

# ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ФЛАНКИРУЮЩИЕ ОБЛАСТИ ГЕНОВ МОЛОЧНЫХ БЕЛКОВ В НОВЫХ ГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ

Белова Надежда Викторовна  
м.н.с. лаборатории клеточной  
и геной иинженерии,  
ВНИИФБиП животных,  
г.Боровск

Саратов - 2018

# Использование сельскохозяйственных ЖИВОТНЫХ

Продукты  
питания

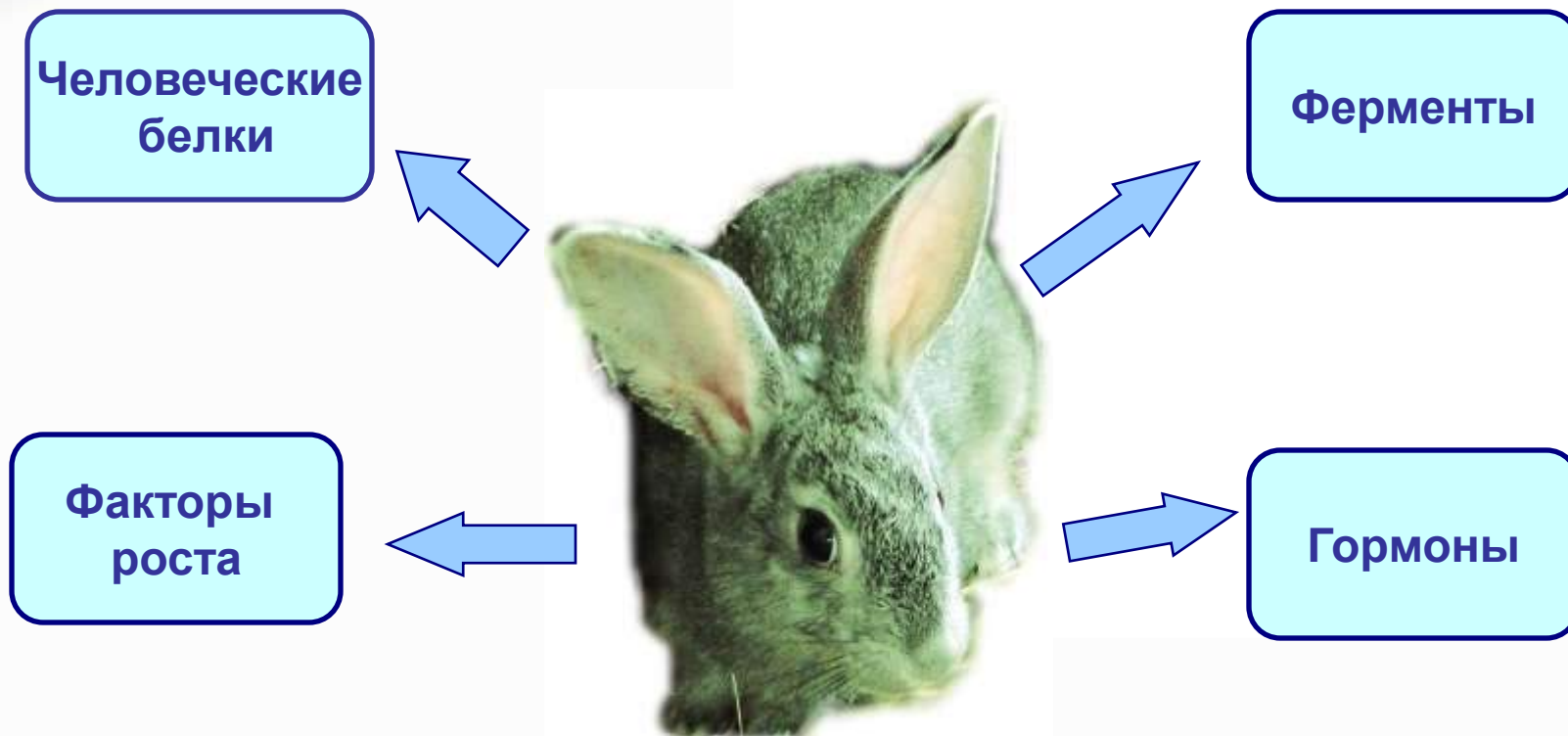
Производственное  
сырье

Транспорт

Удобрение



## Использование трансгенных сельскохозяйственных животных



*Трансгенное  
животное*

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»

