

УДК 575.11:577.2:57.08

**СОЗДАНИЕ ГЕНО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ,  
СОДЕРЖАЩЕЙ СТРУКТУРНЫЙ ГЕН *G-CSF* ЧЕЛОВЕКА  
ПОД КОНТРОЛЕМ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ГЕНА  
 $\beta$ -ЛАКТОГЛОБУЛИНА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

Езерский В.А., Иванова Л.Б., Шевченко В.Г.

*Институт физиологии, биохимии и питания с.-х. животных, Борзовск, Россия*

Гены казеиновых и сывороточных белков крупного рогатого скота находят все большее применение в биотехнологических исследованиях, связанных с модификацией состава белков молока и при получении трансгенных животных – продуцентов биологически активных веществ. Регуляторные последовательности этих генов определяют тканеспецифический характер экспрессии в клетках молочной железы, вследствие чего используются в качестве промоторов в генных конструкциях при создании животных-продуцентов биологически активных белков. При целенаправленном переносе в геном данных генных конструкций, в случае их экспрессии в молочной железе трансгенных животных, вместе с молоком могут выделяться искомые белки (Вауна et al., 1990; Henninghaustn, 1990). Следовательно, после соответствующих генетических манипуляций молочная железа сельскохозяйственных животных могла бы выполнять роль биореактора и стать экономически целесообразной альтернативой возможным системам культивирования клеточных культур для получения высокоценных фармакологически активных рекомбинантных белков.

Успехи последних лет показывают, что количество рекомбинантных белков в молочной железе может достигать нескольких миллиграммов и даже граммов на один литр молока (Ebert et al., 1991; Wright et al., 1991). Как правило, в этих работах (Brem et al., 1994; Mead et al., 1990) при получении генных конструкций использовали фланкирующие районы гена *αs1*-казеина быка. При этом выделенные из молока рекомбинантные белки обладают специфической активностью, что указывает на способность ферментных систем клеток молочной железы к посттрансляционной модификации типа гликозилирования (Denman et al., 1991). Однако уровень экспрессии чужеродного гена в молочной железе трансгенных животных в большинстве экспериментов остается невысоким, что предполагает дальнейший поиск оптимальных генных конструкций для проведения работ в этом направлении. Поэтому изначально важным этапом в трансгенной технологии получения животных, продуцирующих с молоком фармакологически ценные белки, является создание генно-инженерных конструкций, способных эффективно экспрессировать в клетках молочной железы. В определенной степени экспрессия трансгена зависит от специфических особенностей переносимого гена, а также от выбранных регуляторных районов, которые определяют тканеспецифичность экспрессии трансгена (Uusi-Oukari et al., 1997). Следует отметить, что круг генов, используемых в данных экспериментах не очень велик.

Молочная железа трансгенных животных является реальным источником производства рекомбинантных белков. Она физиологически обладает огромным потенциалом для синтеза белков. Кроме того, молоко имеет высокий гигиенический стандарт, а рекомбинантные белки могут быть извлечены с использованием имеющихся технологий. К настоящему времени накоплен огромный фактический материал, подтверждающий возможность использования трансгенных животных для получения рекомбинантных белков в молочной железе. В многочисленных ис-

следованиях изучалась возможность использования регуляторных областей генов основных белков молока (казеинов и сывороточных белков молока) для обеспечения тканеспецифичной экспрессии трансгена.

Большой интерес для медицины представляет получение рекомбинантного белка гранулоцитколониестимулирующего фактора человека (hG-CSF). Данный протеин относится к семейству гемопоэтических факторов роста и является одним из физиологических регуляторов, специфически и высокоэффективно стимулирующих пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических предшественников нейтрофилов (Recommendation..., 1994). Он увеличивает продолжительность жизни клеток костного мозга, усиливает функциональную активность зрелых нейтрофилов (Lieschke et al., 1989). Обычно его используют для лечения анемий различной этиологии и для повышения эффективности трансплантации костного мозга.

Получение hG-CSF с помощью биотехнологических приемов началось в 80-х годах. Некоторые человеческие колониестимулирующие факторы 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). Также были получены экспрессирующие клеточные линии CHU-2 из опухоли ротовой полости человека, продуцирующие высококачественный белок (Nomura et al., 1986).

