
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕТРОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ПРИМОРДИАЛЬНЫХ ЗАРОДЫШЕВЫХ КЛЕТОК КУР

Е.К. Томгорова¹, Д.В. Белоглазов¹, Н.А. Волкова¹,
А.А. Никишов², Н.А. Зиновьева¹

¹Центр биотехнологии и молекулярной диагностики
ФГБНУ Всероссийский НИИ животноводства
п. Дубровицы, Подольский р-н, МО, 142132

²Кафедра стандартизации, метрологии и технологии
производства продукции животноводства
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

В работе изучена результативность использования ретровирусных векторов для генетической трансформации клеток примордиальных зародышевых клеток кур *in vitro* и *in vivo* с целью получения трансгенных кур. Показано, что с использованием ретровирусных векторов возможна генетическая трансформация клеток гонад эмбрионов кур с эффективностью до 3,2%.

Ключевые слова: куры, трансгенез, примордиальные зародышевые клетки, рекомбинантная ДНК.

Создание биоинженерных форм в животноводстве, в том числе в птицеводстве, является одним из перспективных направлений развития современной науки. Генетическая модификация сельскохозяйственной птицы рассматривается в качестве приема улучшения генотипа уже существующих пород для придания им устойчивости к различным возбудителям инфекционных заболеваний, улучшения продуктивных показателей, а также получения биореакторов, синтезирующих рекомбинантные белки в клетках яйцевода [1—4].

Однако, несмотря на заметные успехи в области трансгенеза птиц, само создание трансгенных кур представляет сегодня определенную проблему. Особенности воспроизводства и развития кур [5] значительно снижают эффективность традиционного метода введения экзогенной ДНК в клетки животных — микроинъекции, что требует поиска и разработки альтернативных методов направленного переноса генов. Одним из таких направлений, интенсивно развивающихся в последние годы, является разработка методических подходов, связанных с использованием в качестве клеток-мишеней для введения рекомбинантной ДНК разных типов плюрипотентных стволовых клеток, в том числе примордиальных зародышевых клеток (ПЗК) — предшественников высоко дифференцированных половых клеток.

Генетическая трансформация ПЗК *in vitro* и *in vivo* рассматривается как перспективный метод целенаправленной генетической модификации гонад и получения трансгенной птицы. В связи с этим проведение исследований в данном направлении представляется актуальным в рамках разработки высокоэффективных трансгенных технологий с целью их дальнейшего использования в птицеводстве.

Материалы и методы. В работе использовали ретровирусный вектор pL-GFP, содержащий репортерный ген GFP (зеленый флюоресцирующий белок).

Трансфекцию ПЗК в культуре осуществляли путем совместного культивирования с клетками-упаковщицами и инфицирования вирусным препаратом [6]. В первом случае клетки-упаковщицы использовали в качестве фидерного слоя, на который высевали ПЗК, во втором — ПЗК культивировали на эмбриональных фибробластах кур в вирусном препарате. Экспрессию репортерного гена в трансфицированных клетках изучали на 3—5 день культивирования в зависимости от используемого источника генных конструкций (клетки-упаковщицы, вирусный препарат).

Трансформацию ПЗК *in vivo* осуществляли на третий день развития эмбрионов, т.к. данный период является наиболее удобным для проведения генно-инженерных манипуляций с эмбрионами кур с целью генетической модификации ПЗК ввиду начала миграции данного типа клеток в кровь.

В качестве источника генной конструкции использовали вирусный препарат ($1 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл) и клетки-упаковщицы (500, 1000, 2000 клеток/эмбрион), которые вводили в дорсальную аорту 2,5-дневных эмбрионов. Эффективность трансформации клеток гонад оценивали на 9 день эмбриогенеза методом иммуногистохимии с использованием специфических антител к GFP.

Результаты исследования. Исследования, проведенные нами ранее, по переносу рекомбинантной ДНК в эмбриональные клетки кур показали эффективность использования ретровирусных векторов для генетической модификации клеток кур [7]. В этой связи данная система направленного переноса генов была выбрана и для трансфекции ПЗК кур.

