

Transgeniczne zwierzęta hodowlane — efektywność transgenezy przy zastosowaniu techniki mikroiniekcji

Jacek Jura

Instytut Zootechniki
Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt
Balice k. Krakowa

Początek lat osiemdziesiątych był przełomowy w dziedzinie prac związanych ze świadomym przenoszeniem informacji genetycznej pomiędzy różnymi organizmami. W tym czasie opracowano szereg złożonych metod doświadczalnych, które okazały się szczególnie przydatne w przypadku pożądanej zmiany cech zwierząt na poziomie materiału genetycznego. W pionierskich badaniach z zakresu transgenezy wykorzystywano głównie geny hormonu wzrostu. Po raz pierwszy ekspresję szczurzego genu hormonu wzrostu u transgenicznych myszy uzyskał w 1982 r. zespół Palmitera (1). Transgeniczne myszy były dwukrotnie większe i cięższe od osobników kontrolnych. Zastosowana w eksperymencie Palmitera, a wcześniej w pracach Gordona technika mikroiniekcji DNA do przedjądrza zygoty, należy obecnie do podstawowych metod przy otrzymywaniu transgenicznych ssaków (1). W dotychczasowych doświadczeniach z zakresu transgenezy u ssaków wykazano, że najlepsze rezultaty otrzymuje się właśnie na drodze mikroiniekcji egzogenego DNA do przedjądrza zapłodnionej komórki jajowej (2,3,4). Posługując się techniką mikroiniekcji uzyskano transgeniczne króliki, świnię, owcę, kozy i bydło, u których stwierdzono ekspresję różnych egzogenych genów (5,6,7,8,9,10). Kierunek badań, w którym wykorzystywane są geny hormonu wzrostu cieszy się nadal sporym zainteresowaniem badaczy. Stwierdzono, że hormon wzrostu u ssaków odpowiada za procesy związane ze sterowaniem rozwoju, jak również związane z metabolizmem tłuszczów, soli mineralnych, azotu i węglowodanów. Prawdopodobnie, hormon wzrostu posiada zdolność łączenia się z wieloma receptorami w organizmie, ponieważ posiada szereg znaczących sekwencji aminokwasów odpowiedzialnych za sterowanie ważnymi procesami biologicznymi (11). Mechanizm oddziaływania hormonu wzrostu na zwielokrotnienie istotnych procesów biologicznych organizmu, jak dotąd, nie jest dokładnie poznany (11). Wiedza na temat funkcji hormonu wzrostu w organizmie została w ostatnich latach znacznie poszerzona między innymi dzięki badaniom z

zakresu transgenezy. Pełne poznanie jego roli pozwoli na rozwiązanie szeregu problemów, które występują, np. w medycynie ludzkiej (karłowatość dzieci czy cukrzyca), jak również umożliwi opracowanie właściwej strategii dotyczącej podniesienia produktywności zwierząt hodowlanych.

Efektywność uzyskiwania zwierząt transgenicznych na drodze mikroiniekcji egzogenego DNA jest nadal niska. Wiąże się z dużą pracochłonnością i wysokimi nakładami finansowymi. Sprawia to, że wysiłek badawczy wielu zespołów zajmujących się transgenezą ukierunkowany jest na podniesienie efektywności techniki wprowadzania egzogenego materiału genetycznego. Potrzeby związane z aplikacją osiągnięć inżynierii genetycznej są wyzwaniem dla embriologii eksperymentalnej, w której proponuje się zastosowanie szeregu metod mających za zadanie podniesienie efektywności transgenezy. Jednak w głównej mierze od postępu w konstruowaniu wektorów genetycznych zależeć będzie efektywność integracji i ekspresji. W literaturze dotyczącej prac prowadzonych na myszach, uznanych za modelowe dla innych gatunków, stwierdzono, że aby otrzymać jednego transgenicznego osobnika, należy poddać mikroiniekcji 100 zygot. Wynika to z uzyskiwanej efektywności integracji, która wynosi 5-10% w stosunku do transplątowanych zygot lub 20-40% w stosunku do uzyskanego potomstwa (12,13). W przeprowadzonych do tej pory doświadczeniach nad uzyskiwaniem transgenicznych zwierząt hodowlanych jednoznacznie wykazano, że poziom integracji nowo wprowadzonej informacji genetycznej jest dużo niższy. Waha się on w zależności od gatunku od 4% (królik) do poniżej 1% (bydło) w odniesieniu do liczby uzyskanych osobników. Natomiast w odniesieniu do liczby przenoszonych zarodków jest on 10-1000 razy niższy w porównaniu z ekspresją uzyskiwaną u myszy (7,13).