Несмотря на успех в выделении и очистке белка из культуральной среды, кондиционированной некоторыми клеточными линиями, как правило, человека, риск патогенной контаминации, высокая лабильность белка, сложность технологии получения препарата накладывают целый ряд ограничений в его использовании. В связи с вышеперечисленными трудностями возникает вопрос о поиске альтернативных путей получения данного белка цитокинового ряда.

Широко ведутся работы по получению трансгенных сельскохозяйственных животных, содержащих в своем геноме ген hG-CSF. Так, например, были получены козы с интегрированным геном колониестимулирующего фактора человека (Jang et al., 2000). Биологическая активность выделенного белка сравнима с рекомбинантным hG-CSF, экспрессирующим клетками яичника китайского хомяка (CHO).

Как экспериментальные модели для изучения биологической функции гранулоцитколониестимулирующего фактора, были получены трансгенные мыши (Yamada et al., 1996). Согласно результатам этого исследования, G-CSF имел стимулирующий эффект, что подтверждается высоким уровнем лимфоцитов и гематопоэтических стволовых клеток.

Другая группа ученых более года исследовала воздействие вредных последствий устойчивого синтеза нейтрофилов у трансгенных по G-CSF мышей. В результате продолжительного спинномозгового гемопоэза в костях и печени наблюдались изменения. В печени присутствовали кровоизлияния и некрозы вследствие разрушительного гранулоцитопоза. Несмотря на повышенную инфильтрацию нейтрофилов в легких, их повреждения редко обнаруживались. Хотя названные изменения являлись результатом длительной нейтрофилии, смертность трансгенных и нетрансгенных мышей не отличалась в течение года (Serizawa et al., 2000).

В настоящее время в институте проводятся работы по получению трансгенных животных с генно-инженерной конструкцией на основе регуляторных последовательностей гена  $\beta$ -лактоглобулина ( $\beta$ -lg) быка. Обычно для этих целей используются регуляторные районы  $\beta$ -lg овец, коз и крупного рогатого скота. Simons и соавторы (Simons et al., 1987) получили первых трансгенных мышей с геном  $\beta$ -lg овцы. Высокий уровень экспрессии  $\alpha_1$ -антитрипсина ( $\alpha_1$ AT) человека был достигнут в молоке овец, когда была использована геномная последовательность  $\alpha_1$ AT под контролем промотора  $\beta$ -lg овцы (Wright et al., 1991). Две полученные трансгенные овцы продуцировали от 1 до 5 мг/мл белка  $\alpha_1$ AT. Примерно такой же уровень

экспрессии наблюдался у мышей трансгенных по гену  $\beta$ -Ig овцы (McClenahan et al., 1995).

В 1998 г. были опубликованы результаты специфической экспрессии гена  $\beta$ -Ig крупного рогатого скота в молоке трансгенных мышей. Уровень экспрессии этого белка в четырех полученных линиях мышей достигал 1-2 мг/мл и сохранялся стабильным в ходе двух лактаций (Hyttinen et al., 1998). Регуляторные элементы гена  $\beta$ -Ig крупного рогатого скота использовались при получении трансгенных мышей и кроликов с экспрессией эритропоэтина человека в молоке (Korhonen et al., 1997). Исходя из важности получения рекомбинантного hG-CSF, а также необходимости изучения взаимодействия структурных генов и регуляторных областей генно-инженерных конструкций, было решено сделать несколько различающихся регуляторными областями генно-инженерных конструкций, имеющих один структурный ген (ген G-CSF человека).

Учитывая вышеизложенное, для проведения экспериментальной работы была поставлена следующая задача: получить рекомбинантную плазмиду, содержащую последовательности гена G-CSF человека с регуляторными областями гена  $\beta$ -Ig быка с целью обеспечения тканеспецифической экспрессии рекомбинантного белка в молочной железе животных.

Из базы данных GENBANK (NCBI) была получена информация о нуклеотидных последовательностях гена  $\beta$ -Ig быка и гена G-CSF человека (запись AF388025). На основании рестриктной и функциональной карты гена  $\beta$ -Ig быка были выбраны последовательности, потенциально способные обеспечивать тканеспецифичную экспрессию трансгена. Интересующие нас фрагменты 5' и 3' регуляторных областей гена  $\beta$ -Ig быка, были выделены методом ПЦР-амплификации из ДНК крупного рогатого скота. Подбор структур праймеров проводили на основании полученных из GENBANK последовательностей генов. Прямые и обратные праймеры подбирали с учетом их "некомплементарности" друг другу и неспособности к самообразованию вторичных структур. При этом в состав некоторых праймеров были дополнительно введены сайты рестрикции.