**усиливает  
антитело-зависимую  
клеточную  
цитотоксическую  
активность**

**Лактоферрин**

**подавляет рост  
ряда патогенных  
бактерий**

**инициирует  
активность  
киллерных клеток**

**Источник железа**

**противовоспалительное  
действие**

**Уменьшает  
токсичность  
химиотерапии**

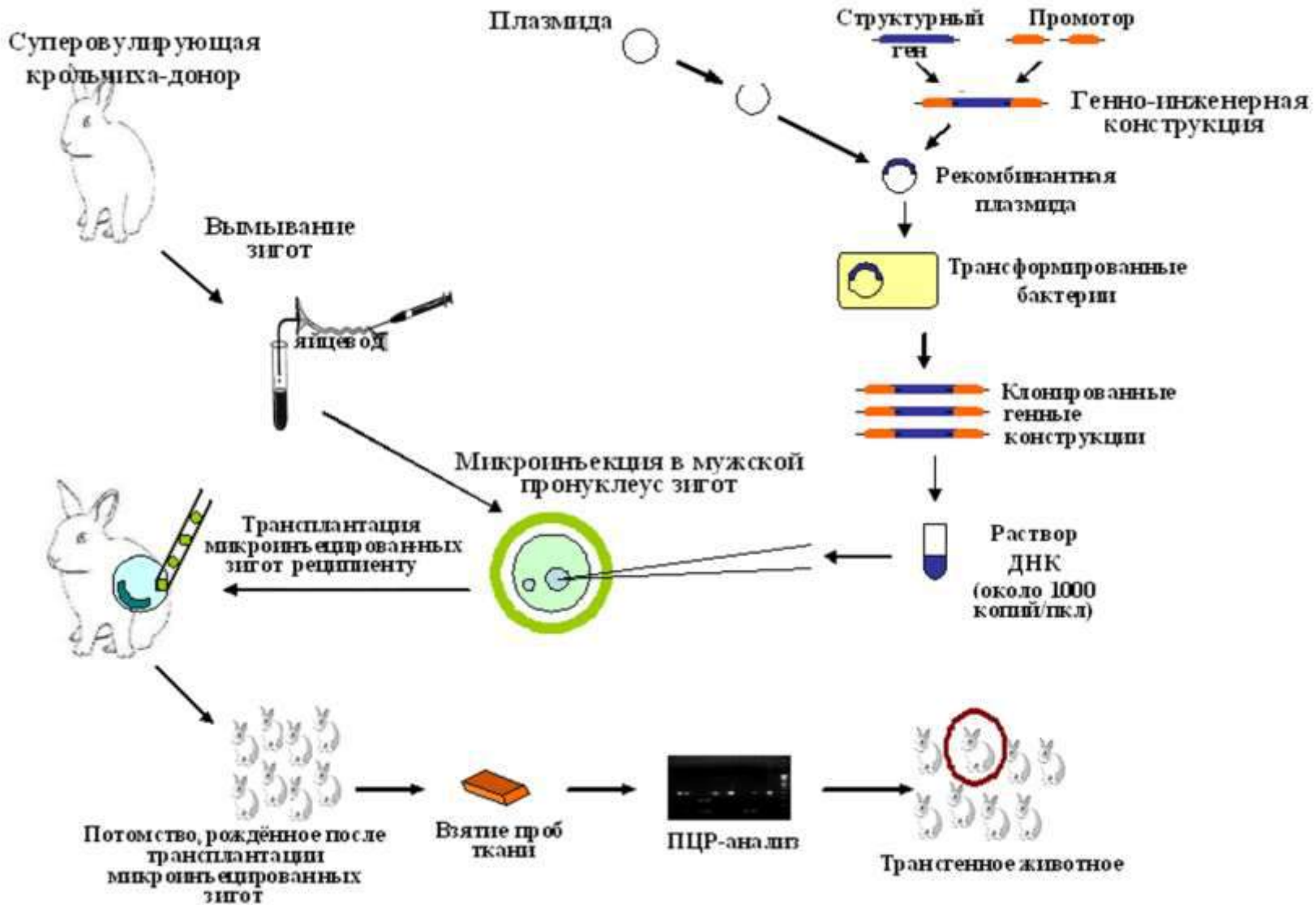
**Г-КСФ**

**Восстановление  
кроветворения**

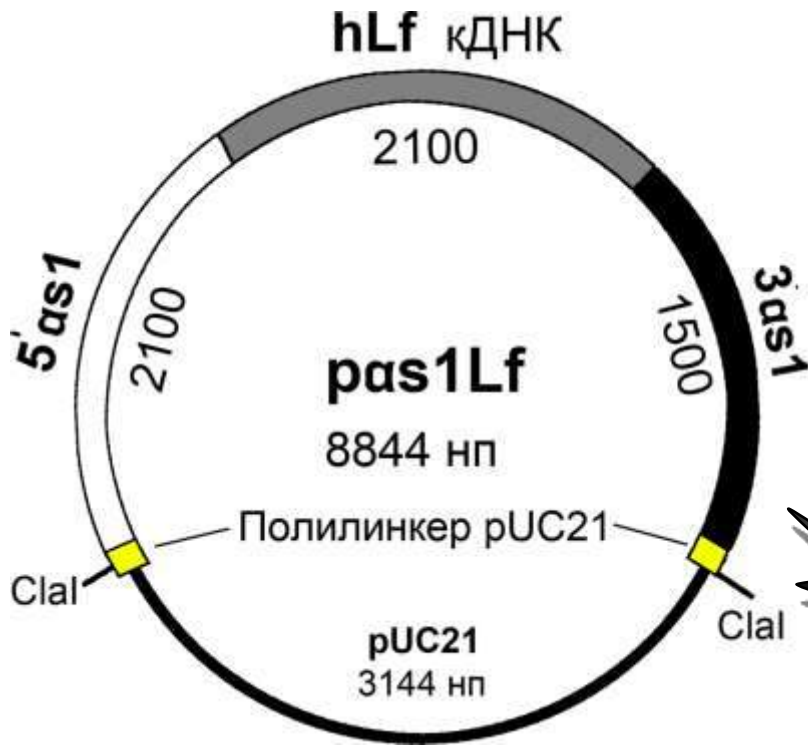
**Стимулирует рост  
клеток костного мозга**



