

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНА ОВАЛЬБУМИНА НА ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЭКСПРЕССИЮ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГЕНОВ*

Н.А. ВОЛКОВА, И.К. ФОМИН, А.В. ДОЦЕВ, Т.Е. ДЕНИСКОВА,
Н.А. ЗИНОВЬЕВА

Использование лентивирусных векторов для генетической модификации эмбриональных клеток кур рассматривается в качестве одного из перспективных способов получения трансгенной сельскохозяйственной птицы. При этом встает вопрос об определении регуляторных элементов гена овальбумина, обеспечивающих тканеспецифичность и высокую экспрессию трансгена в клетках яйцевода кур. Целью настоящей работы стало изучение влияния последовательностей в составе интрона и промотора гена овальбумина на тканеспецифичность и экспрессию трансгена. Мы получили 5 экспрессирующих конструкций на основе лентивирусного вектора pWpx1, где маркерный ген *eGFP* был поставлен под контроль модифицированных регуляторных элементов гена овальбумина. В состав вектора pW2.8 входил хромосомный фрагмент ДНК размером 2,8 т.п.н., включавший первый экзон, интронную последовательность, а также часть второго экзона гена овальбумина; в состав вектора pW1.2 — хромосомный фрагмент ДНК длиной 1,2 т.п.н., включавший промотор и последовательность (без интрона и первого экзона) гена овальбумина до точки инициации транскрипции; в векторы pW131, pW225, pW315 — хромосомный фрагмент ДНК, аналогичный фрагменту 1,2 т.п.н. в векторе pW1.2, в котором промоторная часть (80 п.н.) была заменена соответственно на 131, 225 или 315 п.н. высокоструктурированной последовательности промоторной области гена β -актина птиц. Контрольный вектор pWCAGgfp включал конститутивный гибридный регуляторный элемент, содержащий энхансер ранних генов цитомегаловируса человека и промотор гена β -актина птиц (CAG). В качестве клеток-мишеней для трансфекции использовали первичную культуру клеток яйцевода кур и клетки фибросаркомы человека 293T (контроль). Вирусный препарат вносили в концентрации $1-3 \times 10^7$ КОЕ/мл по достижении клетками монослоя. Экспрессию *eGFP* определяли флуориметрически через 72 ч после трансфекции. В условиях *in vitro* на культуре клеток яйцевода кур и клеточной линии 293T была подтверждена низкая степень экспрессии гена *eGFP*, контролируемого хромосомным фрагментом 2,8 т.п.н. из лидерной области гена овальбумина: экспрессия рекомбинантного белка оказалась в 25 раз ниже, чем в случае вектора pWCAGgfp с конститутивным промотором CAG. При этом степень экспрессии *eGFP* для конструкций pW2.8 и pW1.2 была идентичной, что свидетельствует об отсутствии влияния интрона на экспрессию рекомбинантной ДНК с использованием этого регуляторного элемента. При замене промотора гена овальбумина на высокоструктурированные элементы конститутивного промотора гена β -актина отмечалось увеличение экспрессии *eGFP* в 2-3 раза, а также наблюдалось усиление экспрессии по мере удлинения промоторной области гена β -актина (векторы pW131, pW225, pW315). Экспрессия, достигнутая с использованием экзогенного промотора гена β -актина, была сопоставима с контролируемой конститутивным промотором CAG, однако замена промоторной части гена овальбумина на экзогенный промотор (гена β -актина) приводила к дерегуляции тканеспецифичного выражения *eGFP*, что свидетельствует о том, что транскрипция с тканеспецифичного промотора гена овальбумина не может быть модулирована или активирована с помощью экзогенных энхансеров.

Ключевые слова: трансгенез, куры, лентивирусные вектора, яйцевод, регуляторные элементы гена овальбумина.

Использование вирусных векторов, полученных на основе рекомбинантных ретровирусов и лентивирусов, для генетической модификации сельскохозяйственной птицы рассматривается как один из перспективных способов получения трансгенных особей. Высокая эффективность применения этих векторных систем для трансгенеза кур показана разными исследователями (1-6). Одно из основных направлений в трансгенезе сельскохозяйственной птицы — разработка эффективных векторных систем, обеспечивающих высокую экспрессию рекомбинантного белка в клетках яйцевода для получения трансгенного продукта.