Временные и температурные параметры ПЦР были подобраны в зависимости от структуры праймеров.

Выделение высокомолекулярной и плазмидной ДНК проводилось по методам, описанным в работах Кузнецова (1990), Блина и Стаффорда (Blin et al., 1976). Для очистки и концентрирования ДНК, а также количественного анализа содержания ДНК были использованы процедуры, предложенные Маниатисом (1984). Выделение высококопийных плазмид осуществляли по Берквисту (Blin et al., 1976).

Гидролиз ДНК рестриктазами и лигирование проводили стандартными методами (Маниатис и др., 1984). Для проведения рестрикции брали 0,2-1 мкг плазмидной ДНК и добавляли соответствующий буфер 10-кратной концентрации. Затем добавляли рестриктазу из расчета 1 ед. фермента на 1 мкг ДНК, доводили объем раствора до 30 мкл и инкубировали пробы 2 часа при 37°C. В зависимости от того, какие концы имели фрагменты ДНК, реакцию лигирования проводили в различных условиях (Маниатис и др., 1984; pGEM-T..., Technical manual). Молярное отношение вектора и вставки составляло 1:2 при лигировании по "липким" концам, концентрация ДНК составляла 20 мкг/мкл. Лигазу добавляли из расчета 0,5 ед. на 1 мл. Для отбора необходимых рекомбинантных молекул лигазную смесь брали на трансформацию клеток *E.coli*. Трансформацию проводили по стандартной методике, описанной Гловером (1988) с применением хлористого кальция и хлористого рубидия. Фрагменты ДНК из геля выделяли с использованием наборов фирмы «Promega» и НП АО «Силекс». Секвенирование плазмидной ДНК проводили в соответствии с рекомендациями к секвенирующему набору фирмы «Promega» (fmol DNA..., Technical manual). Реакционные смеси разделяли в 5 или 6 %-ом полиакриламидном геле, содержащем 100 мМ трис-боратный буфер, pH 8,3 и 7 М мочевины.

Высушенные гели экспонировали при комнатной температуре 18-72 ч. с пленкой Retina (Германия).

*Создание генно-инженерной конструкции на основе регуляторных элементов  $\beta$ -лактоглобулина быка и структурного гена G-CSF человека*

Методом ПЦР-амплификации была выделена кодирующая часть структурного гена G-CSF человека размером около 1,5 т.п.н и проклонирована в промежуточный вектор pUC18. При этом в прямой и обратный праймер были дополнительно введены сайты рестрикции, удобные для дальнейшего клонирования. В качестве матрицы для реакции амплификации была использована ДНК человека.

Для амплификации гена G-CSF были использована следующая пара праймеров:

прямой: GCE11 5' -ag t cta gag **aag acc** cca tgg ctt gga cct gcc ac - 3'; к последовательности G-CSF человека с 2037 до 2056 добавлен сайт -**gaagac** для BpI (BbvII) с целью получения липкого по NcoI конца, и сайт для XbaI t cta ga, для клонирования в плазмиду pUC18, и обратный: GCE12 5' -atg **tcg act** cag ggc tgg gca agg tgg cgt aga a - 3'; последовательности G-CSF человека от 3525 до 3500, включающей стоп кодон TGA, добавлен сайт -g tcg ac для Sall. Через этот сайт была присоединена 3' область гена  $\beta$ -lg быка.

Выделенный и очищенный ампликон был обработан в течение ночи при 37°C рестриктазами XbaI и Sall, пересажен, чтобы избавиться от рестриктного буфера, и клонирован в ранее подготовленную плазмиду pUC18 с липкими концами по XbaI и Sall. Было отобрано несколько десятков клонов, которые методом ПЦР амплификации с использованием праймеров GCE11 и GCE12 были проверены на наличие вставки (рис 1).

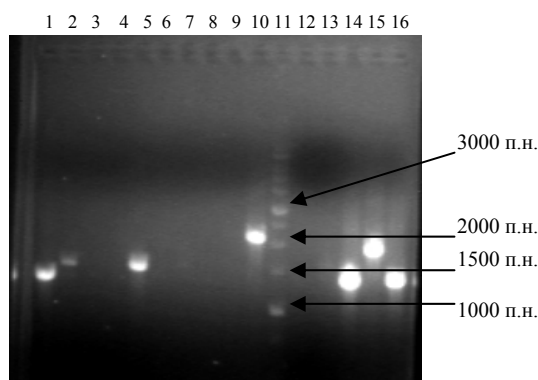


Рис. 1. Электрофореграмма ампликонов гена G-CSF человека с праймерами GCE11 и GCE12 в 0,8% агарозе с 1хТБЕ. Дорожки 1, 5, 14, 16 – амплифицированные фрагменты, имеющие размер приблизительно 1500 п.н. Дорожка 11 – маркер молекулярных масс.