# Принципиальная схема биотехнологии получения трансгенных животных



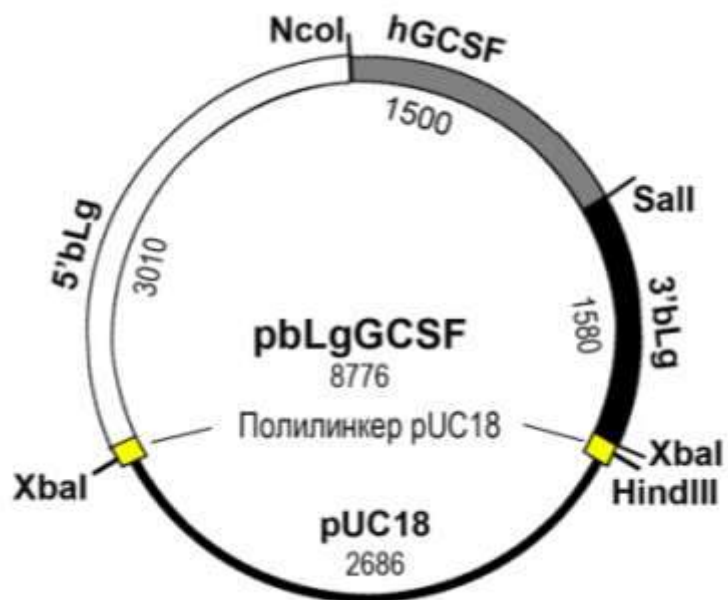
# Плазмида $\rho\alpha s1Lf$



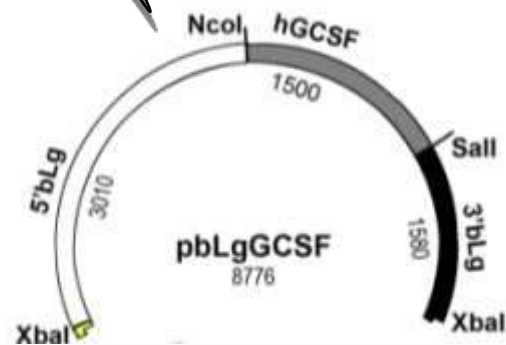
Рестрикция  $Clal$ ,  
разделение  
в агарозном геле,  
очистка



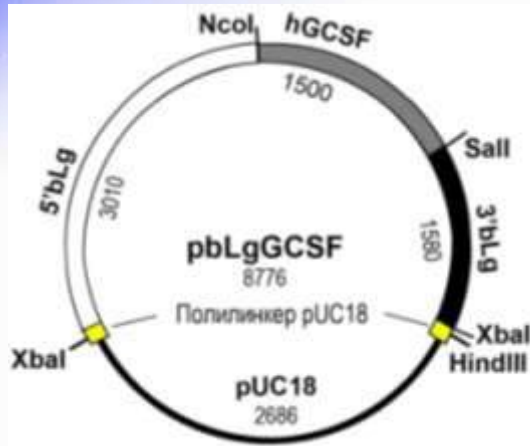
## Плазмида pbLgGCSF



Рестрикция XbaI,  
разделение  
в агарозном геле,  
очистка



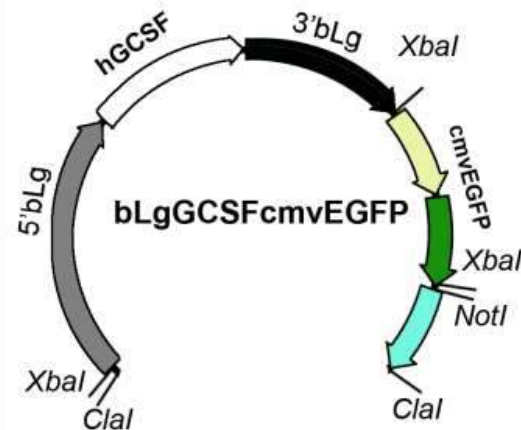
# Получение ГИК bLgGCSFcmvEGFP с репортерным геном



Гидролиз XbaI,  
дефосфорелирование



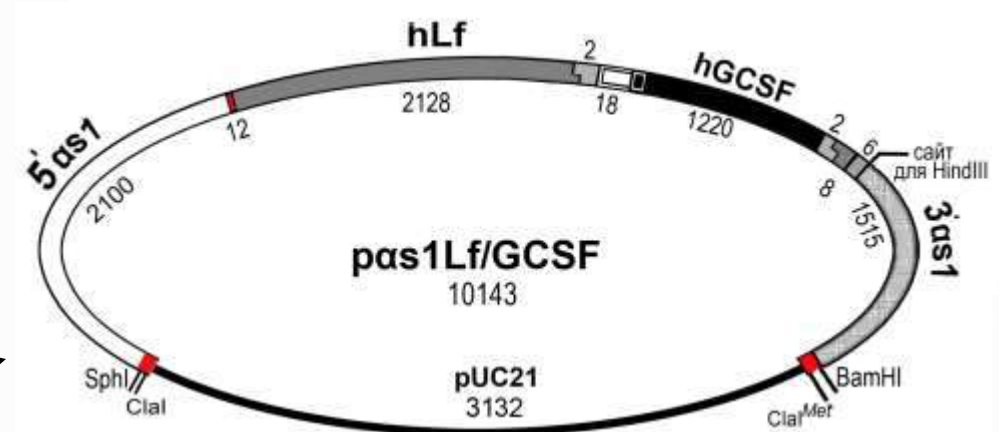
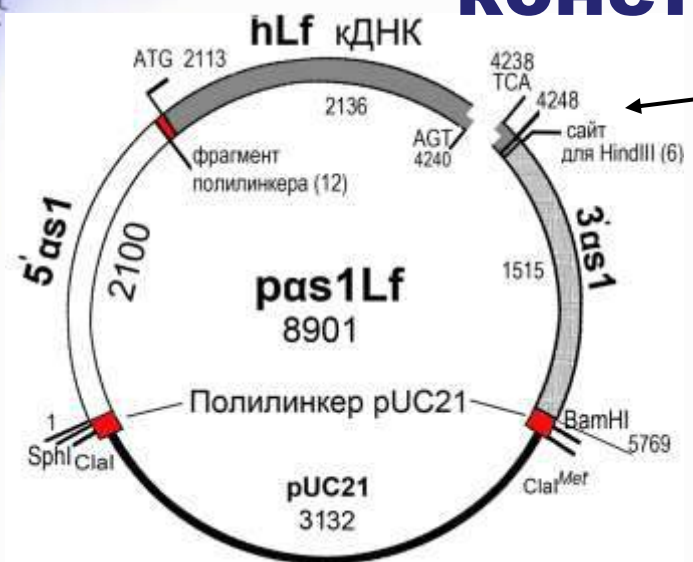
Клонирование по сайту XbaI, лигирование





