

ИНТЕГРАЦИЯ И ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРНЫХ ГЕНОВ В ЭМБРИОНАХ КУР ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РЕТРОВИРУСНЫХ ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ВЕКТОРОВ*

Н.А. ВОЛКОВА¹, Л.А. ВОЛКОВА¹, И.К. ФОМИН¹, Н.А. ЗИНОВЬЕВА¹,
Л.Ш. ГОРЕЛИК², Н.С. ЛОЦМАНОВА³

Изучена эффективность переноса экзогенной ДНК в эмбрионы кур *in vivo* с использованием ретровирусных векторов. Генные конструкции содержали маркерный ген GFP под контролем промотора ранних генов цитомегаловируса человека CMV IE (конструкция pLNCgfp) или промотора вируса лейкемии мышей Молони Мо-MuLV (конструкция pLgfpSN). Для доставки ретровирусных векторов использовали две пакующие линии — GP + envAM12 и PT67. Установлена высокая эффективность трансформации эмбрионов при использовании генной конструкции pLNCgfp (до 18,8 %). Показана экспрессия маркерного гена в клетках 5- и 15-суточных эмбрионов кур.

Ключевые слова: клеточная инженерия, трансгенез, ретровирусные векторы, куры.

Keywords: cell engineering, transgenesis, retrovirus vectors, chicken.

Изучение биологических основ создания трансгенных форм остается актуальной задачей современной науки. Трансгенез признается неотъемлемой частью биотехнологий будущего, сориентированных на решение широкого спектра задач фундаментального и прикладного характера. Одно из перспективных направлений в этой области — получение трансгенных кур-биореакторов (1-6).

Существенные физиологические различия между птицами и млекопитающими обуславливают явное преимущество использования первых в качестве продуктивной платформы при производстве рекомбинантных белков со сложной структурой: птицы иммуноустойчивы к потенциальным терапевтическим протеинам (например, к эритропоэтину человека), экспрессия которых может негативно влиять на состояние здоровья трансгенных млекопитающих, продуцирующих подобные лекарства на коммерческом уровне. К тому же при применении трансгенной птицы в качестве продуктивной платформы значительно снижается стоимость получаемых протеинов по сравнению с таковой при микробиологической ферментации *Escherichia coli*, дрожжей или культивировании клеток млекопитающих (7).

Вместе с тем, традиционный метод получения трансгенных животных (микроинъекция ДНК в пронуклеус зигот) при трансгенезе птицы малоэффективен, что требует поиска и разработки альтернативных приемов переноса экзогенной ДНК, к числу которых относится использование генных конструкций на основе рекомбинантных ретровирусов. Возможность адресной доставки экзогенных генов в делящиеся клетки делает применение подобных векторов особенно актуальным в случае трансформации эмбриональных клеток птицы, в частности кур, так как к снесению яйца эмбрион уже находится на стадии 50-60 тыс. клеток.

В этой связи целью нашей работы было изучение эффективности переноса рекомбинантной ДНК в эмбрионы кур *in vivo* с использованием различных ретровирусных экспрессирующих векторов в рамках поэтапной разработки и оптимизации технологии создания трансгенной птицы.

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, шифр 2012-1.4-12-000-2021-009. При проведении исследований использовано оборудование ЦКП «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» ГНУ ВИЖ Россельхозакадемии.

Методика. Для трансформации эмбрионов кур использовали две генные конструкции — pLgfpSN и pLNCgfp, полученные соответственно на основе векторов pLXSN и pLNCX (8). Конструкции содержали следующие цис-действующие элементы ретровирусного генома: 5'- и 3'-LTR (U3-R-U5); сайт связывания т-РНК затравки (PBS, primer binding site, сайт инициации синтеза минус-цепи ДНК); ψ -область, а также часть гена *gag* (последовательности, ответственные за упаковку и димеризацию вирусных РНК); *sd* (splice donor, донорный сайт сплайсинга); полипуриновый тракт (PPT, polypurine tract, сайт инициации синтеза плюс-цепи ДНК). Для селективного введения в клетки пакующей линии в конструкции был интегрирован ген устойчивости к химическому аналогу неомицина G418 (*neo*), контроль транскрипции которого осуществлялся либо с ретровирусного LTR (pLNCgfp), либо с промотора ранних генов вируса SV40 (pLgfpSN). В генной конструкции pLgfpSN маркерный ген GFP был поставлен под контроль промотора Mo-MuLV, в конструкции pLNCgfp — под контроль промотора ранних генов цитомегаловируса человека (CMV-IE). Для упаковки ретровирусных векторов применяли две пакующие линии — GP + envAM12 и PT67 (9, 10). Обе линии были получены на базе мышиных фибробластов NIH 3T3 и различались типом продуцируемых env-белков, ответственных за распознавание поверхностных рецепторов на клетках-мишенях.

