

**Трансгенез. Культура клеток и тканей**

УДК 636.52/.58:573.6.086.83:636.082

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ВВЕДЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК В СПЕРМАТОГЕННЫЕ КЛЕТКИ СЕМЕННИКОВ ПЕТУХОВ *in vivo*\***

**Н.А. ВОЛКОВА<sup>1</sup>, Л.А. ВОЛКОВА<sup>1</sup>, И.К. ФОМИН<sup>1</sup>, Н.А. ЗИНОВЬЕВА<sup>1</sup>,  
Н.С. ЛОЦМАНОВА<sup>2</sup>**

Изучены факторы, влияющие на эффективность переноса рекомбинантной ДНК в клетки сперматогенного эпителия семенников петухов *in vivo* с использованием ретровирусных векторов. Максимальная эффективность трансформации сперматогенных клеток петухов установлена при использовании вирусного препарата в качестве источника генной конструкции (генная конструкция rLgfpSN, содержащая репортерный ген зеленого флуоресцирующего белка GFP, которая получена на основе рекомбинантного ретровирусного вектора). Показана возможность передачи трансгена потомству с частотой трансгенеза 4,2 %.

**Ключевые слова:** трансгенез, ретровирусные векторы, сперматогонии, куры.

**Keywords:** transgenesis, retrovirus vectors, spermatogonia cells, chicken.

Использование половых клеток самцов в качестве клеток-мишеней для адресной доставки ДНК рассматривают как один из перспективных способов получения трансгенных особей (1-5). Развитие этого направления особенно актуально в случае создания биоинженерных форм сельскохозяйственной птицы, так как особенности ее воспроизводства делают малоэффективным традиционный для сельскохозяйственных животных метод направленного переноса генов — микроинъекцию ДНК в пронуклеус зигот (6). Интерес к использованию клеток семенников в качестве векторов для доставки рекомбинантных генов связан прежде всего с их природной способностью поглощать чужеродную ДНК (чДНК) и переносить ее в яйцеклетку посредством оплодотворения (7). При этом интегрированная в геном организма чДНК может устойчиво передаваться в ряде поколений. Ввиду проведения манипуляций на взрослых животных значительно сокращаются материальные и временные затраты на получение трансгенного потомства.

Для трансформации половых клеток самцов используют различные методические подходы (липофекцию, электропорацию и вирусную трансдукцию), однако системы, позволяющие эффективно доставлять рекомбинантную ДНК в указанные клетки-мишени, пока что не разработаны. В то же время создание таких систем позволит получать трансгенных животных простым и удобным способом, так как искусственное осеменение давно и успешно применяется в сельскохозяйственной практике.

В качестве перспективного метода генетической модификации половых клеток можно рассматривать трансформацию указанного типа клеток на ранних стадиях их дифференцировки с использованием ретровирусных векторов, представляющих собой эффективный инструмент для введения генов с их последующей экспрессией.

В этой связи нами были проведены исследования по оптимизации условий введения экзогенной ДНК в половые клетки петухов *in vivo* с помощью ретровирусных векторов.

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

*Методика.* Для трансформации клеток сперматогенного эпителия петухов использовали генную конструкцию pLgfpSN, содержащую репортерный ген GFP (зеленый флуоресцирующий белок). Конструкция была получена на основе ретровирусного вектора pLXSN (8) и введена посредством трансфекции в пакующую клеточную линию GP+env-AM12, обеспечивающую *in trans* все необходимые функции для репликации вируса (9). Для определения титра вируса (КОЕ/мл) в вирусном препарате супернатант, собранный от клеток-упаковщиц (линия GP+env-AM12) центрифугировали в течение 10 мин при 3000 g для удаления клеток и дебриса. Инфицирование проводили немедленно после сбора вируса. Реципиентные клетки 293T высевали с плотностью  $3 \times 10^5$  на чашки Петри ( $d = 60$  мм) за сутки до инфицирования. На 2-е сут среду заменяли на 1 мл свежей среды, содержащей полибрен (8 мкг/мл) и аликвоты тестируемого вируса. Инкубирование проводили в течение 6 ч, после чего среду заменяли на свежую. Через 48-72 ч инкубации клетки снимали трипсином, ресуспендировали в PBS и измеряли флуоресценцию GFP на проточном цитофлуориметре FACSCanto («BD», США) с набором фильтров 480-490 нм (excitation) и 510 нм (emission).

Введение генной конструкции в паренхиму семенников *in vivo* осуществляли методом множественной инъекции (5-8 инъекций на семенник). В качестве источника конструкций использовали суспензию клеток-упаковщиц и вирусный препарат, который представляет собой среду культивирования клеток-упаковщиц, содержащую рекомбинантный ретровирус (10). Вирусный препарат ( $10^5$  КОЕ/мл) вводили с добавлением полибрена (8 мкг/мл). Доза клеток-упаковщиц в расчете на семенник составляла от 0,5 до 2,0 млн.