# Схема получения плазмиды *pas1Lf/GCSF* и линейной конструкции *as1Lf/GCSF*

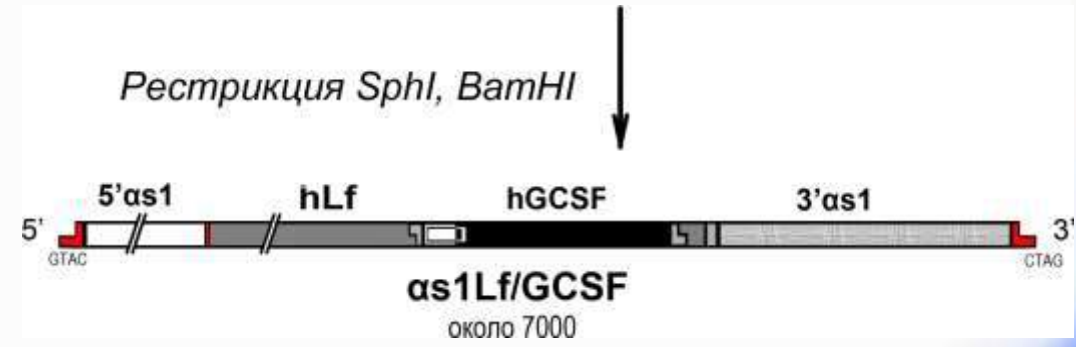
*Bsu36I*-рестрикция, щелочная фосфатаза



Лигирование

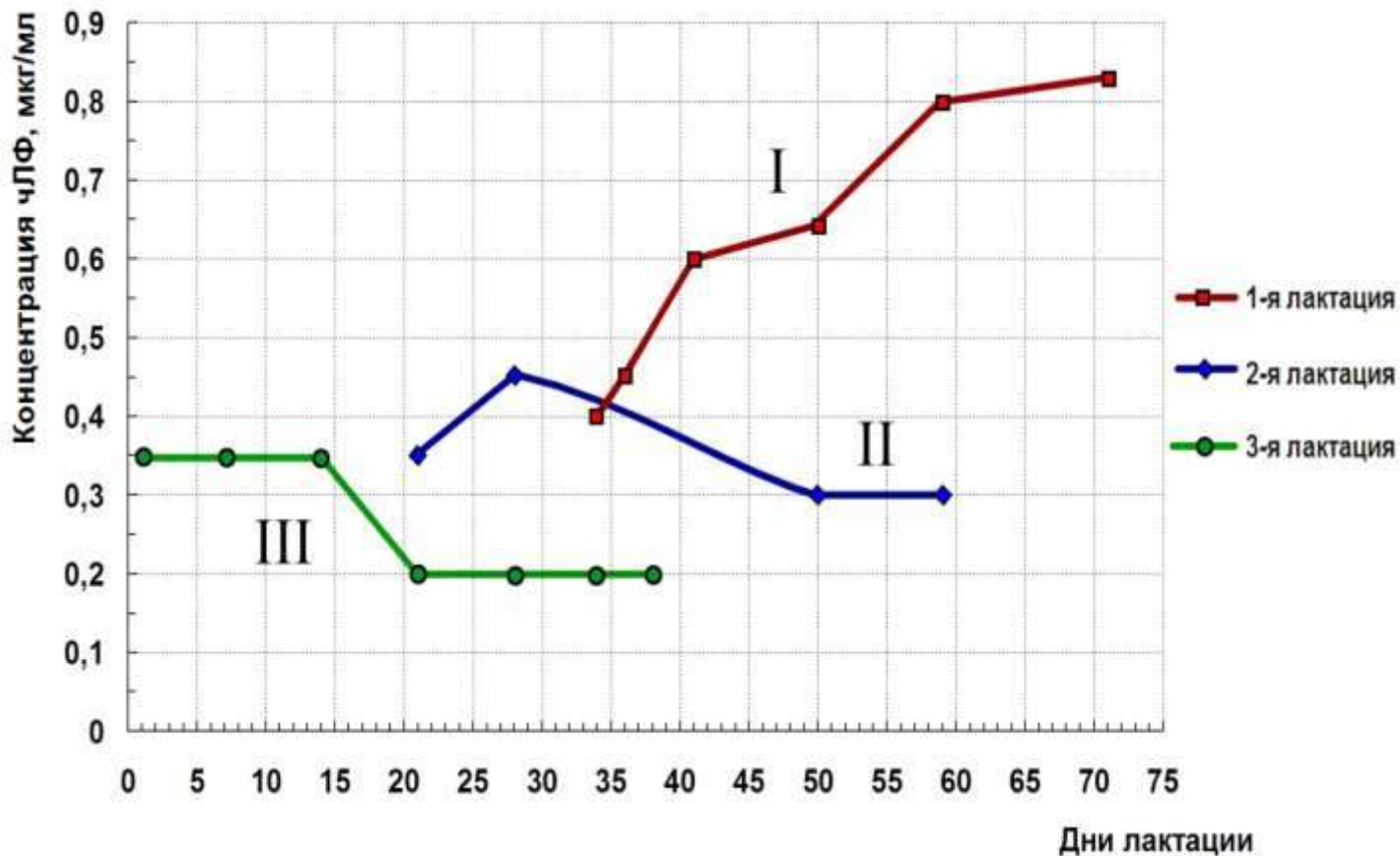


Рестрикция *SphI*, *BamHI*



# Динамика содержания чЛФ в молоке трансгенной крольчихи

## №36 на протяжении первых трёх лактаций



*содержание человеческого лактоферрина в молоке снижается в каждую последующую лактацию.*

## Результаты получения второго поколения (F2) трансгенных кроликов - потомков крольчихи №36 с интегрированным геном лактоферрина человека (hLf).

№№ крольчих	№№ самцов	Степень родства	Получено крольчат				
