
ИЗУЧЕНИЕ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОМАТИЧЕСКОГО ТРАНСГЕНЕЗА КУР

Ю.А. Прытков¹, А.Н. Ветох^{1,2}, Н.А. Волкова¹,
А.А. Никишов², Н.А. Зиновьева¹

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

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

В работе изучена результативность использования ретровирусных векторов для генетической трансформации клеток яйцевода кур *in vivo* с целью получения трансгенных кур-биореакторов и исследованы факторы, влияющие на эффективность локального трансгенеза яйцевода кур. Показано, что с использованием ретровирусных векторов возможна трансформация клеток яйцевода кур с эффективностью до $17,2 \pm 3,1\%$.

Ключевые слова: куры, трансгенез, яйцевод, биореакторы, рекомбинантная ДНК.

Одним из перспективных направлений в области биотехнологии сельскохозяйственной птицы является создание трансгенных кур-биореакторов [1—5].

Существенные физиологические различия между птицами и млекопитающими обуславливают значительное преимущество использования птиц в качестве продуктивной платформы при производстве рекомбинантных белков со сложной структурой. К тому же при использовании трансгенных птиц в качестве продуктивной платформы существенно снижается стоимость получаемых протеинов по сравнению с другими методами производства, такими как микробиологическая ферментация *E. coli*, дрожжи или клетки млекопитающих [6].

Однако несмотря на заметные успехи в области трансгенеза птиц само создание трансгенных кур представляет сегодня определенную проблему, т.к. особенности воспроизводства и развития сельскохозяйственной птицы значительно снижают эффективность традиционного метода введения экзогенной ДНК в клетки животных — микроинъекции, что ограничивает использование трансгенных технологий в птицеводстве. Все это требует поиска и разработки альтернативных методов направленного переноса генов, одним из которых является генетическая трансформация отдельных органов, в частности, яйцевода кур (соматический трансгенез). Это позволяет значительно сократить материальные и временные затраты на получение трансгенных организмов по сравнению с использованием для адресной доставки ДНК других клеток-мишеней (клетки бластодермы, примордиальные зародышевые клетки, эмбриональные стволовые клетки), проведение генно-инженерных манипуляций с которыми возможно только на эмбриональном

материале. При этом в качестве перспективной системы направленного переноса генов в клетки яйцевода кур *in vivo* рассматривается использование векторных систем на основе рекомбинантных ретровирусов. В этой связи была изучена эффективность доставки экзогенной ДНК в клетки яйцевода кур *in vivo* посредством использования ретровирусных векторов.

Материал и методы. В работе были использованы два ретровирусных вектора, полученных на основе вируса лейкемии мышей Молони (Mo-MuLV): pLXSN и рХ. Для упаковки ретровирусных векторов была использована пакующая клеточная линия GP+envAM12, преимуществом которой являлось отсутствие вируса «дикого типа», а также возможность введения клонированных генов в широкий спектр клеток-хозяев.

В составе ретровирусного вектора pLXSN были клонированы две последовательности, маркерный ген GFP, который служит для контроля введения и выражения клонированных генов (конструкция pLN-GFP), и к-ДНК гена инсулина человека (конструкция pLNins). На основе ретровирусного вектора рХ была получена генная конструкция рХ-RSVhgh, содержащая кДНК гормона роста человека.

Трансформацию клеток кур *in vitro* осуществляли путем совместного культивирования с клетками-упаковщицами и добавления вирусного препарата, представляющего собой среду культивирования клеток-упаковщиц и содержащего рекомбинантный ретровирус [7]. Частоту генетической трансформации определяли как отношение числа генетически трансформированных клеток к общему числу клеток.

Введение генных конструкций (суспензия клеток-упаковщиц и вирусный препарат) в яйцевод кур *in vivo* осуществляли в возрасте 4 месяцев путем инъекции препарата в просвет белкового отдела яйцевода. Хирургическое вмешательство проводили с соблюдением правил асептики и антисептики, всей птице применяли одинаковую общую анестезию и послеоперационную терапию. В качестве источника генных конструкций использовали вирусный препарат и клетки-упаковщицы в концентрации 1 млн, 2 млн и 3 млн клеток на яйцевод.

Выделение ДНК из ткани яйцевода кур осуществляли солевым методом [8]. Наличие рекомбинантной ДНК в яйцеводе кур определяли методом ПЦР. Экспрессию рекомбинантных белков в клетках эпителия яйцевода кур изучали методом иммуногистохимии с использованием первых антител, специфичных к выявляемому белку (GFP, инсулин, соматотропин).

Результаты исследования. Исследования, проведенные нами ранее, показали, что оптимальным периодом для введения ретровирусных векторов в яйцевод кур *in vivo* с целью генетической трансформации клеток эпителиального слоя белкового отдела является возраст от 4 до 4,5 месяцев, т. к. в этот период отмечается наиболее высокая пролиферативная активность клеток эпителиального слоя белкового отдела яйцевода [9].