Клоны, давшие положительную реакцию, т.е. содержащие амплифицированные фрагменты размером приблизительно 1500 п.н., были отобраны для дальнейшей проверки с двумя парами праймеров GCE1-GCE2 (465 п.н.) и GCE3-GCE4 (574 п.н.) (табл. 1).

Таблица 1. Структура праймеров, использованных при поиске клонов, содержащих ген *G-CSF* человека

Обозначение праймера	Последовательность	Размер, кол. нукл.
GCE1	5`-gct-gct-tga-gcc-aac-tcc-ata-g - 3`	22
GCE2	5`-tgg-gca-agg-tgg-cgt-aga-ac - 3`	20
GCE3	5`- tct-gga-cag-tgc-agg-aag-cca-c- 3`	22
GCE4	5`- atg-ccc-aga-gag-tgt-ccg-ag- 3`	20

Эти праймеры были подобраны таким образом, чтобы амплифицировались небольшие фрагменты кодирующей части гена *G-CSF* человека (рис. 2, рис. 3).

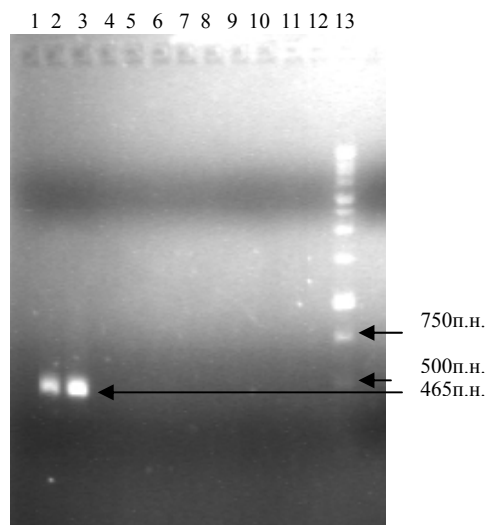


Рис. 2. Электрофореграмма ампликонов гена *G-CSF* человека с праймерами GCE1-GCE2 в 1% агарозном геле с 1хТБЕ. Дорожки 2, 3 – амплифицированные фрагменты, имеющие размер 465 п.н. Дорожка 13 – маркер молекулярных масс.

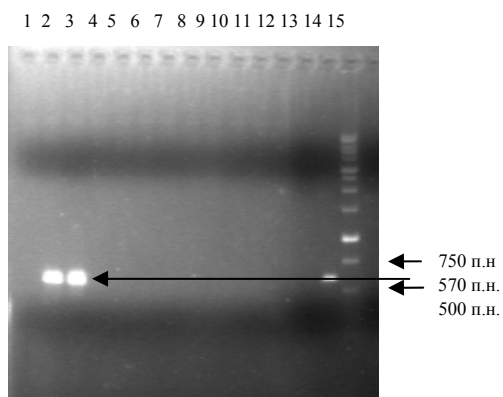


Рис.3. Электрофореграмма ампликонов гена *G-CSF* человека с праймерами GCE3-GCE4 в 1% агарозном геле с 1хТБЕ. Дорожки 2, 3 – амплифицированные фрагменты, имеющие размер приблизительно 574 п.н. Дорожка 15 – маркер молекулярных масс.

Один из клонов, давших положительные реакции со всеми тремя парами праймеров, был частично просеквенирован. Результаты секвенса окончательно подтвердили, что проклонированный нами ген идентичен гену *G-CSF* человека. Данный клон был использован для дальнейшей работы.

После наработки и очистки плазмиды pUC18\GCE11-GCE12 с помощью рестриктаз *Bp*I и *S*alI, был вырезан фрагмент, содержащий ген *G-CSF* человека, и проклонирован в ранее подготовленную плазмиду p5BLg. Данная плазида состоит из плазмиды pUC18 и промоторной части гена  $\beta$ -lg быка (*Bos taurus*), включая первый экзон и интрон, а также начало второго экзона. В начале второго экзона гена  $\beta$ -lg быка находится сайт для рестриктазы *N*coI, по которому и был проведен гидролиз. Обработкой плазмиды pUC18\GCE11-GCE12 рестриктазой *Bp*I был получен липкий конец, комплементарный липкому концу, полученному с помощью *N*coI в плазмиде p5BLg.

