НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН ІМЕНІ М.В.ЗУБЦЯ

ЛЕСНЯК ЮРІЙ ІВАНОВИЧ

УДК 575.113:598.261.7

ТРАНСФЕКЦІЯ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ТА ЕМБРІОНАЛЬНИХ КЛІТИН ЯПОНСЬКОГО ПЕРЕПЕЛА (COTURNIX JAPONICA)

03.00.15 – генетика

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата сільськогосподарських наук

с. Чубинське, Київська область – 2017

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Національному університеті біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник доктор сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник
Спиридонов Владислав Геннадійович,
Інститут ветеринарної медицини
Національної академії аграрних наук України,
провідний науковий співробітник
лабораторія з вивчення Сибірки

Офіційні опоненти: доктор сільськогосподарських наук, професор
Копилов Кирило Вячеславович,
Інститут розведення і генетики тварин
імені М.В.Зубця Національної академії
аграрних наук України, головний науковий
співробітник лабораторії генетики

кандидат сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник
Облап Руслан Васильович,
Державне підприємство «Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації,
метрології, сертифікації та захисту прав споживачів»
Міністерства економічного розвитку і торгівлі України,
старший науковий співробітник науково-виробничої
лабораторії молекулярно-генетичних досліджень

Захист відбудеться 28 грудня 2017 року о 10^{00} годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 27.355.01 Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН за адресою: вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський район, Київська обл., 08321

З дисертацією можна ознайомитися в науковій бібліотеці Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН за адресою: вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський район, Київська обл., 08321

Автореферат розіслано «___» _____ 2017 року

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради, О. Д. Бірюкова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. В даний час генетичні методи широко розповсюджуються у різних напрямах життєдіяльності людини. Цьому сприяють дві обставини. З одного боку, бурхливий розвиток сучасної молекулярної біології та генетики, завдяки яким можна широко використовувати потенціал живих організмів. З іншого боку, велика практична потреба у новітніх технологіях, необхідних для подолання зростаючих потреб у продовольчих товарах, фармацевтичних препаратах тощо (Markaki M., Drabek D., Livadaras I., et al., 2007).

Введення чужорідних генів тваринам, дозволяє отримати генетично трансформовані особини, у яких введені гени можуть покращувати породні властивості тварин, підвищувати стійкість їх організму до різних інфекційних захворювань, або отримувати тварин-продуцентів фізіологічно активних продуктів, необхідних у медицині, ветеринарії, тваринництві (Ebara F., 1999; Royer C., Jalabert A., Da Rocha M., et al., 2005).

Найважливішим пріоритетом створення генетично трансформованих організмів залишається отримання рекомбінантних білків на їх основі (Прокофьев М.И., Захарченко В.И., Сураева Н.М., Лагутина И.С., 1994; Городецкий С.И., Мезина М.Н. и др., 2003; Peltola H., Heinonen O.P., Valle M., et al., 1994; Houdebine L.M., 2002; Zhu L., Lavoir M.C., Leighton P., 2005; Harvey A.J., Ivarie R., 2003; Lillico S.G., McGrew M.J., Sherman A., Sang H.M., 2005).

Одним з методів отримання тварин-продуцентів фізіологічно активних продуктів є використання ембріональних химер. Суть цього методу полягає у тому, що є можливість отримувати і культивувати ранні ембріональні клітини. Якщо в подальшому підсадити ці клітини в ембріон, то з такого ембріона розвивається соматична химера. Якщо трансфікувати культивовані ембріональні клітини до підсадки їх в інший ембріон, то можна отримати генетично трансформовану химеру, продуцента певних видів білків (Mizuarai S, Ono K, Yamaguchi K, Nishijima K, Kamihira M, Iijima S., 2001).

Розробка технологій введення чужорідного гена за допомогою сперматозоїдів, на прикладі японського перепела, відкриває широкі можливості у використанні біологічного матеріалу даного виду птаха для продукції фармацевтичних білків, саме цьому питанню і була присвячена більша частина даної роботи (Mizushima S, Takagi S, Ono T, Atsumi Y, Tsukada A, Saito N, Shimada K., 2009; Windbichler N., Papathanos P.A., Catteruccia F., Ranson H., Burt A., Crisanti A., 2007; Yang H., Wang H., Jaenisch R., 2014).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження за темою дисертації виконувалися згідно плану науково-дослідних робіт відділу молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України за фундаментальною темою «Розробка імуноферментних діагностикумів для виявлення та ідентифікації генетично модифікованих гербіцидостійких сільсько-господарських рослин» (№ державної реєстрації 0113U003826).

Частину експериментальної роботи було виконано на базі: відділення генетики та репродуктології при Лос-Анджелеському інституті The Fertility Institutes (США); генетичної лабораторії Reproductive Genetechs Institute (США); Columbia University in the City of New York (Anatomy and Cell Biology Department) (США); The Rockefeller University (США).

Мета та завдання дослідження. Мета дослідження – визначити основні параметри та провести трансфекцію сперматозоїдів та ембріональних клітин японського перепела (Coturnix japonica).

Для досягнення цієї мети були поставлені наступні завдання:

1) здійснити оптимізацію методів трансфекції GFP-геном сперматозоїдів та ембріональних клітин японського перепела (Coturnix japonica) шляхом застосування різних комбінацій з диметилсульфоксидом (DMSO), ліпосомами та Triton X-100;

2) отримати довгострокові культури ембріональних клітин;

3) застосувати для трансфекції ембріональних клітин генно-інженерну конструкцію pEGFP-N1 в комплексі із DMSO та ліпосомами;

4) підібрати найбільш ефективні методики для роботи з генеративними клітинами японського перепела (Coturnix japonica);

5) підвищити рівень ефективності штучного осіменіння японського перепела (Coturnix japonica);

6) застосувати для проведення трансфекції генеративних клітин генно-інженерні конструкції CRISPR/Cas-GFP в поєднанні із Triton X-100 та pEGFP-N1 в комплексі із DMSO та ліпосомами;

7) здійснити інтродукцію гена GFP у геном генеративних клітин перепела.

Об'єкт дослідження: трансфекція сперматозоїдів та ембріональних клітин перепелів.

Предмет дослідження: особливості трансфекції сперматозоїдів, бластодермальні та первинні зародкові клітини перепелів.

Методи дослідження: молекулярно-генетичні (екстракція ДНК, полімеразна ланцюгова реакція), методи трансгеніки (введення чужорідних генів в геном тваринного організму), мікрохірургічні (інтрацитоплазматична ін'єкція сперматозоїда – ICSI, мікроін'єкція ДНК), зоотехнічні (оцінка тварин за генеалогічною належністю, власною продуктивністю), статистичні (біометричне обчислення отриманих даних).

Наукова новизна одержаних результатів. За допомогою лінійної генно-інженерної конструкції у складі плазміди pEGFP-N1 вперше в Україні отримані трансфікофані сперматозоїди та продемонстрована експресія цільового гена. Вперше отримано генетично трансформованих ембріонів перепелів за допомогою інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїдів в комплексі з Triton X-100, екстрактом сперми та CRISPR/Cas-GFP вектором. Визначено оптимальні режими трансфекції гену GFP в сперматозоїдах перепела за допомогою ліпосом, диметилсульфоксиду і Triton X-100. Проведено культивування ембріональних (ЕК) клітин на моношарі STO

(мишачі ембріональні фібробласти), розроблений протокол тривалого культивування ЕК з метою їх подальшого використання для трансфекції.

Практичне значення одержаних результатів. За результатами експериментальних даних, що отримані в роботі, рекомендовано використовувати розроблені методи для отримання генетично трансформованих химерних ембріонів птиці шляхом трансплантації трансфікованих ембріональних клітин у зародковий диск реципієнта, що може бути використано при розробці технології виробництва рекомбінантних білків. Введення чужорідного гена за допомогою сперматозоїдів, на прикладі японського перепела, відкриває широкі можливості щодо використання біологічного матеріалу даного виду птахів для продукції фармацевтичних білків.

За результатами роботи отримано два патенти на винахід: 1) патент на винахід №99240 «Спосіб запліднення *in vitro*» від 25.07.2012; 2) патент на винахід №101744 «Спосіб запліднення *in vitro*» від 25.04.2013; два патенти на корисну модель: 1) патент на корисну модель №65889 «Спосіб запліднення *in vitro*» від 12.12.2011; 2) патент на корисну модель №65890 «Спосіб запліднення *in vitro*» від 12.12.2011.

