

THE OBTAINMENT OF HUMAN GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR WITH MILK OF TRANSGENIC ANIMALS

Prokofiev M.I., Gorodetskii S.I., Kosorukov V.S., Mezina M.N., Yutkin E.V., Elagin V.V., Pinyugina M.V.

Biotechcenter of Russian Institute of Medicinal and Aromatic Plants,
Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences,
Russian N.N. Blokhin memorial cancer research center RAMS

ABSTRACT

A hybrid gene producing the human granulocyte colony stimulating factor with milk of transgenic animals was cloned. This hybrid gene consist of Kpn and ClaI fragments 500 bp, 5' - flanking region of bovine κ -kasein gene, includes BLG type promoter (bovine κ -lactoglobuline) and fragment of 3' - flanking region of bovine κ -kasein gene, polylinker region including specific sites of recognition for restriction exonucleases. It was determined that 78.7% of microinjected by hGCSF gene zygotes developed to the stage of blastocyst, 30.4% - to the stage of implantation and 17.5% continued their development to the offspring birth. The effectiveness of gene integration from the results of offspring obtainment was 3.3% of the total number of newborn animals and 0.62% of the number of implanted microinjected zygotes. Impregnability of intact females fertilized by sperm of transgenic males was mean 77.9%, in the amplitude from 66.7% to 100%. The heritability of transgene in the first generation offspring (F1) was mean 16.6%, in the amplitude from 9.3% to 21.8% in offsets from different original transgenic males.

Получение человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора с молоком трансгенных животных

Прокофьев М.И., Городецкий С.И., Косоруков В.С., Мезина М.Н., Юткин Е.В., Елагин В.В., Пинюгина М.В.

Биотехцентр всероссийского института лекарственных и ароматических растений, РАСХН,
*Институт биологии гена, РАН,
Российский онкологический научный центр им.Н.Н.Блохина РАМН

Резюме

Создан гибридный ген, который обеспечивает экспрессию чГКСФ с молоком трансгенного животного. Гибридный ген состоит из фрагмента Kpn и Cla I размером 0,5 тыс. пар нуклеотидов 5' - фланкирующей области гена бета-казеина быка, содержащего про-

тор типа BLG (бета-лактоглобулин быка); из фрагмента, содержащего 3' - фланкирующую область гена бета-казеина быка, из участка полилинкера, содержащего уникальные сайты узнавания экзонуклеазами рестрикции. Установлено, что 78,7% микроинъецированных зигот геном чГКСФ развивались до стадии бластоцис-

ты, 30,4% до стадии инплантации и 17,5% продолжали развиваться до рождения приплода. Эффективность интеграции по результатам получения потомства составила в среднем 3,3% к числу родившихся крольчат и 0,62% к числу пересаженных микроинъецированных зигот. Оплодотворяемость интактных самок, осемененных семенем трансгенных самцов была в среднем 77,9%, с колебаниями у отдельных самцов от 66,7 до 100%. Наследование чужеродного гена у потомков первого поколения (F1) составила в среднем 16,6% с колебаниями от 9,3 до 21,8% у потомков разных исходных трансгенных самцов (F0).

Введение

В последние десятилетия широкое развитие получило новое направление в биотехнологии - производство человеческих лекарственных белков с молоком трансгенных сельскохозяйственных животных. Применение этого метода нашло признание среди биотехнологов в 1987 году, когда была получена первая трансгенная мышь, продуцирующая с молоком тканевый человеческий плазминогенный активатор (ТРА), используемый для рассасывания тромбов [4].

Домашнее трансгенное животное становится живым биореактором. Оно легко воспроизводимо естественным путем и поддерживает собственную жизнеспособность с использованием традиционных условий кормления и содержания, производит нужное лекарство в большом количестве, не оказывая влияния на его собственное здоровье, и передает способность производить это лекарство в больших количествах своему потомству.