Анализ интеграции и экспрессии трансгена выполняли с помощью ПЦР и иммуногистохимического метода (11). В последнем варианте проанализировали не менее 20 гистологических срезов (толщина 4-5 мкм) с интервалом 50 мкм. Материал для гистологических исследований отбирали при убое птицы. Семенники фиксировали раствором Буэна. Гистологические срезы готовили по общепринятой методике (12). Было проанализировано не менее 30 семенных канальцев от каждого петуха (учитывали только семенные канальцы, имеющие округлую форму). Исследование гистопрепаратов осуществляли с помощью программы Image Scope (ООО «Системы для микроскопии и анализа», г. Москва).

С целью изучения результативности передачи трансгена потомству выполняли генетическую модификацию семенников у петухов *in vivo* ( $n = 6$ ) с использованием вирусного препарата в качестве источника генной конструкции. Генную конструкцию вводили в семенники 2,5-месячным особям. С целью объективной оценки эффективности передачи трансгена потомству исследовали полученные эмбрионы (от каждого подопытного петуха — не менее 100 эмбрионов). Рекомбинантную ДНК в эмбрионах кур выявляли с помощью ПЦР.

Для статистической обработки данных использовали стандартную компьютерную программу Microsoft Excel.

*Результаты.* Введение генной конструкции pLgfpSN в семенники петухов выполняли по представленной ниже схеме (табл. 1).

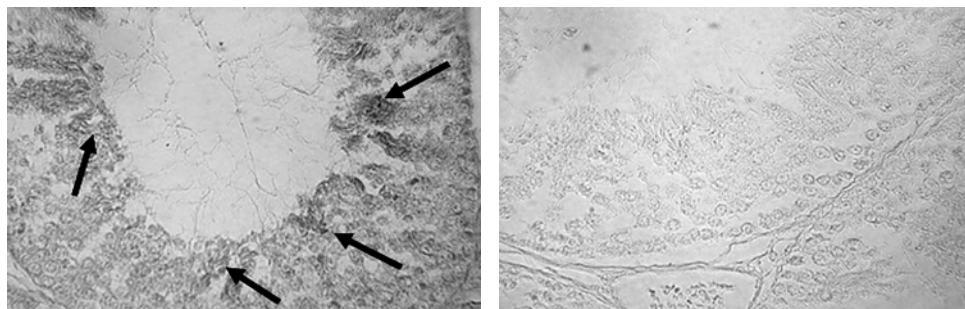
Интеграция и экспрессия репортерного гена GFP в клетках сперматогенного ряда были установлены как при введении вирусного препарата, так и после инъекции суспензии клеток-упаковщиц (рис.). Число трансформированных сперматогенных клеток в одном семенном канальце

варьировало от 1 до 26 независимо от используемого источника генной конструкции.

### 1. Схема введение генной конструкции pLgfpSN в семенники петухов *in vivo* по группам птицы

Показатель	Группа			
	I	II	III	IV
Объем суспензии в расчете на семенник, мл	1	1	1	1
Концентрация вирусного препарата, КОЕ/мл	$1 \times 10^5$	—	—	—
Число клеток-упаковщиц в расчете на семенник, млн	—	0,5	1,0	2,0
Возраст животных, нед	3	3	3	3
Число животных, <i>n</i>	3	3	3	3

Примечание. В I группе источником генной конструкции был вирусный препарат, во II, III и IV группах — суспензия клеток-упаковщиц.



Иммуногистохимическое окрашивание среза семенника у петуха при экспрессии репортерного гена GFP после введения генной конструкции pLgfpSN, полученной на основе рекомбинантного ретровирусного вектора (слева — опыт, справа — контроль). Трансформированные половые клетки внутри семенных канальцев отмечены стрелками. Хромоген — аминоэтилкарбозол, увеличение  $\times 400$ .