Особистий внесок здобувача. Планування досліджень, вибір методичних підходів, розробку схеми досліджень, обговорення результатів та формулювання висновків проведено спільно з науковим керівником. Особисто здобувачем здійснено огляд та аналіз наукової літератури за темою роботи, виконано експериментальні дослідження, статистичний аналіз, інтерпретацію та узагальнення отриманих результатів.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційних досліджень доповідалися та отримали позитивну оцінку на з'їзді фахівців України з репродуктивної медицини (26–28 травня 2010 р., м. Київ); симпозіумі з питань репродуктивної медицини «Від науки до практики» (5–7 квітня 2012 р., м. Київ); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Медична ефективність діяльності сучасних клінічних лабораторій» (16–17 квітня 2013 р., м. Київ); Всеукраїнській конференції з питань якості роботи IVF-лабораторій (лабораторій ембріологічно-генетичного спрямування): «5th Annual Meeting of Ukrainian Club of Embryologist held in cooperation with ORIGIO CooperSurgical Company: Management in IVF Lab – Standardization Increase and Outcome Optimization» (26–27 квітня 2013 р., м.Київ); Міжнародному симпозіумі з питань репродуктивної медицини та з клінічної ембріології (30 травня 2013 р., м. Львів); Міжнародному конгресі по генетиці та репродуктології (American Society for Reproductive Medicine, Annual Meeting) (18–22 жовтня 2013 р., м. Гонолулу, США); Всеукраїнській науково-практичній інтернет-конференції молодих учених «Сучасний стан і перспективи розвитку аграрного сектору України» (19–20 жовтня 2016 р.); XV Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (8–9 грудня 2016 р., м. Львів); III конференції молодих учених «Біологія рослин і біотехнологія», секція конференції «Молекулярна та

клітинна біологія» (16–18 травня 2017 р., м. Київ); XV Всеукраїнській науковій конференції молодих вчених і аспірантів «Селекційні, генетичні та біотехнологічні методи збереження, поліпшення і використання генофонду тварин» (с. Чубинське, Київська обл., 2017 р.).

Публікації. Основні результати дисертаційного дослідження викладено у 15 опублікованих працях, з яких 6 статей у наукових фахових виданнях, 5 тез наукових доповідей, 2 патенти на винахід, 2 патенти на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду наукової літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів експериментальних досліджень та їх узагальнення, висновків, списку використаних джерел літератури (309 найменувань, з них 180 латиницею), додатків. Загальний обсяг дисертації становить 174 сторінки комп'ютерного тексту, роботу проілюстровано 25 таблицями та 31 рисунком.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд наукової літератури. У розділі проаналізовано наукові праці вітчизняних та зарубіжних науковців, а також подано сучасні погляди на проблему введення чужорідних генів тваринам з метою отримання тварин-продуцентів фізіологічно активних продуктів, необхідних в медицині, ветеринарії, тваринництві (Ebara F., 1999; Royer C. et al., 2005; Markaki M. et al., 2007). Розглянуто технологію введення чужорідного гена за допомогою сперматозоїдів (Lavitrano M. et al., 1997; Gandolfi F., 2000; Dyck M. K. et al., 2003; Gagne M. B., 1991; Rieth A., 2000; Khoo H. W., 2000; Фисинин В.И. и др., 2009).

Розглянуто використання генетично трансформованих тварин в якості біореакторів, охарактеризовано процес включення в клітини їхніх організмів генів, які викликають у них синтез нових білків, як правило, фармакологічного або технологічного напрямків (Прокофьев М. И. и др., 1994; Городецкий С. И. и др., 2003; Peltola H. et al., 1994; Houdebine L. M., 2002; Zhu L. et al., 2005; Harvey A. J., Ivarie R., 2003; Lillico S. G. et al., 2005). Розглянуто способи доставки генно-інженерних конструкцій в геном тварин (Mather C., 1994; Naito M., Kuwana T., 2004; Windbichler N. et al., 2007; Yang H. et al., 2014).

Акцентовано увагу на недостатньому висвітленні в сучасних наукових джерелах проблеми трансфікування сперматозоїдів та ембріональних клітин японського перепела (Coturnix japonica); обґрунтовано необхідність проведення досліджень за темою дисертаційної роботи.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження були проведені у 2013–2017 роках на базі науково-дослідного відділу молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України, якій згідно наказу Міністерства аграрної політики України та Української академії аграрних наук від 29 грудня 2007 р. № 966/141 присвоєно статус підприємства (лабораторії) генетичного контролю. Загальна схема досліджень передбачала трансфекцію

сперматозоїдів та ембріональних клітин японського перепела (Coturnix japonica) (рис.1).

У дослідах використовували 46 самиць і 70 самців перепелів. Птахів розміщували у спеціальних клітках.

Самців утримували в окремих клітках, а самиць групами при кімнатній температурі (22 °С) та 14 год./10 год. циклі світло/темрява. Вода і збалансований за вітамінами та мінералами корм були доступні птахам без обмежень.

Забір сперми від кожного самця здійснювали два рази на тиждень. Для забору еякуляту використовували дозатор. У більшості випадків для максимальної ефективності та зручності процедуру проводили два оператори.

У свіжозібраній спермі оцінювали такі показники: об’єм, колір, в’язкість еякуляту, концентрацію та морфологію сперматозоїдів, а також наявність кров’яних виділень та фекалій. Оцінка якості сперми і підрахунок кількості сперматозоїдів проводився під мікроскопом Eclipce E200F («Nikon», Японія).

Рис.1. Загальна схема досліджень

Генно-інженерні конструкції, що використані у роботі. Ми використовували генно-інженерну конструкцію pEGFP-N1 («Clontech», США) для генетичної трансформації сперматозоїдів перепела. Генетична карта конструкції pEGFP-N1 представлена на рисунку 2.

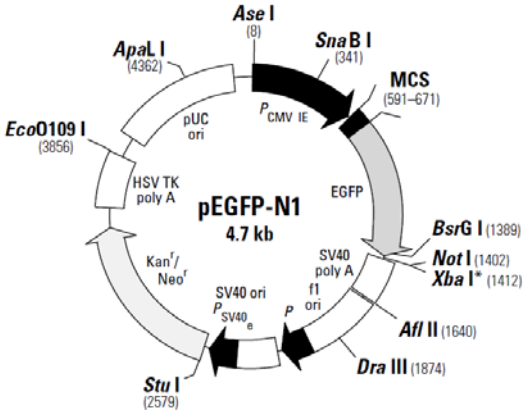

Рис. 2. Карта генно-інженерної конструкції pEGFP-N1.

Ця конструкція кодує маркерний зелений флуоресцентний білок – EGFP (англ. Enhanced green fluorescent protein).

Підготовка генно-інженерної конструкції pEGFP-N1 для трансформації сперматозоїдів. Для трансформації сперматозоїдів перепела ми використовували лінійну частину генно-інженерної конструкції pEGFP-N1 (GenBank#U55762), яку ампліфікували у полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) із використанням пари олігонуклеотидних праймерів TG-F/TG-R.

Склад реакційної суміші для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) містив 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3, 0,25 мМ кожного дНТФ, 2,5 мМ MgCl2, по 10 пМ кожного з праймерів (TG-F, TG-R) та 0,5 одиниці Pfu-ДНК полімерази («Fermentas/Thermo Sciantific», США).

Після ампліфікації продукт ПЛР, розміром 2420 bp, розділяли електрофорезом в 1,0%-вому агарозному гелі, фотографували у променях ультрафіолетового (УФ) світла та вирізали із гелю за допомогою стерильного скальпелю. Лінійну генно-інженерну конструкцію виділяли з фрагменту агарозного гелю із використанням набору GeneJET PCR Purification kit («Fermentas/Thermo Sciantific», США). Вимірювали концентрацію на скануючому спектрофотометрі BioSpec-Nano («Shimadzu», Японія) та використовували у різних реакційних сумішах для трансформації сперматозоїдів перепелів.

Виділення геномної ДНК із сперматозоїдів перепелів та контроль інтродукції гену GFP у геном сперматозоїдів. Залишок відмитих сперматозоїдів, після трансформації лінійною генно-інженерною конструкцією та штучного запліднення самок перепелів, обробляли протеїназою К у концентрації 1 мг/мл при 55 ^{o}C протягом 1 години. Геномну ДНК виділяли за допомогою Genomic DNA Purification kit («Fermentas/Thermo Sciantific», США). Розділяли електрофорезом в 1,0%-вому агарозному гелі 1 годину при електричній напрузі 15 В/см. Геномну ДНК вирізали із гелю за допомогою стерильного скальпелю у променях УФ світла та повторно виділяли з фрагменту агарозного гелю із використанням набору Genomic DNA Purification kit («Fermentas/Thermo Sciantific», США). Контроль інтродукції гену GFP проводили у ПЛР із використанням пари праймерів GFP-F/GFP-R (табл. 1). Склад реакційної суміші для ПЛР містив 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3), 0,25 мМ кожного дНТФ, 2,5 мМ $MgCl_2$, по 10 пМ кожного з

праймерів (GFP-F, GFP-R) та 0,5 одиниці Taq-ДНК полімерази («Fermentas/Thermo Sciantific», США).