В экспериментах *in vitro* максимальный процент трансформированных ПЗК был установлен при совместном культивировании данного типа клеток с клетками-упаковщицами (рис. 1, 2). Частота генетической трансформации при этом достигала $8 \cdot 10^{-4}$. При трансфекции ПЗК вирусным препаратом результативность переноса рекомбинантной ДНК в клетки-мишени была в 1,9—2,2 раза ниже по сравнению с совместным культивированием с клетками-упаковщицами. Частота генетической трансформации при этом варьировала от $3 \cdot 10^{-4}$ до $4 \cdot 10^{-4}$.

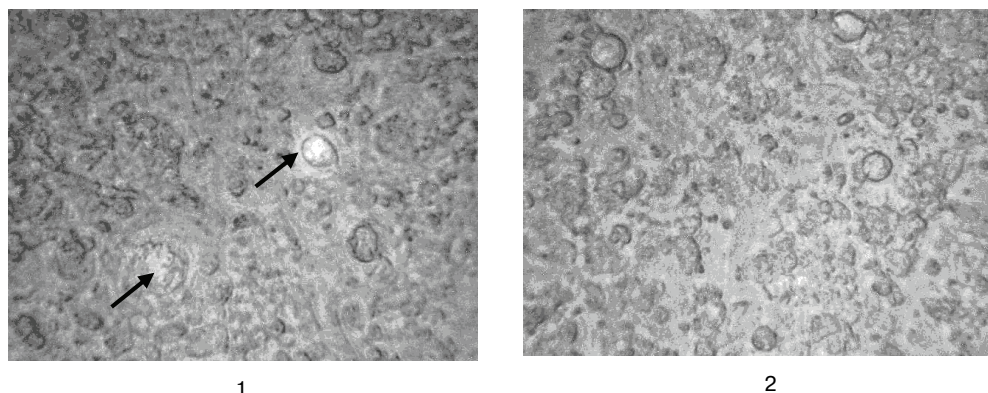


Рис. 1. Свечение GFP в культуре ПЗК кур в ультрафиолетовом свете:
1 — опыт, 2 — контроль. Трансформированные ПЗК показаны стрелкой. Ув. $\times 400$

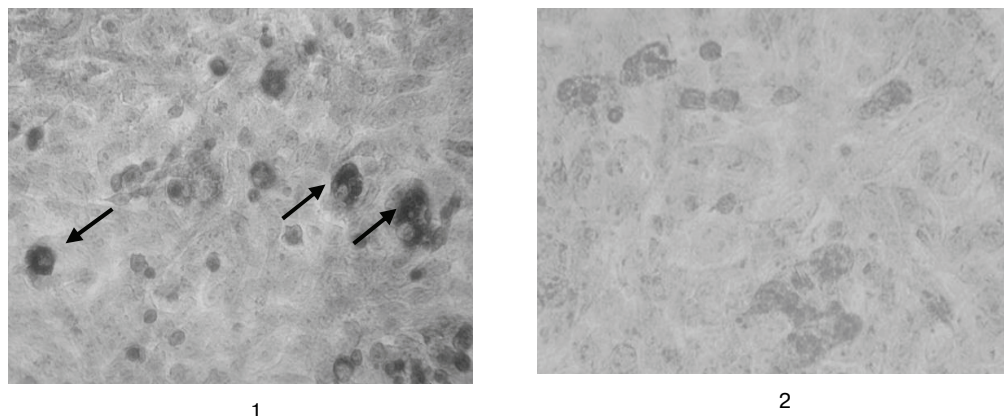


Рис. 2. Иммуногистохимическое окрашивание культуры ПЗК кур на GFP: 1 — опыт, 2 — контроль. Трансформированные ПЗК показаны стрелкой. Ув. ×400

При введении генной конструкции pL-GFP в эмбрионы кур *in vivo*, как и в экспериментах по трансформации ПЗК *in vitro*, высокая эффективность трансформации клеток-мишеней была установлена при использовании в качестве источника генной конструкции клеток-упаковщиц (табл. 1, рис. 3). Максимальная частота интеграции генной конструкции (процент эмбрионов с трансформированными гонадами от общего числа развившихся эмбрионов) наблюдалась при введении в эмбрионы кур суспензии клеток-упаковщиц в концентрации 1000—2000 клеток/эмбрион и составила 35,6—37,2%. При этом эффективность трансформации ПЗК в трансформированных гонадах эмбрионов достигала $3,2 \pm 0,2\%$.