Первоначально с целью оценки тропности используемых ретровирусных генных конструкций pLN-GFP, pLNins и рХ-RSVhGH был проведен ряд экспериментов по трансфекции клеток кур в культуре *in vitro*.

Частота генетической трансформации клеток-мишеней варьировала в зависимости от используемой генной конструкции и типа ретровирусного препарата. Максимальное число генетически трансформированных клонов было получено при использовании в качестве источника генных конструкций клеток-упаковщиц. В данном случае из 1000 инфицированных клеток было выявлено от 11 до 38 трансформированных клонов (в зависимости от используемой генной конструкции). При инфицировании клеток-мишеней вирусным препаратом данный показатель был меньше в 3,9—4,8 раз.

Результаты исследований, полученные в опытах *in vitro*, послужили основой для проведения дальнейших исследований по переносу рекомбинантной ДНК в клетки яйцевода кур *in vivo*.

На первом этапе была оценена эффективность использования ретровирусных векторов для генетической трансформации клеток яйцевода кур *in vivo* и оптимизирована доза вводимых генных конструкций в яйцевод, на втором — изучена эффективность введения в яйцевод кур генных конструкций, содержащих целевые гены человека, в частности, ДНК гена инсулина и гормона роста человека.

При введении генной конструкции pLN-GFP в просвет белковой части яйцевода 4-месячных кур ($n = 3$) наличие трансформированных клеток эпителиального слоя яйцевода кур было установлено у всех подопытных кур. Эффективность трансформации клеток яйцевода (отношение числа трансформированных клеток эпителиального слоя белковой части яйцевода к общему числу исследованных клеток данного типа, выраженное в процентах) при этом варьировала от $15,9 \pm 4,2$ до $19,1 \pm 6,4\%$ (табл. 1).

Таблица 1

Эффективность генетической трансформации клеток яйцевода кур *in vivo* генной конструкцией pLN-GFP

Показатель	Значение
Исследовано кур, гол	3
Исследовано срезов от каждой подопытной птицы, n	20
Доля срезов с трансформированными клетками*, %	$43,3 \pm 7,3$
Эффективность трансформации клеток яйцевода**, %	$17,2 \pm 3,1$
Исследовано проб на ДНК от каждой подопытной птицы, n	10
Число «ПЦР+» проб, %	$54,3 \pm 2,4$

Примечание: *отношение числа срезов с трансформированными клетками яйцевода к общему числу исследованных срезов, выраженное в процентах; **отношение числа трансформированных клеток яйцевода к общему числу исследованных клеток данного типа, выраженное в процентах.

Вместе с тем методом ПЦР наличие рекомбинантной ДНК было выявлено в 50,0—58,3% исследованных проб, что можно объяснить более высокой чувствительностью метода.

С целью повышения эффективности трансгенеза был проведен ряд экспериментов по оптимизации дозы вводимой генной конструкции в яйцевод кур *in vivo*. В качестве источника генной конструкции использовали суспензию клеток-упаковщиц в концентрации 1 млн, 2 млн и 3 млн клеток на яйцевод (табл. 2).

**Эффективность генетической трансформации эпителиальных клеток
белковой части яйцевода кур *in vivo* при введении генной конструкции pLN-GFP**

Показатель	Группа		
	I	II	III
Концентрация клеток-упаковщиц, млн. клеток/ яйцевод	1	2	3
Доля срезов с трансформированными эпителиальными клетками*, %	40,0 ± 5,0	35,0 ± 6,1	20,0 ± 3,3
Доля трансформированных эпителиальных клеток на срезе**, %:			
— минимальная;	5,4	1,3	4,9
— максимальная;	79,8	54,9	43,2
— в среднем по группе	14,3 ± 3,0	12,5 ± 4,1	7,7 ± 5,4
Общая эффективность трансформации клеток яйцевода***, %	7,1 ± 2,9	5,4 ± 1,8	3,6 ± 2,4

Примечание: *отношение числа срезов с трансформированными клетками яйцевода к общему числу исследованных срезов, выраженное в процентах; **отношение числа трансформированных клеток яйцевода к общему числу исследованных клеток данного типа на одном срезе, выраженное в процентах; ***отношение числа трансформированных клеток яйцевода к общему числу исследованных клеток данного типа, выраженное в процентах.

Предполагалось, что увеличение концентрации вводимых клеток-упаковщиц позволит повысить эффективность трансгенеза клеток эпителиального слоя белковой части яйцевода. Однако с увеличением дозы введения клеток-упаковщиц наблюдалась обратная тенденция. Результативность переноса рекомбинантной ДНК в эпителиальные клетки была ниже по сравнению с использованием вирусного препарата. Так, при инъекции в яйцевод кур суспензии клеток-упаковщиц в концентрации 1 млн клеток общая эффективность трансформации клеток эпителиального слоя составила $7,1 \pm 2,9\%$, что было в 2,4 раза ниже аналогичных показателей, полученных при использовании вирусного препарата. При введении клеток-упаковщиц в концентрации 2 млн и 3 млн клеток различия по данным показателям были больше: эффективность трансформации эпителиальных клеток не превышала $3,6 \pm 2,4\%$.