Після ампліфікації продукт ПЛР, розміром 609 bp, розділяли електрофорезом в 1,0%-вому агарозному гелі, фотографували в УФ променях.

Внесення модифікацій в геном за допомогою системи CRISPR/Cas9.

В процесі наших досліджень робота здійснювалась із сайтом інсерції одиночної направляючої РНК (sgRNA) - OVA (ovalbumin). Одним з початкових етапів був процес перевірки sgРНК на деструкцію сайту OVA (цільовий сайт/мішень). Для цього гену-мішені були вибрані чотири цільові ділянки (Tg): OVATg1-4 в екзоні 2 OVA, sgРНКзи були розроблені для кожної послідовності-мішені (рис. 3). Специфічні sgРНКзи (pX330-Neo-OVATg1-4) були сформовані та перевірені на їх здатність чинити деструктивний вплив на цільовий ген (аналіз на одноланцюговий відпал (SSA)). Репортерна плазміда pCAG-EGxxFP-OVA, яка містила цільову ділянку для OVA, була спільно трансфікована з плазмідою pX330 в клітинах HEK293T («Invitrogen», США). Через два дні після трансфекції, клітини досліджували на ефект репарації ДНК генів-мішеней з використанням у якості маркера флуоресценції EGFP. За результатами оцінки інтенсивності флуоресценції, найбільш ефективною виявилась OVATg3-версія, яка і використовувалась у подальшому.

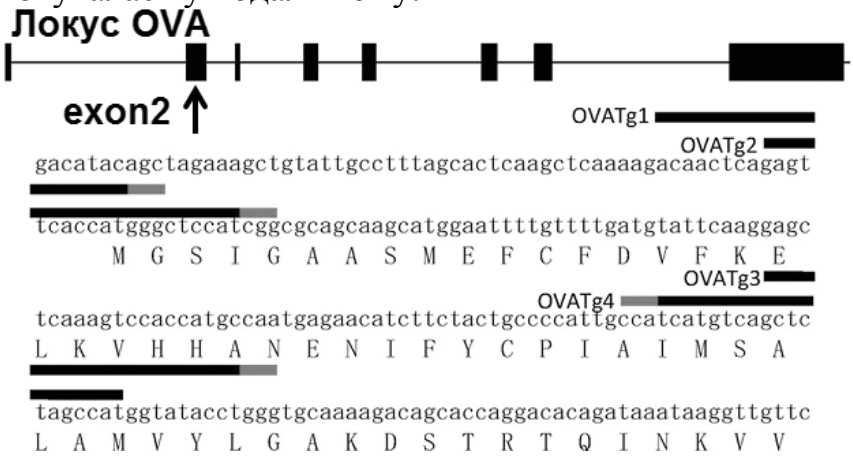

Рис. 3. Схематичне зображення sgРНКз, що орієнтовані на сайт OVA.

Інтрацитоплазматична ін'єкція сперматозоїда (ICSI). Аспірацію незапліднення ооциту здійснювали з передньої частини ділянки магнуму (білкового відділу яйцеводу) протягом 1 години після попадання ооцита через воронку в яйцевод, в цій ділянці яйцеклітини покриті тонким шаром білка, без шкаралупи. Кожній яйцеклітині нами здійснювалась мікроін'єкція одного сперматозоїда разом із супровідними реагентами. Екстракт сперми (ЕС) вводили в кількості 2нг. Загальний об’єм введеної суміші складав 1 нл. Всі процедури, які використовуються для ICSI були виконані, як описано Hrabia A. і співавт. (2003) та Mizushima S. (2008). Яйцеклітину поміщали в середовище DMEM, а потім здійснювали мікроін'єкцію в центральну частину зародкового диска ооциту на глибину 30–50 мкм, за використання мікроманіпуляторів та стереомікроскопу SZ11 («Olympus», Японія). Швидкість введення (впорскування) складала 6 нл/хв. Так як зародковий диск перепелиних яєць є непрозорим, завершення ін'єкції підтверджувалось візуально шляхом

спостереження набряку в місці ін'єкції під стереомікроскопом. Після цього проводили культивування ооцитів.

Виділення і культивування ембріональних клітин перепелів. Первинні зародкові клітини виділяли з гонад шестиденних ембріонів перепелів. Для цього ізольовані ембріони поміщали під бінокуляр і в фосфатно-сольовому розчині (PBS) за допомогою скальпеля і препарувальної голки з ембріона спочатку виділяли мезонефроз, на поверхні якого розташовуються гонади, а потім від мезонефрозу відокремлювали і самі гонади. Ізольовані гонади поміщали в 0,25%-вий розчин трипсину з 0,53 мМ ЕДТА на солях Хенкса без Ca 2+ і Mg 2+, інкубували 10 хвилин при 37 °С, потім гонади промивали в розчині PBS декілька разів і розсуспендовували в культуральному середовищі.

З неінкубованих запліднених яєць перепелів виділяли бластодермальні клітини. Бластодиск поміщали в розчин PBS і під бінокуляром відокремлювали від жовтка. Диски переносили в пробірку з культуральним середовищем і розсуспендовували.

Наукові дослідження за темою дисертаційної роботи виконано із застосуванням новітніх методик і розробок та опрацьовано статистично із використанням пакетів програмного забезпечення MS Excel 2010, PowerStats v. 12 (Promega), Cervus v. 3.0.3, GENALEX 6.5.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Оптимізація методів отримання трансфікованих ембріональних клітин. Нами досліджувались методи трансфекції ембріональних клітин (ЕК) на прикладі первинних зародкових клітин (ПЗК) та бластодермальних клітин (БК). Здійснювалося вивчення методів введення генно-інженерних конструкцій шляхом ін'єкції трансфікованих ПЗК та БК в ембріони перепелів.

Трансфекція ПЗК. Було досліджено вплив ліпосом (на прикладі ліпофектаміну («Invitrogen», США)) та різних концентрацій DMSO («Sigma», США) на ефективність трансфікування ПЗК японського перепела за використання генно-інженерної конструкції pEGFP-N1 (табл. 1).

Таблиця 1

Ефективність трансфекції ПЗК перепелів за допомогою генно-інженерної конструкції pEGFP-N1 в поєднанні з ліпофектаміном та різними концентраціями DMSO

Вид препарату	Загальна кількість ПЗК	Відсоток трансфікованих ПЗК, (%)
Контроль	2301	0,0
ПЗК+ pEGFP-N1	2257	3,8
ПЗК+ pEGFP-N1+DMSO (0,3%)	2198	15,3
ПЗК+ pEGFP-N1+DMSO (3,0%)	2324	34,6
ПЗК+ pEGFP-N1+DMSO (20,0%)	2308	39,3
ПЗК+ pEGFP-N1+ ліпофектамін	2218	41,8

Трансфекція БК. Було охарактеризовано вплив ліпофектаміну («Invitrogen», США) та різних концентрацій DMSO («Sigma», США) на

ефективність трансфікування БК японського перепела за використання генно-інженерної конструкції pEGFP-N1 (табл. 2).

Розробка методів отримання довгострокових культур ембріональних клітин перепелів. Зміна середовища і згортання фідерного моношару стромальних клітин є лімітуючими факторами, що впливає на процес проліферації ЕК при культивуванні in vitro. Використання фідерного моношару лінії STO дало можливість підтримувати довгострокову культуру ЕК. Додавання в середовище культивування перепелиної сироватки крові в 2–3 рази збільшувало вихід ЕК. Присутність в культуральному середовищі ембріонального екстракту сприяла підвищенню ефективності культивування ЕК.

Таблиця 2

Ефективність трансфекції БК перепелів за допомогою генно-інженерної конструкції pEGFP-N1 в поєднанні з ліпофектаміном та різними концентраціями DMSO

Вид препарату	Загальна кількість БК	Відсоток трансфікованих БК, (%)
Контроль	2021	0,0
БК+ pEGFP-N1	2205	4,1
БК+ pEGFP-N1+DMSO (0,3%)	2135	16,6
БК+ pEGFP-N1+DMSO (3,0%)	2068	35,4
БК+ pEGFP-N1+DMSO (20,0%)	2187	40,6
БК+ pEGFP-N1+ ліпофектамін	2211	42,7

Використання стабільних ліній ЕК дозволяє істотно підвищити ймовірність отримання генетичної трансформації в досліджуваному об’єкті, з огляду на те, що в процесі культивування з наступною трансфекцією можна отримати культуру клітин із стійкою інтеграцією чужорідної ДНК.

Характеристика нативного еякуляту самців японського перепела.

Для оцінки якості сперми використовували такі основні параметри як: концентрація сперми ($n\times10^6$ мл$^{-1}$), об’єм еякуляту (мл), живі та морфологічно нормальні сперматозоїди (%).