Клонирование произведено так, чтобы не нарушить аминокислотную последовательность гена *G-CSF* человека. Таким образом, была получена плазида p5BLgGC, содержащая структурную часть гена *G-CSF* человека под промотором гена  $\beta$ -lg быка.

Для конструирования полностью функционального гена было необходимо выделить последовательность, содержащую сигналы сплайсинга и полиаденилирования гена  $\beta$ -lg быка и клонировать полученный фрагмент ДНК в рекомбинантную плазмиду p5BLgGC. Наиболее удобным и быстрым для выделения достаточного количества искомого фрагмента ДНК оказался метод ПЦР. В качестве матрицы использовалась хромосомная ДНК быка (*Bos taurus*). Были подобраны праймеры следующей структуры:

прямой: BlgE4 - 5' tag **tcg acg agc agt gcc aca tct agg tg** 3', соответствует положению 6279 – 6299 в гене  $\beta$ -lg быка (точка 6279 - начала 6 экзона), на 5' конце дополнительно введен сайт **-g tcg ac** для *S*alI. Через этот сайт 3' регуляторная область  $\beta$ -lg была присоединена к гену *G-CSF* человека после терминирующего кодона в ранее созданной плазмиде p5BLgGC;

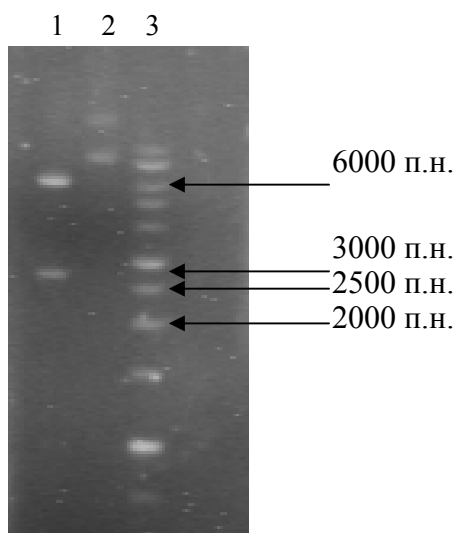


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов рестрикции плазмиды pBLgGC рестриктазой *Xba*I. Дорожка 1- pBLgGC с рестриктазой *Xba*I. Дорожка 2 - интактная плазида pBLgGC. Дорожка 3 - маркер молекулярных масс.

