

ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕГРАЦИИ В ГЕНОМ ЭМБРИОНОВ КРОЛИКОВ ГЕНО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ, СОСТОЯЩЕЙ ИЗ ЦЕЛЕВОГО И МАРКЕРНОГО ГЕНОВ

Белова Надежда
аспирант, м.н.с. лаборатории
клеточной и генной инженерии,
ВНИИФБиП животных, г.Боровск

Выполнено в соответствии с тематикой ГЗ 0600-2018-0017: «Исследование молекулярно-биологических аспектов биоинженерных технологий для совершенствования генетических ресурсов и создания новых селекционных форм сельскохозяйственных животных и птицы»

Получение трансгенных кроликов микроинъекцией линейной генно-инженерной конструкции в зиготы

Микроинъекция
ДНК в зиготу



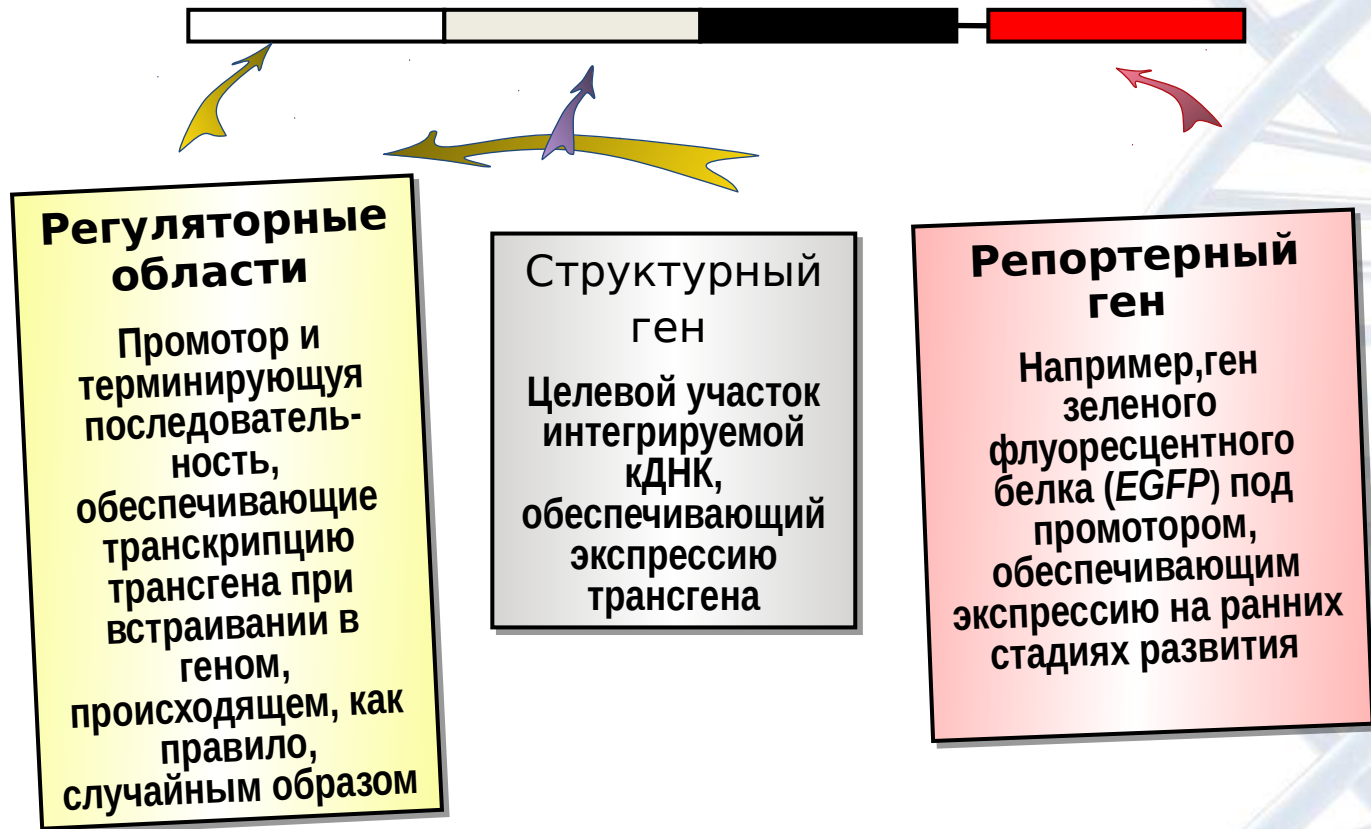
2% полученных
трансгенных животных
от количества
пересаженных
микроинъекцированных
эмбрионов