Середня порція об’єму еякуляту самця японського перепела складала близько 10-30 мкл. Середня концентрація сперматозоїдів перед розведенням становила 678,0±196,08 х 10^6 мл$^{-1}$ (табл. 3).

Таблиця 3

Характеристика нативного еякуляту самців японського перепела, зібраного після стимуляції з використанням самки

Показники	Концентрація сперми [х10^6 мл$^{-1}$]	Об’єм еякуляту [мл]	Класи сперматозоїдів [%]					
			Кількість живих сперматозоїдів	Морфологічно нормальні	Патологія голови	Патологія шийки	Незначні відхилення	Інші деформації
Середні значення	678,0±196,08	0,026 ± 0,011	92,1± 3,86	82,2 ± 5,63	3,1 ± 1,90	1,9 ± 0,97	1,2 ± 0,64	5,0 ± 2,76

Істотних відмінностей між досліджуваними особинами відносно здатності до запліднення виявлено не було. Відсоток запліднених яєць склав від 35,0 до 41,0 %. При заплідненні перепелів змішаною спермою спостерігалася тенденція до збільшення відсотка запліднених яєць до 62% (P<0,01). Тому в подальших експериментах використовувалася змішана сперма від трьох продуцентів.

Отримання трансфікованих сперматозоїдів японського перепела за допомогою генно-інженерної конструкції у складі плазміди pEGFP-N1. Встановлено, що сперматозоїди можуть бути використані в якості природного вектора, що транспортує ДНК в генеративні клітини. Очевидною перевагою є легкодоступність матеріалу, відсутність необхідності застосування високовартісного устаткування та порівняно невеликий період часу для проведення експерименту. Нами запропоновано використання лінійної генно-інженерної конструкції у складі плазміди pEGFP-N1 (рис. 4).

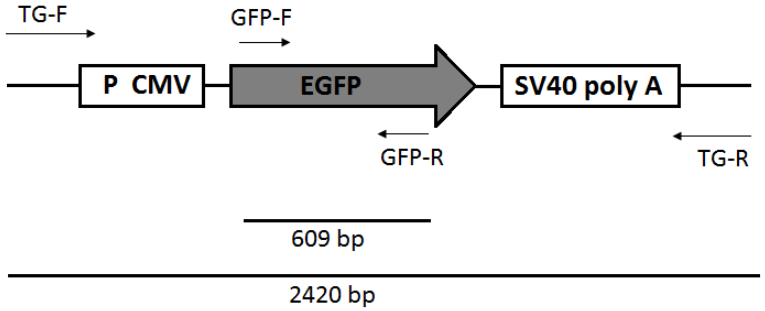

Рис. 4 Схема лінійної генно-інженерної конструкції у складі плазміди pEGFP-N1.

За допомогою пари праймерів TG-F/TG-R ми ампліфікували лінійну генно-інженерну конструкцію на матриці ДНК плазміди pEGFP-N1 (див.рис.2). При цьому отримали лінійний фрагмент ДНК, розміром 2420 bp, який кодує мутантний (підсилений) ген зеленого флуоресціюючого протеїну EGFP, розроблений для максимальної флуоресценції в клітинах вищих еукаріотів (рис. 5).

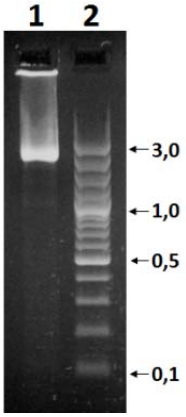

Рис. 5. Електрофореграма лінійної генно-інженерної конструкції після ампліфікації на матриці ДНК плазміди pEGFP-N1, розділеної електрофорезом у 1,0%-вому агарозному гелі після забарвлення гелю інтеркалюючим барвником етидієм броміду: 1 – продукт ампліфікації; 2 – маркер довжини фрагментів ДНК GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder («Fermentas/Thermo Sciantific», США).

Ген EGFP знаходиться під контролем двох регуляторів транскрипції: раннього промотору цитомегаловірусу (P CMV IE) та термінатору вірусу SV-40 (SV-40 poly A).

Після очищення лінійної генно-інженерної конструкції з агарозного гелю ми отримали препарат для трансформації сперматозоїдів із концентрацією 3,1 мг/мл, та співвідношенням OD260/280 – 2, що вказує на високу чистоту препарату ДНК для трансформації. Спектр кількісного визначення концентрації ДНК лінійної конструкції для трансформації, представлений на рисунку 6.

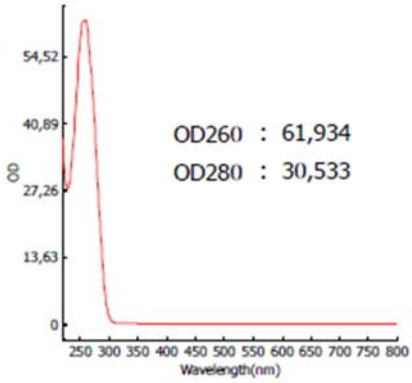

Рис. 6. Спектрофотометрична характеристика препарату ДНК для трансформації сперматозоїдів перепелів.

Ми виділили геномну ДНК із трансформованих лінійною генно-інженерною конструкцією сперматозоїдів перепелів, та розділили електрофорезом в 1,0%-вому агарозному гелі низькомолекулярну ДНК від високомолекулярної – геномної. З метою підтвердження явища інтродукції лінійної генно-інженерної конструкції, що містить GFP, в гаплоїдний геном сперматозоїдів, нами була розроблена власна методика. Сутність методики полягає у розділенні електрофорезом фрагментів геномної ДНК, виділених із трансформованих сперматозоїдів від фрагментів ДНК (розміром близько 2420 bp), що являють собою лінійну генно-інженерну конструкцію. Наступна ампліфікація гена GFP, розміром 609 bp у ПЛР із використанням внутрішньої пари праймерів GFP-F/GFP-R на фрагменті очищеної високомолекулярної геномної ДНК дає нам підстави стверджувати, що саме генно-інженерна лінійна конструкція була інтродукована в геном сперматозоїдів перепелів (рис. 7).

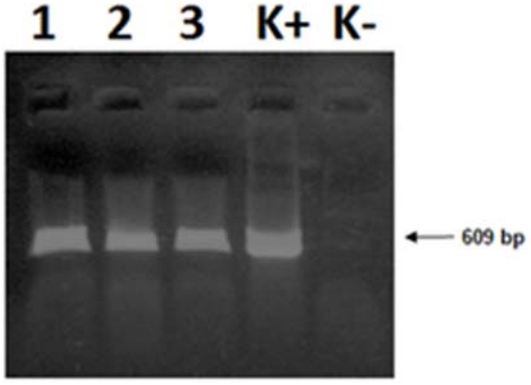

Рис. 7. Електрофореграма продуктів ПЛР гену GFP, інтегрованого у геном сперматозоїдів перепелів. Продукти ПЛР розділені електрофорезом у

1,0%-вому агарозному гелі, після забарвлення гелю інтеркалюючим барвником етидієм броміду. 1 – зразок 2; 2 – зразок 6; 3 – зразок 8; К+ – pEGFP-N1; К – (H_2O).

Отримання трансфікованих сперматозоїдів за допомогою генно-інженерної конструкції у складі плазміди pEGFP-N1 в комплексі з ліпосомами (рис. 8). Наступним етапом нашої роботи було дослідження впливу ліпосомальних препаратів, на прикладі ліпофектаміну («Invitrogen», США), на ефективність трансфікування сперматозоїдів японського перепела (табл. 4).

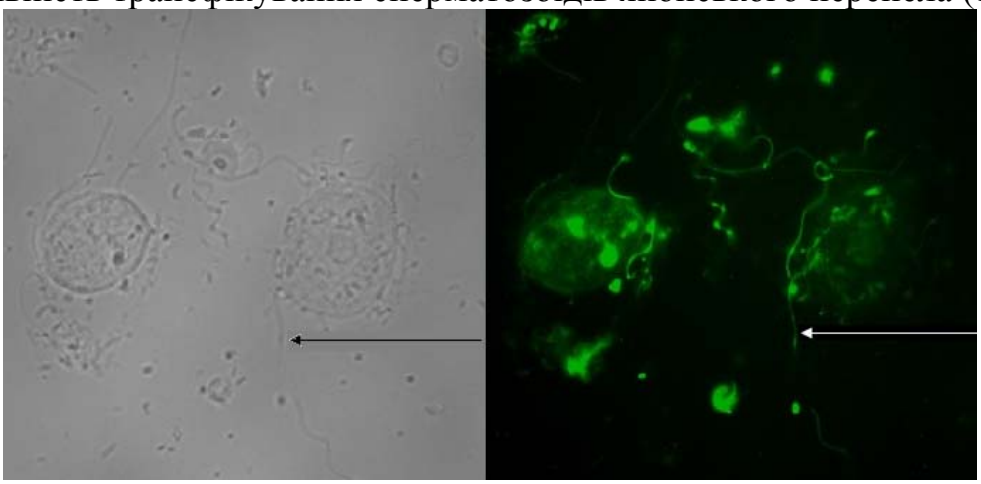

Рис. 8. Трансфіковані сперматозоїди за допомогою генно-інженерної конструкції у складі плазміди pEGFP-N1 в комплексі з ліпосомами (збільшення в 400 разів).