В качестве источника генных конструкций использовали вирусный препарат с титром 9×10^5 КОЕ/мл. Конструкции вводили в дорсальную аорту 2,5-суточных эмбрионов кур (2 мкл на эмбрион) при помощи капиллярной микропипетки Transferpetor («Sigma», США). Эффективность введения ретровирусных векторов изучали на 5- и 15-суточных эмбрионах. Результативность трансформации эмбрионов кур определяли по наличию и экспрессии гена GFP. Наличие гена GFP выявляли методом полимеразной цепной реакции с использованием ДНК, выделенной из эмбрионов солевым методом (11). Экспрессию GFP оценивали на криостатных срезах тканей, полученных от эмбрионов, по наличию специфической флуоресценции (микроскоп фирмы «Nikon», Япония; фильтр 480-490 нм). Криостатные срезы готовили по общепринятой методике (12).

Результаты. Эффективность трансформации эмбрионов варьировала в зависимости от используемой генной конструкции и пакующей линии клеток. Минимальное влияние на эмбриогенез кур было установлено в вариантах с генными конструкциями, помещенными в пакующую линию pT67: развитие эмбрионов наблюдалось в 70-73 % случаев. При введении в эмбрионы кур генных конструкций, упакованных в клеточную линию GP + envAM12, эмбриональная смертность оказалась на 3-13 % выше (табл. 1). Значительных различий по влиянию на эмбриогенез кур в зависимости от используемой генной конструкции мы не установили.

1. Эффективность введения ретровирусных векторов pLNCgfp и pLgfpSN в эмбрионы кур *in vivo* при использовании разных линий клеток-упаковщиц

Показатель	Линия пакующих клеток			
	GP + envAM12		pT67	
	pLNCgfp	pLgfpSN	pLNCgfp	pLgfpSN
Проинъецировано эмбрионов, <i>n</i>	78	72	81	85
5-е сут эмбрионального развития				
Исследовано яиц, шт.	30	30	30	30
Развилось эмбрионов, <i>n</i> (%)	20 (67)	17 (57)	21 (70)	22 (73)
В том числе трансгенных, <i>n</i>	14	10	10	9
Частота интеграции, %	70,0	58,9	47,7	40,9
Эффективность трансгенеза, %	46,7	33,4	33,4	30,0
15-е сут эмбрионального развития				
Исследовано яиц, шт.	48	42	51	55

	Продолжение таблицы 1			
Развилось эмбрионов, <i>n</i> (%)	14 (29)	10 (24)	20 (39)	24 (44)
В том числе трансгенных, <i>n</i>	9	5	6	5
Частота интеграции, %	64,3	50,0	30,0	20,9
Эффективность трансгенеза, %	18,8	11,9	11,8	9,1

Примечание. Метод введения вирусного препарата, содержащего конструкцию, — в дорсальную аорту. Частоту интеграции (%) определяли как отношение числа полученных трансгенных эмбрионов к числу развившихся, эффективность трансгенеза (%) — как отношение числа полученных эмбрионов к числу инъецированных.

Высокую результативность генетической трансформации эмбрионов кур выявили при использовании генной конструкции pLNCgfp: доля трансформированных эмбрионов от общего числа инъецированных достигала 46,7 %. В варианте с генной конструкции pLgfpSN этот показатель был на 13,3-37,6 % ниже и варьировал от 9,1 до 33,4 %.

Использование пакующей линии GP + envAM12 позволило повысить частоту интеграции рекомбинантной ДНК и эффективность трансгенеза на 2,8-13,3 % по сравнению с показателем в случае линии pT67.