Преимущества использования домашних животных в качестве живых биореакторов по сравнению с получением лекарственных белков из донорской крови, рекомбинантных микроорганизмов и культивируемых клеток млекопитающих обусловлены целым рядом и других факторов. Получение лекарственных белков из донорской крови ограничено источником сырья и опасностью переноса человеческих инфекций; рекомбинантные микроорганизмы не обеспечивают посттрансляционные модификации крупных молекул рекомбинантных белков (гидроксिलирование, гликозилирование, карбоксилирование); использование линий клеток млекопитающих слишком дорого и не обеспечивает высокий выход продукта.

Основная стратегия получения трансгенных животных состоит в следующем. Генная конструкция, состоящая из структурного гена, прикрепленного к промотору специфического белка молока вводится в оплодотворенные эмбрионы (зиготы) в большинстве случаев путем микроинъекции. Эмбрионы культивируют короткое время и затем пересаживают самкам с синхронизированным половым циклом для дальнейшего развития. Трансгенных животных идентифицируют с помощью постнатальной биопсии и выращивают до половозрелости, чтобы обеспечить передачу потомству.

Если исходным трансгенным животным является самка, то молоко для анализа содержания рекомбинантного белка получают, когда она родит свое первое

потомство. Если исходным трансгенным животным окажется самец, то от него должны быть получены дочери, которые будут лактировать только после достижения половозрелости и рождения собственного потомства. Отсюда интервал времени от введения гена в оплодотворенную яйцеклетку до 1-й лактации составляет: у кролика - 7 месяцев, у свиной - 17 месяцев, у овцы и козы - 18 месяцев и у коровы - 33 месяца, когда исходным трансгенным животным является самка и, соответственно, 14, 28, 31 и 54 месяца, когда исходным трансгенным животным является самец.

Однако, чтобы обеспечить фармацевтическую потребность в рекомбинантном белке сроки создания необходимого размера продуктивного стада, короче когда исходным трансгенным животным является самец, а не самка. Это обусловлено тем, что от исходного самца можно быстрее создать необходимую численность продуктивных животных чем от самки. Так, для крупного рогатого скота интервал времени от микроинъекции гена до создания такого стада составляет 54 месяца, если исходным трансгенным животным является самец и 78 месяцев, если исходным трансгенным животным является самка.

Вероятность создания трансгенного животного, которое может производить лекарственный белок, очень низкая. Установлено, что лишь 0,2-0,8% свиной, овец или коров и 3,5% мышей после пересадки им микроинъецированных эмбрионов приносят трансгенное потомство [12]. У кроликов получают в среднем 1% трансгенных животных к числу пересаженных микроинъецированных зигот [2].

Экспрессия рекомбинантного белка с молоком трансгенных сельскохозяйственных животных (IX фактора у овец) была впервые продемонстрирована. В последующее десятилетие была получена экспрессия 17 различных белков с молоком трансгенных сельскохозяйственных животных [10]. Были получены следующие рекомбинантные белки: у коров-лактоферрин, альфа-лактоальбумин; у коз- антитромбин-III, альфа-антитрипсин, гормон роста, моноклональные антитела, тканевый плазминогенный активатор; у свиной- фактор VIII, протеин С; у кроликов - кальцитонин, внеклеточная супероксид дисмутаза, эритроноэтин, гормон роста, инсулино-подобный фактор роста-1, интерлейкин-2; у овец - альфа 1-Антитрипсин, факторы VIII и IX, фибриноген. При этом 11 из 17 белков секретируются в концентрациях более 1 грамма на литр молока.

Выбор вида животного при получении лекарственного белка определяется потребностью фармацевтического рынка в лекарственном белке, сроками получения достаточного количества такого белка и продуктивностью животного.

Если потребность лекарственного белка определяется граммами (фактор VIII), то можно использовать кролика, несколькими килограммами (протеин С, антитромбин-III) - овец, коз, а десятками килограммов (фибриноген) или тоннами (человеческий альбумин) - коров.

