

**ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ТРАНСГЕННЫХ КОЗ
ПО ЛАКТОФЕРРИНУ ЧЕЛОВЕКА И ЭФФЕКТИВНОСТЬ
ТРАНСМИССИИ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК ПОТОМСТВУ**

А.И. Будевич, С.Н. Пайтеров, И.Н. Шевцов, В.Г. Чарторийский,
Ю.К. Кирикович, Н.Л. Заремба, С.В. Козлов, И.И. Будевич, Т.Н. Бровка

*РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси
по животноводству»*

Введение. Открытия, сделанные в области молекулярной генетики, послужили началом развития нового направления в биотехнологии – трансгенеза в животноводстве, целью которого является интеграция чужеродного гена в геном индивидуума для получения определенной, необходимой для человека в больших количествах, во многих случаях дефицитной продукции, зачастую несвойственной для данного вида животных. Одним из важнейших, наиболее ответственных и трудоемких этапов в технологии остается создание полноценных первичных трансгенных особей – основы для дальнейшей реализации запланированных работ по организации инфраструктуры для размножения животных-продуцентов и получения соответствующих субстанций целевых продуктов.

Существует мнение [3], что направленная изменчивость при трансгенезе предопределяет новые взаимодействия генотипа и фенотипа с выделением других факторов, участвующих в различных биохимических, физиологических и иных процессах, происходящих в организме, и в ряде случаев откладывающих свой отпечаток на морфофункциональные признаки животного.

Так, по данным некоторых исследователей [2], получение трансгенных овец по гену химозина с конструкцией под альфа-S1-промотором привело к созданию стад животных, не имеющих какой-либо хозяйственной ценности вследствие гиполактрии, непроходимости молочных альвеол и первичных протоков: под влиянием химозина происходит створаживание молока и переход ряда его составляющих в нерастворимую гелеобразную форму. Установлено [1], что рекомбинантный ген химозина, встроенный в геном овцы, способен передаваться по наследству и экспрессироваться в молочной железе с выделением в молоко продукта экспрессии – прохимозина, при этом трансгенность не отражается на воспроизводительной функции животных, на росте и развитии потомства как самцов, так и самок. По данным Юткина Е.В. [4], трансгенные бараны по гену химозина имели нормальные половые рефлексы, при естественном осеменении ими маток оплодотворяемость составила 71,2-82,4%, а при искусственном – 43,1%. Репродуктивная способность трансгенных овец была на уровне 81,5%, нетрансгенных – 80,2%. Передача трансгена потомству была установлена в 31,5-32,4% случаев, при этом наследование чужеродной генной составляющей исследовано в трех поколениях животных.

Мага Е.А. et al. [5] при разведении трансгенных по человеческому лизоциму (конструкция α S1-HLZ) коз использовали естественное спаривание животных, при этом трансгенных коз осеменяли обычными самцами. Трансмиссия чужеродной ДНК у потомства составила 44%, было получено 52% - самок и 48% самцов.

Ebert K.M. et al. [6] сообщили о создании 2 первичных трансгенных коз (самка и самец) по гену тканевого плазминогенного активатора человека (WAP-LAtPA), который используется в медицине для рассасывания тромбов, особенно в коронарных артериях сердца. В 9-месячном возрасте самка была осеменена нетрансгенным козлом, после чего два родившиеся козленка оказались нетрансгенными, второе покрытие оказалось удачным: из трех козлят один был идентифицирован как носитель генной конструкции WAP-LAtPA. В то же время у первичного трансгенного самца была обнаружена аспермия и впоследствии диагностирована билатеральная киста на головке придатка семенника, что блокировало нормальный сперматогенез. Данный врожденный дефект довольно часто встречается у коз, поэтому неясно, вызвано ли это интеграцией трансгена.

