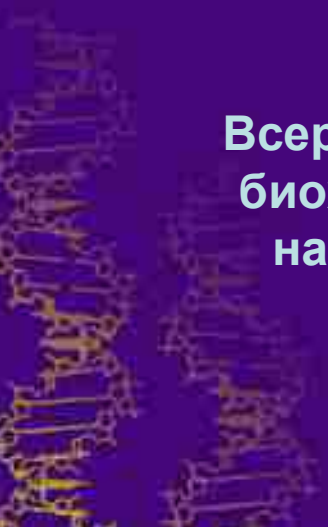




«Трансгенные кролики – продуценты лактоферрина и Г-КСФ человека с молоком»

Езерский В.А., Колоскова Е.М., Трубицина Т.П.,
Максименко С.В., Жукова О.Б.,



**Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии,
биохимии и питания животных - филиал ФГБНУ «Федеральный
научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К.
Эрнста**

1. Кролики как продуценты биологически активных белков с молоком: достоинства и недостатки

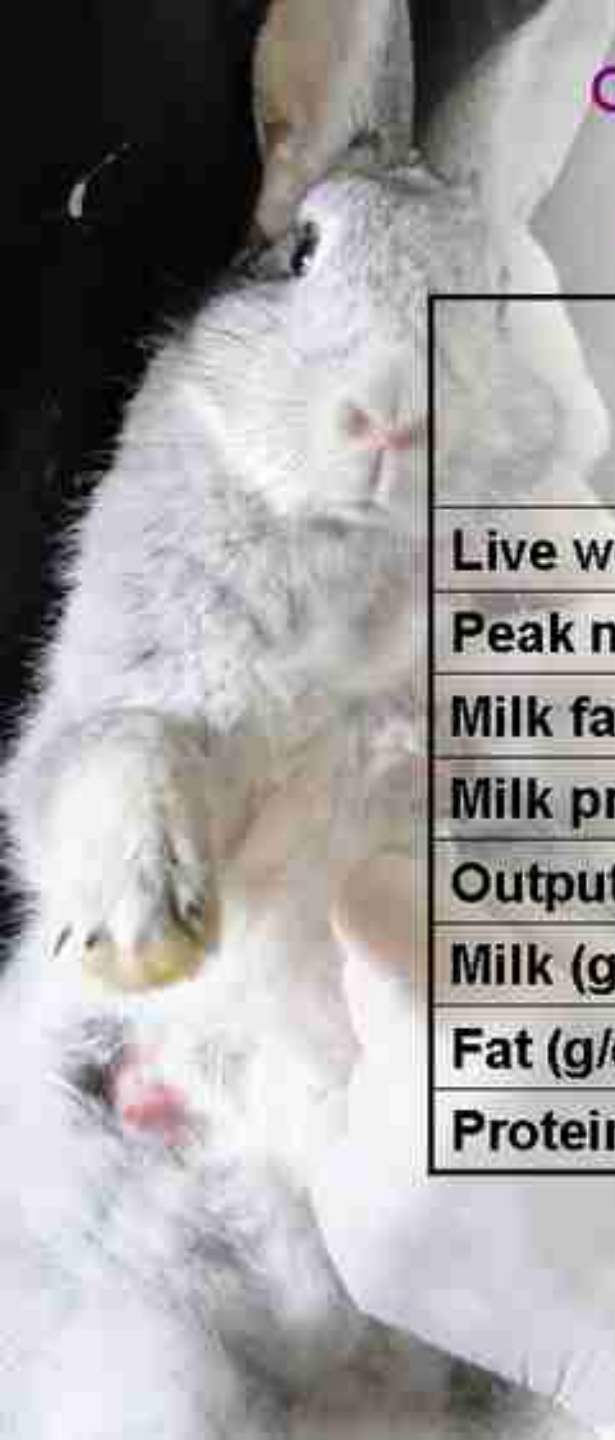


Трансгенные животные-биореакторы

Species	Pregnancy (months)	Maturation (months)	Milk yield per lactation (L)	months from microinjection to milk production
Mouse	0.75	1	0.0015	3–6
Rabbit	1	5-6	1–1.5	7-8
Pig	4	7-8	200–400	15-16
Sheep	5	6–8	200–400	16–18
Goat	5	6–8	600–800	16–18
Cow	9	15	6000–8000	30–33

РЕПРОДУКТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КРОЛИКОВ

Reproductive parameter	Value
Sexual maturity	4-5 months
Conception rate	65%
Gestation time	30–33 days
Litter size	5–12
Lactation period	40–50 days
Litter interval	44 days
Litters per year	4–7