### 2. Эффективность генетической трансформации семенных канальцев и клеток сперматогенного эпителия в семенниках петухов *in vivo* в зависимости от схемы введения генной конструкции pLgfpSN

Показатель	Группа, <i>n</i> = 3			
	I	II	III	IV
Концентрация вирусного препарата, КОЕ/мл	$4,2 \times 10^5$	—	—	—
Число клеток-упаковщиц в расчете на семенник, млн	—	0,5	1,0	2,0
Исследовано срезов от каждого петуха, <i>n</i>	20	20	20	20
Доля срезов с трансформированными семенными канальцами, %	85	85	50	35
Доля трансформированных семенных канальцев на срезе, %:				
минимальная	1,7	5,9	1,7	2,5
максимальная	31,0	47,1	31,3	13,2
в среднем по группе	$15,7 \pm 2,10$	$18,1 \pm 2,60$	$10,7 \pm 2,20$	$5,8 \pm 0,90$
Общая эффективность трансформации семенных канальцев, %	$13,3 \pm 2,30$	$9,1 \pm 2,70$	$8,6 \pm 2,20$	$2,3 \pm 0,90$
Доля трансформированных сперматогенных клеток в семенных канальцах, %:				
минимальная	1,8	1,3	0,1	0,7
максимальная	32,2	47,2	21,1	11,1
в среднем по группе	$1,5 \pm 0,30$	$1,0 \pm 0,30$	$0,6 \pm 0,20$	$0,3 \pm 0,05$
Общая эффективность трансформации клеток в семенных канальцах, %	$1,3 \pm 0,30$	$0,5 \pm 0,20$	$0,3 \pm 0,20$	$0,1 \pm 0,04$

Примечание. Общая эффективность трансформации семенных канальцев — отношение числа трансформированных семенных канальцев к общему числу исследованных семенных канальцев, выраженное в процентах. Общая эффективность трансформации сперматогенных клеток — отношение числа трансформированных сперматогенных клеток к общему числу исследованных клеток, выраженное в процентах.

При введении вирусного препарата в семенники петухов из 60 проанализированных срезов только на 51 было выявлено наличие семенных канальцев с трансформированными сперматогенными клетками, и доля таких канальцев на одном срезе достигала  $15,7 \pm 2,1$  % (табл. 2). Доля трансформированных клеток в семенных канальцах варьировала от 1,8 до 32,2 % и составила в среднем по группе  $1,5 \pm 0,3$  %. Вместе с тем общая эффек-

тивность трансформации семенных канальцев и клеток сперматогенного слоя семенников (отношение числа трансформированных семенных канальцев и клеток к их общему числу на всех исследованных срезах, выраженное в процентах) составила соответственно  $13,3 \pm 2,3$  и  $1,3 \pm 0,3$  %.

С целью повышения эффективности трансгенеза был проведен ряд экспериментов по оптимизации дозы вводимой генной конструкции в семенники самцов *in vivo*. В качестве источника генной конструкции использовали суспензию клеток-упаковщиц (от 0,5 до 2,0 млн клеток в дозе). Предполагалось, что увеличение количества вводимых клеток-упаковщиц позволит усилить трансгенез сперматогенных клеток в семенниках петухов. Однако с ростом дозы клеток-упаковщиц наблюдалась обратная тенденция. Кроме того, результативность переноса рекомбинантной ДНК в семенные канальцы и клетки сперматогенного слоя в семенниках петухов оказалась ниже, чем при использовании вирусного препарата. Так, при инъекции суспензии клеток-упаковщиц в дозе 0,5 млн общая эффективность трансформации семенных канальцев составила  $9,1 \pm 2,7$  %, сперматогенных клеток —  $0,5 \pm 0,2$  %, что было в 1,5–2,6 раза ниже аналогичных показателей при введении вирусного препарата. В варианте с введением клеток-упаковщиц из расчета 2,0 млн на семенник различия по изученным показателям стали больше: эффективность трансформации семенных канальцев не превышала  $2,3 \pm 0,9$  %, клеток сперматогенного слоя —  $0,1 \pm 0,04$  %. Снижение частоты трансформации сперматогенных клеток семенников при увеличении числа вводимых клеток-упаковщиц, вероятно, связано с иммунной реакцией организма на введение чужеродных клеток.

Возможность передачи трансгена потомству при генетической модификации семенников петухов *in vivo* с использованием вирусного препарата в качестве источника генной конструкции pLgfpSN была подтверждена у всех подопытных петухов, в то же время число трансгенных эмбрионов в потомстве разных особей варьировало от 1 до 7 и составило в среднем 4,2 %. От двух петухов с максимальной эффективностью трансформации клеток семенников генной конструкцией получили по 30 цыплят, у двух из которых установили наличие трансгена. Эти данные свидетельствуют о перспективности использования генных конструкций на основе рекомбинантных ретровирусов для генетической трансформации клеток семенников петухов *in vivo*, причем использованный подход, характеризующийся невысокими временными и материальными затратами, может рассматриваться как эффективная альтернатива другим способам создания трансгенной птицы.

