyama Y., Asano S. Purification and characterization of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) // *EMBO J.* – 1986. – Vol. 5. – P. 871-876.
23. Serova I.A., Dvoryanchikov G.A., Andreeva L.E., Burkov I.A., Dias L.P., Battulin N.R., Smirnov A.V., Serov O.L. A 3,387 bp 50-flanking sequence of the goat alpha-S1-casein gene provides correct tissue-specific expression of human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) in the mammary gland of transgenic mice // *Transgenic Res.* – 2012. – Vol. 21. – P. 485-498.
24. Takada T., Iida K., Awaji T., Itoh K., Takahashi R., Shibui A., Yoshida K., Sugano S., Tsujimoto G. Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker // *Nat. Biotechnol.* – 1997. – Vol.15. – P. 458-461.
25. Whitelaw, C.B., Harris, S., McClenaghan, M., Simons, J.P. and Clark, A.J. Position-independent expression of the ovine beta-lactoglobulin gene in transgenic mice // *Biochem. J.* – 1992. – Vol. 286. – P. 31-39.
26. Wright G., Carver A., Cottom D., Reeves D., Scott A., Simons P., Wilmut I., Garner I., Colman A. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep // *Biotechnology (NY).* – 1991. – Vol. 9. – P. 830-834.

REFERENCES

1. Amsterdam A., Lin S., Hopkins N. The Aequorea Victoria green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev. Biol.* 1995, 171: 123-129.
2. Avdeeva Zh.I., Soldatov A.A., Alpatova N.A., Kiselevskii M.V., Lysikova S.L., Bondarev V.P., Medunitsyn N.V., Mosyagin V.D., Merkulov V.A., Mironov A.N. [Bioanalogic (bio-like) drugs of recombinant granulocyte-colony-stimulating factor]. *Otsenka kachestva. Biopreparaty - Quality control. Biopreparations.* 2015, 1: 4-14. (In Russian)
3. Brem G., Hartl P., Besenfelder U., Wolf E., Zinovieva N., Pfaller R. Expression of synthetic cDNA sequences encoding human insulin-like growth factor-1 (IGF-I) in to mammary gland of transgenic rabbits. *Gene.* 1994, 149: 331-355.
4. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 1994, 263: 802-805.
5. Chrenek P., Makarevich A.V. Analysis of transgenic rabbit vitrified embryos carrying EGFP gene. *Slovak J. Anim. Sci.* 2011, 44(1): 1-5.
6. Devinoy E., Thepot D., Stinnakre M.-G., Fontaine M.-L., Grabowski H., Puissant C., Pavirani A., Houdebine L.-M. High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland. *Transg. Res.* 1994, 3(2): 79-89.
7. Dvoryanchikov G.A., Serova I.A., Andreeva L.E., Dias L.P.B., Azevedo S., Serov O.L. [Secretion of biologically active granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in human milk of transgenic mice]. *Genetika – Genetics.* 2005, 41: 1330-1337. (In Russian)
8. Ebert K.M., Selgrath J.P., DiTullio P., Gordon K. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Bio/Technol.* 1991, 9: 835-838.
9. Ezerskii V.A., Ivanova L.B., Shevchenko V.G. [Creation of a genetic engineering structure containing the human GCSF structural gene under the control of the regulatory elements of the cattle β -lactoglobulin gene]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology.* 2007, 1: 123-131. (In Russian)
10. Freitas V.J.F., Serova I.A., Moura R.R., Andreeva L.E., Melo L.M., Teixeira D.I.A., Pereira A.F., Lopes-Jrd E.S., Diase L.P.B., Nunes-Pinheirof D.C.S., Sousa F.C., Alcântara-Neto A.S., Albuquerque E.S., Melo C.H.S., Rodrigues V.H.V., Batista R.I.T., Dvoryanchikov G.A., Serov O.L. The establishment of two