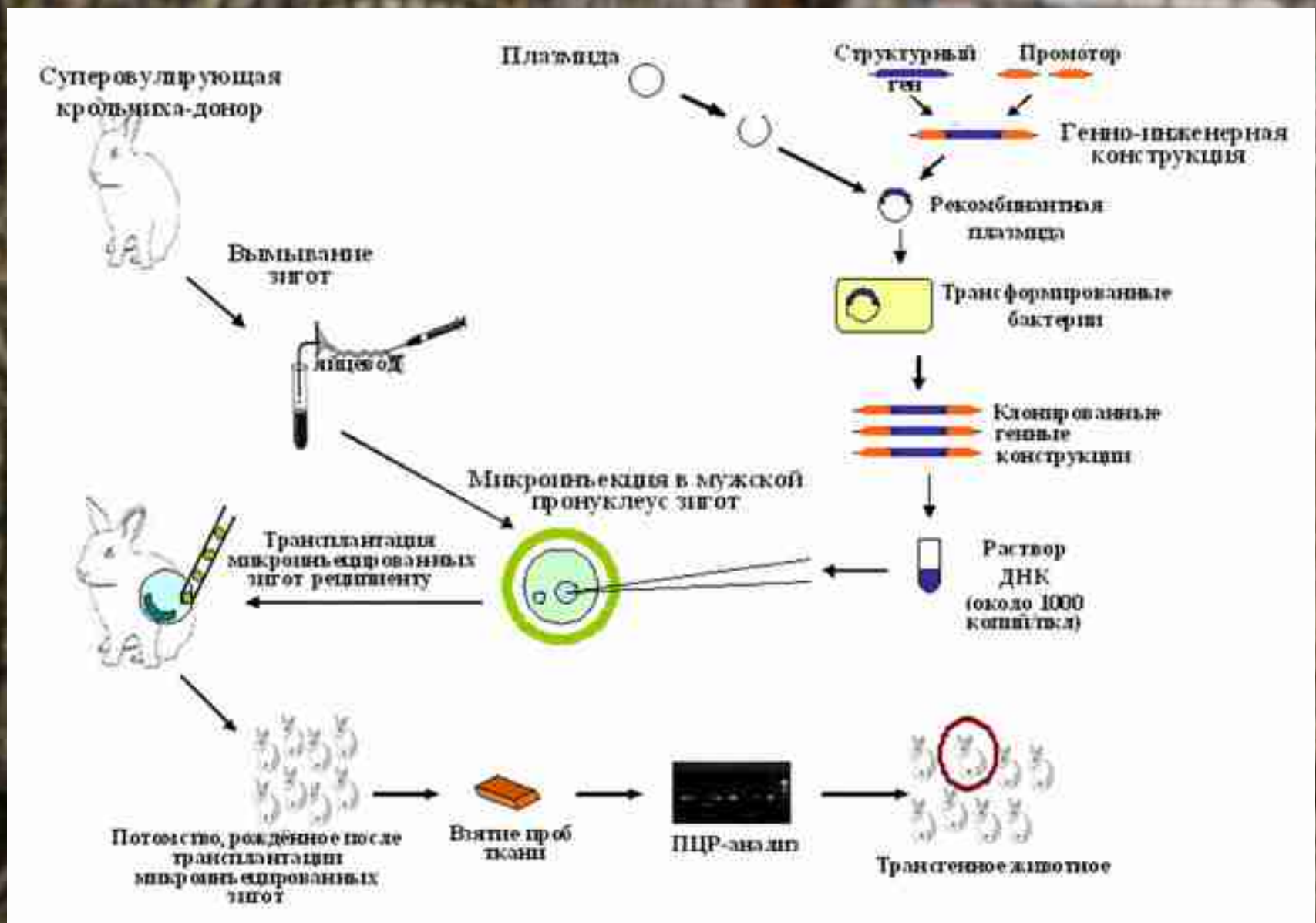


СУТОЧНЫЙ УДОЙ, СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА И ЖИРА В МОЛОКЕ КРОЛЬЧИХ, КОРОВ И СВИНЕЙ

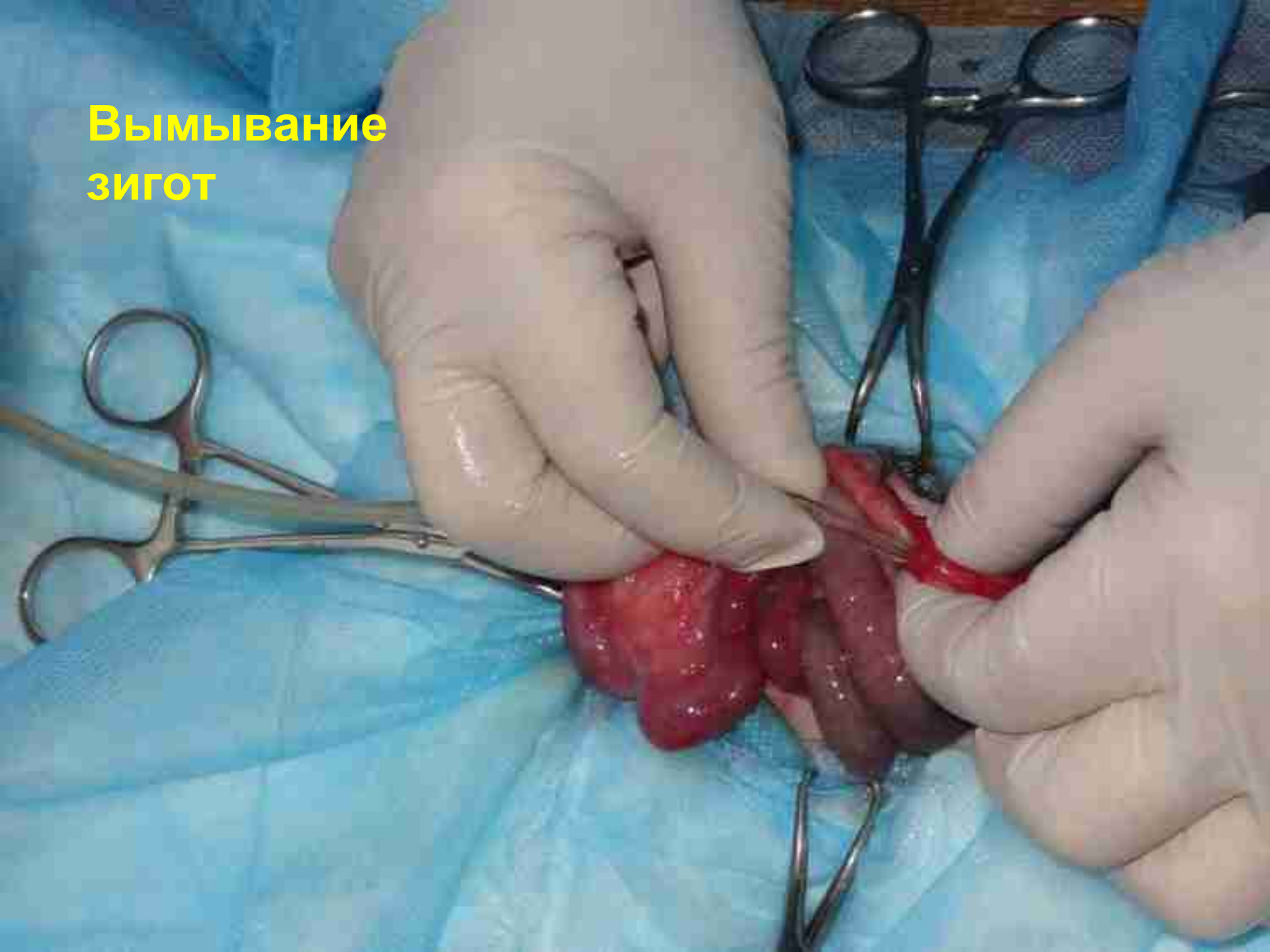
	Hybrid rabbit does	Holstein cows	Hybrid sows
Live weight (kg)	4.2	650	230
Peak milk yield (kg)	0.320	47.5	8.9
Milk fat (g/100 g)	12.9	3.7	6.5
Milk protein (g/100 g)	12.3	2.84	5.1
Output/kg live weight (LW)			
Milk (g/d)	76	73	39
Fat (g/d)	9.8	2.7	2.5
Protein (g/d)	9.4	2.1	2.0

Maertens et al. Rabbit milk: a review of quantity, quality and non-dietary Affecting factors. World Rabbit Sci. 2006, 14: 205-230

2. Биотехнология получения трансгенных кроликов



**Вымывание
зигот**



**Введение раствора конструкции в пронуклеус
зиготы.**



3. Кролик - продуцент лактоферрина человека с МОЛОКОМ



Плазмида pas1Lf

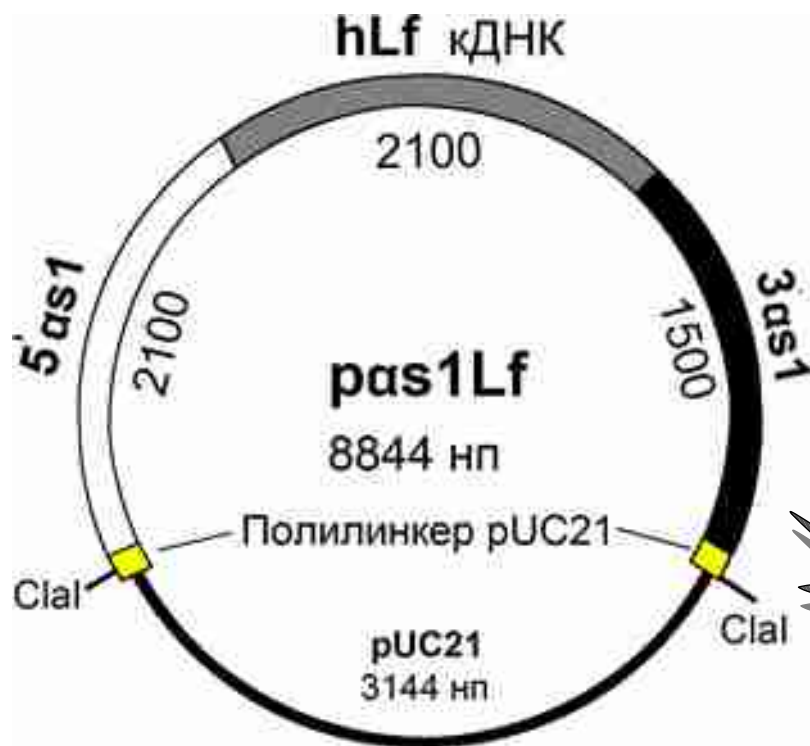
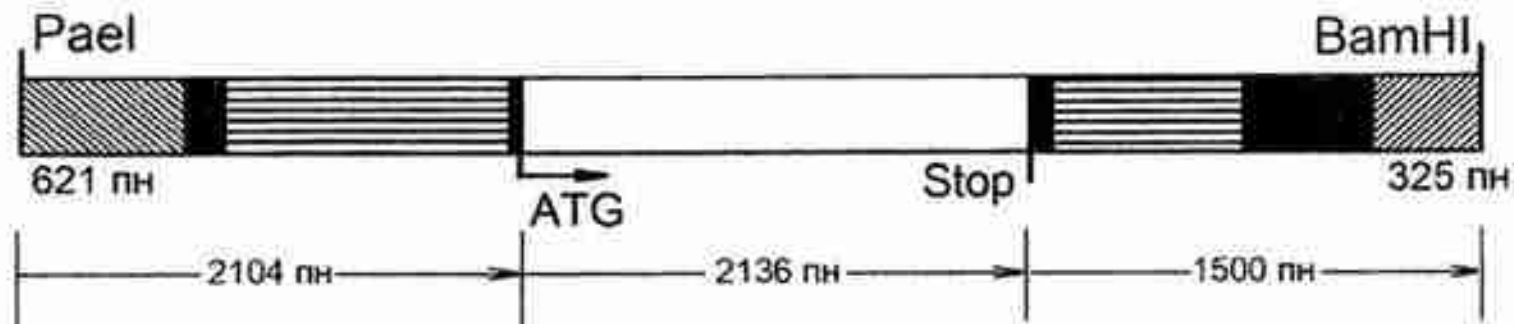


Схема генно-инженерной конструкции $\alpha_{S1}Lf$



-  – 5'-фланговая последовательность гена α_{S1} -казеина крупного рогатого скота (621 п.н.);
-  – 3'-фланговая последовательность гена α_{S1} -казеина крупного рогатого скота (325 п.н.);
-  1-й, часть 2-го, часть 18-го, 19-й экзоны гена α_{S1} -казеина крупного рогатого скота;
-  – 1-й, 18-й интроны гена α_{S1} -казеина крупного рогатого скота;
-  – кодирующая ДНК гена hLF, включающая стартовый ATG - иницирующий кодон транскрипции и стоп-кодон.