Если концентрация рекомбинантного белка не ниже 1 г/литр молока, то по расчетам [11] для обеспечения

потребности мирового фармацевтического рынка в факторе свертываемости крови (фактор VIII) требуется 217 трансгенных кроликов, в протеине С или анти-тромбине III 3-12 овец или коз и лишь 2-3 трансгенных коровы; в фибриногене - 45-83 овцы или козы или 17 коров. Таким образом, единицы или несколько десятков трансгенных животных могут обеспечить мировую потребность в целом ряде фармацевтических белков. Ввиду того, что затраты на содержание трансгенных животных многократно ниже, чем поддержание биореакторов с микроорганизмами и тем более с клетками млекопитающих, то себестоимость производства рекомбинантных белков в десять, а по сравнению с клетками млекопитающих и более раз, чем с молоком трансгенных животных.

Это обусловлено тем, что в органах плотность клеток в 100 раз выше, чем в культурах клеток: в тканях органа содержится 10^9 клеток/грамм, тогда как в культуре тканей 10^7 клеток/мл. К тому же стоимость получения и содержания трансгенных животных составляет лишь 1/10 часть стоимости биореактора [6].

В задачу настоящего исследования входило получение человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (чГКСФ) с молоком трансгенных кроликов. чГКСФ регулирует продукцию нейтрофилов и их выход в кровь из костного мозга. Препарат широко используется в онкологии для борьбы с нейтропенией у больных, получавших цитостатики по поводу злокачественных опухолевых заболеваний, а также при трансплантации костного мозга. Применение этого препарата позволяет резко уменьшить число опасных для жизни инфекционных осложнений, которые развиваются у больных с нейтропенией [7]. Получение чГКСФ с использованием рекомбинантных микроорганизмов не обеспечивает посттрансляционных модификаций, как гликозилирование, силиконирование, фолдинг белка и отщепление лишнего метионина с N-конца белка, что приводит к снижению устойчивости и биологической активности получаемого препарата [9].

Для обеспечения посттрансляционных модификаций в молекуле белка чГКСФ получена его гликозилированная форма путем использования клеток млекопитающих [8]. Гликозилированная форма чГКСФ по сравнению с негликозилированным рекомбинантным белком, получаемым с использованием микроорганизмов в 2 раза превосходит по способности стимулировать рост колоний гранулоцитов и в 20 раз быстрее обеспечивает проявление положительного эффекта. Вместе с тем концентрация рекомбинантного белка, полученного в культуре клеток млекопитающих очень низкая, а сам процесс культивирования дорогостоящий и требует высокого технологического обеспечения.

Все это и послужило основанием провести настоящее исследование по получению трансгенных кроликов, продуцирующих чГКСФ с молоком.

Материалы и методы исследований

В качестве доноров зигот использовали половозрелых самок кроликов породы шиншилла в возрасте 5-7 месяцев. Для вызывания суперовуляции у доноров при-

меняли гонадотропин сыворотки жеребых кобыл (Сергон, Чехия). Каждому донору инъецируют 100 МЕ сергона, через 48-72 часа самку спаривали с самцом и индуцировали овуляцию внутривенным введением 100 МЕ хорионического гонадотропина (Московский эндокринный завод). Для извлечения зигот у самок-доноров использовали оперативное промывание яйцеводов. В качестве анестетиков использовали кетамин 5%, ромпун 2%. Наркотизированное животное фиксировали на операционном столе и выбривали шерсть в области живота. Репродуктивный тракт обнажали через разрез по белой линии живота. В воронку яйцевода вводили полиэтиленовый катетер. В стенке рога матки металлической канюлей со стилетом делали отверстие. Затем в просвет матки вводили теплую манипуляционную среду и направляли ее ток через соединение матки с фаллопиевыми трубами в яйцевод.

Поиск оплодотворенных яйцеклеток (зигот) осуществляли на бинокулярной лупе Nikon при увеличении 40х.

Зиготы с визуализированными пронуклеусами инъецировали в 1-2 пкл раствора ДНК в один пронуклеус [1]. Микроинъекции проводили в специальной камере, заполненной культуральной средой (PBS с добавлением 5% фетальной сыворотки). Камера состоит из двух параллельно расположенных силиконизированных покровных стекол, между которыми находится капля манипуляционной среды в виде столбика. Все остальное пространство заполняли минеральным маслом (Sigma, $d=0,84$ г/мл.). Предназначенные для инъецирования зиготы помещали в столбик манипуляционной среды, удерживали на стеклянной пипетке и оценивали пронуклеусы с использованием инвертированного микроскопа Axiovert 35 при увеличении 400х. Раствор ДНК инъецировали с помощью микроинъекционной иглы, вытянутой из капиллярной трубочки с микрофиламентом (тонкостенное тугоплавкое стекло, диаметр 1мм) на вертикальном пулере (НПО «Биоприбор» РАН).