Таблиця 4

Ефективність трансфекції сперматозоїдів японського перепела за допомогою генно-інженерної конструкції pEGFP-N1 та ліпофектаміну

Вид препарату	Загальна кількість Sp	Відсоток трансфікованих Sp, (%)
Контроль	12112	0,0
Sp+ pEGFP-N1	12008	3,1
Sp+ pEGFP-N1+ліпофектамін	12236	41,4

Примітка. Тут та далі Sp – сперматозоїди.

З метою отримання ембріонів та потомства для тестування їх на присутність чужорідного гена нами було проведено осіменіння перепілок спермою трансфікованою GFP-плазмідою із застосуванням ліпофектаміну. З 28 зібраних яєць отримано 21 ембріон, 15 з яких виявилися генетично трансформованими. Ефективність трансгенезу за використання даного препарату складала 71,4 %.

Отримання трансфікованих сперматозоїдів за допомогою генно-інженерної конструкції у складі плазміди pEGFP-N1 в комплексі з DMSO (рис. 9). Було вивчено вплив DMSO («Sigma», США) на ефективність трансфікування сперматозоїдів японського перепела (табл. 5).

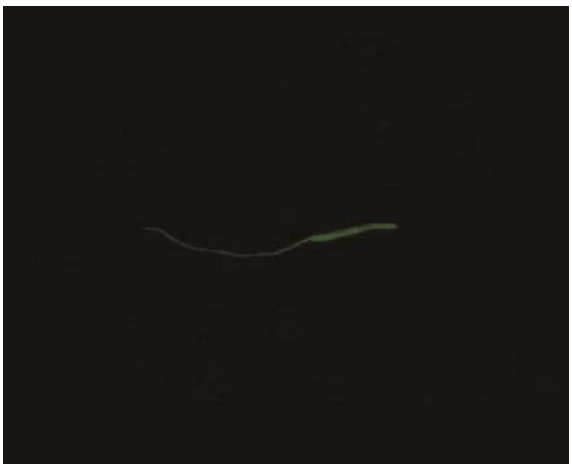

Рис. 9. Трансфікований сперматозоїд за допомогою генно-інженерної конструкції у складі плазміди pEGFP-N1 в комплексі з DMSO (20,0%) (збільшення в 1000 разів).

Таблиця 5

Ефективність трансфекції сперматозоїдів японського перепела за допомогою генно-інженерної конструкції pEGFP-N1 та різних концентрацій DMSO

Вид препарату	Загальна кількість Sp	Відсоток трансфікованих Sp, (%)
Контроль	12215	0,0
Sp+ pEGFP-N1	11967	3,4
Sp+ pEGFP-N1+DMSO (0,3%)	12327	14,4
Sp+ pEGFP-N1+DMSO (3,0%)	12261	33,2
Sp+ pEGFP-N1+DMSO (20,0%)	12319	38,1

В наступних експериментах досліджено вплив 20%-вого розчину DMSO на ефективність процесу трансфекції. Проведено осіменіння перепілок спермою трансфікованою GFP-плазмідою із застосуванням 20%-вого розчину DMSO («Invitrogen», США) з метою отримання ембріонів та потомства для тестування їх щодо присутності чужорідного гена. З цією метою ми зібрали 39 яєць, отримали 23 ембріони, 15 з яких виявилися генетично трансформованими. Ефективність трансгенезу з використанням даного препарату складала 65,2 %.

Отримання трансфікованих сперматозоїдів японського перепела за допомогою генно-інженерної конструкції CRISPR/CAS-GFP в комплексі з Triton X-100, та подальше їх використання для інтрацитоплазматичної ін'єкції в ооцит. З метою впровадження нових методичних підходів у трансгенезі перепелів шляхом використання інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда нами оцінювалася здатність до запліднення і трансфекції перепелиних ооцитів за допомогою мікроін'єкції сперматозоїдів трансфікованих за допомогою Triton X-100 (TX-100) та CRISPR/Cas-GFP вектору (рис. 10). Під час проведення ICSI використовувався екстракт сперми. Перевагою цього методу є його відносно висока ефективність для мікроін’єкції дуже великих фрагментів ДНК в геном реципієнта. В наших дослідженнях

застосування ЕС під час мікроін'єкції за використання сперматозоїда, сприяло підвищенню рівня активації ооцитів.

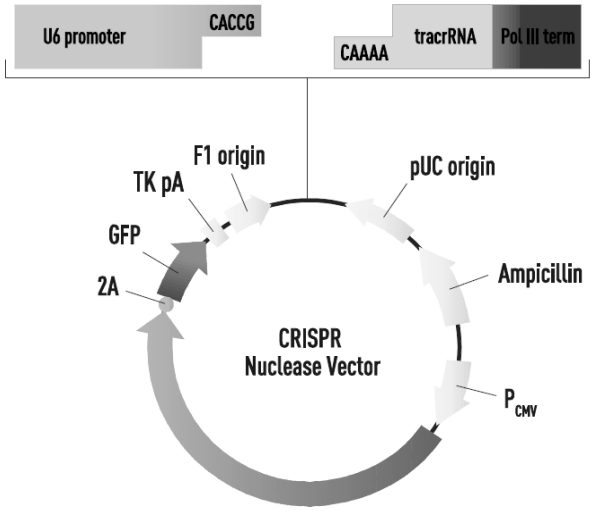

Рис. 10. Карта генно-інженерної конструкції CRISPR/Cas-GFP.

Було вивчено вплив Triton X-100 («Sigma», США) та ліпофектаміну («Invitrogen», США) на ефективність трансфікування сперматозоїдів японського перепела із використанням генно-інженерної конструкції CRISPR/Cas-GFP (табл. 6).

Таблиця 6

Ефективність трансфекції сперматозоїдів японського перепела за допомогою генно-інженерної конструкції CRISPR/Cas-GFP в поєднанні з Triton X-100 та ліпофектаміном

Вид препарату	Загальна кількість Sp	Відсоток трансфікованих Sp, (%)
Контроль	12071	0,0
Sp+ CRISPR/Cas-GFP	12114	6,2
Sp+ CRISPR/Cas-GFP+ Triton X-100 (0,5%)	12352	42,9
Sp+ CRISPR/Cas-GFP+ ліпофектамін	12288	44,8

Використання Triton X-100 індукувало пошкодження мембран сперматозоїдів, що зменшувало запліднюючий потенціал сперми, проте, у поєднанні з методом ICSI значно підвищувало ефективність переносу генетичної інформації. Для збільшення кількості запліднених ооцитів під час інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїдів ми використовували ЕС. Ооцити, які запліднювали сперматозоїдами з ЕС методом ICSI продемонстрували ефективність запліднення – 73,4 %. Під час інтрацитоплазматичної ін'єкції лише сперматозоїдів (без використання ЕС) кількість запліднених яйцеклітин становила 17,8 %.

Після використання інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїдів трансфікованих за допомогою Triton X-100 (ТХ-100) та CRISPR/Cas-GFP вектору (рис. 11) в комплексі із ЕС, розвиток бластодерми спостерігався у

42,2 % запліднених яйцеклітин; у 82,3 % ембріонів спостерігалось зелене флуоресцентне випромінювання, з них в 47,8 % – було виявлено експресію GFP в бластодермі (табл. 7).

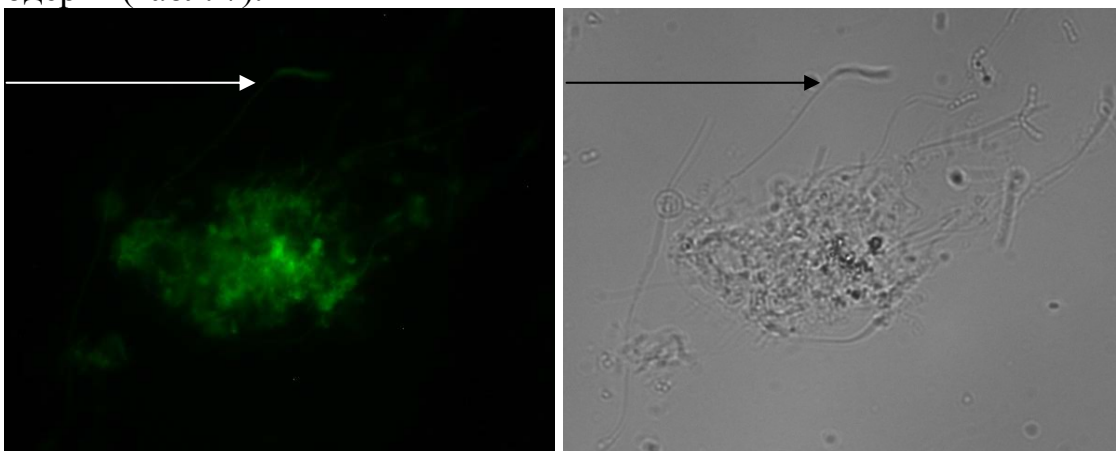

Рис. 11. Трансфіковані сперматозоїди за допомогою генно-інженерної конструкції CRISPR/Cas-GFP в комплексі з Triton X-100 (0,5%) (збільшення в 400 разів).