W prowadzonych przez nas od kilku lat doświadczeniach nad transgenezą zwierząt gospodarskich wykorzystano dwie konstrukcje genetyczne bydłęcego genu hormonu wzrostu, wyprodukowane w Edison Animal Biotechnology Institute, Ohio University, USA. Bydłęcy hormon wzrostu (bGH — *bovine Growth Hormone*) jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym zbudowanym z 191 aminokwasów, o masie cząsteczkowej ok. 22 000 daltonów. Jest on wydzielany przez zewnętrzne komórki przysadki mózgowej. Gen kodujący hormon wzrostu zbudowany jest z pięciu egzonów i czterech intronów (11). Pierwsza z użytych przez nas konstrukcji genetycznych to wektor bGH-10Δ6. W swojej strukturze zawiera on nie zmodyfikowany laboratoryjnie gen hormonu wzrostu bydła (gen „dziki”) oraz intron A. Połączony jest on z transkrypcyjną sekwencją regulatorową mysiej metalotioneiny (promotor Mt). Konstrukcja genetyczna bGH-10Δ6 spowodowała, zgodnie z oczekiwaniem, zwiększenie masy ciała transgenicznych myszy. Drugą konstrukcją genetyczną, nazwaną bGH10Δ6-M8, zaprojektowano tak, aby układ kodonów w procesie translacji powodował zamianę trzech aminokwasów w łańcuchu białkowym hormonu (11). Wprowadzone zmiany w strukturze genu spowodowały zamianę glutaminy-117 na leucynę, glicyny-119 na argininę, oraz alaniny-122 na asparaginę w łańcuchu białka hormonu wzrostu. Autorzy wektora, wprowadzając opisane zmiany, mieli na celu zbadanie funkcji, jaką pełni III α -helisa

hormonu wzrostu w procesie biologicznego uaktywniania hormonu. Okazało się, że wprowadzone modyfikacje nie zmieniają zdolności zmodyfikowanego hormonu do włączania się w sterowane przez niego funkcje. Zdolność ta była identyczna do tej jaką uzyskali w przypadku ekspresji nie zmodyfikowanego genu (bGH-10Δ6). Okazało się jednak, że transgeniczne myszy, wyposażone w zmodyfikowany gen, uzewnętrziły znaczne zmiany fenotypowe, przejawiające się wyraźnym zmniejszeniem wymiarów i masy ciała. Wprowadzone w sekwencji genu bGH-M8 zmiany spowodowały antagonistyczne działanie powstałego na jego bazie hormonu wzrostu. Stopień karłowatości był skorelowany z poziomem zmodyfikowanego hormonu wzrostu w surowicy krwi (11).

Opisane konstrukcje genetyczne wykorzystaliśmy w doświadczeniach przeprowadzonych na królikach, świnia i bydło.

1. Królik

Egzogenny DNA w postaci wektora Mt-bGH-10Δ6 wprowadzono na drodze mikroiniekcji do męskiego przedjadrza 210 zygot uzyskanych w wyniku superowulacji po 18 godzinach od podania HCG i krycia. Mikroiniekcję wektora Mt-bGH-M8 przeprowadzono do przedjadrzy 501 zygot. Zastosowany system stymulacji hormonalnej dawczyń (100 j.m PMSG/szt) oraz sposób uzyskiwania zygot okazał się efektywny. Odsetek uszkodzonych w wyniku mikroiniekcji zygot w obydwu doświadczeniach był identyczny i wyniósł 10%. Do jajowodów zsynchronizowanych biorczyń przeniesiono 201 nie uszkodzonych zygot podanych iniekcji wektorem Mt- bGH-10Δ6 i 447 zygot, którym do męskiego przedjadrza wprowadzono wektor Mt-bGH-M8 (tab. 1). Wyizolowany z tkanek urodzonych 64 potencjalnie transgenicznych osobników DNA poddano reakcji PCR stosując specyficzne dla danej konstrukcji genetycznej primery. Obecność

TABELA 1
EFEKTYWNOŚĆ MIKROINIEKCJI DNA

Gatunek	Gen	Liczba mikroiniekcji	Liczba osobników PCR+/Southern+	TG/Efektywność %
królik	Mt-bGH-10Δ6	210	2/0	0/-
	Mt-bGH-M8	501	4/2	2/0,4
świnia	Mt-bGH-10Δ6	427	7 ^a /1	1/0,2
	Mt-bGH-M8	335	2/2	2/0,6
bydło	Mt-bGH-10Δ6	212*/65**	2/0	#
	Mt-bGH-M8	208*/58**	2/0	#

TG — osobniki transgeniczne; * — zygoty; ** — zarodki 2-komórkowe; # — osobniki mrozowalnego; a — 6 osobników martwo urodzonych na DNA których nie przeprowadzono analizy Southern. Efektywność liczona w stosunku do zygot poddanych mikroiniekcji.

powielonego fragmentu wektora Mt-bGH-10Δ6 o długości 487 pz stwierdzono w DNA dwóch królików. W rozkładzie elektroforetycznym próbek uzyskanych po reakcji PCR przeprowadzonej na DNA, uzyskanym od królików urodzonych z zygot, którym wprowadzono wektor Mt-bGH-M8, wykazano obecność powielanego fragmentu genu u czterech osobników. W przeprowadzonej za pomocą metody *Southern blot* hybrydyzacji potwierdzono obecność genu bGH-M8 w genomie dwóch z czterech królików ocenionych pozytywnie z zastosowaniem metody PCR.