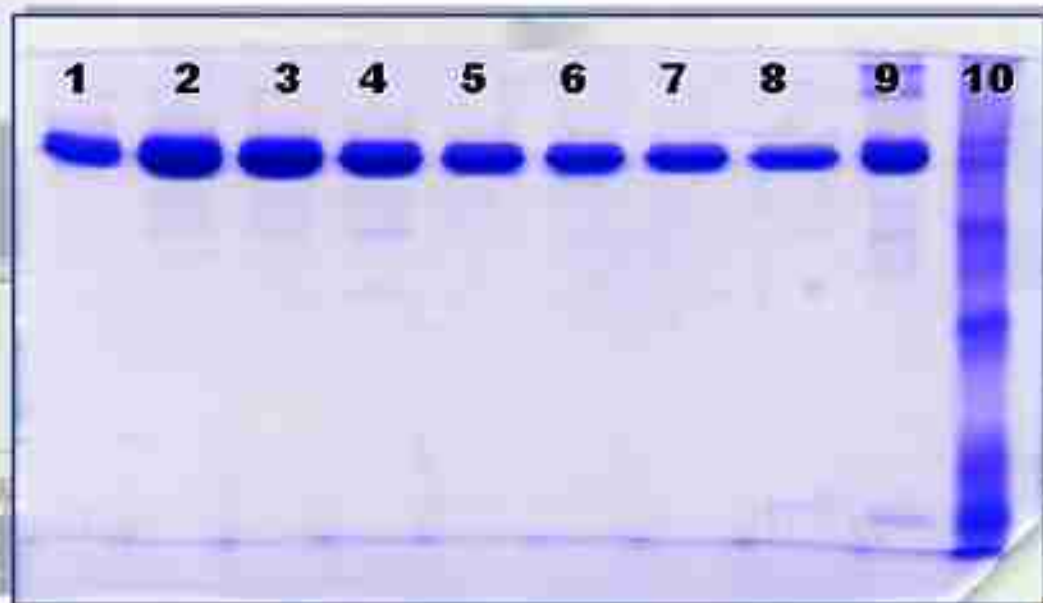
Создание ТЕСТ-СИСТЕМЫ для определения лактоферрина человека в молоке трансгенных животных с высоким содержанием жира

- Выделение и очистка лактоферрина человека из женского молока
- Получение антивидовых конъюгатов, меченных ПХ
- Получение кроличьих и мышинных поликлональных антител к лактоферрину человека
- Получение аффинного сорбента с лактоферрином человека
- Разработка сэндвич-варианта иммуноферментного анализа на основе нативного человеческого ЛФ и полученных к нему антител

■ **Выделение и очистка лактоферрина человека из женского молока (конечный этап)**

✓ Гель-хроматография на ультрагеле AcA34

Электрофорез в 12, 5% ПААГ в денатурирующих условиях.



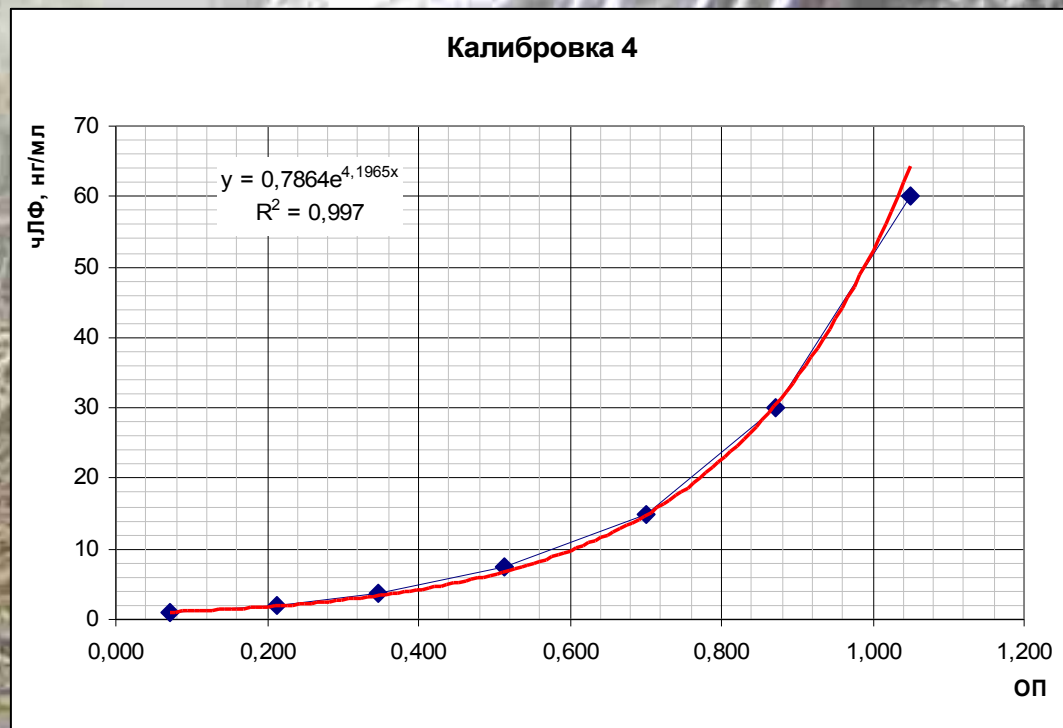
1–8. – фракции 1-8 соответственно.

9. - стандарт ЛФ человека (МИИОМИ им.Герцена,)

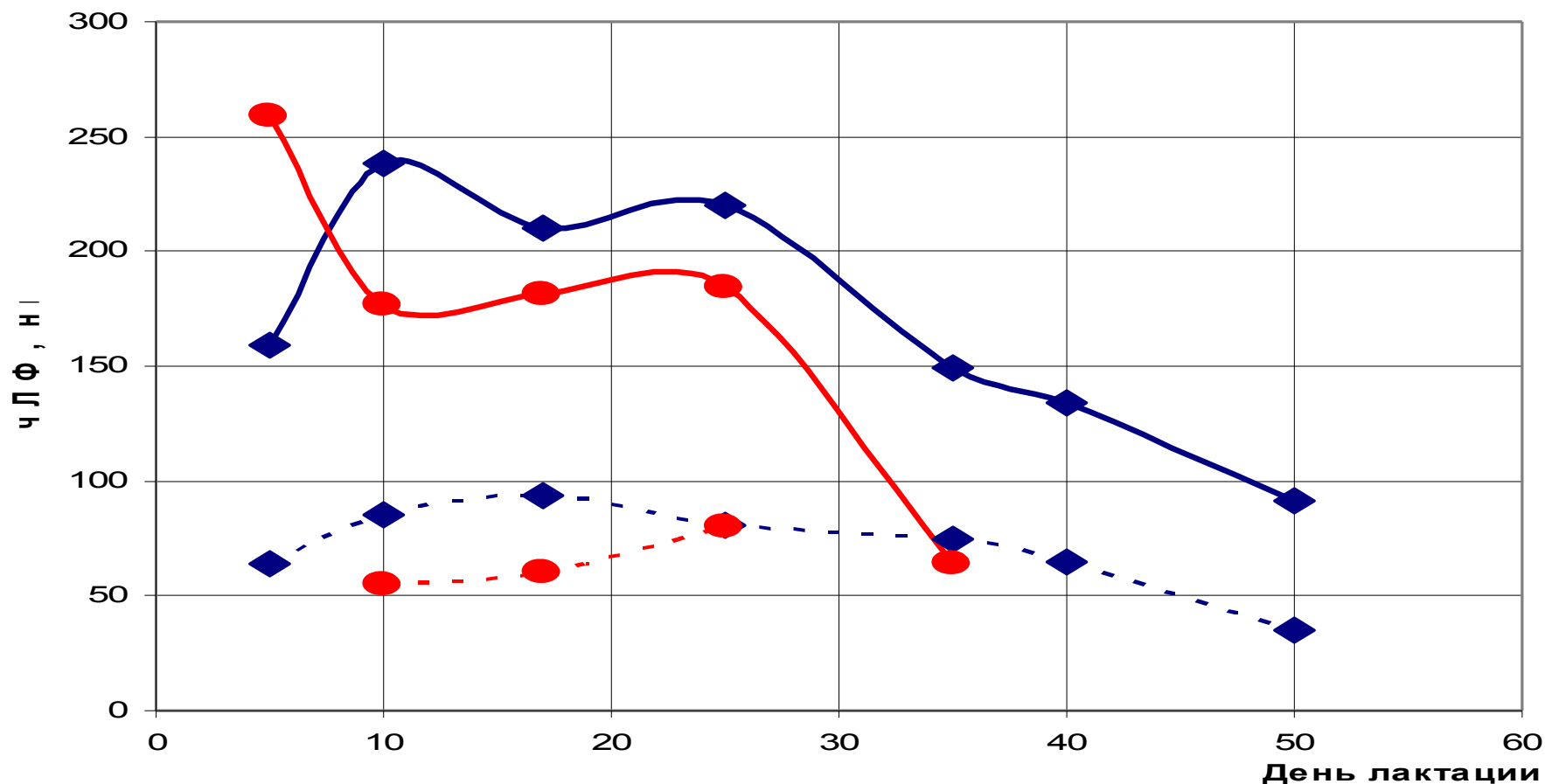
10. - стандарт М.м.

Калибровочная кривая разработанной тест-системы для количественного определения чЛФ в молоке трансгенных животных.

Содержание чЛФ в молоке трансгенных кроликов варьировало от 40 до 800 нг/мл



**Содержание человеческого лактоферрина в молоке
трансгенных крольчих гомозиготных и
гетерозиготных по гену лактоферрина человека в
течение разных лактаций**



- ◆— гетерозиготы, 1-я лактация
- -◆- - гетерозиготы, 3 и 4-я лактации
- гомозиготы, 1-я лактация
- -●- - гомозиготы, 2-я лактация

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА У ЛАКТИРУЮЩИХ ТРАНСГЕННЫХ КРОЛЬЧИХ

У крольчихи F0 содержание чЛФ в молоке **снижалось с каждой последующей лактацией**: к концу первой лактации концентрация чЛФ повышалась почти вдвое по сравнению с ее началом (от 0,4 до 0,8 мкг/мл), в последующие две лактации, содержание чЛФ к концу лактации уменьшалось. Снижение концентрации чЛФ с каждой последующей лактацией начиналось раньше

В поколениях **гетерозиготных** животных содержание чЛФ в молоке было стабильно в **2-3 раза ниже**, чем у гомозиготных крольчих (2-3 мкг/мл). Если у гетерозиготных крольчих наблюдали повышение чЛФ в первой трети лактации (около 20 суток), далее происходило почти двукратное ее снижение.