Микроинъекционные иглы заполняли раствором ДНК, используя действие капиллярных сил, затем устанавливали в манипуляторе. Положение обоих микроинструментов (фиксирующей пипетки и микроинъекционной иглы) регулировали с помощью микроманипуляторов (НПО «Биоприбор»РАН). Микроинъекционную иглу с инъецируемым раствором ДНК соединяли силиконовой трубочкой с микроинъектором. Об успехе микроинъекции судили по увеличению объема пронуклеуса. Инъецированные зиготы инкубируют 30-60 мин, чтобы удалить поврежденные. К дегенерированным относили зиготы с фрагментированной цитоплазмой и с поврежденной цитоплазматической мембраной. Зиготы, имеющие нормальный внешний вид, пересаживали реципиентам крольчихам, у которых половой цикл синхронизировали с циклом доноров. Самок-реципиентов спаривали с вазоэктомизированным самцом и вводили хорионический гонадотропин в то же время, когда спаривали донорскую самку с полноценным самцом. Эмбрионы трансплантировали в яйцеводы самок-реципиентов хирургическим способом. Для пересадки

зигот используют стерильные катетеры для пересадки эмбрионов (Биомедикол, Россия). Реципиенту через воронку яйцевода вводили катетер, содержащий манипуляционную среду с зиготами. Каждому реципиенту пересаживали 15-20 зигот, распределяя их поровну между яйцеводами.

После трансплантации эмбрионов, каждая крольчиха-реципиент находилась в отдельной клетке на весь срок беременности. В течение 7-10 дней проводилась санация операционного шва. На 14-16 дни после трансплантации эмбрионов методом пальпации устанавливали наличие плодов у реципиентов. Беременных реципиентов переводили на рацион кормления для сукольных и лактирующих самок. Окрол ожидали на 29-30 дни после трансплантации эмбрионов. В случае задержки окролов на следующий день после ожидаемой даты с целью стимуляции родов внутривенно инъецировали 3 МЕ окситоцина. Ввели четкий учет числа родившихся крольчат. Через 5-7 дней всех крольчат метили и одновременно брали образцы ткани уха для анализа ДНК на интеграцию трансгеноза.

Наличие интеграции определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими праймерами GCA CAG CCT GTA GGT GGC ACA и CCT GCA GAG CTC AGA AGC GTC. Положительные по ПЦР пробы подтверждали методом блот-гибридизации (рис. 1).

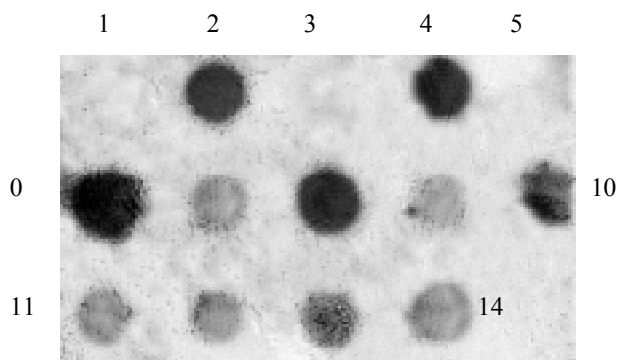


Рис. 1

Автограф слот-блот-гибридизации проб ДНК кроликов проинъецированных конструкцией h-GM-1. Более темные участки отражают наличие в пробе ДНК участков гена Г-КСФ человека.

2, 4, 6, 8, 10 - пробы ДНК трансгенных особей кроликов
1, 3, 5, 7, 11-14 - пробы ДНК нетрансгенных кроликов.