Значительная экспрессия рекомбинантного белка в клетках яйце-

* Исследования выполнены при поддержке ФАНО России.

вода (до нескольких мг/мл) у трансгенных особей (G_0) была достигнута при использовании генных конструкций, включающих конститутивные промоторы-энхансеры, в частности промотор-энхансер ранних генов цитомегаловируса человека (CMV) и промотор-энхансер гена β -актина птиц (7). Вместе с тем отмечалось снижение экспрессии рекомбинантного белка в клетках яйцевода в последующих поколениях (G_1 и G_2). Была установлена прямая корреляционная связь между экспрессией рекомбинантного продукта и «дозой гена» (числом копий вируса в расчете на клеточный геном): интенсивная выработка трансгенного продукта в органах и тканях у генно-модифицированных особей повышает вероятность развития физиологических дефектов (8-10).

Решением проблемы служит использование в составе генных конструкций промоторов, обеспечивающих тканеспецифичную экспрессию рекомбинантных генов. В качестве перспективного подхода рассматривается применение регуляторных элементов, которые контролируют синтез овальбумина яиц, в частности хромосомных фрагментов ДНК длиной 7,5 и 2,8 т.п.н., примыкающих на 5'-конце к гену овальбумина (11-15). При включении этих фрагментов ДНК в генные конструкции отмечалась стабильная тканеспецифичная экспрессия рекомбинантного гена у нескольких поколений трансгенной птицы. Однако синтез рекомбинантного продукта был в 20-50 раз ниже по сравнению с результатами, полученными при использовании конститутивных промоторов (16). Это свидетельствует о влиянии на систему регуляции синтеза овальбумина ряда регуляторных элементов, расположенных как внутри, так и рядом или вне структурного гена.

Мы впервые предприняли попытку изучить степень тканеспецифического выражения генов с использованием различных модификаций хромосомного фрагмента ДНК размером 2,8 т.п.н., который включал около 1,2 т.п.н., расположенных до точки инициации транскрипции, а также 1,6 т.п.н., в том числе первые два экзона и интрон гена овальбумина.

Цель представленной работы — изучить влияние последовательностей интрона и промотора гена овальбумина в составе генных конструкций на тканеспецифичность и экспрессию рекомбинантной ДНК.

Методика. Использовали модифицированную лентивирусную векторную систему второго поколения, в состав которой входили три плазмиды: psPAX2 (кодирует гены *gag* и *pol*, служит классическим упаковщиком), pLPG (кодирует поверхностный гликопротеин G вируса везикулярного стоматита VVS-G) и pWPXL (содержит ген *eGFP*, enhanced green fluorescence protein, под контролем промотора гена фактора элонгации 1 РНК-полимеразы II человека *hEF1 α* , служит самоинактивирующимся лентивирусным вектором) (17). Векторы pWCAGgfp, pW2.8, pW1.2, pW131, pW225 и pW315 конструировали на основе плазмиды pWPXL, лентивирусные векторы — стандартными методами молекулярного клонирования (18).

Для получения рекомбинантного вируса и определения вирусных титров использовали клеточную линию 293Т. Клетки культивировали в среде DMEM (Dibacco's Modified Eagle's Medium), содержащей эмбриональную телячью сыворотку (10 %), L-глутамин (2 мМ), пенициллин (100 ЕД/мл), стрептомицин (100 мкг/мл), в атмосфере 5 % CO_2 при температуре 37 °С. Вирусные препараты концентрировали, подвергая культуральные супернатанты ультрацентрифугированию (70000 g, 120 мин, +4 °С), осадки ресуспендировали в буфере TNE (50 мМ Трис-НСl, pH 7,8; 130 мМ NaCl; 1 мМ Na_2 -EDTA). Физический титр вирусных векторов определяли в количественной real-time PCR на приборе MiniOpticon™ («Bio-Rad», США), биологический титр вируса — согласно G. Tiscornia с соавт. (19). Полу-

ченные вирусные препараты применяли для инфицирования первичной культуры клеток яйцевода кур согласно методике (20).

В качестве клеток-мишеней для трансфекции использовали первичную культуру клеток яйцевода кур и клетки фибросаркомы человека 293Т (контроль). Вирусный препарат (1-3 КОЕ/мл) вносили по достижении клетками монослоя.