Трансгенное
животное



Генно-инженерная конструкция, включающая репортерный и селективный гены



Плазмида pas1Lf

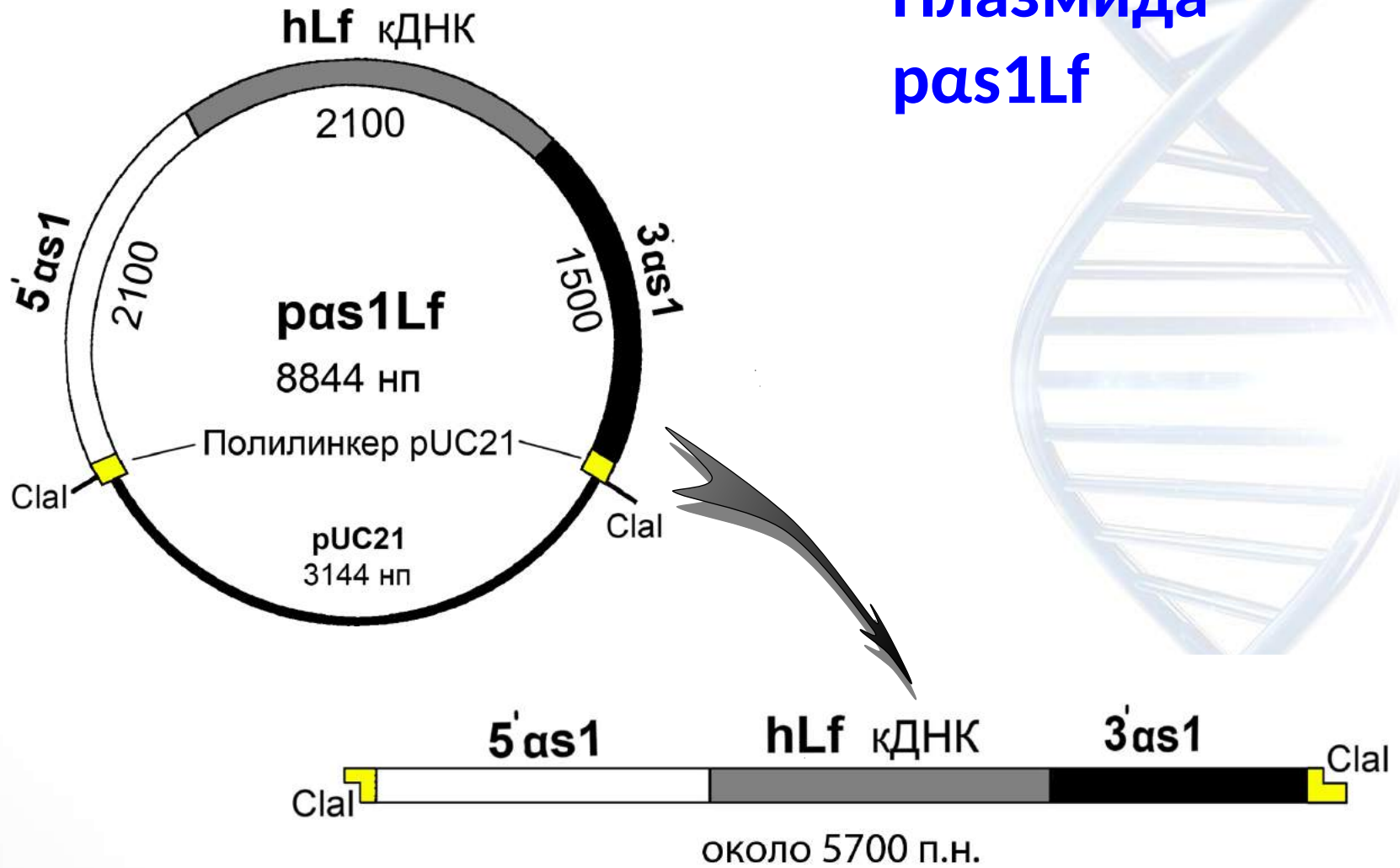
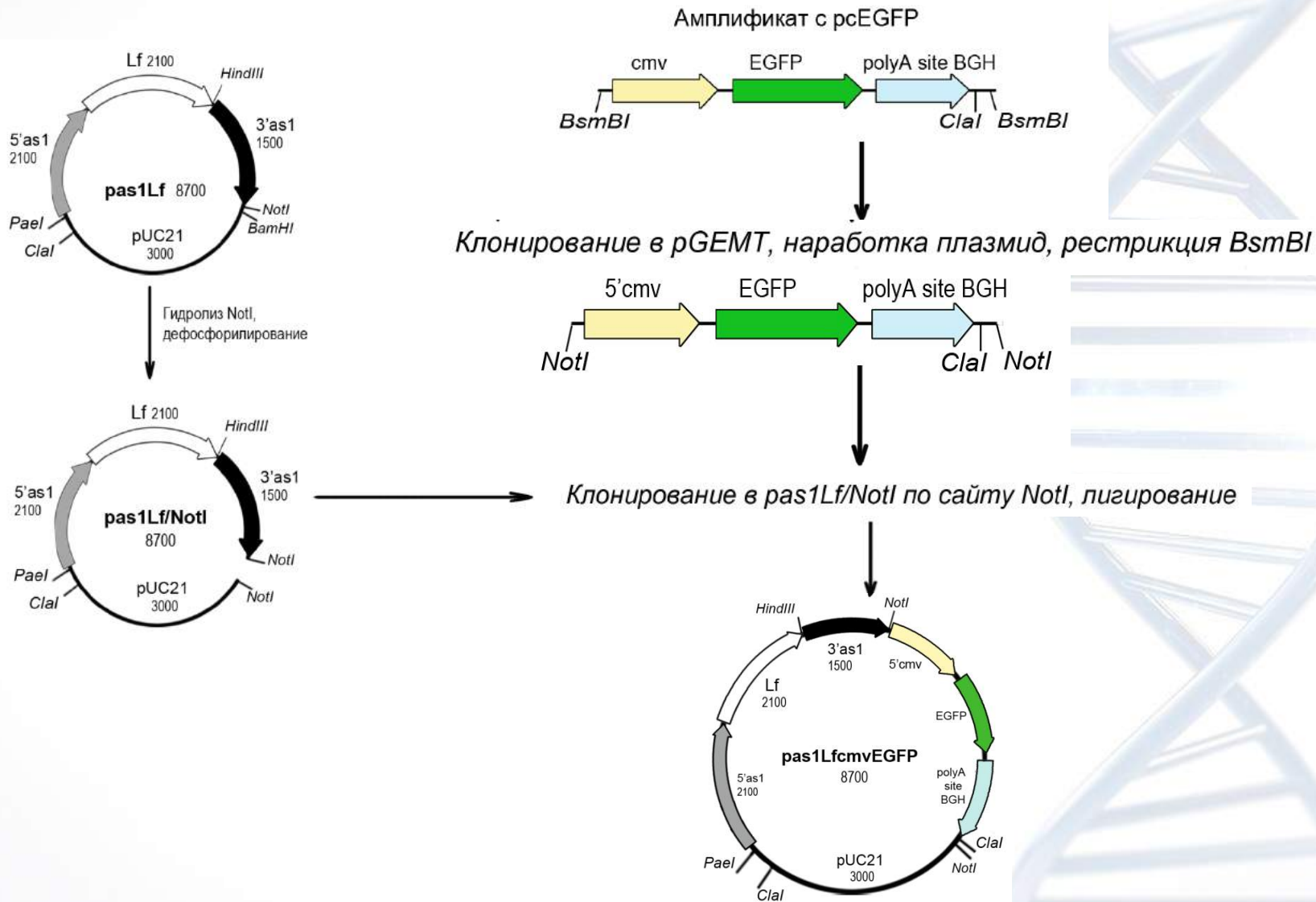