Экспрессия трансгена у **гомозиготных** по гену hLf крольчих первого и **последующих поколений** практически не отличалась, достигая максимума в первой трети лактации и оставаясь с некоторыми колебаниями стабильно высокой на всем ее протяжении

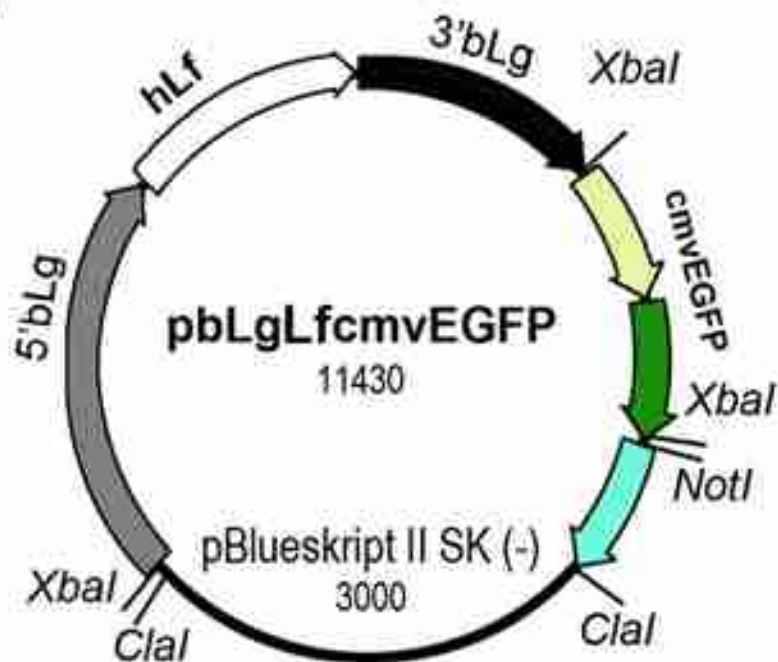
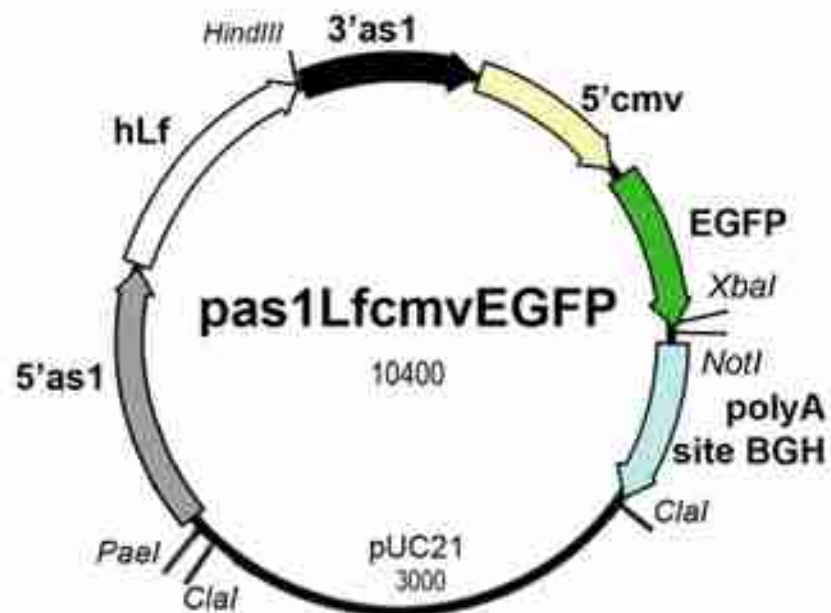
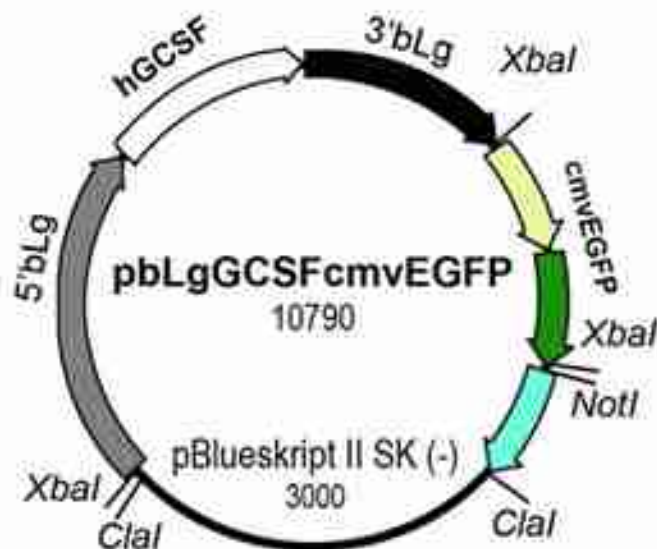
С каждой **последующей лактацией** отмечали **снижение** концентрации чЛФ в молоке как гомо-, так и гетерозиготных трансгенных крольчих.

4. Использование маркерного гена в получении кролика-продуцента биологически активного белка человека (чГКСФ) с молоком





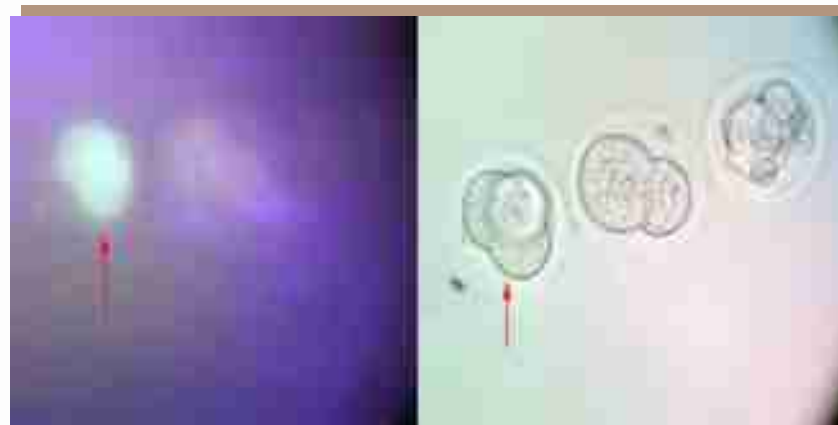
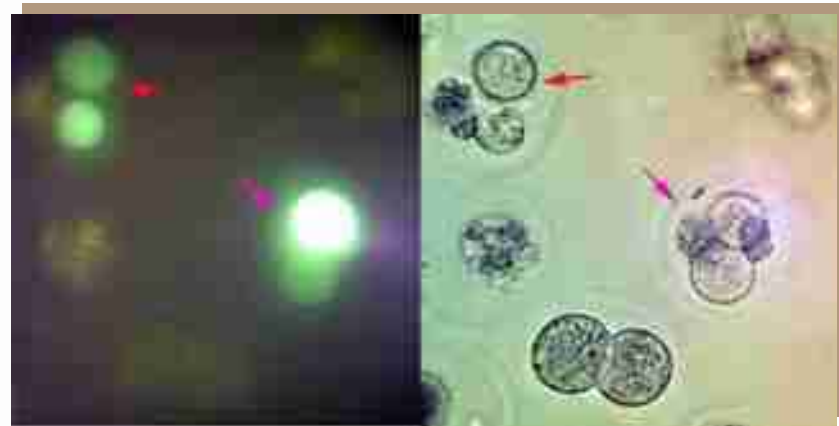
Плазмиды, содержащие ген зеленого флуоресcentного белка (EGFP)



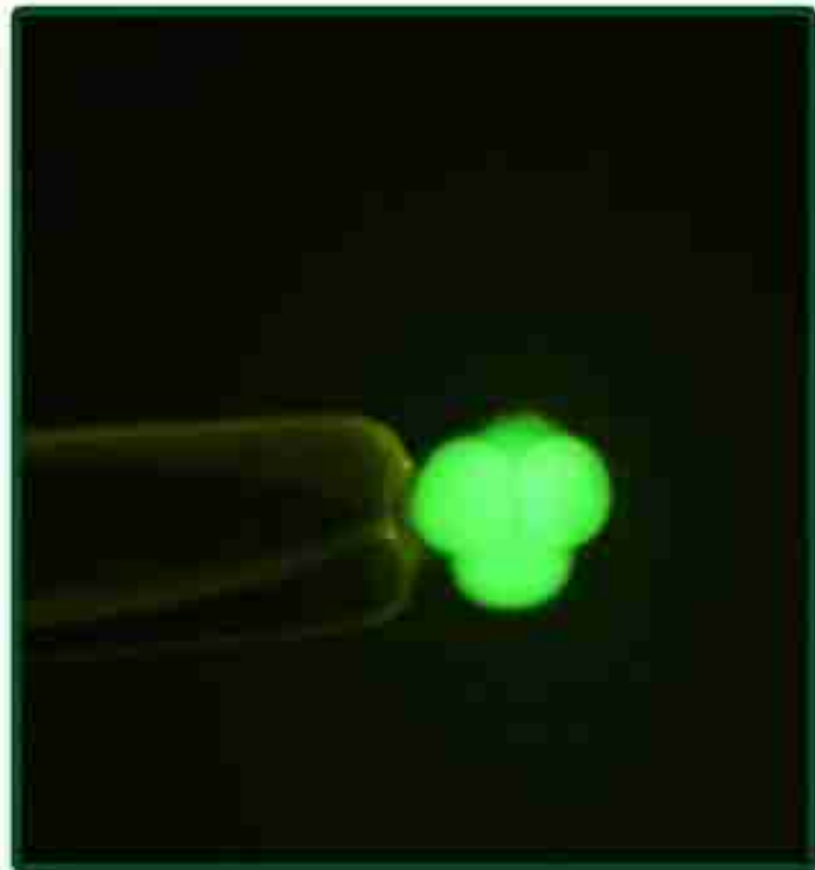


Свечение эмбрионов на разных стадиях развития после микроинъекции линейной ДНК, содержащей гены ГКСФ и зеленого флуоресцентного белка