Оценивая эффективность переноса рекомбинантной ДНК в эмбрионы кур на 5-е и 15-е сут развития, следует отметить снижение доли трансгенных эмбрионов с увеличением срока инкубации. Так, при введении генной конструкции pLNCgfp процент трансгенных эмбрионов от общего числа проинъецированных составил на 5-е сут 46,7 %, на 15-е сут — 18,8 %. Аналогичную тенденцию отмечали и при использовании генной конструкции pLgfpSN: к 15-м сут по сравнению с 5-ми сут анализируемый показатель сократился на 20,9-21,5 % в зависимости от используемой линии клеток-упаковщиц. Снижение доли трансгенных эмбрионов с увеличением срока инкубации свидетельствует о влиянии экспрессии трансгена на эмбриогенез.

Топографический анализ паттернов интеграции показал, что наибольший процент трансформированных органов и тканей наблюдался при введении в эмбрионы кур генной конструкции pLNCgfp и пакующей линии GP + envAM12 — 42 % (табл. 2). Экспрессия репортерного белка была выявлена преимущественно в клетках печени, сердца и в мышечной ткани. При использовании генной конструкции pLgfpSN и пакующей линии pT67 результативность трансформации органов и тканей оказалась на 11 % ниже и равнялась 31 %.

2. Топография генетической трансформации *in vivo* у 15-суточных эмбрионов кур при введении ретровирусных векторов pLNCgfp и pLgfpSN с использованием разных линий клеток-упаковщиц

Показатель	Линия пакующих клеток			
	GP + envAM12		pT67	
	pLNCgfp	pLgfpSN	pLNCgfp	pLgfpSN
Трансгенных эмбрионов, <i>n</i>	9	5	6	5
Исследовано органов, <i>n</i>	5	5	5	5
Трансформированных органов в среднем по группе, %	42	40	34	31

Экспрессию гена GFP в органах и тканях у 5- и 15-суточных эмбрионов кур иллюстрирует рисунок (см. вклейку).

Таким образом, эксперименты по переносу рекомбинантной ДНК в эмбрионы *in vivo* показали перспективность использования ретровирусных векторов для генетической трансформации эмбриональных клеток кур и получения трансгенных особей. Высокая эффективность трансгенеза (18,8 %) установлена при использовании генной конструкции pLNCgfp и пакующей линии GP + envAM12.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kamihira M., Nishijima K., Iijima S. Transgenic birds for the production of recombinant proteins. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2004, 91: 171-189.
2. Kamihira M., Ono K., Esaka K. et al. High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *J. Virol.*, 2005, 79: 10864-10874.
3. Kiies W.A., Niemann H. The contribution of farm animals to human health. *Trends Biotechnol.*, 2004, 22: 286-294.
4. Rapp J.C., Harvey A.J., Speksnijder G.L. et al. Biologically active human interferon alpha-2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Res.*, 2003, 12: 569-575.
5. Эрнст Л.К., Волкова Н.А., Зиновьева Н.А. Некоторые аспекты использования трансгенных технологий в животноводстве. *Сельскохозяйственная биология*, 2009, 2: 4-9.
6. Scott B.B., Velho T.A., Sim S., Lois C. Applications of avian transgenesis. *ILAR J.*, 2010, 51(4): 353-361.
7. Ivarie R. Avian transgenesis: progress towards the promise. *Trends Biotechnol.*, 2003, 21: 14-19.
8. Miller A.D., Rosman G.J. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques*, 1989, 7: 980-990.
9. Markowitz D., Goff S., Bank A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology*, 1988, 167: 400-406.
10. Miller A.D., Chen F. Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. *Virology*, 1996, 70: 5564-5571.
11. Зиновьева Н.А., Попов А.Н., Эрнст Л.К. и др. Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве. Дубровицы, 1998.
12. Микроскопическая техника: руководство /Под ред. Д.С. Саркизова, Ю.П. Перова. М., 1996.