			Всего	Трансгенных		Не трансгенных	
				n	%	n	%
36/53	36/55	сибсы	9	6	66,6	3	33,3
36/54	36/55	сибсы	6	3	50,0	3	50,0
36/2	36/55	сибсы	6	5	83,3	1	16,7
36/13	36/1	сибсы	4	3	75,0	1	25,0
36/53	36/55	сибсы	3	2	66,6	1	33,3
53/13	36/1	полусибсы	6	4	66,6	2	33,3
53/27	36/1	полусибсы	7	5	71,5	2	28,5
53/37	36/1	полусибсы	7	5	71,5	2	28,5
<b>Итого:</b>			<b>48</b>	<b>33</b>	<b>68,7</b>	<b>15</b>	<b>31,3</b>

Варианты сочетания видов гамет при моногибридном скрещивании гетерозигот между собой.

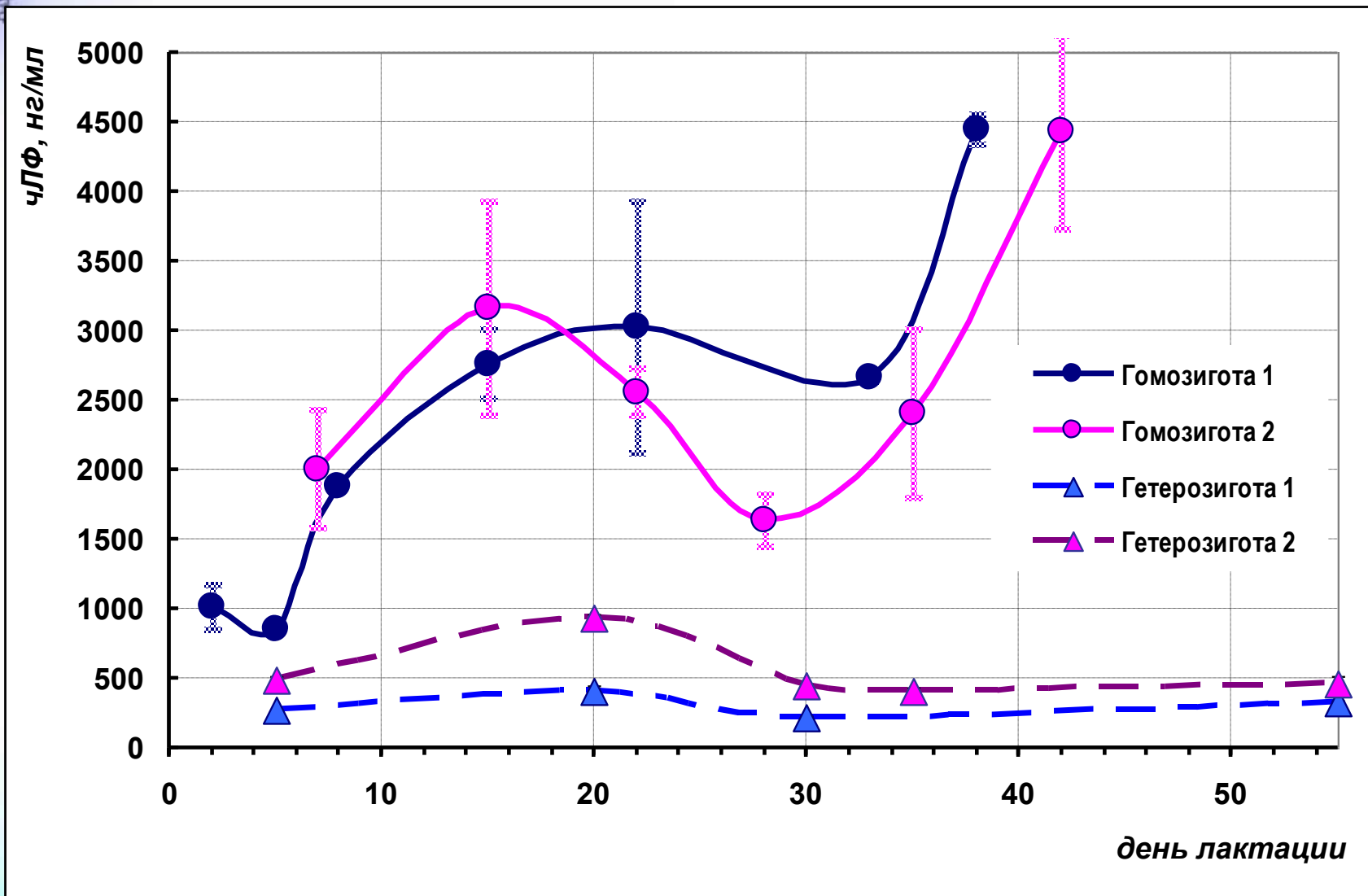
$$\text{♀Tн} \times \text{♂Tн} = \text{TT} : \text{Tн} : \text{Tн} : \text{нн} = 1\text{TT} : 2\text{Tн} : 1\text{нн} = 3 : 1,$$