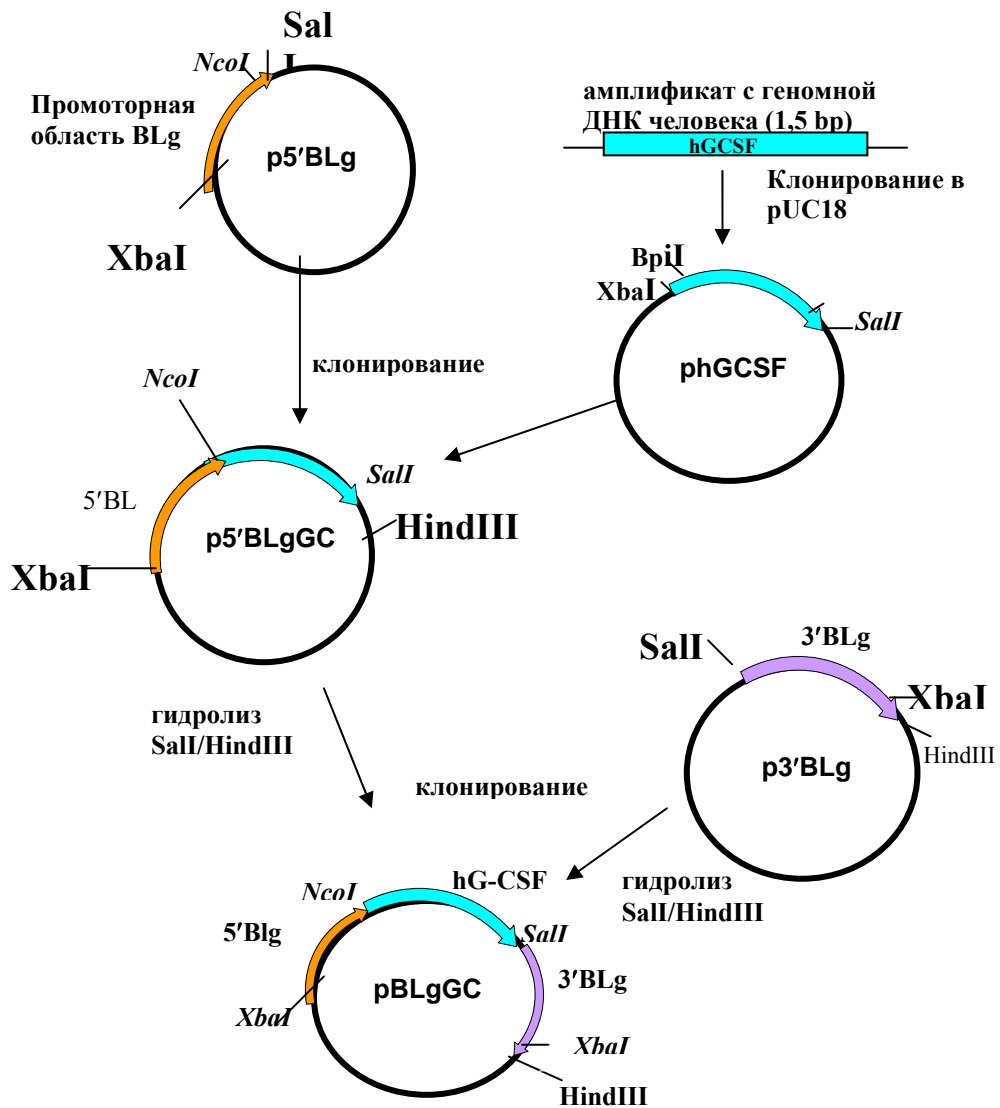


Рис.5. Схема получения рекомбинантной плазмиды pBLgGC, несущей ген G-CSF человека с регуляторными областями  $\beta$ -lg быка.

обратный: BlgE5 5'-**caa gct tct aga** agg gct aca gtc cat ggg tc- 3', соответствует положению от точки 7851 до точки 7831 в гене  $\beta$ -lg быка. Дополнительно введены сайты **-aagctt** для рестриктазы HindIII и **-tctaga** для XbaI. Сайт для HindIII дает возможность клонировать фрагмент BlgE4 - BlgE5 в плазмиду p5BLgGC, а наличие сайта для XbaI позволяет вырезать всю генно-инженерную конструкцию одним ферментом (XbaI) (рис. 4).

Таким образом, в результате проведенных генно-инженерных манипуляций получена плаزمиды pBLgGC, при гидролизе которой рестриктазой XbaI выщепляется фрагмент величиной 6000 п.н., содержащий ген *G-CSF* человека под контролем регуляторных элементов гена  $\beta$ -lg быка. На рис. 5. представлена схема основных этапов конструирования плазмиды pBLgGC. Плаزمиды содержит последовательно гена *G-CSF* человека размером 1,5 т.п.н. с регуляторными областями гена  $\beta$ -lg быка – 5'-фланкирующая последовательность длиной 3 т.п.н. и 3'-фланкирующая последовательность размером 1,5 т.п.н. Полученная рекомбинантная ДНК предназначена для использования в технологии получения трансгенных животных с тканеспецифичной экспрессией *G-CSF* человека в клетках молочной железы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bayna E.M., Rosen J.M. Tissue-specific, high level expression of the rat whey acidic protein gene in transgenic mice. *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18(10): 2977-2985.
2. Henninghausen L. The mammary gland as a bioreactor: Production of foreign protein in milk. In: *Protein expression and purification*, 1990, 1: 3-8.
3. Ebert K.M., Selgrath J.P., DiTullio P. et al. 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.
4. Wright G., Carver A., Cottom D. et al. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Bio/Technol.*, 1991, 9: 830-834.
5. Brem G., Hartl P., Besenfelder U. et al. Expression of synthetic cDNA sequences encoding human insulin-like growth factor-1 (IGF-I) in the mammary gland of transgenic rabbits. *Gene*, 1994, 149: 31-355.
6. Mead H., Gates L., Lacy E. et al. Bovine alpha s1 - casein gene sequences direct high level expression of active human urokinase in mouse milk. *Bio/Technol.*, 1990, 8 : 443-446.
7. Denman J., Hayes M., O'Day C. et al. Transgenic expression of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: Purification and characterization of the recombinant enzyme. *Bio/Technol.*, 1991, 9: 839-843.
8. Uusi-Oukari M., Hyttinen J.M., Korhonen V.P. et al. Bovine alpha s1-casein gene stimulating factor in the milk of transgenic mice. *Transgenic Res.*, 1997, 6(1): 75-84.
9. Recommendation for the hemapoetic colony-stimulating factors: evidence-based, clinical practice guidelines. *J. Clinic. Oncol.*, 1994, 12 : 2471-2508.
10. Lieschke G.J., Cebon J., Morstyn G. Characterization of the clinical effects after the first dose of bacterially synthesized recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 1989, 74(8) : 2634-43.
11. 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.
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, 226 (4680): 1339-1342.
13. 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(5): 871-6.
14. Jang Ho Ko, Chul-Sand Lee, Kui Huin Kim, Myung-Geol Pang, Jashin Koo Production of biologically active human granulocyte colony stimulating factor in the milk of transgenic goat. *Transgenic Research.*, 2000, 9: 215-222.