Таблиця 7

Розвиток бластодерми протягом 24 годин після інтрацитоплазматичної ін'єкції в ооцити перепела сперматозоїдів трансфікованих за допомогою ТХ-100 та CRISPR/Cas-GFP вектору в комплексі із ЕС

Зразки сперми	Кількість ін’єктованих ооцитів	Кількість ооцитів, які дали розвиток бластодерми після ICSI (%)	Кількість ембріонів із зеленим флуоресцентним випромінюванням (%)	Кількість ембріонів із експресією зеленого флуоресцентного білка GFP (%)
Контроль (без ТХ-100)	54	21 (38,9)	0 (0)	0 (0)
В комплексі з ТХ-100	71	28 (42,2)	23 (82,3)	11 (47,8)

Ці результати вказують на те, що інтрацитоплазматична ін'єкція сперматозоїдів трансфікованих за допомогою ТХ-100 та CRISPR/Cas-GFP вектору в комплексі із ЕС відкривають широкі перспективи для ефективного здійснення переносу генетичної інформації у перепелів.

ВИСНОВКИ

1. Науково обґрунтовано, удосконалено основні параметри та проведена трансфекція сперматозоїдів та ембріональних клітин японського перепела (Coturnix japonica).

2. Розроблено методику інтродукції гена GFP у геном сперматозоїдів японського перепела (Coturnix japonica). Наглядно продемонстровано, що саме

генно-інженерна конструкція була інтродукована в геном досліджуваних нами генеративних клітин перепелів.

3. Здійснено оптимізацію методів трансфекції GFP-геном сперматозоїдів та ембріональних клітин японського перепела (Coturnix japonica) шляхом застосування різних комбінацій з диметилсульфоксидом (DMSO), ліпосомами та Triton X-100.

4. Застосування фідерного моношару лінії STO (мишачих ембріональних фібробластів) дало змогу підтримувати довгострокову культуру ЕК. Через 3–6 діб число ЕК, які культивувалися на STO моношарі, збільшувалося у 3–5 разів. Додавання в середовище культивування перепелиної сироватки крові у 2–3 рази збільшувало вихід ЕК.

5. У результаті застосування генно-інженерної конструкції pEGFP-N1 в комплексі із DMSO було отримано генетично трансформовані БК у наступному відсотковому співвідношенні: а) 0,3%-овий розчин DMSO – 16,6 %; б) 3,0%-овий розчин DMSO – 35,4 %; в) 20,0%-овий розчин DMSO – 40,6 %. Під час використання pEGFP-N1 в поєднанні з ліпосомами було отримано 42,7 % трансфікованих БК.

6. При використанні генно-інженерної конструкції pEGFP-N1 у поєднанні із DMSO було отримано генетично трансформовані ПЗК у наступному відсотковому співвідношенні: а) 0,3%-овий розчин DMSO – 15,3 %; б) 3,0%-овий розчин DMSO – 34,6 %; в) 20,0%-овий розчин DMSO – 39,3 %. Під час застосування pEGFP-N1 в комплексі з ліпосомами було отримано 41,8 % трансфікованих ПЗК.

7. У процесі підбору ефективних методик забору сперми встановлено, що стимуляція самців з використанням самок є більш ефективним методом для забору еякуляту в порівнянні з дорзоабдомінальним масажем. Метод стимуляції самців сприяв швидкій еякуляції і давав можливість отримувати еякулят з максимально якісними показниками: великим об’ємом сперми (0,026 мл), високою концентрацією (678 млн/мл) та великою кількістю живих (92,1%), морфологічно нормальних та активних сперматозоїдів.

8. Шляхом застосування методу внутрішньоматкової інсемінації нами підвищено рівень ефективності штучного осіменіння (відсоток запліднених яєць знаходився в діапазоні від 35 до 41%, та зростав до 62% при застосуванні техніки зі змішаною спермою).

9. Використання інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїдів у комплексі з CRISPR/Cas-GFP, ТХ-100 та ЕС давало розвиток бластодерми в 42,2% запліднених яйцеклітин, у 82,3% ембріонів спостерігалось зелене флуоресцентне випромінювання, з них в 47,8% було виявлено експресію GFP в бластодермі.

10. У результаті застосування генно-інженерної конструкції pEGFP-N1 в поєднанні із DMSO було отримано генетично трансформовані сперматозоїди у наступному відсотковому співвідношенні: а) 0,3%-овий розчин DMSO – 14,4%; б) 3,0%-овий розчин DMSO – 33,2%; в) 20,0%-овий розчин DMSO – 38,1%. Під час використання pEGFP-N1 в комплексі з ліпосомами отримано 41,4% трансфікованих сперматозоїдів.

РЕКОМЕНДАЦІЇ

Рекомендовано використовувати розроблені методи для отримання генетично трансформованих ембріонів птиці шляхом введення чужорідного гена за участю сперматозоїдів та за допомогою трансплантації трансфікованих ембріональних клітин в зародковий диск реципієнта, використовуючи фідерний моношар лінії STO для підтримування довгострокової культури ембріональних клітин (ЕК), з проведенням обробки УФ ембріонів-реципієнтів та використанням системи CRISPR для максимально ефективного здійснення трансфекції ЕК та генеративних клітин. Дані підходи можуть бути використані при розробці технології виробництва рекомбінантних білків.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. **Лесняк Ю. І.**, Калакайло Л. І., Спиридонов В. Г., Мельничук М. Д. Удосконалення способів забору сперми та основні характеристики еякуляту японського перепела (Coturnix Japonica). Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2014. Вип. 45. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nd_2014_3_6.
(Здобувач брав участь у відборі дослідного матеріалу, обробці первинних даних та інтерпретації отриманих результатів).

2. **Лесняк Ю. І.**, Калакайло Л. І., Спиридонов В. Г., Мельничук М. Д. Особливості впливу піни клоакальної залози на рухливість сперматозоїдів у японських перепелів. Біоресурси і природокористування. 2014. Т. 6. № 3–4. С. 23–26. *(Здобувачем отримано експериментальні дані та підготовлено матеріали до друку).*

3. **Lesniak Y. I.**, Kalakaylo L. I., Spiridonov V. G., Melnichuk M. D. General characteristics of ejaculate and effective ways collection of sperm japanese quail (Coturnix Japonica). Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва. 2013. Вип. 202. С. 282–286. *(Здобувачем отримано експериментальні дані, виконано статистичну обробку даних та підготовлено матеріали до друку).*

4. **Лесняк Ю. І.**, Калакайло Л. І., Спиридонов В. Г. Ефективність штучного осіменіння японських перепелів (Coturnix japonica). Біоресурси і природокористування. 2014. Т. 6. № 1–2. С. 184–187. *(Здобувачем отримано експериментальні дані та підготовлено матеріали до друку).*

5. **Лесняк Ю. І.**, Калакайло Л. І., Спиридонов В.Г., Мідик С. В. Ефективність застосування інтрацитоплазматичної ін’єкції сперматозоїда для переносу генетичної інформації в японського перепела (Coturnix japonica). Біоресурси і природокористування. 2017. Т. 9. № 1–2. С. 83–87. *(Здобувачем отримано експериментальні дані та підготовлено матеріали до друку).*

6. **Лесняк Ю. І.**, Калакайло Л. І., Спиридонов В. Г., Мельничук М. Д. Основні аспекти переносу чужорідних генів в геном сперматозоїдів японських перепелів (Coturnix japonica). Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Біологія, біотехнологія,

екологія. 2013. Вип. 193. С. 131–136. *(Здобувачем отримано експериментальні дані та підготовлено матеріали до друку).*

Тези наукових доповідей:

7. Калакайло Л. І., **Лесняк Ю. І.**, Спиридонов В. Г. Вплив різних речовин на ефективність перенесення чужорідних генів в геном сперматозоїдів японських перепелів (Coturnix japonica). Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини: XV Всеукраїнська науково-практична конференція, м. Львів, 8–9 грудня 2016 року: тези доповіді. Львів, 2016. Т. 18. № 4. С. 147. *(Здобувачем отримано експериментальні дані, виконано статистичну обробку даних та підготовлено матеріали до друку).*

8. **Лесняк Ю. І.** Нові підходи переносу гена у птахів із використанням інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда на прикладі японського перепела (Coturnix Japonika). Селекційні, генетичні та біотехнологічні методи збереження, поліпшення і використання генофонду тварин: XV Всеукраїнська наукова конференція молодих учених і аспірантів Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН, с. Чубинське Бориспільського району Київської області, 19 травня 2017 року: тези доповіді. Чубинське, 2017. С. 20. *(Здобувачем отримано експериментальні дані та підготовлено матеріали до друку).*

9. **Лесняк Ю. І.**, Калакайло Л. І., Спиридонов В. Г. Особливості підготовки сперми для штучного осіменіння японського перепела (Coturnix japonica). Сучасний стан і перспективи розвитку аграрного сектору України: Всеукраїнська науково-практична інтернет-конференція молодих вчених, м. Дніпро, 19–20 жовтня 2016 року: тези доповіді. Дніпро, 2016. С. 191–193. *(Здобувачем отримано експериментальні дані, виконано математичну обробку, інтерпретовано результати, підготовлено матеріали до друку)*.