т.е. 75% трансгенных и 25% не трансгенных потомков

**Жизнеспособность эмбрионов при получении кроликов  
гомозиготных по гену лактоферрина человека (hLf) разными  
вариантами скрещивания**

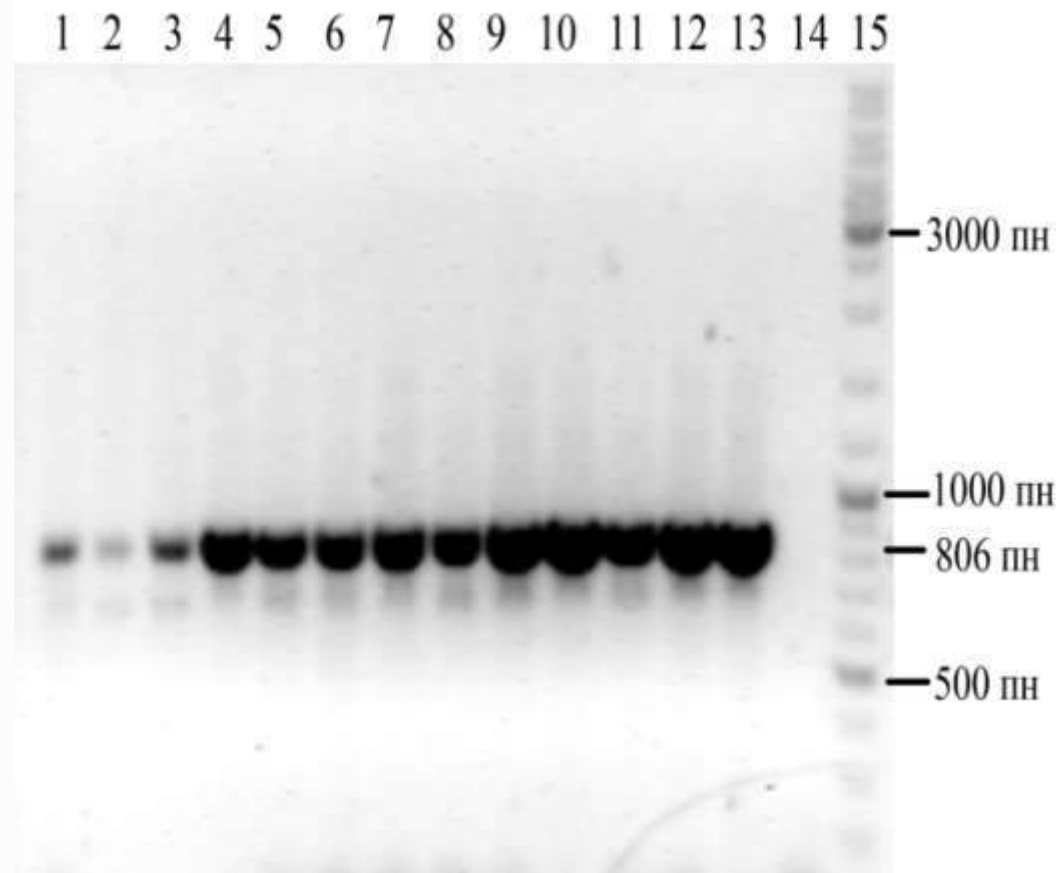
№№ гр.	Характер истика групп	Степень родства	Число окролов	Число потомков	Получено потомков на один окрол				
					Всего		Мёртворожденных		Живых
					n	%	n	%	n
<b>I</b>	<b>Гетеро зиготы</b>	<b>нет</b>	<b>10</b>	<b>69</b>	<b>6,9</b>	<b>0,5</b>	<b>7,3</b>	<b>6,4</b>	<b>92,7</b>
<b>II</b>	<b>Гомо зиготы I</b>	<b>сиссы</b>	<b>9</b>	<b>44</b>	<b>4,9</b>	<b>2,3</b>	<b>46,9</b>	<b>2,6</b>	<b>53,1</b>
<b>III</b>	<b>Гомо зиготы II</b>	<b>сиссы</b>	<b>5</b>	<b>24</b>	<b>4,8</b>	<b>0,8</b>	<b>16,6</b>	<b>4,0</b>	<b>83,4</b>

# Динамика содержания человеческого лактоферрина в молоке трансгенных крольчих, гетерозиготных и гомозиготных по гену hLf