Флуоресценцию eGFP измеряли на проточном цитофлуориметре FACSCanto («BD», США) с набором фильтров $\lambda = 480-490$ нм (excitation) и $\lambda = 510$ нм (emission) через 72 ч после трансфекции. Для учета экспрессии eGFP определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI, mean fluorescence intensity) клеток с экспрессирующими конструкциями по сравнению с исходными клетками.

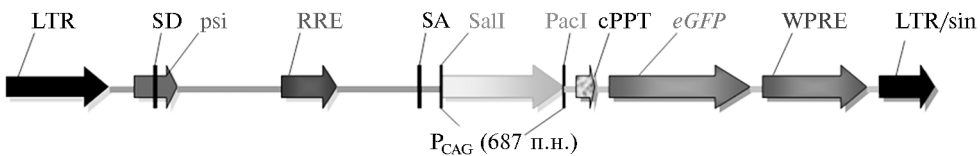
Результаты. На основе лентивирусного вектора pWpxl было получено пять экспрессирующих генных конструкций, содержащих маркерный ген eGFP под контролем модифицированных регуляторных элементов гена овальбумина (табл. 1).

1. Характеристика генных конструкций, полученных на основе лентивирусного вектора pWpxl (в качестве структурного использован ген eGFP)

Вектор	Регуляторные элементы
pW2.8	2,8 т.п.н., включает первый экзон, первый интрон, а также часть второго экзона гена овальбумина
pW1.2	1,2 т.п.н., включает промотор и последовательность (без интрона и первого экзона) гена овальбумина до точки инициации транскрипции
pW131	1,2 т.п.н., аналогично pW1.2 промоторная часть (80 п.н.) заменена на 131 п.н. высокоструктурированную последовательности промоторной области гена β -актина птиц
pW225	1,3 т.п.н., аналогично pW1.2 промоторная часть (80 п.н.) заменена на 225 п.н. высокоструктурированную последовательности промоторной области гена β -актина птиц
pW315	1,4 т.п.н., аналогично pW1.2 промоторная часть (80 п.н.) заменена на 315 п.н. высокоструктурированную последовательности промоторной области гена β -актина птиц

Контролем служил полученный нами ранее вектор pWCAGgfp (рис.), который содержал ген eGFP и конститутивный гибридный регуляторный элемент, включавший энхансер ранних генов цитомегаловируса человека и промотор гена β -актина птиц (21).

pWCAG



Структура лентивирусного экспрессирующего вектора pWCAG. LTR, LTR/sin (LTR, long terminal repeat; sin, self-inactivating), длинные концевые повторы лентивирусов: 5'-LTR — дикого типа, 3'-LTR/sin — самоинактивирующийся вариант. SD, SA (splice donor, splice acceptor) — донорный и акцепторный сайты сплайсинга; psi — область, ответственная за упаковку вирусной геномной РНК в вирион; RRE (rev responsible element) — сайт связывания Rev-белка, осуществляющего транспорт геномной молекулы РНК из ядра в цитоплазму; cPPT (central polyuridine tract) — центральный полипуриновый тракт, принимающий участие в транспорте прединтегративного комплекса в ядро клетки; eGFP (enhanced green fluorescence protein) — ген зеленого флуоресцирующего белка; WPRE (woodchuck post-transcriptional regulatory element) — посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита древесного сурка. P_{CAG} — гибридный регуляторный элемент, содержащий энхансер ранних генов цитомегаловируса человека и промотор гена β -актина птицы. SalI, PacI — сайты рестрикции, которые были использованы для клонирования регуляторных элементов.

Плазмидная ДНК вирусных векторов, а также упаковщика и VVS-G была выделена в препаративном количестве, подвергнута тонкой очистке и количественному анализу для определения оптимального соотношения между компонентами при трансфекции. При получении вирусных препаратов трехплазмидную векторную систему вводили в клетки человека

(линия 293Т) транзистентно посредством СаРо₄-преципитации. Для каждой из экспрессирующих конструкций были получены препараты с высокими вирусными титрами (1-3×10⁷ КОЕ/мл) с целью их дальнейшего введения в клетки-мишени.