10. **Лесняк Ю. І**., Калакайло Л. І., Спиридонов В. Г. Перспективи застосування інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда для запліднення ооцитів японського перепела (Coturnix japonica). Біологія рослин та біотехнологія: третя конференція молодих вчених, м. Київ, 16–18 травня 2017 року: тези доповіді. К., 2017. С. 15. *(Здобувачем отримано експериментальні дані та підготовлено матеріали до друку).*

11. **Lesniak Y. I.**, Chaplia O. V., Botsiura G. I., Melnyk N. V. Blastocyst collapsing and subsequent dissection of ¼ of zona pellucida before the embryotransfer significantly increase pregnancy rate in fresh cycles. Fertility and Sterility: Magazine. Birmingham, 21 October 2014. P. 276. *(Здобувачем отримано експериментальні дані, виконано статистичну обробку даних та підготовлено матеріали до друку).*

Патенти:

12. **Лесняк Ю. І.**, Давид Л. В. Патент на винахід Україна № 99240 Спосіб запліднення *in vitro*; заявлено 02.11.2011; опубліковано 25.07.2012. Бюл. № 14. *(Здобувачем проведено дослідження та оформлено патент).*

13. **Лесняк Ю. І.**, Давид Л. В. Патент на винахід Україна № 101744 Спосіб запліднення *in vitro*; заявлено 02.11.2011; опубліковано 25.04.2013. Бюл. № 8. *(Здобувачем проведено дослідження та оформлено патент).*

14. **Лесняк Ю. І.**, Давид Л. В. Патент на корисну модель України № 65889 Спосіб запліднення *in vitro*; заявлено 02.11.2011; опубліковано 12.12.2011. Бюл. № 23. *(Здобувачем проведено дослідження та оформлено патент).*

15. **Лесняк Ю. І.**, Давид Л. В. Патент на корисну модель України № 65890 Спосіб запліднення *in vitro*; заявлено 02.11.2011; опубліковано 12.12.2011. Бюл. № 23. *(Здобувачем проведено дослідження та оформлено патент).*

АНОТАЦІЯ

Лесняк Ю. І. Трансфекція сперматозоїдів та ембріональних клітин японського перепела (Coturnix japonica). – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика. – Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН, с. Чубинське, Київської обл., 2017.

У дисертації представлено результати досліджень з трансфекції сперматозоїдів та ембріональних клітин японського перепела (Coturnix japonica).

Охарактеризовано процес введення в клітини організму генів, які викликають у них синтез нових білків, як правило, фармакологічного або технологічного напрямків.

Розглянуто способи доставки генно-інженерних конструкцій в геном досліджуваних тварин.

Відпрацьовано методи генетичної трансформації генеративних, бластодермальних та первинних зародкових клітин перепелів.

Запропоновано найбільш ефективні методи трансфекції геном GFP генеративних та ембріональних клітин перепела за використання генно-інженерних конструкцій CRISPR/Cas-GFP та pEGFP-N1 в комплексі із ліпосомами, диметилсульфоксидом (DMSO) і Triton X-100 (TX-100).

Охарактеризовано методи отримання генетично трансформованих ембріональних химер за допомогою трансфікованих ембріональних клітин (ЕК).

Застосовано фідерний моношар лінії STO (мишачі ембріональні фібробласти), що дало змогу підтримувати довгострокову культуру ЕК. Через 3–6 діб число ЕК, які культивувалися на STO моношарі, збільшувалося у 3–5 разів. Додавання в середовище культивування перепелиної сироватки крові сприяло збільшенню виходу ЕК у 2–3 рази. Використання стабільних ліній ЕК дозволяло істотно підвищувати ймовірність отримання генетичної трансформації в досліджуваному об’єкті, з огляду на те, що в процесі культивування з наступною трансфекцією була можливість отримувати культуру клітин із стійкою інтеграцією чужорідної ДНК.

У результаті застосування генно-інженерної конструкції pEGFP-N1 в комплексі із DMSO було отримано генетично трансформовані бластодермальні клітини (БК) у наступному відсотковому співвідношенні: а) 0,3%-вий розчин DMSO – 16,6%; б) 3,0%-вий розчин DMSO – 35,4 %; в) 20,0%-вий розчин DMSO – 40,6 %. Під час використання pEGFP-N1 в поєднанні з ліпосомами було отримано 42,7% трансфікованих БК.

Використання генно-інженерної конструкції pEGFP-N1 у поєднанні із DMSO дало змогу отримати генетично трансформовані первинні зародкові клітини (ПЗК) у наступному відсотковому співвідношенні: а) 0,3%-вий розчин DMSO – 15,3 %; б) 3,0%-вий розчин DMSO – 34,6 %; в) 20,0%-вий розчин DMSO – 39,3 %. Під час застосування pEGFP-N1 в комплексі з ліпосомами було отримано 41,8% трансфікованих ПЗК.

У процесі підбору ефективних методик забору сперми встановлено, що стимуляція самців з використанням самок є більш ефективним методом для забору еякуляту в порівнянні з дорзоабдомінальним масажем. Метод стимуляції самців сприяв швидкій еякуляції і давав можливість отримувати еякулят з максимально якісними показниками: великим об’ємом сперми (0,026 мл), високою концентрацією (678 млн. / мл), та великою кількістю живих (92,1 %), морфологічно нормальних та активних сперматозоїдів.

Використання інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїдів у комплексі з CRISPR/Cas-GFP, TX-100 та екстрактом сперми (ЕС) давало розвиток бластодерми в 42,2% запліднених яйцеклітин, у 82,3% ембріонів спостерігалось зелене флуоресцентне випромінювання, з них в 47,8% було виявлено експресію GFP в бластодермі.

Застосування методу ICSI забезпечило високу ефективність переносу великих фрагментів ДНК в геном господаря.

У результаті застосування генно-інженерної конструкції pEGFP-N1 в поєднанні із DMSO було отримано генетично трансформовані сперматозоїди у наступному відсотковому співвідношенні: а) 0,3%-вий розчин DMSO – 14,4%; б) 3,0%-вий розчин DMSO – 33,2%; в) 20,0%-вий розчин DMSO – 38,1%. Під час використання pEGFP-N1 в комплексі з ліпосомами отримано 41,4 % трансфікованих сперматозоїдів.

Наші результати показали, що починаючи з третього промивання вплив ДНКаз суттєво знижувався, а після шести відмивань рівень трансфекції сперматозоїдів перепелів суттєво підвищувався. Таким чином, з кожним наступним промиванням ДНКазна активність суттєво зменшувалась, що значно спрощувало процес трансфекції.

Здійснено інтродукцію гена GFP у геном сперматозоїдів і наглядно продемонстровано, що саме генно-інженерна лінійна конструкція була інтродукована в геном сперматозоїдів перепелів.

Представлені основні аспекти технології введення чужорідного гена за допомогою сперматозоїдів японського перепела (Coturnix japonica). Встановлено, що сперматозоїди можуть бути використані в якості природного вектора, що транспортує ДНК в генеративні клітини.

Досліджено характер експресії цільового гена.

Ключові слова: перепел японський (Coturnix japonica), генеративні клітини, трансфекція, геном, генно-інженерна конструкція, ембріональні клітини.

АННОТАЦИЯ

Лесняк Ю. И. Трансфекция сперматозоидов и эмбриональных клеток японского перепела (Coturnix japonica). - На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 03.00.15– генетика. - Институт разведения и генетики животных имени М.В. Зубца НААН, с. Чубинское, Киевская обл., 2017.

В диссертации представлены результаты исследований по трансфекции сперматозоидов и эмбриональных клеток японского перепела (Coturnix japonica).

Охарактеризован процесс введения в клетки организма генов, которые вызывают у них синтез новых белков, как правило, фармакологического или технологического направлений.

