

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНТЕГРАЦИИ ТРАНСТЕНА В ГЕНОМ КРОЛИКОВ НА СТАДИИ ЭМБРИОНОВ

Белова Н.В., Кутык И.В., Езерский В.А., Максименко С.В., Трубицкая Т.П., Колоскова Е.М., Рыбых В.П.

Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «ФНЦ животноводства – ВНИИ имени Л.К. Эрнста» в Воронеж, Капунская обл., 249013

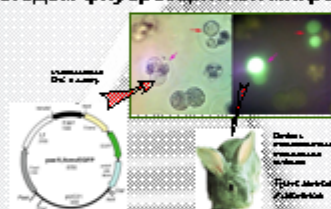
E-mail: navikbel@mail.ru

Создание трансгенных животных до сих пор остается трудоемким и дорогостоящим процессом. Особенно это касается малоплодных крупных сельскохозяйственных животных. Одной из основных проблем является низкий процент интеграции чужеродной ДНК при микроинъектировании. Можно повысить эффективность технологии, если подсаживать самкам-реципиентам заведомо трансгенные эмбрионы. Этого можно добиться, в том числе, используя, помимо целевого гена, репортерные гены во встраиваемой генно-инженерной конструкции (ГИК).

Для осуществления возможности визуального определения ПТ эмбрионов в нашей лаборатории была создана ГИК, содержащая кДНК лактоферрина человека (hLf) под контролем регуляторных последовательностей гена α SI-казеина крупного рогатого скота (α SI-C₁) и репортерный экспрессирующий ген зеленого белка под цитомегаловирусным промотором (*cmv-EGFP*) - (α SI-C₁-hLf-cmv-EGFP).

Полученная ГИК содержит два основных гена - целевой и репортерный. Для проверки эффективности встраивания ГИК на стадии эмбрионов проверялась двумя методами - флуоресцентной микроскопией и ПЦР-анализа.

Определение трансгенных эмбрионов методом флуоресцентной микроскопии



Проверено blastocист всего	Состлился в УФ		Положительны по генам EGFP и hLf		Положительны только по гену EGFP		Положительны только по гену hLf	
	ч	%	ч	%	ч	%	ч	%
42	7	17	22	52	1	2	3	7

Так как под флуоресцентным микроскопом свечение наблюдалось только у 17% blastocист, а ПЦР-анализ показал положительные результаты в 52% случаев, было принято решение произвести дополнительную обработку эмбрионов для исключения ложноположительных результатов, которые могли возникнуть при сокращении неинтегрированной ГИК.

На втором этапе экспериментов для исключения ложноположительных результатов лизаты blastocист были обработаны рестриктазой DpnI, разрезающей последовательность GATC с метилированным аденином. Так как большинство штаммов E. coli содержат Дам-метилтрансферазу, лизаты, нарабатываемые в таких штаммах, и следовательно, ГИК содержат в своем составе метилированный аденин. В отличие от бактерий, в клетках эукариот аденин не метилируется. В случае интеграции генной конструкции в геномную ДНК эмбриона, и последующей репликацией трансгена аденин не метилируется. Напротив, неинтегрированная конструкция несет в своем составе метилированный аденин. EGFP фрагмент генной конструкции содержит два сайта для DpnI, и после обработки рестриктазой ПЦР-амплификация должна осуществляться только интегрированной в геном конструкции.

По этой методике было проверено 80 blastocист, из которых, при предварительном анализе методом флуоресцентной микроскопии, свечение было обнаружено в 19 (24%) случаях. ПЦР-анализ после обработки рестриктазой показал 24 (30%) положительных результата, что, в целом, сопоставимо с результатами визуализации.

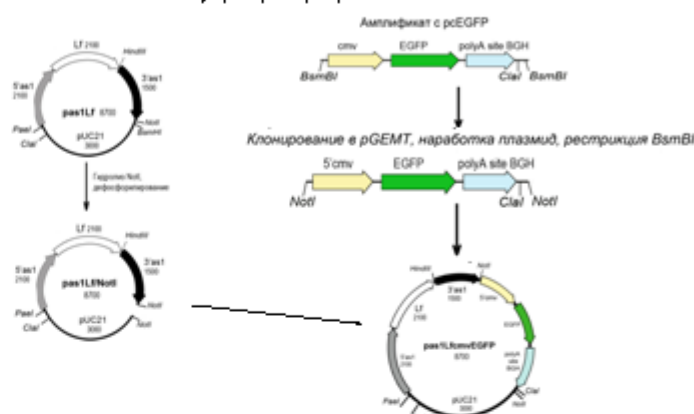
Всего	Состлился в УФ		Положительная ПЦР	
	ч	%	ч	%
80	19	24	24	30

Выводы.

Проведенные исследования подтверждают эффективность определения интеграции трансгена, содержащего репортерный экспрессирующий ген зеленого белка в геном кролика методом флуоресцентной микроскопии. Этот метод может успешно использоваться уже на ранних стадиях развития эмбрионов сельскохозяйственных животных.

При использовании данной ГИК были получены жизнеспособные трансгенные животные, содержащие гены hLf и EGFP.

Схема получения рекомбинантной плазмиды на основе *pac1LacI*, несущей репортерный ген EGFP



Праймеры использованные для ПЦР-анализа эмбрионов

№	Праймер	5' - 3' последовательность	Базовый сайт
1	Z28a (F)	GGGCGAAGCCAGTAGATAGAA	Микрогенетический участок, кодирующий ДНК
2	Z28a (R)	CAAAAATAGGACCCCTGTACT	
3	GFPE1 (F)	AGCCAAATAGGCGAGAGAGCCGAGGAGCGTGT	Репортерный ген зеленого белка EGFP
4	GFPE1 (R)	AGACCGAGCCGCGCCCTTACTGTGACAGCCGC	
5	L16 (R)	AACACAGCGCGCCAGAGAGAC	кДНК лактоферрина человека hLf
6	L16 (F)	TATGAGAGAGACCGCTGG	

На первом этапе экспериментов было проверено 42 эмбриона кролика. При облучении ультрафиолетом свечение было визуализировано в 7 (17%) случаях. Затем была проведена проверка эмбрионов методом ПЦР-анализа праймерами соответствующими генам EGFP и hLf. Положительный результат одновременно по обоим генам был выявлен в 22 (52%) случаях. Также в 1 (2%) случае определилось только наличие гена EGFP, и в 3 (7%) случаях - только наличие гена hLf. Это говорит о том, что в 9% случаев ГИК распадалась на составляющие фрагменты. Полностью отрицательный результат, соответственно был в 16 (38%) случаях. При этом 7 светящихся blastocист при ПЦР-анализе показали полностью положительный результат, что говорит об эффективном встраивании трансгена в данном случае.