Средняя интенсивность флуоресценции в культуре клеток яйцевода кур при использовании вектора рWСAGgfr с конститутивным промотором-энхансером СAG в 89 раз превышала фон в контроле (табл. 2). При введении в клетки-мишени векторов рW2.8 и рW1.2 с регуляторными элементами гена овальбумина экспрессия *eGFP* превышала контрольные значения только в 3,5 раза и была в 25 раз ниже, чем в случае конститутивного промотора. Включение в состав регуляторных элементов гена овальбумина высокоструктурированных элементов конститутивного промотора гена β-актина (векторы рW131, рW225 и рW313) способствовало повышению экспрессии рекомбинантного гена в 7,8-14,8 раза.

2. Экспрессия маркерного гена *eGFP* (по средней интенсивности флуоресценции, ед.) в первичных клетках яйцевода кур и гетерологичных клетках 293Т при использовании различных векторов с модифицированными регуляторными элементами гена овальбумина

Культура клеток	Контроль	рWСAGgfr	рW2.8	рW1.2	рW131	рW225	рW315
Первичная культура клеток яйцевода кур	128	11433	459	461	3601	4841	6785
Клеточная линия 293Т	542	10936	497	538	1324	1508	1810

Примечание. Контроль — нетрансформированная культура клеток, фоновая флуоресценция.

Для оценки тканеспецифичности полученных векторов и выявления регуляторных элементов в составе лидерной области гена овальбумина, ответственных за тканеспецифичную экспрессию, полученные векторы вводили в гетерологичные клетки 293Т (клетки фибросаркомы человека) посредством инфицирования. Были определены уровни экспрессии маркерного гена *eGFP* для различных вариантов экспрессирующих кассет. Экспрессия маркерного гена в трансфицированных клетках при использовании вектора рWСAGgfr была практически идентична полученной на клетках яйцевода кур. Однако с учетом относительно высокой фоновой флуоресценции в опытных образцах было установлено только 20-кратное превышение контрольных значений. При введении векторов рW2.8 и рW1.2, несущих хромосомные фрагменты гена овальбумина, средняя интенсивность флуоресценции клеток в опытных образцах не отличалась от фоновой, что свидетельствовало об отсутствии экспрессии гена *eGFP* вследствие тканеспецифичности конструкций. Повышение средней флуоресценции в опытных образцах в 2,5-4,0 раза отмечалось в случае векторов рW131, рW225 и рW315, содержащих в составе регуляторных элементов гена овальбумина фрагменты промоторной последовательности гена β-актина. Доля флуоресцирующих клеток при этом достигала 35 % (для рW2.8 и рW1.2 показатель составлял 0,65-1,70 %), что свидетельствует об отсутствии тканеспецифичности у использованных векторов.

Таким образом, полученные результаты подтвердили низкую экспрессию рекомбинантных генов при использовании регуляторных элементов хромосомного фрагмента ДНК 2,8 т.п.н. из лидерной области гена овальбумина. Этот показатель был примерно в 25 раз ниже, чем для вектора с конститутивным промотором СAG. Степень экспрессии *eGFP* у конструкций рW2.8 и рW1.2 оказалась идентичной, что свидетельствует об отсутствии влияния интрона на экспрессию в случае этого регуляторного элемента. Замена промотора гена овальбумина на высокоструктурированные элементы конститутивного промотора гена β-актина способствовала

значительному повышению экспрессии рекомбинантного гена. Был выявлен эффект усиления экспрессии по мере удлинения промоторной области гена β -актина. Однако замена промоторной части гена овальбумина на экзогенный промотор (промотор гена β -актина) приводила к дерегуляции тканеспецифичного выражения *eGFP*.

ФГБНУ Всероссийский НИИ животноводства
им. академика Л.К. Эрнста,
142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,
e-mail: natavolkova@inbox.ru

Поступила в редакцию
14 сентября 2016 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2016, V. 51, № 6, pp. 782-787

INFLUENCE OF OVALBUMIN GENE REGULATORY ELEMENTS ON TISSUE SPECIFICITY AND LEVEL OF TRANSGENE EXPRESSION

N.A. Volkova, I.K. Fomin, A.V. Dotsev, T.E. Deniskova, N.A. Zinovieva

L.K. Ernst All-Russian Research Institute of Animal Husbandry, Federal Agency of Scientific Organizations, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail natavolkova@inbox.ru

Acknowledgements:

Supported by Federal Agency of Scientific Organizations

Received September 14, 2016

doi: 10.15389/agrobiol.2016.6.782eng

Abstract

The use of lentiviral vectors for the genetic modification of embryonic chicken cells is regarded as one of the promising methods for producing transgenic poultry. In this case, it is very important to determine the regulatory elements of the ovalbumin gene, providing tissue-specificity and high transgene expression in cells of chicken oviduct. The aim of this work was to study the effect of the intron sequences and promoter of ovalbumin gene on tissue specificity and level of the transgene expression. For this purpose constructs based on lentiviral vector pWpxl, containing eGFP marker gene under control of the modified ovalbumin gene regulatory elements were obtained. Vector pW2.8 included a chromosomal DNA fragment of 2.8 kb comprising a first exon, intron sequence and part of the second exon of the ovalbumin gene; vector pW1.2 — chromosomal DNA fragment of 1.2 kb comprising a promoter and ovalbumin gene sequence (without the intron and the first exon) to the transcription initiation point; vectors pW131, pW225, pW315 — chromosomal DNA fragment, similar to the fragment of 1.2 kb in pW1.2 vector in which promoter (80 bp) was replaced by highly structured sequence of the birds β -actin gene promoter region of 131, 225 or 315 bp respectively. The control vector pWCAGgfp included constitutive hybrid regulatory element comprising human cytomegalovirus early gene enhancer and birds' β -actin gene promoter (CAG). Primary culture cells of chick oviduct and human fibrosarcoma cells 293T (control) were used as target cells for transfection. Viral preparation was added after a monolayer of cells reached concentration of $1-3 \times 10^7$ CFU/ml. eGFP expression was determined by fluorimetry in 72 hours after transfection. Low level of expression of eGFP gene controlled by chromosomal fragment of 2.8 kb leader region of the ovalbumin gene was confirmed in vitro using culture of chicken oviduct cells and 293T cell line: in vector pW2.8 recombinant protein expression level was up to 25 times lower compared to pWCAGgfp vector with a constitutive promoter CAG. Yet the eGFP expression levels for pW1.2 and pW2.8 constructs were identical, indicating the absence of introns' influence on the expression level of the recombinant DNA using this regulatory element. When the ovalbumin gene promoter was replaced by highly structured elements of β -actin constitutive gene promoter the increase in the expression of eGFP in 2-3 times was observed, as well as the increased expression occurred with lengthening of the promoter region of β -actin gene (vectors pW131, pW225, pW315). The achieved levels of expression with the use of exogenous β -actin gene promoter were comparable with expression levels controlled by a constitutive promoter CAG, however when the promoter part of the ovalbumin gene was replaced by exogenous promoter (gene β -actin), the deregulation of tissue-specific expression of eGFP was observed, indicating that transcription with tissue-specific ovalbumin promoter gene can be modulated or activated with exogenous enhancers.

Keywords: transgenesis, chickens, lentiviral vectors, oviduct, ovalbumin gene regulatory elements.