Рассмотрены способы доставки генно-инженерных конструкций в геном исследуемых животных.

Отработаны методы генетической трансформации генеративных, бластодермальных и первичных зародышевых клеток перепелов.

Предложено наиболее эффективные методы трансфекции геном GFP генеративных и эмбриональных клеток перепела с использованием генно-инженерных конструкций CRISPR / Cas-GFP и pEGFP-N1 в комплексе с липосомами, диметилсульфоксидом (DMSO) и Triton X-100 (TX-100).

Охарактеризованы методы получения генетически трансформированных эмбриональных химер с помощью трансфицированных эмбриональных клеток (ЭК).

Применен фидерный монослой линии STO (мышиные эмбриональные фибробласты), что позволило поддерживать долгосрочную культуру ЭК. Через 3-6 суток число ЭК, которые культивировались на STO монослое, увеличивалось в 3-5 раз. Добавление в среду культивирования перепелиной сыворотки крови способствовало увеличению выхода ЭК в 2-3 раза. Использование стабильных линий ЭК позволяло существенно повышать вероятность получения генетической трансформации в исследуемом объекте, учитывая то, что в процессе культивирования с последующей трансфекцией была возможность получать культуру клеток с устойчивой интеграцией чужеродной ДНК.

В результате применения генно-инженерной конструкции pEGFP-N1 в комплексе с DMSO получены генетически трансформированные бластодермальные клетки (БК) в следующем процентном соотношении: а) 0,3%-ный раствор DMSO - 16,6 %; б) 3,0%-ный раствор DMSO - 35,4 %; в) 20,0%-ный раствор DMSO - 40,6 %. При использовании pEGFP-N1 в сочетании с липосомами было получено 42,7% трансфицированных БК.

Использование генно-инженерной конструкции pEGFP-N1 в сочетании с DMSO позволило получить генетически трансформированные первичные зародышевые клетки (ПЗК) в следующем процентном соотношении: а) 0,3%-ный раствор DMSO - 15,3%; б) 3,0%-ный раствор DMSO - 34,6%; в) 20,0%-ный раствор DMSO - 39,3%. При применении pEGFP-N1 в комплексе с липосомами было получено 41,8% трансфицированных ПЗК.

В процессе подбора эффективных методик забора спермы установлено, что стимуляция самцов с использованием самок является более эффективным методом для забора эякулята по сравнению с дорзоабдоминальным массажем. Метод стимуляции самцов способствовал быстрой эякуляции и позволял получать эякулят с максимально качественными показателями: большим объемом спермы (0,026 мл), высокой концентрацией (678 млн / мл), и большим количеством (92,1%), живых морфологически нормальных и активных сперматозоидов.

Использование интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов в комплексе с CRISPR / Cas-GFP, TX-100 и экстрактом спермы (ЭС) давало развитие бластодермы в 42,2% оплодотворенных яйцеклеток, в 82,3% эмбрионов наблюдалось зеленый флуоресцентное излучение, из них в 47,8 % было обнаружено экспрессию GFP в бластодерме.

Применение метода ICSI обеспечило высокую эффективность переноса больших фрагментов ДНК в геном хозяина.

В результате применения генно-инженерной конструкции pEGFP-N1 в сочетании с DMSO были получены генетически трансформированные сперматозоиды в следующем процентном соотношении: а) 0,3%-ный раствор DMSO - 14,4%; б) 3,0%-ный раствор DMSO - 33,2%; в) 20,0%-ный раствор DMSO - 38,1%. При использовании pEGFP-N1 в комплексе с липосомами получено 41,4% трансфицированных сперматозоидов.

Наши результаты показали, что, начиная с третьего промывания, влияние ДНКаз существенно снижалось, а после шести отмываний уровень трансфекции сперматозоидов перепелов существенно повышался. Таким образом, с каждым последующим промыванием ДНКазная активность существенно уменьшалась, что значительно упрощало процесс трансфекции.

Осуществлена интродукция гена GFP в геном сперматозоидов и наглядно продемонстрировано, что именно генно-инженерная линейная конструкция была интродуцирована в геном сперматозоидов перепелов.

Представлены основные аспекты технологии введение чужеродного гена с помощью сперматозоидов японского перепела (Coturnix japonica). Установлено, что сперматозоиды могут быть использованы в качестве природных векторов, транспортирующих ДНК в генеративные клетки.

Исследован характер экспрессии целевого гена.

Ключевые слова: перепел японский (Coturnix japonica), генеративные клетки, трансфекция, геном, генно-инженерная конструкция, эмбриональные клетки.

ANNOTATION

Lesnjak Y. I. Transfection of spermatozoa and embryonic cells of the Japanese quail (Coturnix japonica). - Manuscript.

Thesis for the degree of the candidate of agricultural science on specialty 03.00.15 – genetics. – Institute of Animal Breeding and Genetics of name of M.V. Zubtca of NAAS, v. Chubinske, Kyiv region, 2017.

The dissertation presents the results of research on the transfection of spermatozoa and embryonic cells of the Japanese quail (Coturnix japonica).

The process of introducing into the cells of the organism of genes, which causes them to synthesize new proteins, as a rule, pharmacological or technological directions, was described.

Methods of delivery of genetic engineering constructions to the genome of investigated animals were considered.

Methods of genetic transformation of generative, blastodermal and primary germ cells of quail were worked out.

The most effective methods for transfection by GFP-gene of generative and embryonic quail cells with using genetically engineered structures CRISPR/Cas-GFP and pEGFP-N1 in combination with liposomes, dimethylsulfoxide (DMSO) and Triton X-100 (TX-100) were proposed.

Methods of obtaining genetically transformed embryonic chimeras with using transfected embryonic cells (EC) were described.

The STO monolayer (mouse embryonic fibroblasts) has been used to support the long-term EC culture. After 3-6 days, the number of EC cultivated on the STO monolayer increased by 3-5 times. Adding to the culture medium of quail blood serum contributed to an increase in EC release 2-3 times. The use of stable EC lines allowed to significantly increase the probability of obtaining genetic transformation in the investigated object, given that in the process of cultivation with subsequent transfection, it was possible to obtain a culture of cells with the stable integration of foreign DNA.

As a result of use of genetic construction pEGFP-N1 in combination with DMSO were obtained genetically transformed blastoderm cells (BCs) in the following percentages: a) 0.3 % DMSO solution - 16.6 %; b) 3.0 % solution of DMSO - 35,4 %; c) 20.0 % solution of DMSO - 40.6 %. During the use of pEGFP-N1 in combination with liposomes, 42.7 % of transfected BCs were obtained.

The use of genetic construction of pEGFP-N1 in conjunction with DMSO enabled to receive the transfected primary germ cells (PGCs) in the following percentages: a) 0.3 % DMSO solution - 15.3 %; b) 3,0 % solution of DMSO - 34,6 %; c) 20.0 % solution of DMSO - 39.3 %. During the use of pEGFP-N1 in combination with liposomes, 41.8 % of transfected PGCs were obtained.

In the process of selection of effective methods for the collection of semen, it has been found that stimulation of males using females is a more effective method for ejaculate collection compared with dorsal-abdominal massage. The method of male stimulation contributed to rapid ejaculation and gave the opportunity to receive ejaculate with the highest quality indicators: a large volume of sperm (0,026 ml), a

high concentration (678 ml / ml), and a large number of live (92,1 %), morphologically normal and active sperm.

The use of intracytoplasmic sperm injection in combination with CRISPR/Cas-GFP, TX-100 and sperm extract (SE) gave develop of blastoderm in 42.2 % of fertilized eggs, 82.3 % of embryos showed green fluorescence, of which into 47,8 % GFP expression in the blastoderm was found.

The use of the ICSI method has ensured the high efficiency of the transfer of large fragments of DNA to the host genome.

As a result of use of genetic construction pEGFP-N1 in combination with DMSO were obtained genetically transformed spermatozoa in the following percentages: a) 0.3 % DMSO solution - 14.4 %; b) 3.0 % DMSO solution - 33.2 %; c) 20.0 % DMSO solution - 38.1 %. During the use of pEGFP-N1 in combination with liposomes, 41.4 % of transfected sperms were obtained.

Our results showed that, since the third rinse, the effect of DNase was significantly reduced, and after six washings, the level of transfection of quail spermatozoa was significantly increased. Thus, with each subsequent wash, DNase activity significantly decreased, which greatly simplified the transfection process.

The introduction of the GFP gene into the sperm genome has been made and it is clearly demonstrated that the transgenic linear construction was introduced into the genome of the sperm quails.

The technology of introducing an alien gene with the help of spermatozoa of the Japanese quail (Coturnix japonica) was considered. It has been found that sperm can be used as a natural vector that transports DNA into generative cells.

The character of expression of the target gene is investigated.

Key words: Japanese Quail (Coturnix japonica), generative cells, transfection, genome, genetic construction, embryonic cells.