Таким образом, нами оптимизированы условия введения генных конструкций в семенники петухов *in vivo*. Максимальная эффективность трансформации клеток сперматогенного слоя семенников установлена при использовании в качестве источника генной конструкции вирусного препарата. У двух цыплят, полученных от петухов с наибольшей частотой трансформации клеток семенников генной конструкцией pLgfpSN, эта конструкция выявлена, что указывает на перспективность использования генных конструкций на основе рекомбинантных ретровирусов при трансгенезе сельскохозяйственной птицы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Brinster R.L., Nagano M. Spermatogonial stem cell transplantation, cryopreservation and culture. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 1998, 9(4): 401-409.
2. Савченкова И.П., Коржикова С.В., Костерева Н.В., Эрнст Л.К. Культивирование и трансплантация сперматогоний типа А хряков. *Онтогенез*, 2006, 37(4): 292-300.

3. Коржикова С.В. Выделение, характеристика и трансплантация сперматогоний типа А хряка. Автореф. канд. дис. Дубровицы, 2002.
4. Novgorodova I.P., Mormyshev A.N., Volkova N.A., Zinovieva N.A., Ernst L.K. In vivo genetic transformation of rabbit spermatogonia cells. *Biotechnology in Russia*, 2008, 1: 35-41.
5. Волкова Н.А., Зиновьева Н.А., Волкова Л.А., Лоцманова Н.С., Эрнст Л.К. Изучение факторов, влияющих на эффективность переноса генов в половые клетки самцов сельскохозяйственных животных. *С.-х. биол.*, 2010, 6: 16-19.
6. Ivarie R. Avian transgenesis: progress towards the promise. *Trends Biotechnol.*, 2003, 21: 14-19.
7. Spadafora C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays*, 1998, 20: 955-964.
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. Новое в клонировании ДНК. Методы /Под ред. Д. Гловера. М., 1989.
11. Микроскопическая техника: Руководство /Под ред. Д.С. Саркизова, Ю.П. Перова. М., 1996.
12. Ромейс Б. Микроскопическая техника /Пер. с нем. В.Я. Александрова, З.И. Кроковой. М., 1953.

*1*ГНУ Всероссийский НИИ животноводства  
Россельхозакадемии,  
142132 Московская обл., Подольский р-н, пос. Дубровицы,  
e-mail: natavolkova@inbox.ru;

*2*ГБУ СПО Медицинское училище № 15  
Департамента здравоохранения г. Москвы,  
109263 г. Москва, ул. Шкулева, 4а

*Поступила в редакцию  
15 октября 2012 года*

## OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR RECOMBINANT DNA INJECTION INTO SPERMATOGENIC CELLS OF THE CHICKEN *in vivo*

*N.A. Volkova<sup>1</sup>, L.A. Volkova<sup>1</sup>, I.K. Fomin<sup>1</sup>, N.A. Zinovieva<sup>1</sup>, N.S. Lotsmanova<sup>2</sup>*

### Summary

The factors affecting the efficiency of the transfer of recombinant DNA into seminiferous epithelium of the chicken *in vivo* using retroviral vectors are studied. The maximum efficiency of the transformation of spermatogenic cells in chicken is demonstrated when virus was used as a source of genetic structure (pLgfpSN gene construct which contains the reporter gene of green fluorescent protein GFP based on the recombinant retroviral vector). The possibility of transmission of the transgene to offspring with the efficiency of transgenesis 4.2 % is shown.

### Новые книги

**Медицинская микробиология, вирусология и иммунология.** М.: изд-во «ГЭОТАР-Медиа», 2011, 928 с.

Издание подготовлено сотрудниками кафедр микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова, Российского государственного медицинского университета, Московского государственного медико-стоматологического университета, Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени И.П. Павлова, Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, Оренбургской государственной медицинской академии, Ростовского государственного медицинского университета, Омской государственной медицинской академии, Волгоградской государственной медицинской академии, Челябинской государственной медицинской академии. Учебник состоит из двух томов (20 глав), в которых последовательно разбираются вопросы об-

щей и частной микробиологии, вирусологии и иммунологии. Теоретический материал проиллюстрирован таблицами и рисунками. Первый том состоит из 2 частей, в которые входят 14 глав. Материал первой части (гл. 1-7) посвящен общей микробиологии. Во второй части (гл. 8-14) изложено учение об инфекции и иммунитете. Издание дополнено компакт-дискom.

**Иванов А.А. Физиология рыб.** СПб: изд-во «Лань», 2011, 288 с.

Описаны осморегуляция рыб, деятельность их почек и жабр, сенсорные системы (зрение, слух и т.д.). Дана характеристика нервной системы, кожного покрова, движения, особенностей кровообращения, газообмена, пищеварения. Уделено внимание физиологическим основам искусственного питания рыб, физиологии их воспроизводства. Охарактеризованы эндокринная система, иммунитет, поведение в различных условиях, стрессовое состояние и т.д.