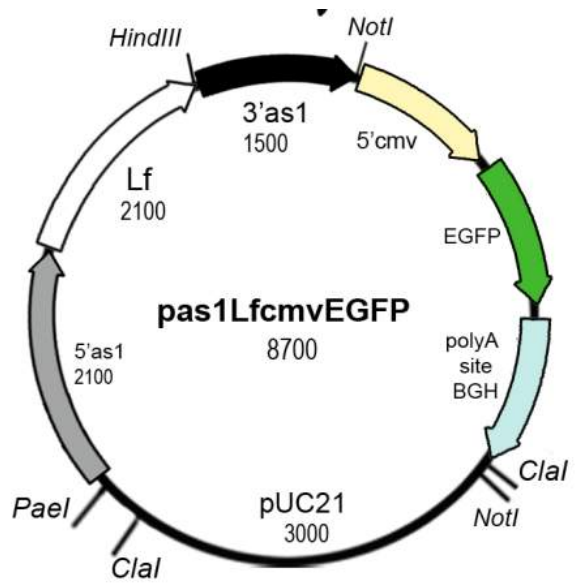
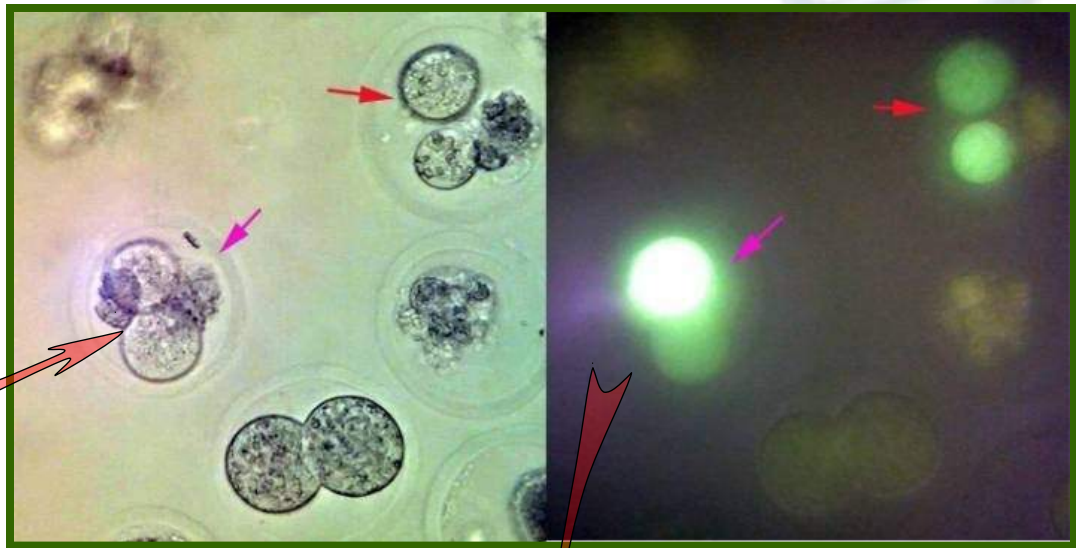