При введении в эмбрионы кур вирусного препарата в концентрации $1 \cdot 10^6$ и $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл и клеток-упаковщиц в дозе 500 клеток/эмбрион частота интеграции трансгена была на 14,2—16,1% ниже и составила, соответственно, 20,8, 28,3 и 27,7% при эффективности трансформации ПЗК $1,8 \pm 0,17$, $2,2 \pm 0,15$ и $2,5 \pm 0,14\%$.

Таблица 1

Эффективность трансформации ПЗК кур генной конструкцией pL-GFP *in vivo*

Показатель	Источник генной конструкции				
	вирусный препарат, КОЕ/мл		клетки-упаковщицы, кл/эмбрион		
	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^8$	500	1000	2000
Проинъецировано эмбрионов, шт.	50	50	50	50	50
Число развившихся эмбрионов до 9-го дня инкубации, <i>n</i> (%)	48 (96)	46 (92)	47 (94)	45 (90)	43 (86)
в т.ч. с трансформированными гонадами, <i>n</i>	10	13	13	16	16
Частота интеграции*, %	20,8	28,3	27,7	35,6	37,2
Эффективность трансгенеза**, %	20,0	26,0	26,0	32,0	32,0
Эффективность трансформации клеток гонад***, %	$1,8 \pm 0,17^c$	$2,2 \pm 0,15^c$	$2,5 \pm 0,14^b$	$3,2 \pm 0,2^a$	$3,1 \pm 0,15$

Примечание: * отношение числа эмбрионов с трансформированными гонадами к общему числу развившихся эмбрионов, выраженное в процентах; ** отношение числа эмбрионов с трансформированными гонадами к общему числу проинъецированных эмбрионов, выраженное в процентах; *** отношение числа трансформированных клеток (ПЗК) к их общему в гонадах одного эмбриона, выраженное в процентах (при расчете данного показателя учитывали только эмбрионы с трансформированными гонадами). Достоверные различия а, b $p < 0,005$ и а, c $p < 0,001$.

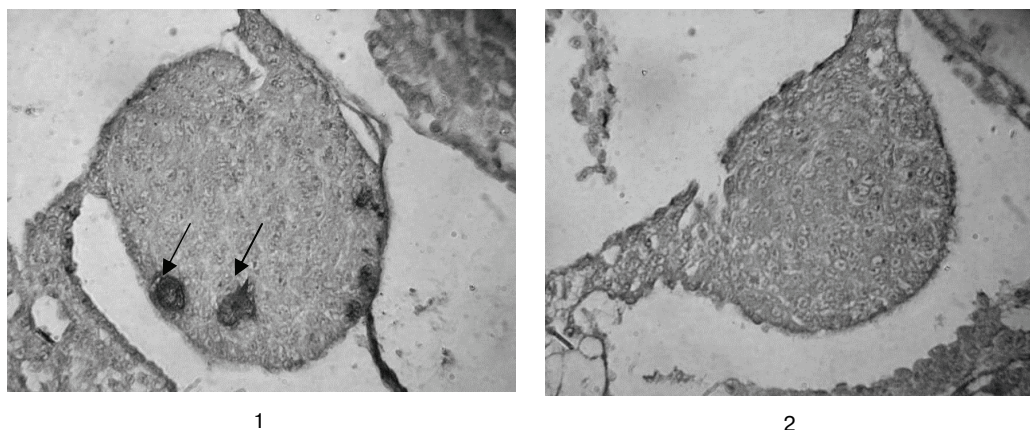


Рис. 3. Гонады 9-дневных эмбрионов кур:
иммуногистохимическое окрашивание на GFP, 1 — опыт, 2 — контроль.
Трансформированные ПЗК показаны стрелкой. Ув. $\times 400$