15. Yamada T., Kaneko H., Iizuka K., Matsubayashi Y., Kokai Y., Fujimoto J. Elevation of lymphocyte and hematopoietic stem cell numbers mice transgenic for human granulocyte CSF. *Lab. Invest.*, 1996, 74(2): 384-394.
16. Serizawa I., Amano K., Ishii H., Ichikawa T., Kusaka M., Taguchi T., Kiyokawa N., Fujimoto J. Long-term overexpression of human granulocyte colony-stimulating factor in transgenic mice: neutrophilia with no increased mortality for more than one year. *Cytokine*, 2000, 12(6): 630-635.
17. Simons J., McClenaghan M., Clarc A. Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice. *Nature*, 1987, 328: 530-532.
18. Wright G., Carver A., Cottom D. et al. High-level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Bio/Technol.*, 1991, 9: 830-834.
19. McClenaghan M., Springbett A., Wallace R. Secretory proteins compete for production in the mammary gland of transgenic mice. *Biochem. J.*, 1995, 310: 637-641.
20. Hyttinen J.M., Korhonen V.P., Hiltunen M.O., Myohanen S., Janne J. High-level expression of bovine beta-lactoglobulin gene in transgenic mice. *J. Biotechnol.*, 1998, 61 (3) : 191-198.
21. Korhonen V.P., Tolvanen M., Hyttinen J.M., Uusi-Oukari M., Sinervirta R., Alhonen L., Jauhainen 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 (2) : 482-489.
22. NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
23. Кузнецов К.Д. Методы молекулярной генетики и геной инженерии. М.: Наука, 1990: 61-65.
24. Blin N., Stafford D.W. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.*, 1976, 3(9): 2303-8.
25. Маниатис Г. и др. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984.
26. pGEM-T and pGEM-T Easy Vector System. Technical manual. Promega Corporation.
27. Гловер Д. Клонирование ДНК. Методы. М.: Мир, 1988, 538 с.
28. Fmol DNA Sequencing System. Technical manual. Promega Corporation.

### **Gene-engineering construction containing human gene G-CSF under control of regulatory elements of bovine gene $\beta$ -lactoglobulin**

V.A. Ezersky, L.B. Ivanova, V.G. Shevchenko

*Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of Farm Animals,  
Russian Agroicultural Academy, Borovsk, Kaluga Region, Russia*

A new plasmid pBLgGC containing construct with full-length gene of the human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) fused with 5' and 3' flanking promoter sequences of bovine gene  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) was devised. Construct contain 5'-promoter sequence of total length about 3000 bp, that includes exon 1/intron 1/ fragment of the exon 2, and 3' flanking sequence about 1500 bp containing exon of 6/ intron 6/ exon 7 and polyadenylation signal of the bovine  $\beta$ -Lg gene. All this construct of length 6000 bp was cut from the pBLgGC by means of restrictase XbaI. Plasmid pBLgGC was designed to be used for obtaining laboratory and farm transgenic animals with tissue specific expression of the human G-CSF in the mammary gland.

*Key words: gene-engineering, plasmids,  $\beta$ -lactoglobulin, granulocyte colony-stimulating factor*

*Prob. Prod. Anim. Biol., 2007, 1: 123-131*