- transgenic goat lines for mammary gland hG-CSF expression. *Small Ruminant Research*. 2012, 105: 105-113.
11. Gasson J.C., Weisbart R.H., Kaufman S.E., Clark S.C., Hewick R.M., Wong G.G., Golde D.W. Purified human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: direct action on neutrophils. *Science*. 1984, 226(4680): 1339-1342.
 12. Gordon K., Lee E., Vitale J.A., Smith A.E., Westphal H., Hennighausen L. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Nature Biotechnol.* 1987, 5: 1183-1187. DOI: 10.1038/nbt1187-1183
 13. Heim R., Prasher D.C., Tsien R.Y. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994, 91: 12501-12504.
 14. Ikawa M., Kominami K., Yoshimura Y., Tanaka K., Nishimune Y., Okabe M. A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP). *FEBS Lett.* 1995, 375: 125-128.
 15. Iqbal K., Barg-Kues B., Broll S., Bode J., Niemann H. and Kues W.A. Cytoplasmic injection of circular plasmids allows targeted expression in mammalian embryos. *BioTechniques*. 2009, 47: 959-968. DOI: 10.2144/000113270
 16. Kato M., Yamanouchi K., Ikawa M., Okabe M. Efficient selection of transgenic mouse embryos using EGFP as a marker gene. *Mol. Reprod. Dev.* 1999, 54: 43-48.
 17. Ko J.H., C.-S. Lee, K.H. Kim, M.-G. Pang, J. Koo. Production of biologically active human granulocyte colony stimulating factor in the milk of transgenic goat. *Transgenic Research*. 2000, 9: 215-222.
 18. Korhonen V.P., Tolvanen M., Hyttinen J.M., Uusi-Oukari M., Sinervirta R., Alhonen L., Jauhiainen M., Janne O.A., Janne J. Expression of bovine beta-lactoglobulin/human erythropoietin fusion protein in the milk of transgenic mice and rabbits. *Eur. J. Biochem.* 1997, 245: 482-489.
 19. Metcalf D., Nicola N.A. The hematopoietic colony-stimulating factor. In: *From Biology to Clinical Applications*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995, P. 44-55.
 20. Nicola N.A., Begley C.G., Metcalf D. Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukaemic cells. *Nature*. 1985, 314(6012): 625-628.
 21. Nomura H., Imazeki I., Oheda M., Kubota N., Tamura M., Ono M., Ueyama Y., Asano S. Purification and characterization of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *EMBO J.* 1986, 5: 871-876.
 22. Serova I.A., Dvoryanchikov G.A., Andreeva L.E., Burkov I.A., Dias L.P., Battulin N.R., Smirnov A.V., Serov O.L. A 3,387 bp 50-flanking sequence of the goat alpha-S1-casein gene provides correct tissue-specific expression of human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) in the mammary gland of transgenic mice. *Transgenic Res.* 2012, 21: 485-498.
 23. Takada T., Iida K., Awaji T., Itoh K., Takahashi R., Shibui A., Yoshida K., Sugano S., Tsujimoto G. Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. *Nat. Biotechnol.* 1997, 15: 458-461.
 24. Whitelaw, C.B., Harris, S., McClenaghan, M., Simons, J.P., Clark, A.J. Position-independent expression of the ovine beta-lactoglobulin gene in transgenic mice. *Biochem. J.* 1992, 286: 31-39.
 25. Wright G., Carver A., Cottom D., Reeves D., Scott A., Simons P., Wilmut I., Garner I., Colman A. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology (NY)*. 1991, 9: 830-834.

Genetic engineering structure comprising a coding sequence of human G-CSF with the regulatory regions of bovine β -lactoglobulin gene and reporter gene EGFP

Ezerskii V.A., Koloskova E.M., Trubitsina T.P., Maksimenko S.V., Ryabykh V.P.,

*Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition, Borovsk,
Kaluga oblast, Russian Federation*

ABSTRACT. On the basis of previously obtained *p β LgGCSF* plasmid containing the coding sequence of the gene human granulocyte-colony stimulating factor (*G-CSF*) under the control of regulatory elements of the bovine β -lactoglobulin gene and *pGEMTcmvEGFP* plasmid, containing the gene for *EGFP* (modified green fluorescent protein) under the promoter *cmv* (cytomegalovirus) and the bovine growth hormone polyadenylation site (*BGH polyA site*), recombinant plasmid *p β LgGCSFcmvEGFP* was designed.

From the *p β LgGCSF* plasmid on the *XbaI* site a *β LgGCSF* fragment was cut out, which after purification was cloned into a vector *pBluescript II SK(-)* hydrolyzed on the same site. From *pGEMTcmvEGFP* plasmid with *BsmBI (Esp3I)* restrictases the fragment *cmv-EGFP-BGH PolyA site (cmvEGFP)* was cut and purified, which was cloned in plasmid *p β LgGCS* on the site *NotI*. The *β LgGCSFcmvEGFP* construction was cut with *ClaI* restrictase and used to study the integration of transgene at different stages of ontogenesis of laboratory and farm animals.

Keywords: genetic engineering structure, human GCSF structural gene, bovine β -lactoglobulin gene, green fluorescent protein

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2018, 3: 35-44.

Поступило в редакцию: 12.08.2018

Получено после доработки: 29.08.2018

Езерский Вадим Александрович, с.н.с., тел. 9066425992, e-mail: ez.vadim@yandex.ru
Колоскова Елена Михайловна, к.б.н., с.н.с., тел. 9105909283, e-mail: heleko3@yandex.ru
Трубицина Татьяна Петровна, к.б.н., с.н.с., тел. 9066411572, e-mail: trubitsina.tp@yandex.ru
Максименко Сергей Васильевич, к.б.н., с.н.с., тел. 9066450252, e-mail: vx136@rambler.ru
Рябых Владимир Павлович, д.б.н., зав. лаб., тел. 9605157960, e-mail: vladimirryabykh@rambler.ru