(слева – при облучении светом 480 нм, справа – в видимом свете)



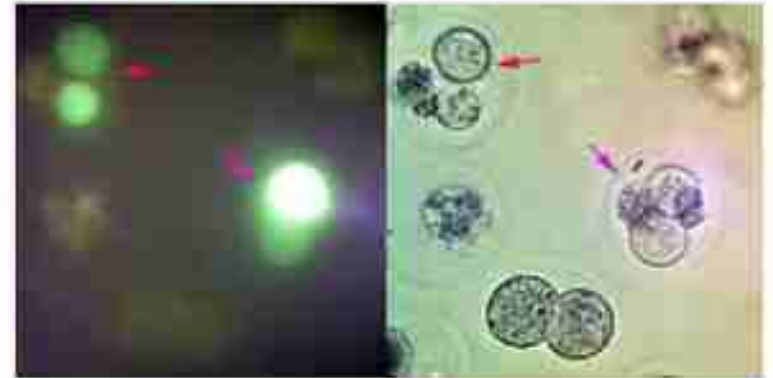
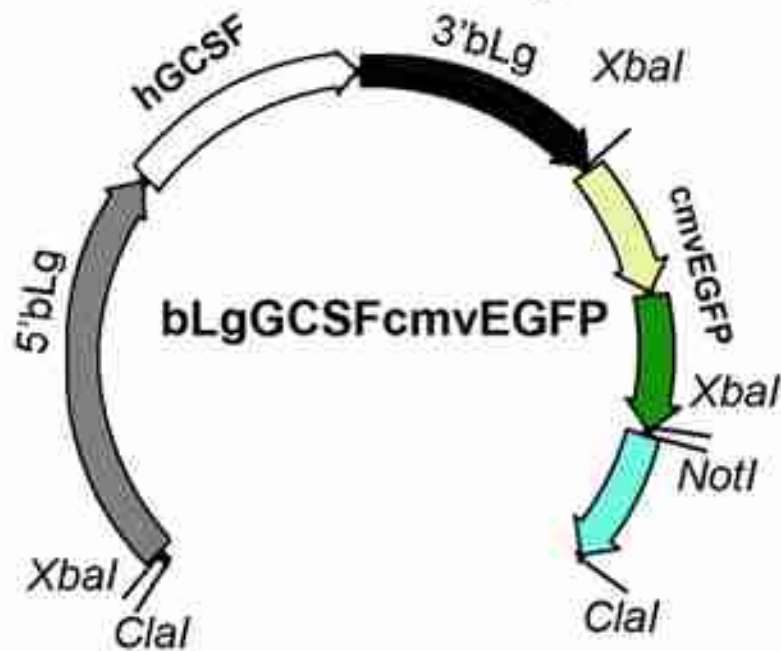
**Рис. . 4-х клеточный эмбрион мыши C57BL,
трансгенный по гену EGFP**





Получение трансгенных кроликов с геном GCSF человека и репортерным геном EGFP

Микроинъекция линейной генно-инженерной конструкции в пронуклеус зиготы



Отбор и трансплантация трансгенных эмбрионов



Трансгенное животное



Получение трансгенных кроликов с геном GCSF человека и репортерным геном EGFP



Были получены (F0):

Трансгенная крольчиха, у которой было два окрола. Крольчата погибали из-за отказа матери выхаживать потомство. Из 14 крольчат 2 были трансгенны. Уровень ГКСФ человека в молоке не превышал 0,2 мкг/мл. В сыворотке крови ГКСФ человека не обнаружен.

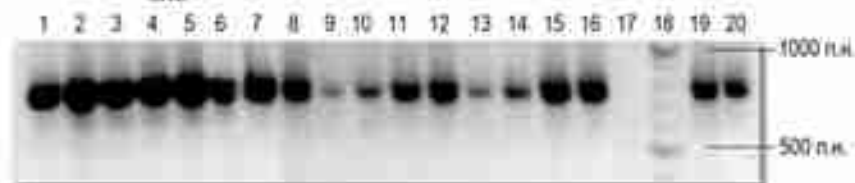
Трансгенный кролик с нормальной воспроизводительной функцией. Дал многочисленное потомство. Трансген наследовался только самцами.



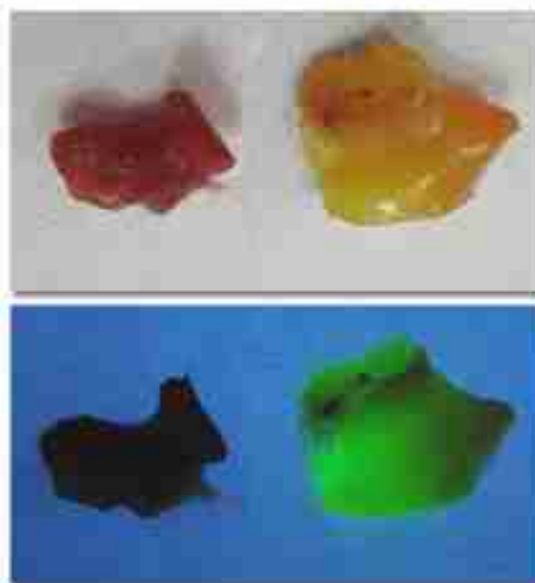
Экспрессия зеленого флуоресцентного белка в органах и тканях трансгенной крольчихи

ПЦР-анализ гена EGFP:

Дор. 1-16 – органы и ткани, 17 – K-; 18 –
– маркер молекулярных масс; 19 – K+;
20 – K_{инг}



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



«Красное» и
«зеленое» мясо в
видимом и
ультрафиолетов
ом свете

Разделанная тушка трансгенной крольчихи

**Внутренняя сторона
шкурки**

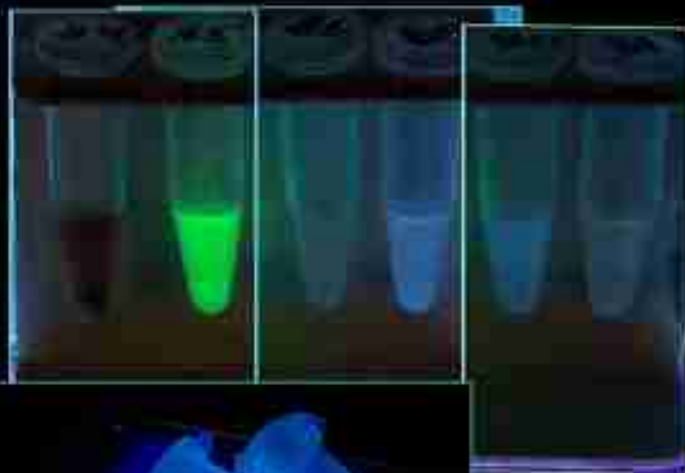


**Внешняя сторона
задней и передней
частей тушки**

**Внутренняя сторона
задней части тушки**



Смотря как смотреть...