Результаты исследований

Создан гибридный ген h-GM-1, который обеспечивает экспрессию человеческого ГКСФ с молоком трансгенного животного. Гибридный ген состоит из фрагмента KpnI и ClaI размером 0,5 тыс пар нуклеотидов 5'-фланкирующей области гена бета-казеина быка, содержащий промотор гена BLG (бета-лактоглобулин быка); из фрагмента размером 1,5 тыс.п.н., содержащий 3'-

фланкирующую область гена бета-казеина быка; из участка полилинкера содержащего уникальные сайты узнавания экзонуклеазами рестрикции EcoI, HindIII, SalI, BamHI, XbaI, NotI (рис. 2).

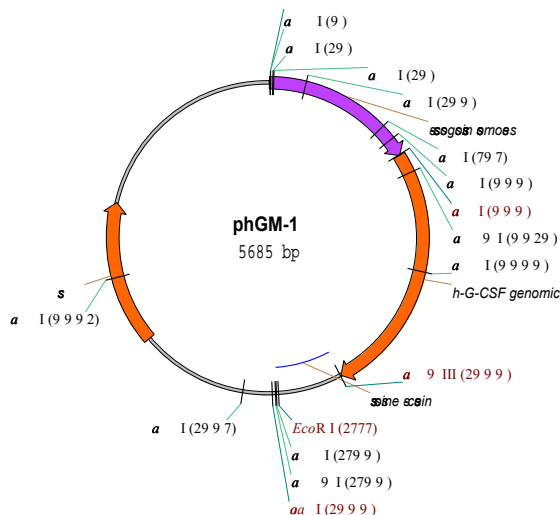


Рис. 2

Схема векторной конструкции phGM-1

Создание гибридного гена h-GM-1 осуществляли следующим образом. Из вектора pBBLG-3, содержащего геномную копию гена бета-лактоглобулина быка с фланкирующими его 5' и 3' последовательностями по уникальным сайтам рестриктаз KpnI и ClaI выделяли фрагмент 5'-фланкирующей области, содержащей промотор гена BLG и его сигнальный пептид. Из этого же вектора методом полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами был выделен 3'-фланкирующий участок гена BLG.

5'-фрагмент был переклонирован в сайт рестриктазы ClaI в вектор pHGCSF2, содержащий геномную копию гена Г-КСФ человека перед ATG сайтом гена Г-КСФ. Правильность клонирования и сохранность рамки считывания проверяли методом секвенирования фрагмента конструкции, амплифицированного по специфическим праймерам OCT GCA GAG CTC AGA AGC GTG и AGG CGG CTC TCC CAT CCT GGG. Полученную конструкцию назвали p5LG-GCSF.

3'-фрагмент был переклонирован в сайт рестриктазы XhoI в вектор p5LG-GCSF после стоп кодона кодирующей части гена ГКСФ. Полученный вектор был проверен на правильность кодирующей последовательности методом секвенирования ключевых участков гибридного гена. Полученный вектор был назван ph GM-1.

При подготовке фрагмента к микроинъекции его вырезали из 20 мкл векторной ДНК ph GM-1 эндонуклеазами KpnI и NotI. Затем выделяли фрагмент из смеси методом фракционирования в агарозном геле и очищали фенол-хлороформным методом. Окончательную очистку проводили на наборе Genomic DNA Purification Kit (Promega). Окончательно растворяли фрагмент в буфере 0,1xTE (1mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0).

С целью изучения возможного токсического действия вводимой генной конструкции гибридного гена Г-КСФ изучали влияние его микроинъекции на разви-

тие зиготы кролика *in vitro*. Контрольные и проинъецированные геном Г-КСФ зиготы культивировали в среде 199 с добавлением 10% фетальной сыворотки в течение 5 суток (табл. 1).

Как видно из данных таблицы 1 микроинъекция гена Г-КСФ не оказала отрицательного воздействия на развитие эмбрионов кроликов, по сравнению с интактными, как по проценту дробления (92,1 и 100%), так и по эффективности развития до стадии бластоцисты (77,1 и 78,7%).

В последующем эксперименте изучали эффективность дальнейшего развития микроинъецированных по сравнению с интактными эмбрионами кроликов до имплантации и рождения приплода (таблица 2).