¹ГНУ Всероссийский НИИ животноводства
Россельхозакадемии,
142132 Московская обл., Подольский р-н, пос. Дубровицы,
e-mail: natavolkova@inbox.ru;
²ФГБОУ ВПО Уральская государственная академия
ветеринарной медицины,
457100 Челябинская обл., г. Троицк, ул. Гагарина, 13,
e-mail: natavolkova@inbox.ru;
³ГБОУ СПО Медицинское училище № 15
Департамента здравоохранения г. Москвы,
109263 г. Москва, ул. Шкулева, 4а,
e-mail: natavolkova@inbox.ru

Поступила в редакцию
19 января 2013 года

INTEGRATION AND EXPRESSION OF MARKER GENES IN CHICKEN EMBRYOS WITH THE USE OF RETROVIRAL VECTOR

*N.A. Volkova¹, L.A. Volkova¹, I.K. Fomin¹, N.A. Zinovieva¹,
L.Sh. Gorelik², N.S. Lotsmanova³*

S u m m a r y

The efficiency was investigated of transfer of exogenous DNA to chicken embryos in vivo with the use of retroviral vectors. The gene construction involves a marker gene GFT under control of promoter of yearly genes of human cytomegalovirus CMV IE (pLNCgfp) or promoter of Moloney leukemia virus Mo-MuLV (pLgfpSN). Two packing lines GP + envAM12 and PT67 were used for the delivery of retroviral vectors. It was established the high efficiency of embryo transformation with the use of pLNCgfp gene construction (up to 18.8 %). The expression of marker gene was demonstrated in cells of 5- and 15-day age chicken embryos.

Научные собрания

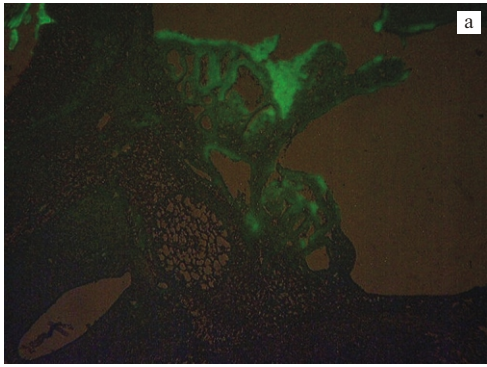


Био Активные Вещества и Материалы 2013
Биологически активные вещества и материалы:
фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения
27 мая - 1 июня 2013, Новый Свет, АР Крым, Украина

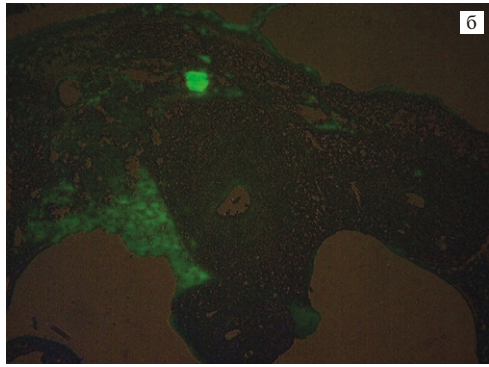
Эффективная междисциплинарная площадка для ученых, технологов и менеджеров производств и фирм.

Контакты и информация:
<http://bas2013.science-center.net>,
mavispublisher@gmail.com