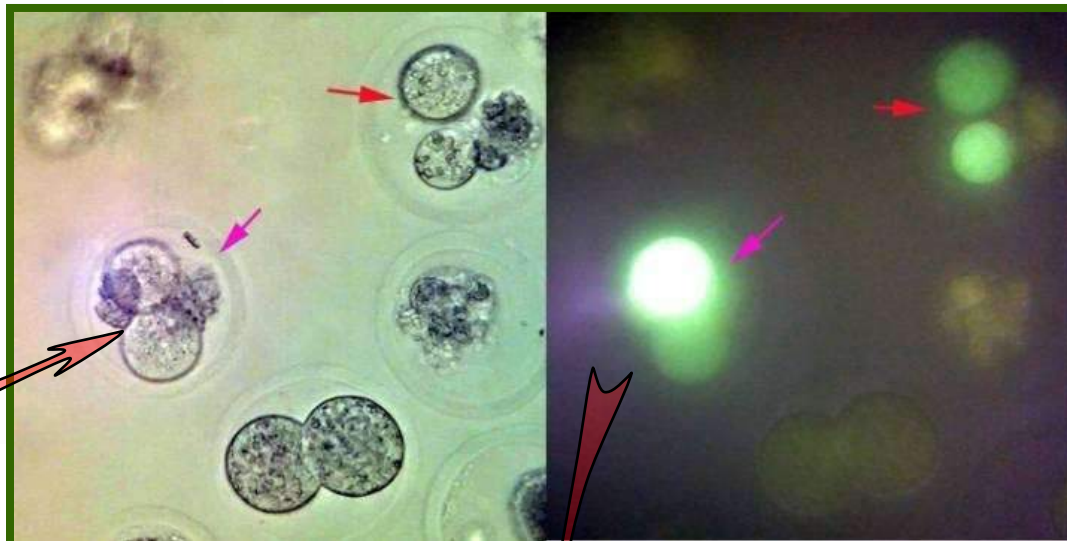


Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации ДНК, выделенной из образцов органов и тканей одного из крольчат, родившегося от ♀ 4183/80 и трансгенного ♂ 36/55. Амплификаты ограничены праймерами Lf10-Lf4 (содержат фрагмент последовательности кДНК hLf размером 806 пн), 0,8% агарозный гель с 0,5xТБЕ.

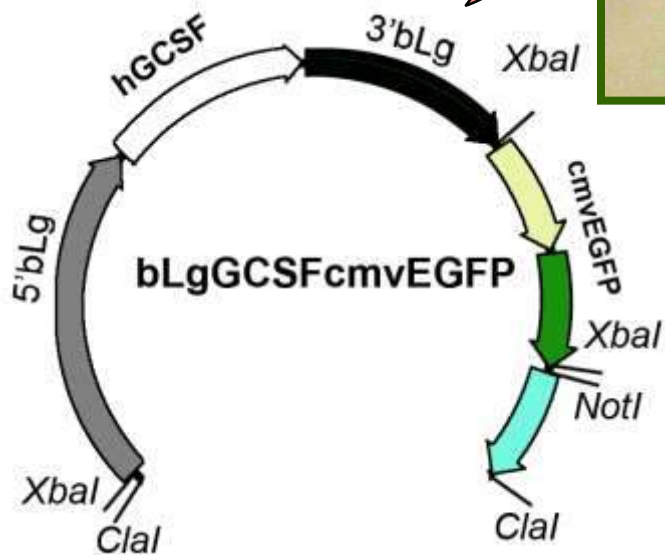
- 1-ушная раковина;
- 2-лёгкое;
- 3-сердце;
- 4-тимус;
- 5-печень;
- 6-желудок;
- 7-почка;
- 8-тонкий кишечник;
- 9-толстый кишечник;
- 10-мышца;
- 11-яичник.
- 12 – К+ (проба №42, ранее тестированная как содержащая трансген);
- 13 – К<sub>инг</sub> (К+ + №74)
- 14 – вода



# Получение трансгенных кроликов микроинъекцией $\beta$ LgGCSFcmvEGFP в зиготы



Микроинъекция ДНК в зиготу



Отбор и трансплантация трансгенного эмбриона

**Трансгенное животное**

## Экспрессия трансгена у крольчихи, трансгенной по $\beta$ LgGCSFcmvEGFP



Уровень ГКСФ человека, определенный методом ИФА:  
в молоке - 0,2 мкг/мл на 35-е сутки лактации;  
в сыворотке крови - 19 пг/мл.

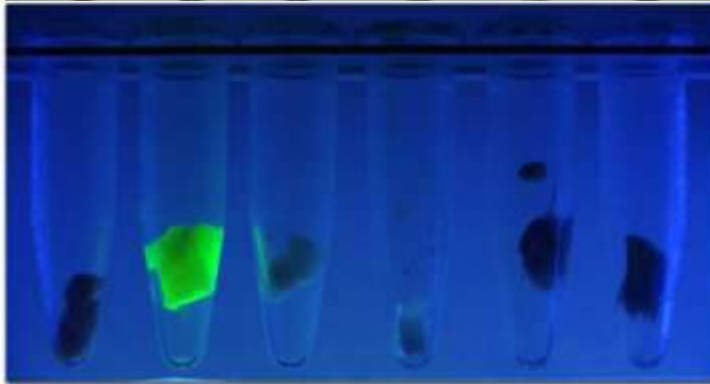
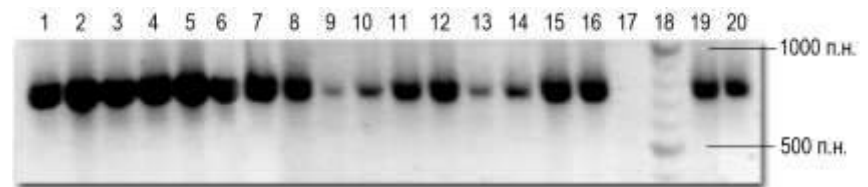