Таблица 1
Эффективность развития микроинъецированных геном Г-КСФ зигот кроликов при культивировании *in vitro*.

| 7 77 | бр7 бо77 | йсло й7 о7 | Дробились | | Итрйлись 7о с77 ии бл77 о7ис77 | | |
|---------|----------------------------|---------------|-----------|---|--------------------------------------|---|---|
| | | | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| 7 | 77 роль | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| 7 | 777и ро7 7 й7 о77 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |

Таблица 2

Эффективность развития микроинъецированных зигот до стадии имплантации и рождения потомства.

| 6 66 | 66 6 36 66 и | 6 иб 6 6 6 6иб бибн666 6 | Из них | | 6 иб 6 6 66 6 н6666 н66 6 6 6 н6н6 х зиб66 6 | Из них 6 6 36 иб иб66 6 иб666 6 н66и иб 6 6 6 66и6 66 66 6 6 666 | |
|---------|---------------------|--------------------------------|--------|--------|--|--|--------|
| | | | 6 | 6 | | 6 | 6 |
| 6 | И66 6 н66и6 | 6 | 6 | 6 6 6 | 6 6 | 6 6 6 | 6 6 6 |
| 6 | 66 6 6ниб 66 6 6666 | 6 6 | 6 6 | 66 6 6 | 6 6 6 | 6 6 6 | 66 6 6 |

Как видно из данных таблицы 2 на 13-ый день беременности было обнаружено 14(30,4%) развивающихся плодов из 46 трансплантированных зигот. Из 212 проинъецированных геном Г-КСФ и трансплантированных зигот было получено 37 крольчат, что составляет 17,5%. По результатам проведенных экспериментов можно заключить, что 78,7% микроинъецированных зигот развились до стадии бластоцисты, 30,4%, до стадии имплантации и 17,5% продолжали развиваться до получения живого потомства. На ранних этапах развития микроинъецированных эмбрионов наблюдались потери эмбрионов по сравнению с предыдущим этапом: от стадии зиготы до бластоцисты 21,3%, от стадии бластоцисты до имплантации - 48,3% и от имплантации до рождения потомства еще 12,9. Общие потери к числу трансплантированных эмбрионов до рождения потомства составили 82,5%.

Эффективность интеграции гена Г-КСФ у родившихся крольчат в результате трансплантации микроинъецированных эмбрионов показаны в таблице 3.

Было трансплантировано 2741 микроинъецированных зигот 168 кроликам-реципиентам. Эффективность трансплантации зигот было высокой: 116 (69%) из 168 кроликов были беременными по результатам окролов. Однако, только 516 (18,2%) из 2741 зигот развивались до получения потомства. 17 (3,3%) из 516 родившихся кроликов были трансгенными. Получено 0,62% трансгенных кроликов к числу пересаженных зигот.

Возраста половозрелости достигли 4 трансгенных самца. В целях определения эффективности размножения исходных трансгенных самцов спаривали с нетрансгенными самками (таблица 4).

Как видно из данных таблицы 4, оплодотворяемость самок, осемененных семенем трансгенных самцов по результатам окрола была достаточно высокой, в среднем 77,9% (102 из 131). На каждую окролившуюся сам-

Таблица 3
Эффективность получения трансгенных кроликов с геном Г-КСФ

| № □□ | □ □□□□□□□ | □ □□ | □ □□□□ |
|---------|-------------------------------------|-------|--------|
| □ | □ □□□□□□□□□□□□□□ □□□□□□□□□□ | □□□ | □ □□ |
| □ | □ □□□□□□□ □□□ □□ □□□□□□□□ □□□□□□ | □□□ | □ □□□ |
| □ | □ □ □□□□ □□□□□□□□ | □ □□□ | □ □□ |
| □ | □ □□□□□□□□□□□□□□ □□□ □□□□ | □□□ | □ □□□ |
| □ | □ □□□□□ □□□□□ □□□□□ □□□□□□□□ | □□ | □ □□ |

Таблица 4
Эффективность размножения исходных трансгенных кроликов.