В связи с вышеизложенным, целью исследований явилось изучение эффективности переноса конструкции по гену лактоферрина человека методом микроинъекции в пронуклеус зигот коз, а

также исследование передачи чужеродной ДНК потомству от первичных трансгенных козлов-производителей.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в период 2003-2009 гг. в лаборатории воспроизводства и генной инженерии с.-х. животных РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству» и на Биотехнологическом центре с опытным производством (д. Будагово) Минской области.

В качестве доноров и реципиентов биоматериала использовались козы 1-3 лактации и случного возраста живой массой 35-40 кг. В зиготы коз микроинъекцировались генные конструкции, включающие ген лактоферрина человека. Трансплантация клеток осуществлялась реципиентам со спонтанным и синхронизированным половым циклом хирургически в яйцевод на стороне явно выраженной овуляции на яичнике.

В опытах использовались первичные трансгенные козлы-производители по гену лактоферрина человека (конструкции hLF3 и hLF5), полученные методом микроинъекции чужеродной ДНК в пронуклеус зиготы: Лак-1 и Лак-2.

Для изучения оплодотворяющей способности спермы трансгенных козлов были сформированы 2 группы здоровых, проявляющих нормальную цикличность маток (опытная (n=109) и контрольная (n=72)). Контрольная группа животных осеменялась нетрансгенными производителями. Анализируются следующие общие показатели: оплодотворяемость маток (%), количество абортос (%), рождение приплода (%).

При изучении трансмиссии трансгена потомству от Лака-1 и Лака-2 учитывались показатели: оплодотворяемость коз (%), продолжительность беременности (дн.), наличие дистоции (%), многоплодие (%), выход козлят, в том числе самцов и самок (%) и выход трансгенного потомства, в том числе самцов и самок (%).

Выявление животных в охоте осуществлялась с помощью вазоэктомированных козлов, осеменение коз в спонтанной охоте контрольной и опытных групп проводилось с использованием естественной случки, а также методом искусственного осеменения свежеполученной и заморожено-оттаянной спермы катетерами «IMV» (Франция).

Кормление и содержание животных осуществлялось согласно норм кормления ВАСХНИЛ (1985).

Полученные данные были обработаны биометрически с помощью программы Excel.

Результаты эксперимента и их обсуждение. В таблице 1 представлены результаты по эффективности переноса конструкции по гену лактоферрина человека методом микроинъекции в пронуклеус зигот коз с целью получения первичных трансгенных животных.

Таблица 1 – Результаты получения первичных трансгенных коз по лактоферрину человека

Показатели	Спонтанная охота	Индукцированный эструс	Всего
Количество пересадок, гол.-%	44-38,9	69-61,1	113-100,0
Количество трансплантированных клеток, n	99	182	281
Приживляемость, гол.-%	14-31,8	18-26,1	32-28,3
Количество абортос, гол.-%	2-14,3	41-22,2	6-18,8
*Получено приплода, гол.-%	15-34,1	22-31,9	37-32,7
**из них:			
– живых, гол.-%	14-93,3	19-86,4	33-89,2
в т.ч. трансгенных	-	2-10,5	2-6,1
– мертворожденных, гол.-%	1-6,7	3-13,6	4-10,8
в т.ч. трансгенных	-	1-5,3	1-2,7

* – в расчете на количество пересадок

** – в расчете на количество полученного приплода

¹ – количество животных с неразвивающейся беременностью

Представленные данные исследований свидетельствуют о том, что приживляемость микроинъекцированных зигот при трансплантации их реципиентам со спонтанным эструсом была на 5,7 % выше по сравнению с индуцированным (31,8 против 26,1%), а показатель абортировавших животных был ниже на 7,9%. Не было выявлено значительной разницы между количеством полученного приплода от реципиентов со спонтанной и синхронизированной охотой (34,1 против 31,9%). Однако, выход живых козлят был на 6,9% выше у коз-спонтанниц. При этом установлено, что из числа полученного молодняка 2 живых самца (6,1%) и один мертворожденный оказались трансгенными, цикл матерей которых подвергался синхронизации с циклом доноров.