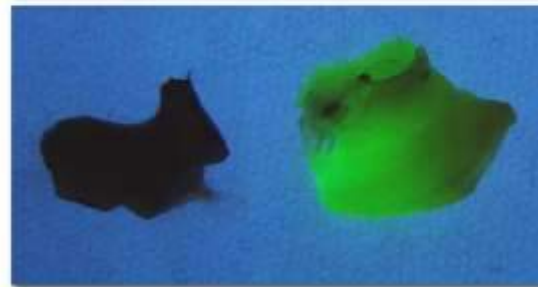
# Экспрессия зеленого флуоресцентного белка в органах и тканях трансгенной крольчихи

ПЦР-анализ гена EGFP:

Дор. 1-16 – органы и ткани, 17 – K<sup>-</sup>; 18 – маркер молекулярных масс; 19 – K<sup>+</sup>; 20 – K<sub>инг</sub>

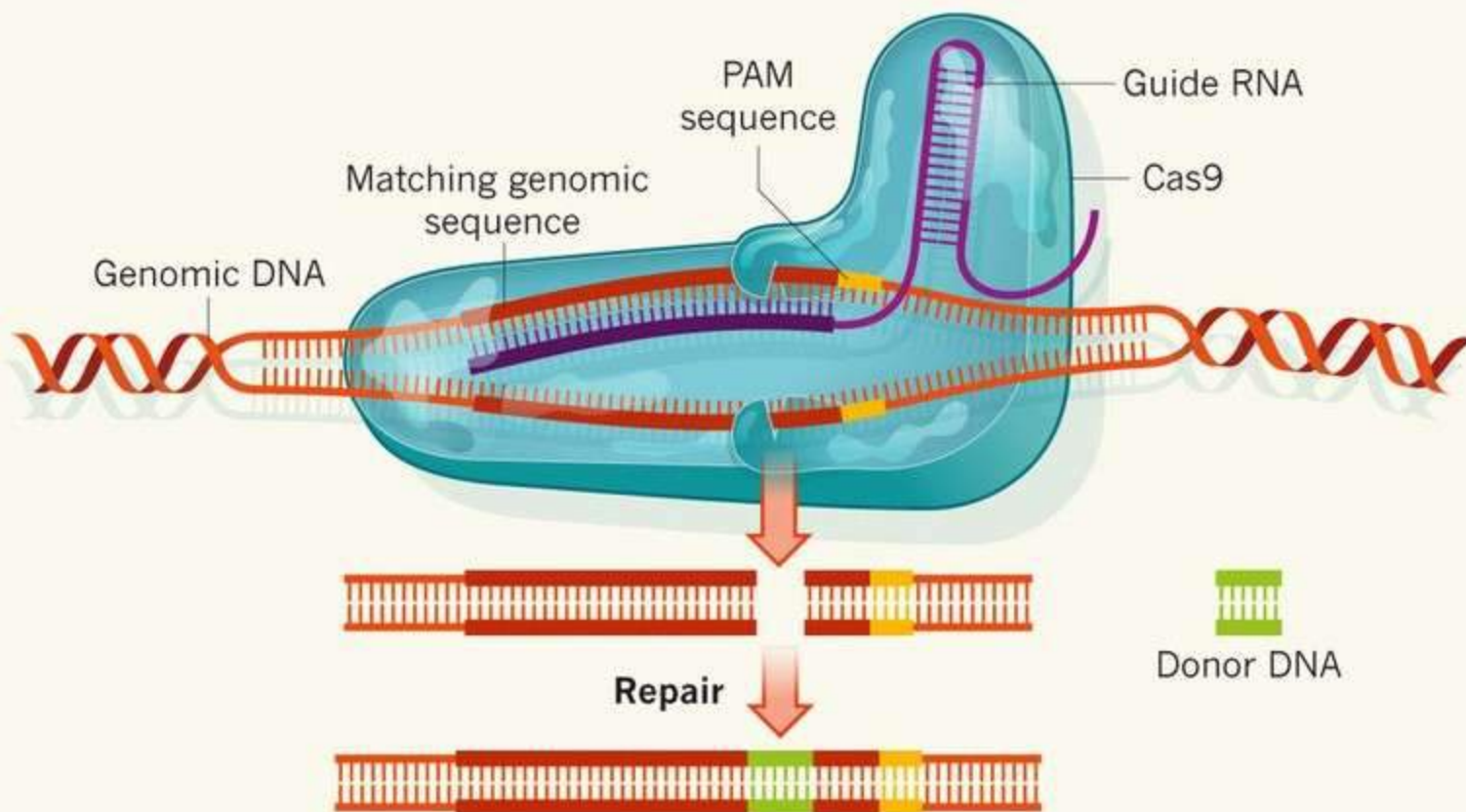


Слева направо: кишечник, «зелёная» мышечная ткань, соединительная ткань, ушной хрящ, желудок, ухо



«Красное» и «зеленое» мясо в видимом и ультрафиолетовом свете

## Целевое встраивание трансгена с помощью CRISPR/Cas9 системы





**Спасибо за  
внимание!**