REFERENCES

1. Mizuarai S., Ono K., Yamaguchi K., Nishijima K-I., Kamihira M., Iiji-

- ma S. Production of transgenic quails with high frequency of germ-line transmission using VSV-G pseudotyped retroviral vector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 286: 456-463 (doi: 10.1006/bbrc.2001.5422).
2. Kwon M.S., Koo B.C., Choi B.R., Park Y.Y., Lee Y.M., Suh H.S., Park Y.S., Lee H.T., Kim J.H., Roh J.Y., Kim N.H., Kim T. Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor. *Mol. Reprod. Dev.*, 2008, 75(7): 1120-1126 (doi: 10.1002/mrd.20860).
 3. Kwon S.C., Choi J.W., Jang H.J., Shin S.S., Lee S.K., Park T.S., Choi I.Y., Lee G.S., Song G., Han J.Y. Production of biofunctional recombinant human interleukin 1 receptor antagonist (rhIL1RN) from transgenic quail egg white. *Biol. Reprod.*, 2010, 82: 1057-1064 (doi: 10.1095/biolreprod.109.081687).
 4. Chapman S.C., Lawson A., Macarthur W.C., Wiese R.J., Loechel R.H., Burgos-Trinidad M., Wakefield J.K., Ramabhadran R., Mauch T.J., Schoenwolf G.C. Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentiviral vector. *Development*, 2005, 132: 935-940 (doi: 10.1242/dev.01652).
 5. Smith C.A., Roeszler K.N., Sinclair A.H. Robust and ubiquitous GFP expression in a single generation of chicken embryos using the avian retroviral vector, RCASBP. *Differentiation*, 2009, 77(5): 473-482 (doi: 10.1016/j.diff.2009.02.001).
 6. Rapp J.C., Harvey A.J., Speksnijder G.L., Hu W., Ivarie R. Biologically active human interferon α -2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Res.*, 2003, 12(5): 569-575 (doi: 10.1023/A:1025854217349).
 7. Kamihira M., Ono K., Esaka K., Nishijima K., Kigaku R., Komatsu H., Yamashita T., Kyogoku K., Iijima S. 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(17): 10864-10874 (doi: 10.1128/JVI.79.17.10864-10874.2005).
 8. McGrew M.J., Sherman A., Ellard F.M., Lillico S.G., Gilhooley H.J., Kingsman A.J., Mitrophanous K.A., Sang H. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep.*, 2004, 5: 728-733 (doi: 10.1038/sj.embor.7400171).
 9. Scott B.B., Velho T.A., Sim S., Lois C. Applications of avian transgenesis. *ILAR J.*, 2010, 51(4): 353-361 (doi: 10.1093/ilar.51.4.353).
 10. Furlan-Magaril M., Rebollar E., Guerrero G., Fernandez A., Moltai E., Gonzalez-Buenda E., Cantero M., Montoliu L., Recillas-Targa F. An insulator embedded in the chicken α -globin locus regulates chromatin domain configuration and differential gene expression. *Nucl. Acids Res.*, 2011, 39(1): 89-103 (doi: 10.1093/nar/gkq740).
 11. Scott B.B., Lois C. Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors. *PNAS*, 2005, 102(45): 16443-16447 (doi: 10.1073/pnas.0508437102).
 12. Dougherty D.C., Sanders M.M. Estrogen action: revitalization of the chick oviduct model. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2005, 16: 414-419 (doi: 10.1016/j.tem.2005.09.001).
 13. Shimizu M., Losos J.K., Gibbins A.M. Analysis of an approach to oviduct-specific expression of modified chicken lysozyme genes. *Biochem. Cell Biol.*, 2005, 83(1): 49-60 (doi: 10.1139/o04-122).
 14. Byun S.J., Kim S.W., Kim K.W., Kim J.S., Hwang I.S., Chung H.K., Kan I.S., Jeon I.S., Chang W.K., Park S.B., Yoo J.G. Oviduct-specific enhanced green fluorescent protein expression in transgenic chickens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011, 75(4): 646-649 (doi: 10.1271/bbb.100721).
 15. Lillico S.G., Sherman A., McGrew M.J., Robertson C.D., Smith J., Haslam C., Barnard P., Radcliffe P.A., Mitrophanous K.A., Elliot E.A., Sang H.M. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *PNAS*, 2007, 104(6): 1771-1776 (doi: 10.1073/pnas.0610401104).
 16. Kodama D., Nishimiya D., Nishijima K., Okino Y., Inayoshi Y., Kojima Y., Ono K., Motoso M., Miyake K., Kawabe Y., Kyogoku K., Yamashita T., Kamihira M., Iijima S. Chicken oviduct-specific expression of transgene by a hybrid ovalbumin enhancer and the Tet expression system. *J. Biosci. Bioeng.*, 2012, 113(2): 146-153 (doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.10.006).
 17. Schomber T., Kalberer C.P., Wodnar-Filipowicz A., Skoda R.C. Gene silencing by lentivirus-mediated delivery of siRNA in human CD34⁺ cells. *Blood*, 2004, 103(12): 4511-4513 (doi: 10.1182/blood-2003-07-2397).
 18. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY, 1989.
 19. Tiscornia G., Singer O., Verma I.M. Production and purification of lentiviral vectors. *Nature Protocols*, 2006, 1(1): 241-245 (doi: 10.1038/nprot.2006.37).
 20. *DNA cloning. Volume III. A practical approach*. D.M. Glover (ed.). Oxford, Washington DC, IRL Press Ltd., 1987.
 21. Volkova N.A., Fomin I.K., Tomgorova E.K., Vetokh A.N., Mennibaeva E.R., Brem G., Zinovieva N.A. The study of factors affected the gene transfer efficiency in chicken embryonic cells by application of lentiviral vectors. *Agricultural Biology*, 2015, 50(4): 458-466 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.4.458eng) (in Engl.).