| 6 6 6 66 66 6 н66и6 6 6 6 666 | 6 иб 6 6 6 6 66н6н6 х 6 6 666 6 | Из них | |
|-------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|---------|
| | | 6 6 6 6 иб иб 6 6 иб 6 6 | 6 |
| 6 | 6 6 | 6 6 | 6 6 6 |
| 6 | 6 6 | 6 6 | 666 6 6 |
| 6 | 6 6 | 6 6 | 6 6 6 |
| 6 | 6 6 | 6 6 | 6 6 6 |
| И66 6 | 6 6 6 | 6 6 6 | 6 6 6 6 |

ку получено в среднем 6,12 крольчат. Вместе с тем обнаружались значительные индивидуальные различия оплодотворяющей способности у отдельных трансгенных самцов. У двух самцов (2 и 3) оплодотворяемость по результатам окрола была близкой к 100% (100 и 96,1%), а у двух других (1 и 4) примерно на 30% ниже (66,7 и 73,0%).

Заметное снижение числа крольчат было отмечено

только у самок, осемененных семенем одного самца (4,28 против 6,8-9,26).

Наследование гена чГКСФ у исходных трансгенных кроликов показано в таблице 5.

Как видно из данных таблицы 5, наследование чужеродного гена у потомков первого поколения составило

Таблица 5
Наследование гена чГКСФ у кроликов первого поколения

| 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 | 6 и 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 | Из них 6 6 6 6 6 6 х | |
|-----------------------------------|---|----------------------|---------|
| | | 6 и 6 6 6 | 6 |
| 6 | 6 6 6 | 6 6 | 6 6 6 6 |
| 6 | 6 6 | 6 | 6 6 6 |
| 6 | 6 6 6 | 6 6 | 6 6 6 6 |
| 6 | 6 6 6 | 6 6 | 6 6 6 6 |
| И 6 6 6 6 | 6 6 6 | 6 6 6 | 6 6 6 6 |

вило в среднем 16,6% (у 103 из 625 кроликов) с колебаниями от 9,3 до 21,8% у потомков разных самцов.

Отход трансгенных кроликов в онтогенезе составил в среднем 58,2% против 33,7% у нетрансгенных потомков первого поколения. Этот показатель у потомков одного трансгенного самца был особенно высоким 91,3%, у двух других - 33,3 - 34,8% и у четвертого - 48,6%.

Обсуждение результатов исследований

В этой серии экспериментов создан гибридный ген h-GM-1, содержащий геномную копию ДНК и промотор гена бета-лактоглобулина быка, обеспечивающий секрецию человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (чГКСФ) с молоком трансгенных животных.

Исследования *in vitro* показали, что инъекция конструкции гибридного гена h-GM-1 в пронуклеус зиготы кролика не оказывает вредного влияния на развитие эмбрионов до стадии бластоцисты по сравнению с развитием интактных эмбрионов (77,1% в контроле и 78,7% инъектированных). Установлено, что к 13-му дню выживают 30,4% микроинъектированных эмбрионов кролика, а к моменту рождения лишь 17,5% к числу пересаженных эмбрионов. Таким образом, большинство микроинъектированных эмбрионов (48,3% к числу пересаженных) погибают в период от стадии бластоцисты до 13-го дня беременности. Процент микроинъектированных эмбрионов, выживших до рождения потомства, в наших экспериментах был значительно выше (17,5% против 4,3-9,3%) по сравнению с данными других исследований, полученных на этом же виде животных (G. Brem et al., 1988). Эффективность же интеграции гена у потомства к числу родившихся в наших экспериментах была, наоборот, примерно в 2-3 раза ниже (3,3% против 8,1-9,6%), чем в экспериментах названных выше авторов. В то же время процент трансгенных животных к числу микроинъектированных зигот в наших экспериментах был на уровне других исследователей (0,62% против 0,41 и 0,75%). Эти данные дают основание заключить, что применяемая нами техника

пересадки микроинъектированных эмбрионов кроликов была по-видимому несколько выше, чем применяемая исследователями более 10 лет назад. Это по-видимому и обеспечило более высокий процент выживания трансплантированных зигот кроликов. Что же касается техники микроинъекции гена в пронуклеус зигот, то ее результативность была одинаковой как в наших экспериментах, так и в экспериментах приведенных выше исследователей.