Схема получения рекомбинантной плазмиды на основе pas1Lf, несущей репортерный ген EGFP.



Отбор трансгенных бластоцист методом флуоресцентной микроскопии

Микроинъекция ДНК в зиготу



Отбор и трансплантация трансгенного эмбриона

Трансгенное животное

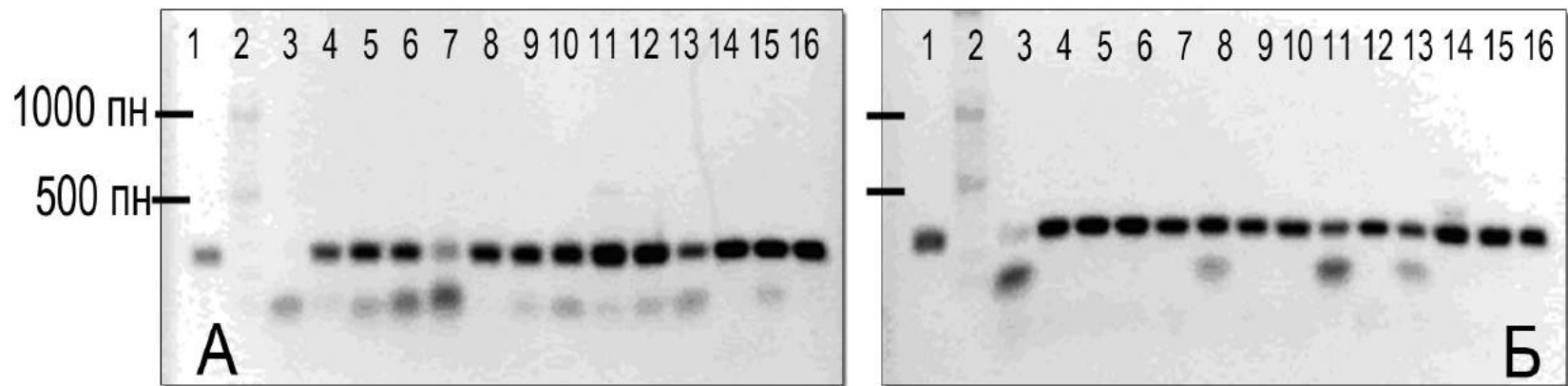
ПЦР-проверка бластоцист кроликов на конструкцию α s1LfcmvGFP

Состав лизирующего буфера для кроличьих бластоцист

№	Компонент буфера (исходный)	Неполный буфер (наш)
1	Протеиназа К, 125 мкг/мл	+
2	Трис-НСI, рН8,3, 100мМ	+
3	КСI, 100 мМ	+
4	Желатин, 0,02%	-
5	Твееп 20, 0,45%	+
6	Дрожжевая тРНК, 60 мкг/мл	-

Проверка возможности ПЦР-амплификации геномной ДНК ограниченного количества клеток.

Подбор условий для ПЦР лизатов кроличьих бластоцист с использованием праймеров 228а-б.



1 (А,Б) – К⁺ (ДНК кролика);

2 (А,Б) – маркер масс ДНК;

3 (А,Б) – вода;

4-16 (А,Б) – ПЦР лизатов кроличьих бластоцист
(в количестве от 1 до 16 мкл на реакцию)

Подбор условий лизиса бластоцист и проведения ПЦР показал достаточное количество геномной ДНК в бластоцисте для анализа.

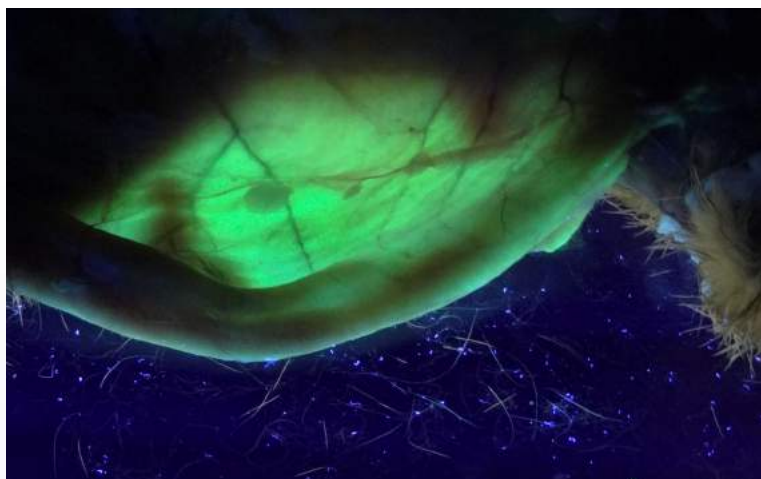
**Проверка бластоцист на наличие трансгена
методами флуоресцентной микроскопии и ПЦР-
анализа**

Проверен о бластоцист всего	Светилось в УФ		Положитель ны по генам EGFP и hLf		Положитель ны только по гену EGFP		Положитель ны только по гену hLf	
	n	%	n	%	n	%	n	%
42	7	17	22	52	1	2	3	7

Проверка бластоцист кроликов с использованием праймеров GFPE1/GFRE2^{750пн} и рестриктазы DpnI

Всего	Светились в УФ		Положительная ПЦР	
	n	%	n	%
80	19	24	24	30

Кролик со встроенной конструкцией $\alpha 1\text{LfcmvGFP}$



Спасибо за внимание!