Таким образом, проведенные исследования показали возможность использования ретровирусных векторов для трансформации ПЗК кур как *in vitro*, так и *in vivo*. Вместе с тем, сопоставляя полученные результаты, следует отметить достаточно низкую эффективность трансфекции ПЗК *in vitro*, что связано с низкой пролиферативной активностью ПЗК в культуре. В связи с этим для генетической модификации ПЗК может быть рекомендован метод трансформации данного типа клеток путем введения генной конструкции в эмбрионы кур *in vivo*. При этом в качестве источника генной конструкции целесообразно использование клеток-упаковщиц в концентрации 1000 клеток/эмбрион. Использование для этих целей клеток-упаковщиц в большей концентрации (2000 клеток/эмбрион и более) негативно влияет на развитие эмбрионов, что выражается в повышении эмбриональной смертности, снижении процента вылупа цыплят и как следствие этого снижения результативности трансгенеза.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Scott B.B., Velho T.A., Sim S., Lois C. Applications of avian transgenesis // *ILAR J.* 2010. 51(4):353—61.
- [2] Kamihira M., Kawabe Y., Shindob T., Onoc K., Esakac K., Yamashitab T., Nishijimac K., Iijimac S. Production of chimeric monoclonal antibodies by genetically manipulated chickens // *Journal of Biotechnology.* 2009. V. 141. P. 18—25.
- [3] Kodama D., Nishimiya D., Nishijima K., Okino Y., Inayoshi Y., Kojima Y., Ono K., Motono 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—53.
- [4] Li J.J., Lu L.Z. Recent progress on the technologies and applications of transgenic poultry // *African Journal of Biotechnology.* 2010. V. 9. P. 3481—3488.
- [5] Petite J., Mozdziaik P. Production of transgenic poultry // In: Pinkert C.A. (Ed.), Chapter 11 in *Transgenic Animal Technology, A Laboratory Handbook*, Academic Press, New York. 2002. P. 525.
- [6] Новое в клонировании ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1989.

- [7] Волкова Н.А., Волкова Л.А., Фомин И.К., Зиновьева Н.А., Горелик Л.Ш., Лоцманова Н.С. Интеграция и экспрессия маркерных генов в эмбрионах кур при использовании ретровирусных экспрессирующих векторов // Сельскохозяйственная биология. 2013. № 2. С. 58—61.

THE EFFICIENCY GENETIC TRANSFORMATION BY USING RETROVIRAL VECTORS OF CHICKEN PRIMORDIAL GERM CELLS

Е.К. Tomgorova¹, D.V. Beloglazov¹, N.A. Volkova¹,
A.A. Nikishov², N.A. Zinovieva¹

¹All-Russian State Research Institute of Animal Breeding
Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Region, 142132

²Department of standardization, metrology
and technology of the livestock products
Peoples' Friendship University of Russia
Mikluho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

In this article we studied the impact by using retroviral vectors for genetic transformation of chicken primordial germ cells IN VITRO and IN VIVO to produce transgenic chickens. By using of retroviral vector system it was shown that the efficiency genetic transformation of chicken embryonic gonads can be of up to 3.2%.

Key words: chicken, transgenesis, chicken primordial germ cells, recombinant DNA.

REFERENCES

- [1] Scott B.B., Velho T.A., Sim S., Lois C. Applications of avian transgenesis. *ILAR J.*, 2010, 51(4):353—61.
- [2] Kamihira M., Kawabea Y., Shindob T., Onoc K., Esakac K., Yamashitab T., Nishijimac K., Iijimac S. Production of chimeric monoclonal antibodies by genetically manipulated chickens. *Journal of Biotechnology*, 2009, V. 141, P.18—25.
- [3] Kodama D., Nishimiya D., Nishijima K., Okino Y., Inayoshi Y., Kojima Y., Ono K., Motono 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—53.
- [4] Li J.J., Lu L.Z. Recent progress on the technologies and applications of transgenic poultry. *African Journal of Biotechnology.* 2010. V. 9. P. 3481—3488.
- [5] Petite J., Mozdziaik P. Production of transgenic poultry. In: Pinkert C.A. (Ed.), Chapter 11 in *Transgenic Animal Technology, A Laboratory Handbook*, Academic Press, New York. 2002. P. 525.
- [6] *Novoe v klonirovanii DNK. Metody.* Ed. D. Glover. M.: Mir, 1989.
- [7] Volkova N.A., Volkova L.A., Fomin I.K., Zinov'eva N.A., Gorelik L.Sh., Locmanova N.S. Integracija i jekspressija markernih genov v jembrionah kur pri ispol'zovanii retrovirusnyh jekspressirujushhijh vektorov. *Sel'skhozjajstvennaja biologija.* 2013. № 2. S. 58—61.