С целью начала создания стада трансгенных животных трансгенные производители Лак-1 и Лак-2 были использованы для осеменения обычных коз, при этом учитывались показатели оплодотворяемости животных и выхода приплода (табл.2). Для сравнения контрольная группа животных была покрыта нетрансгенными козлами.

Таблица 2 – Оплодотворяемость коз, осемененных спермой трансгенных козлов-производителей и выход приплода

Группы животных	Осеменено коз, n	Из них:		* Окозлилось маток, n-%	*Количество абортов, n-%	Получено приплода всего, n	Из них:	
		оплодотворилось, n-%	неоплодотворилось, n-%				живые, n-%	мертворожденные, n-%
Опыт	109	78-71,6	31-28,4	76-97,4	2-2,6	142	138-97,2	4-2,8
Контроль	72	61-84,7	11-15,3	58-95,1	3-4,9	117	114-97,4	3-2,6

* – от числа оплодотворенных коз

Осеменение спермой трансгенных производителей обычных самок (n=109) привело к получению 71,6%-ой фертильности коз (n=78) (после первого осеменения стали беременными 61,5% животных (n=67), после второго – 10,1% (n=11) – данные в таблице не приводятся), 28,4% (n=31) самок не оплодотворилось. Более высокая оплодотворяемость (на 13,1%) животных контрольной группы объясняется использованием естественной случки, в то время как в опытной группе животных применялись методы искусственного и естественного осеменения нативной и заморожено-оттаянной спермой. Не отмечено различий между группами по количеству нормально окозлившихся маток и количеству рожденного живого приплода. Данный факт свидетельствует о высокой оплодотворяющей способности спермы трансгенов, нормально развивающейся и протекающей беременности у животных, что приводит к получению здоровых козлят без выявленных каких-либо аномалий в развитии.

В таблице 3 приведены общие данные по получению потомства с рекомбинантной ДНК по лактоферрину человека с использованием трансгенных родоначальников Лака-1 и Лака-2.

Таблица 3 – получение трансгенного потомства F₁ от производителей Лака-1 и Лака-2

Трансгенные производители	Осеменено коз, п-%	Оплодотворилось коз, п-%	Получено живых козлят, п-%	Из них:		Получено трансгенных козлят всего, п-%	Из них:	
				Самки, п-%	Самцы, п-%		Самки, п-%	Самцы, п-%
Лак-1	44-40,4	36-46,2	72-52,2	33-50,0	39-54,2	22-59,5 (30,6)*	10-76,9	12-50,0
Лак-2	65-59,6	42-53,8	66-47,8	33-50,0	33-45,8	15-40,5 (22,7)*	3-23,1	12-50,0
Итого	109-100,0	78-100,0	138-100,0	66-100,0	72-100,0	37-100,0 (26,8)*	13-100,0	24-100,0

* – от общего количества живых козлят

Трансгенными производителями Лаком-1 было осеменено 40,4% животных, Лаком-2 – 59,6%. Из 78 оплодотворенных животных 53,8% беременностей было получено от Лака-2 и 46,2% от Лака-1. Вместе с тем, от Лака-1 родилось на 4,4% (на 6 гол.) больше живого приплода, причем количество осемененных и оплодотворенных животных было на 21 и 6 голов меньше, соответственно. Не отмечено существенных различий по половой принадлежности козлят, родившихся от трансгенных козлов, однако передача чужеродной ДНК потомству была выше на 19% от Лака-1, чем от Лака-2, а процентное соотношение полученных самок и самцов составило 76,9:23,1% и 50,0:50,0%, соответственно. В среднем показатель передачи трансгена потомству составил 26,8%.

В таблице 4 приведены данные по некоторым показателям воспроизводства, характеризующим в сравнительном аспекте коз, осемененных спермой трансгенов и обычных производителей.