Образцы тканей
и их гидролизатов
в ультрафиолетовом свете



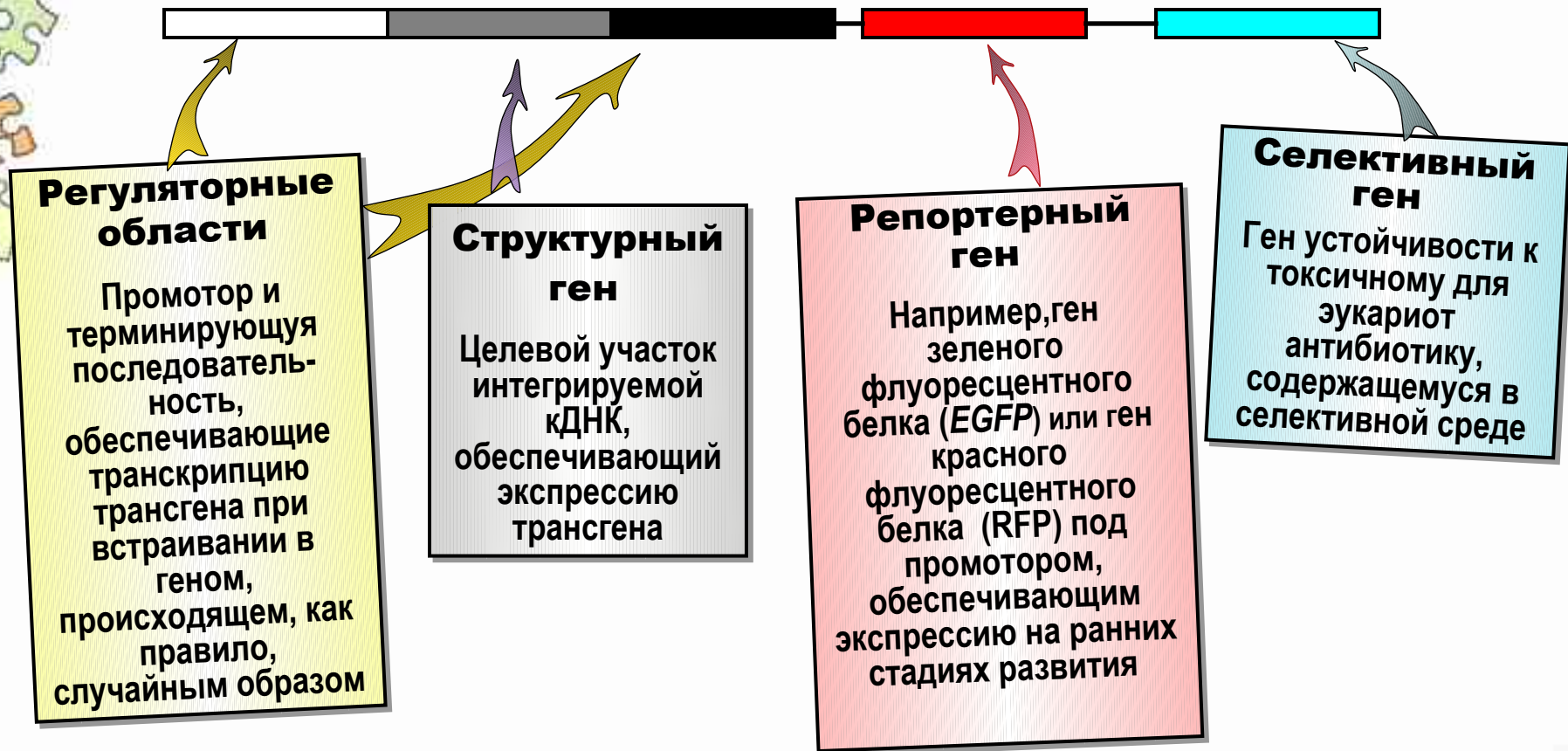
Внутренняя поверхность
бедрла освежеванной тушки
в видимом
и ультрафиолетовом свете



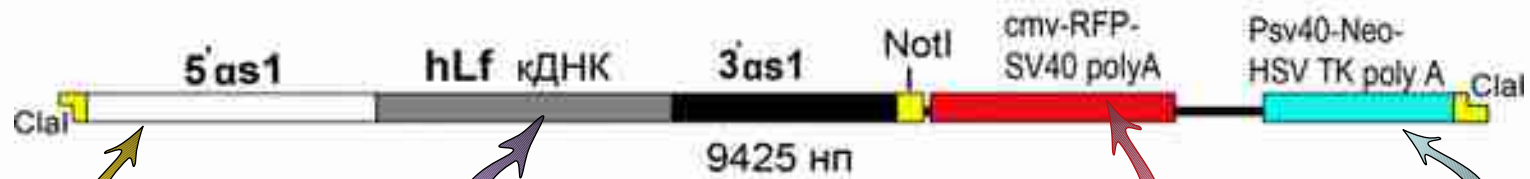
«Красная» и «зеленая»
мышечные ткани
в видимом
и ультрафиолетовом свете

**5. Использование
репортерных и селективных
генов
в составе генетических
конструкций**

Схема генетической конструкции, включающей репортерный и селективный гены



Генетическая конструкция **α s1LfcmvRFPsvNeo**



Регуляторные области

5' и 3' области гена α s1-казеина крупного рогатого скота (α s1)

α s1-казеин - основной белок молока жвачных. Регуляторные элементы гена α s1-казеина обеспечивают тканеспецифическую экспрессию трансгена в молочной железе (вариант - 5'область гена β -лактоглобулина крупного рогатого скота (β Lg))

Структурный ген

кДНК лактоферрина человека (hLF)

Источник железа; подавляет рост ряда патогенных бактерий; обладает противовоспалительным действием; инициирует активность киллерных клеток; усиливает антитело-зависимую клеточную цитотоксическую активность. Может быть использован как радиодиагностический препарат для обнаружения опухолей на ранних стадиях.

Репортерный ген

Ген красного флуоресцентного белка (RFP) под цитомегаловирусным (cmv) промотором

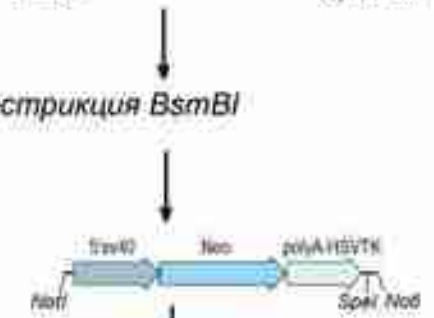
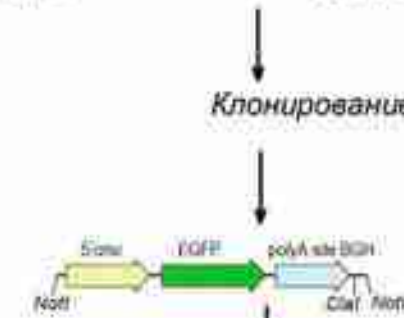
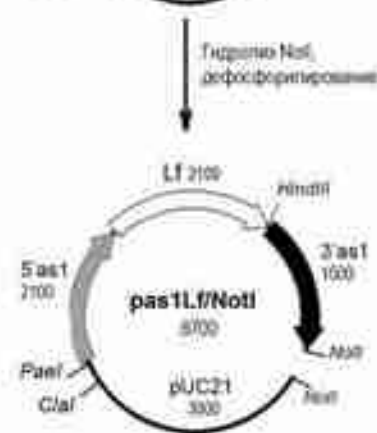
Белок поглощает свет с максимумом 553нм, испускает – 574 нм; не требуются субстрат или кофакторы для флуоресценции; термостабилен и устойчив к действию протеаз; не токсичен при использовании в качестве селекционного маркера у предимплантационных эмбрионов.

Селективный ген

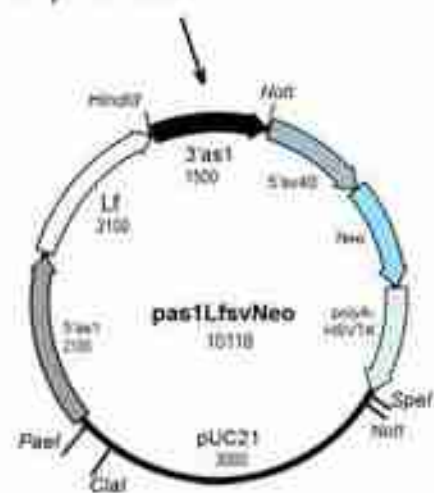
Ген устойчивости к неомицину (неомицинфосфотрансферазы) под ранним промотором sv40 (Neo)

Обеспечивает устойчивость трансфицированных конструкцией клеток млекопитающих к антибиотiku неомицину (G418) посредством продуцирования неомицинфосфотрансферазы.