В известных нам публикациях имеются крайне скудные данные об эффективности размножения и наследования чужеродного гена у трансгенных животных.

В проведенной серии экспериментов нами получены убедительные данные на достоверно большом экспериментальном материале о воспроизводительной способности исходных трансгенных животных. Ввиду того, что стадии половозрелости достигли четыре трансгенных самца и ни одной трансгенной самки, то полученные данные позволяют судить о воспроизводительной способности только самцов. Установлено, что воспроизводительная способность трансгенных самцов в среднем была удовлетворительной (оплодотворяемость 77,9% по числу окролившихся самок после первого осеменения), но обнаруживались значительные индивидуальные различия. У двух самцов оплодотворяющая способность была примерно на 30% выше, чем у двух других (96,1 и 100% против 66,7 и 73,0%). Можно предположить, что это обусловлено различиями между исходными трансгенными животными, вызванными местом интеграции генной конструкции.

Наследование интеграции чужеродного гена у потомства четырех трансгенных самцов была низкой, (16,6%). Это, по-видимому, обусловлено мозаицизмом исходных трансгенных животных и генетическими изменениями в процессе кроссенгвера в период оплодотворения. Индивидуальные различия между исходными трансгенными самцами по степени наследования гена в потомстве при осеменении с нетрансгенными самками колебались в пределах 9,3-22,1%. При этом процент наследования гена у потомства от двух самцов был вдвое выше, чем у двух других (21,8 и 22,1% против 9,3 и 11,2%).

Обнаружены существенные различия между трансгенными кроликами по выживаемости их трансгенного потомства. Выживаемость трансгенного потомства от двух трансгенных кроликов была одинаковой с нетрансгенными (66,7 и 65,2% против 66,3% у нетрансгенных), несколько ниже у потомков третьего кролика (51,4%) и примерно в семь раз ниже у потомков четвертого кролика (8,7%). Эти наблюдения не вызывают сомнений в том, что неадекватное место интеграции введенного гена может оказывать, по-видимому, вредное влияние на жизнеспособность трансгенных животных.

Список литературы

1. Brem G., Brenig B., Goodman H. et al. Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei.// *Zuchtyg*, 1985, 20, p. 251-252.
2. Brem G., Brenig B., Salmons B. et al. Unerwartete transgene Expression eines gesaeugespezifischen

- Wachstumshormon Genkonstruktes in dem Bergman-Gliazellen der Maus. Tierarztl.// Prax., 1991, 19, p. 1-6.
3. Brem G., Besenfelder U., Castro F.O. et al. Transgenesis in rabbits.// Mammary gland transgenesis: Therapeutic protein production, 1998, 7, p. 107-142.
4. Gordon K., Lee E., Vitale JA, et al. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. Biotechnology, 1987, 5, p. 1183.
5. Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection.// Nature, 1985, 315, p. 680-683.
6. Meade H., Ziomer A.C. Urine as substitute for milk?// Nature Biotechnology, 1998, 16, January, p. 21-22.
7. Morstyn G. et al. Clinical studies with grantuents receiving cytotoxic chemotherapy.// Brhring Inst. mitt., 1988, Aug.(83), p. 234-239.
8. Nissen C. Glycosylation of recombinant human granulocyte colony stimulating factor, implications for stability and potency.// Eur. J. Cancer, 1994, 30A, suppl.3, p. 12-14.
9. Perez-perez J. et al. DnaK/DnaJ. supplementation improves the periplasmic production of human granulocyte-colony stimulating factor in Escherichia coli./ / Biochem. Biophys. Res. Commun., 1995, 16, 210(2), p. 524-529.
10. Rudolf N.S. Biopharmaceutical production in transgenic livestock.// Trends Biotechnology, 1999, September, 17, p. 367-374.
11. Wall R.J. Biotechnology for the production of modified and innovative animal products: transgenic livestock bioreactors.// Livestock Production Science. 1999, 59, p. 243-255.
12. Wall R.J., Seidel G.E. Transgenic farm animals. A critical review.// Theriogenology, 1992, p. 337-357.
-