Данные таблицы свидетельствуют об отсутствии различий между группами животных по количеству дней беременности. Так, в опыте данный показатель составил 148,51 дня, в контроле – 149,34 дня. Не установлено также существенных различий по количеству трудных козлений и многоплодию коз. Таким образом, не отмечено влияния трансгена на продолжительность беременности у животных, ее течение, наличие родовых и послеродовых осложнений у коз, а также на многоплодное рождение у маток, покрытых трансгенными производителями.

Таблица 4 – Продолжительность беременности, наличие дистоции и многоплодие у самок, осемененных трансгенной спермой

Группы животных	Окозлилось маток, п	Количество дней беременности, п	*Количество трудных козлений, п-%	*Многоплодие маток		
				Одінцы, п-%	Двойни, п-%	Тройни, п-%
Опыт	76	148,51±0,27	4-5,3	21-27,6	43-56,6	12-15,8
Контроль	58	149,34±0,72	2-3,4	15-25,9	31-53,4	12-20,6

* – от числа окозлившихся маток

Выводы

1. Проядерное микроинъектирование зигот и их хирургическая трансплантация реципиентам с индуцированным циклом позволили получить двух первичных трансгенных производителей по лактоферрину человека, что составило 6,1% от общего количества родившегося живого приплода.

2. Установлено, что сперма первичных трансгенных производителей обладает высокой оплодотворяющей способностью (71,6%). Не отмечено различий между опытной и контрольной группами коз по числу нормально родивших маток (97,4 против 95,1%), количественному показателю живого приплода (97,2 против 97,4%) и числу абортос (2,6 против 4,9%). Продолжительность беременности у животных, осемененных спермой трансгенов, составила 148,51 дня, а в контроле –

149,34 дня. Не установлено также существенных различий между группами по количеству трудных козлений и многоплодию коз. Нормально развивающаяся и протекающая беременность у животных, осемененных спермой трансгенов, приводит к получению здоровых козлят без каких-либо видимых аномалий в их развитии.

3. Не отмечено существенных различий по половой принадлежности козлят, родившихся от трансгенных козлов, однако из 37 трансгенных животных F_1 22 головы (59,5%) было получено от Лака-1 и 15 голов (40,5%) – от Лака-2, при этом процентное соотношение трансгенных самок и самцов первого поколения составило 76,9:23,1% и 50,0:50,0%, соответственно. Средний показатель передачи гена по лактоферрину человека потомству был на уровне 26,8%, при этом от Лака-1 трансмиссия рекомбинантной ДНК приплоду составила 30,6%, а от Лака-2 – 22,7%.

Литература

1. Калмыков, С.П. Биологические и продуктивные особенности овец, трансгенных по гену химозина: Авт. дис. ...к-та биол. наук: 03. 00. 023 / – п. Горки Ленинские, – 2008. – 22 с.
2. Шихов, И.Я. Структурные изменения в молочной железе трансгенных по химозину овец // сб. тр. межд. конф. : «ДНК-технологии в клеточной инженерии и маркировании признаков сельскохозяйственных животных». – Дубровицы (ВИЖ, 12 ноября 2001 г.). – 2001. – С. 98-100.
3. Эрнст, Л. Использование биотехнологии в практике животноводства / Главный зоотехник. – 2008. – №2. – С.19-21.
4. Юткин, Е.В. Получение трансгенных коз и изучение фенотипических показателей у трансгенных овец с геном $\alpha 1$ -казеин-химозина : авт. дис. ...к-та биол. наук: 03. 00. 023 / – п. Горки Ленинские, 1999. – 29 с.
5. Production and processing of milk from transgenic goat expressing human lysozyme in the mammary gland / Maga E.A., Soemaker C.F., Rowe J.D. et al. // Journal of Dairy Science. – 2006. – V. 89. – P. 518-524.
6. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goat and analysis of expression / Ebert K.M., Selgrath J.P. DiTullio P. et al. // Bio/Technol. – 1991. – V.9. – P. 835