5 and
2100

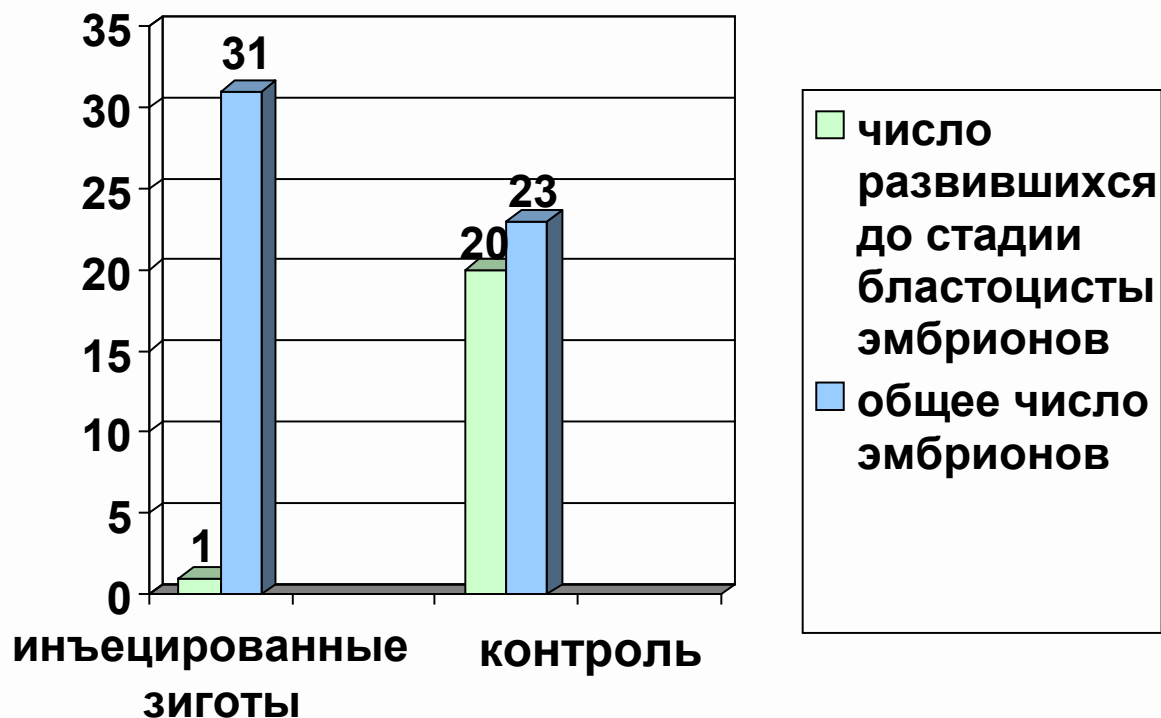


Клонирование в *pas1Lf*/NotI по сайту NotI, лигирование

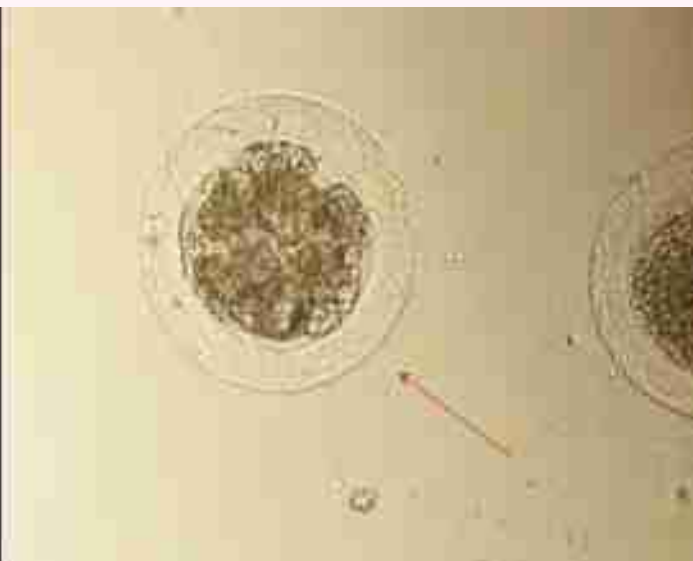




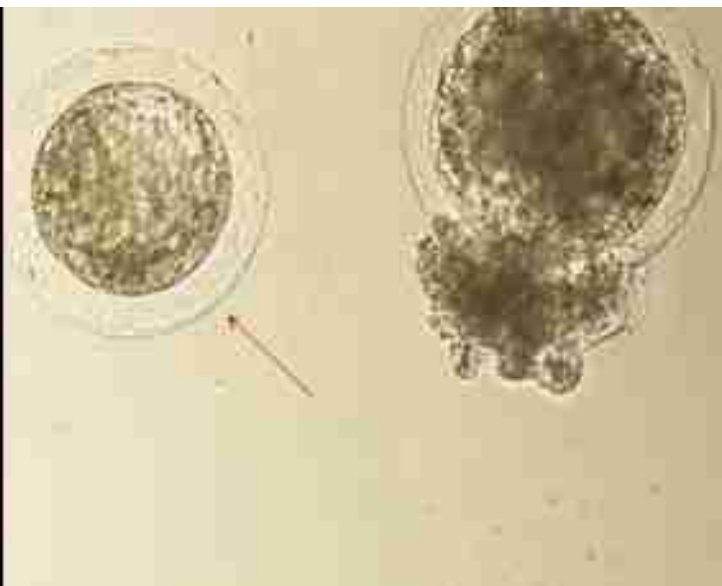
Развитие кроличьих зигот до стадии бластоцисты при введении в пронуклеус зигот конструкции *as1LfcmvEGFP**



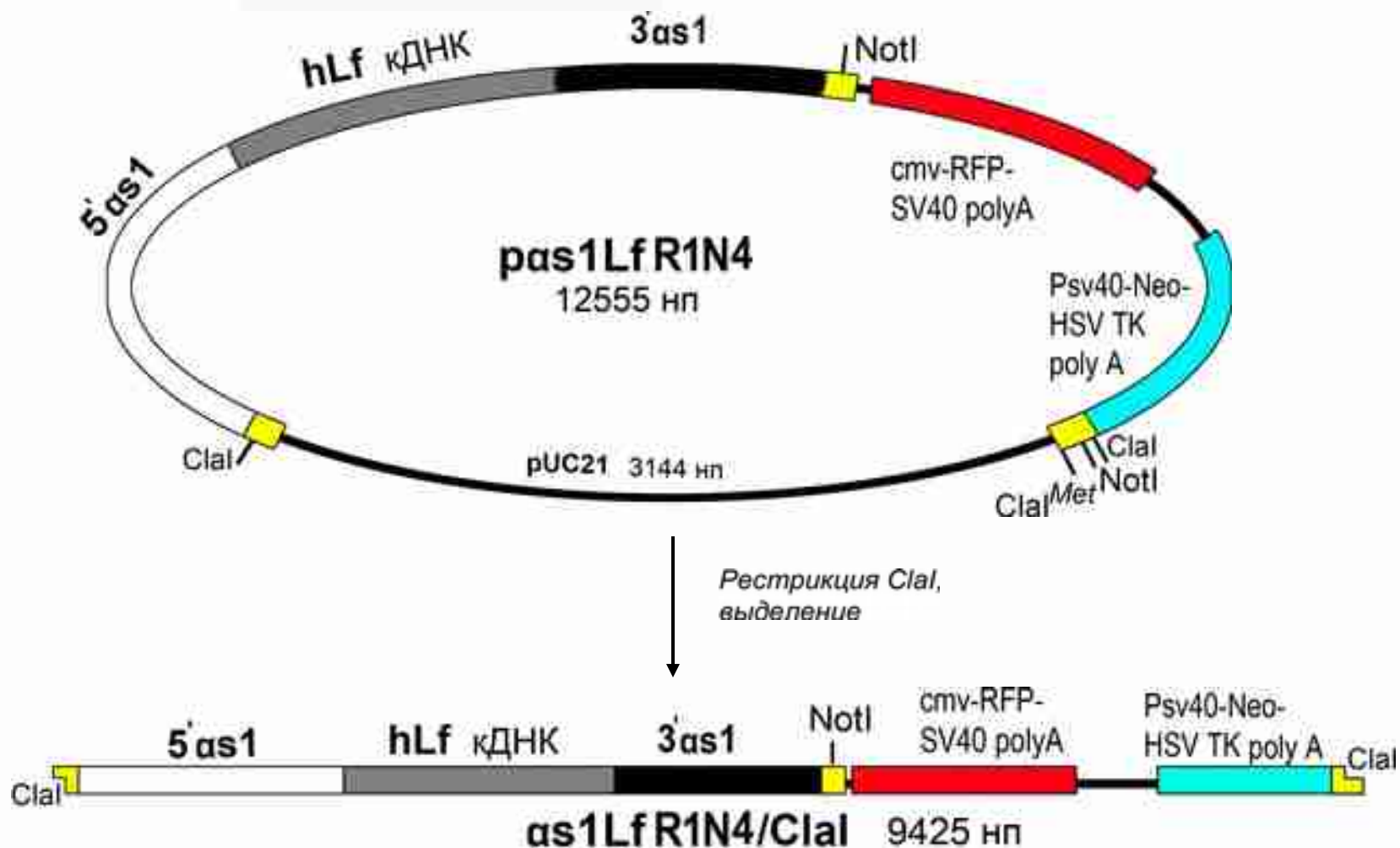
* С этой конструкцией также была получена трансгенная F0-крольчиха, погибшая в возрасте 4 месяца



Эмбрионы кроликов, инъецированные конструкцией с геном красного флуоресцентного белка (**α 1LfcmvRFP**). Фото справа – в обычном свете, слева – в красном свете.



Плазмида и конструкция, содержащие кДНК чЛФ, репортерный ген красного флуоресцентного белка и селективный ген устойчивости к неомицину



caactaaatt gtaagcgta atattttgtt aaaattcgcg taaattttt gttaaatcag ctcaattttt aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatca

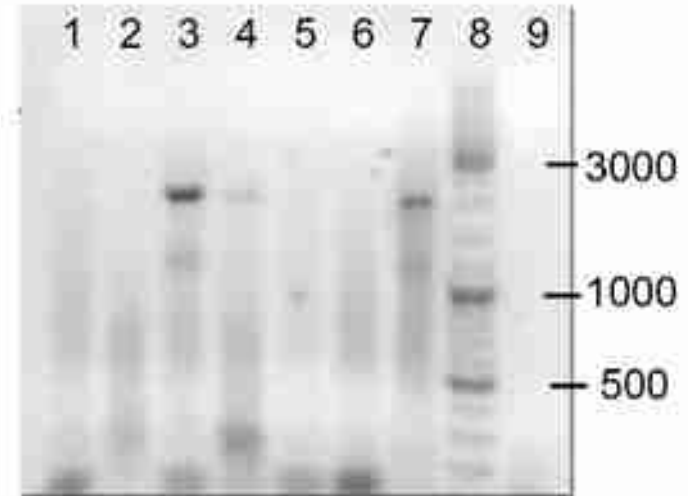
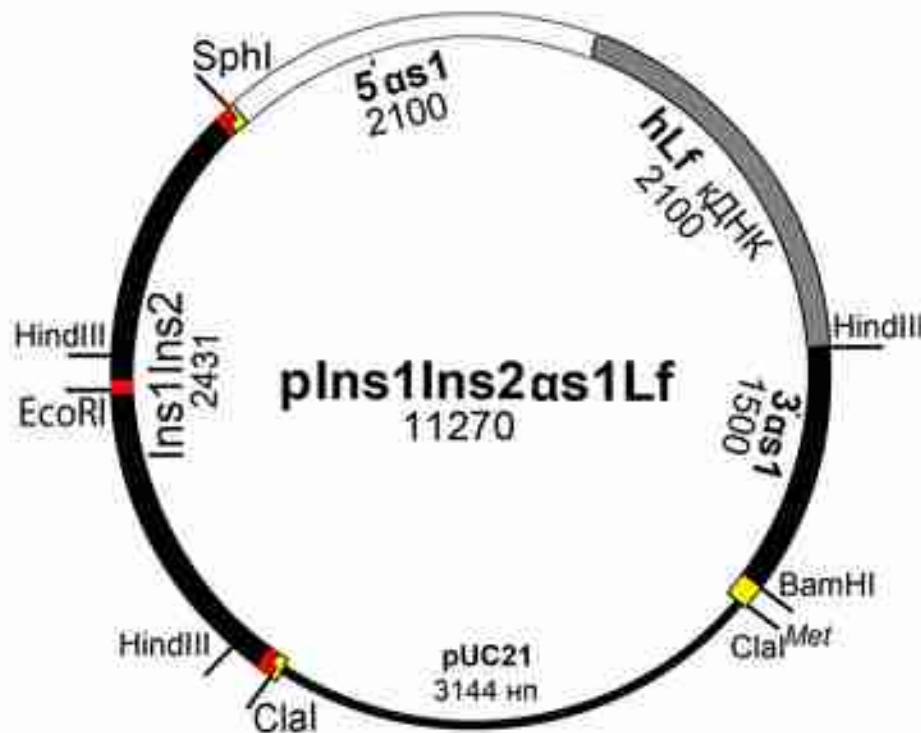
6. Другие конструкции:

- инсуляторы
- слитые белки
- «кроличья кассета»



Инсуляторы в составе конструкций

Плазмида pIns1Ins2as1Lf *

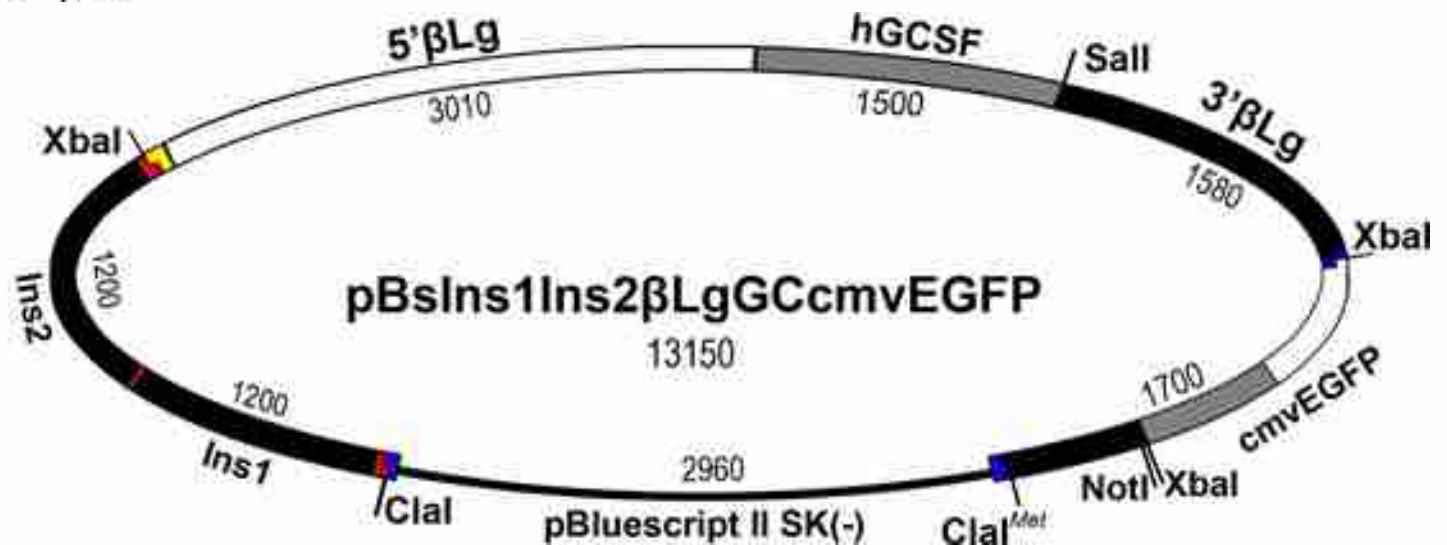
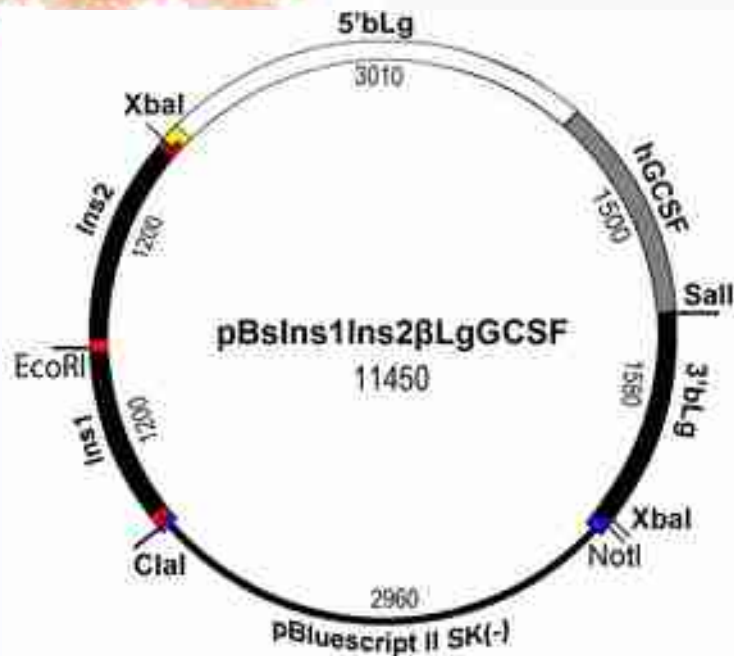


* Электрофореграмма ПЦР-амплификатов ДНК, выделенной из уха и тонкого кишечника крольчат F0, полученных в результате микроинъекции конструкции Ins1Ins2as1Lf.

Дор.3 и 4 – трансгенный крольчонок (живорожденный, погиб).

Дор. 7 – K+ (кролик, трансгенный по as1Lf).

Плазмиды pIns1Ins2bLgGCSF и pIns1Ins2bLgGCSFcmvEGFP



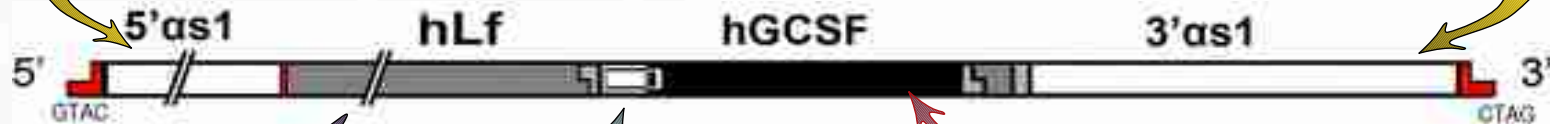
caactaaatt gtaagcggtt atattttggt aaaattcgcg taaattttt gttaaatcag ctcaattttt aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa

Конструкция с геном слитого белка: α s1LfGCSF*

Регуляторные области

5'область гена α s1-казеина крупного рогатого скота (α s1)

α s1-казеин - основной белок молока жвачных. Регуляторные элементы гена α s1-казеина должны обеспечить тканеспецифическую экспрессию трансгена в молочной железе



Структурный ген 1 кДНК лактоферрина человека (hLF)

Источник железа; подавляет рост ряда патогенных бактерий; обладает противовоспалительным действием; инициирует активность киллерных клеток; усиливает антителозависимую клеточную цитотоксическую активность. Может быть использован как радио-диагностический препарат для обнаружения опухолей на ранних стадиях.

Линкер

Нуклеотидная последовательность, соответствующая пептиду, расщепляемому пептидазой IgA
IgA протеаза не содержится в тканях млекопитающих - уменьшается риск расщепления слитого белка и превращения его в активную форму

Структурный ген 2

ДНК гранулоцит колоние-стимулирующего фактора человека (hGCSF)

Стимулирует фагоцитоз, хемотоксическую и антитело-зависимую цитотоксическую активность нейтрофилов. Стимулирует и регулирует пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических предшественников нейтрофилов. Увеличивает продолжительность жизни клеток головного мозга. Используется для лечения анемий различной этиологии, повышает эффективность трансплантации костного мозга

Структура прямого праймера для создания последовательности линкера

GCE1401 - прямой (46 нуклеотидов)

лизимуемая IgA-протеазой последовательность

-6 -5 -4 -3 -2 -1 +1 +2 +3 +4 +5
Pro-Ala-Pro-Arg-Pro-Pro-I-Thr-Pro-Leu-Gly-Pro

5'- ttCC TCAGG cca gcc cca cga cct cct -acc ccc ctg ggc cct g -3'
Bsu36I 1

5'-фрагмент гена чГКСФ

* С конструкцией *as1LfGCSF* был
получен живорожденный F0
трансгенный кролик, умерший в
течение месяца

*Спасибо
за внимание!*