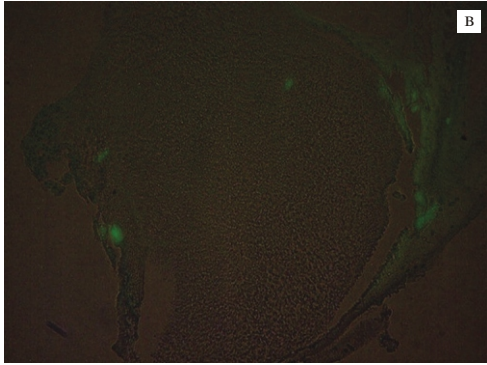
A



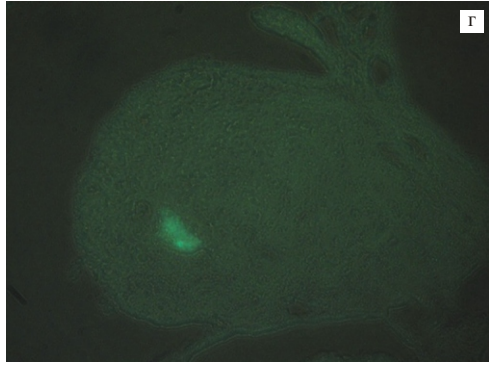
a



б

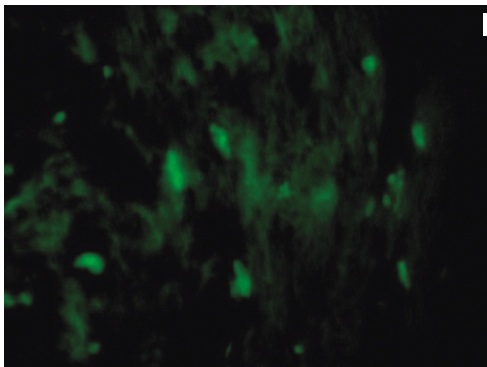


B

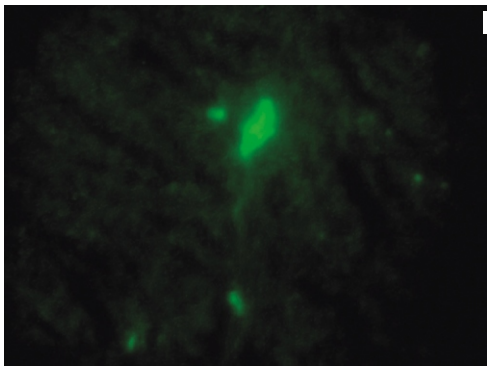
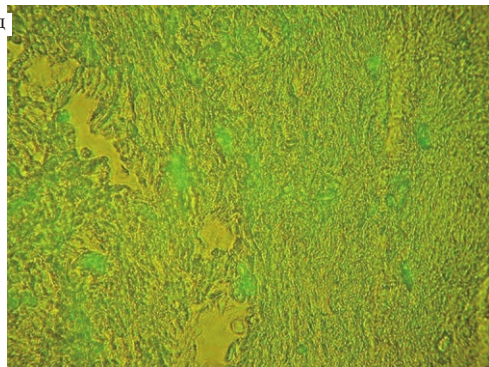


Г

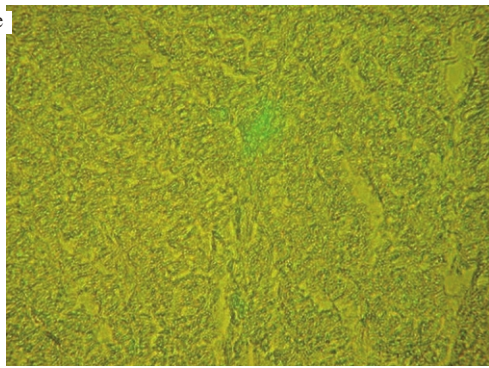
Б

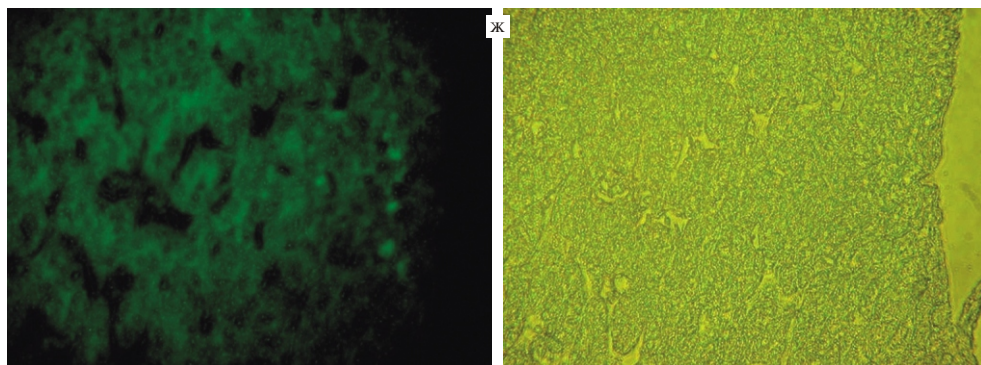


д



e





Экспрессия GFP у 5- (А) и 15-суточных (Б) эмбрионов кур при трансформации *in vivo* с использованием ретровирусного вектора pLNCgfp и пакующей линии GP + envAM12: а — первичная почка, б — печень, в — мышцы (увеличение $\times 160$), г — гонада (увеличение $\times 400$); д — печень, е — сердце, ж — мышцы (слева — в УФ-свете, справа — при одновременном использовании обычного освещения и УФ-света; люминесцентная микроскопия, увеличение $\times 400$).