Таким образом, максимальная эффективность трансформации клеток эпителиального слоя белковой части яйцевода была установлена при использовании вирусного препарата. Исходя из этого в дальнейших исследованиях в качестве источника генной конструкции был использован вирусный препарат.

С целью апробации оптимизированных условий было осуществлено введение в яйцевод подопытных кур генных конструкций pLNins и pX-RSVhgh, содержащих целевые гены человека инсулин и гормон роста соответственно.

При использовании данных генных конструкций наличие трансформированных клеток эпителиального слоя яйцевода кур было установлено практически у всех подопытных кур. Однако показатели эффективности трансформации клеток-мишеней генной конструкцией pLNins были выше, чем при использовании генной конструкции pX-RSVhgh. В данной случае разница по эффективности трансформации клеток яйцевода составила 3,7%, по эффективности интеграции рекомбинантной ДНК — 3,3% (табл. 3).

**Эффективность генетической трансформации клеток яйцевода кур
in vivo генными конструкциями pLNins и pX-RSVhgh**

Показатель	Генная конструкция	
	pLNins	pX-RSVhgh
Исследовано кур, гол	3	3
Исследовано срезов от каждой подопытной птицы, n	20	20
Доля срезов с трансформированными клетками*, %	40,0 ± 5,8	16,7 ± 6,0
Эффективность трансформации клеток яйцевода**, %	11,3 ± 2,6	7,6 ± 1,7
Исследовано проб на ДНК от каждой подопытной птицы, n	10	10
Число «ПЦР+» проб, %	43,3 ± 8,8	40,0 ± 5,8

Примечание: *отношение числа срезов с трансформированными клетками к общему числу исследованных срезов, выраженное в процентах; **отношение числа трансформированных клеток яйцевода к общему числу исследованных клеток данного типа, выраженное в процентах.

Таким образом, проведенные исследования показали возможность генетической трансформации клеток яйцевода кур с использованием ретровирусных генных конструкций с эффективностью до $17,2 \pm 3,1\%$, что свидетельствуют о перспективности использования ретровирусных векторов для локального трансгенеза клеток яйцевода кур in vivo с целью получения трансгенных кур-продуцентов.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Kamihira M., Ono K., Esaka K., Nishijima K., Kigaku R., Komatsu H., Yamashita T., Kyogoku K., and 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.
- [2] 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.
- [3] Scott B.B., Velho T.A., Sim S., Lois C. Applications of avian transgenesis // ILAR J., 2010, 51(4):353—61.
- [4] 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—9.
- [5] 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—53.
- [6] Ivarie R. Avian transgenesis: progress towards the promise // Trends Biotechnol. 2003, 21:14—19.
- [7] Новое в клонировании ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1989.
- [8] Зиновьева Н.А., Попов А.Н., Эрнст Л.К., Марзанов Н.С. Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве. Дубровицы: ВИЖ, 1998.
- [9] Белоглазов Д.В., Волкова Н.А., Волкова Л.А., Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К. Генетическая трансформация клеток яйцевода кур с использованием ретровирусных векторов // Проблемы биологии продуктивных животных. 2011. № 1. С. 8—12.

INCUBATORY QUALITIES OF WHITE SHELL EGGS OF HENS WITH THE DIFFERENT RATIO OF WEIGHT AND VOLUME

Yu.A. Prytkov¹, A.N. Vetokh^{1,2}, 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 of the use of retroviral vectors for genetic transformation of chicken oviduct cells *in vivo* to produce transgenic chickens bioreactors and investigated factors affecting the efficiency of local transgenesis in chickens. By using of retroviral vector system it was shown that with the efficiency of chickens oviduct cells transformation was at least $17,2 \pm 3,1\%$.

Key words: chicken, transgenesis, oviduct, bioreactors, recombinant DNA.

REFERENCES

- [1] *Kamihira M., Ono K., Esaka K., Nishijima K., Kigaku R., Komatsu H., Yamashita T., Kyogoku K., and 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.
- [2] *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.
- [3] *Scott B.B., Velho T.A., Sim S., Lois C.* Applications of avian transgenesis // *ILAR J.*, 2010, 51(4):353—61.
- [4] *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—9.
- [5] *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—53.
- [6] *Ivarie R.* Avian transgenesis: progress towards the promise // *Trends Biotechnol.* 2003, 21:14—19.
- [7] *Novoe v klonirovanii DNK. Metody / Pod red. D. Glovera. M.: Mir, 1989.*
- [8] *Zinov'eva N.A., Popov A.N., Jernst L.K., Marzanov N.S.* Metodicheskie rekomendacii po ispol'zovaniju metoda polimeraznoj cepnoj reakcii v zhivotnovodstve. Dubrovitsy: VIZh. 1998.
- [9] *Beloglazov D.V., Volkova N.A., Volkova L.A., Zinov'eva N.A., Jernst L.K.* Geneticheskaja transformacija kletok jajcevoda kur s ispol'zovaniem retrovirusnyh vektorov // *Problemy biologii produktivnyh zhivotnyh.* 2011. № 1. S. 8—12.