Oprócz wykonanych analiz za pomocą metod PCR i *Southern blot* na surowicy krwi wszystkich uzyskanych osobników przeprowadzono badania mające wykazać ewentualne różnice w poziomie IGF-1 (*Insulinelike Growth Factor - 1*) (14). Poziom IGF-1 w surowicy nietransgenicznych osobników kształtował się pomiędzy wartościami 0,82-1,52ng/ml. Opierając się na uzyskanych wynikach za wyznacznik obniżonego poziomu IGF-1 przyjęto wartość mniejszą od 0,7ng/ml. Za podwyższoną uznano wartość większą od 1,52ng/ml.

Analiza surowicy krwi dwóch królików, u których stwierdzono wbudowany w genom gen bGH-106 nie przekroczył wartości 1,52ng/ml. Natomiast poziom badanego faktora IGF-1 w surowicy czterech królików, u których stwierdzono w DNA obecność genu bGH-M8 był nieznacznie niższy od przyjętej przez nas dolnej wartości i wyniósł 0,6ng/ml.

W przeprowadzonym doświadczeniu królikom transgenicznym nie podawaliśmy w wodzie do picia jonów cynku ($ZnSO_4$ - 20 mmola), ponieważ chcieliśmy sprawdzić czy wystąpią wyraźne różnice fenotypowe bez egzogennej stymulacji promotora genu. Okazało się, że króliki wzbogacone o nową informację w postaci konstrukcji genetycznej Mt-bGH-M8 nie różniły się fenotypowo od osobników kontrolnych, tzn. nie zaobserwowaliśmy znaczących różnic w rozmiarach jak i w masie ciała. Osobniki, u których stwierdzono integrację genu bGH-10Δ6 również nie wykazały znaczących różnic fenotypowych w porównaniu z osobnikami grupy kontrolnej.

W rezultacie przeprowadzonych prac uzyskaliśmy integrację na poziomie 0,5% porównując liczbę uzyskanych osobników (w wyniku zastosowania metod PCR i *Southern blot*) pozytywnych do liczby poddanych iniekcji zygot. Efektywność integracji w stosunku do uzyskanych potencjalnie transgenicznych osobników wyniosła 2,5%. Obie wartości są porównywalne z otrzymanymi przez innych autorów (13).

2. Świnia

Badania nad transgenezą z zastosowaniem omówionych konstrukcji genetycznych przeprowadzono na zygotach i zarodkach 2-komórkowych świni. Czas uzyskiwania zygot świńskich określono na 48-52 godziny od podania HCG. Tylko niewielki odsetek uzyskanego materiału stanowiły zarodki 2-blastomerowe. Liczba 14 komórek jajowych, średnio uzyskanych od jednej superowulowanej dawczyni, pozwoliła na wyselekcjonowanie wystarczającej li-

czyby przydatnych do mikromanipulacji zygot. Zygoty świni, w porównaniu do zygot królika, charakteryzują się ciemną, nieprzezroczystą cytoplazmą. Przyczyną tego są znajdujące się w cytoplazmie ciemne komórki pigmentowe. Wprowadzenie egzogennej informacji genetycznej bez zastosowania zabiegów, które uwidaczniają przedjądrza jest niemożliwe. Skuteczną metodą uwidaczniania przedjądrzy jest wirowanie zygot przez 5 minut przy 15 000xg. Wirowanie powoduje, że warstwa komórek pigmentowych zostaje przesunięta na jeden z biegunów komórki jajowej. Druga połowa komórki jajowej pozostaje przezroczysta, w której to uwidoczniają się przedjądrza. W odróżnieniu od przedjądrzy królika, gdzie przedjądrze męskie jest znacznie większe od żeńskiego, przedjądrza zygoty świni nie różnią się wielkością, a otaczająca je błona cytoplazmatyczna jest słabo widoczna. Lokalizację przedjądrzy świni ułatwiają jąderka, które są duże, występują pojedynczo i mają dyskoidalny kształt. Objętość roztworu DNA, jaką wprowadza się do przedjądrza zygoty świni, jest identyczna z tą, jaką wstrzykuje się do przedjądrza królika i wynosi ok. 2-5pl. Odsetek zygot, które ulegają uszkodzeniu w wyniku mikroiniekcji nie przekracza 10% komórek jajowych poddanych zabiegowi. Dodatkowym czynnikiem, który nieznacznie wpływa na zmniejszenie liczby przydatnych do przeniesienia zygot świni jest ich wirowanie. Redukuje ono o dalsze 5% liczbę jaj. Mikroiniekcję konstrukcji genetycznej Mt-bGH-10Δ6 przeprowadzono na 427 zygotach. Wektor Mt-bGH-M8 wprowadzono do jednego z przedjądrzy 335 zygot. W rezultacie chirurgicznego przeniesienia zygot uzyskano 27,5% odsetek prośnych loch. Amplifikację specyficznych fragmentów nowo wprowadzonych informacji genetycznych stwierdzono u dziewięciu z trzydziestu ośmiu urodzonych prosiąt. W przeprowadzonej hybrydyzacji za pomocą metody *Southern blot* potwierdzono integrację genu bGH-10Δ6 u jednego osobnika. Obecność genu bGH-M8 stwierdzono przeprowadzając amplifikację i hybrydyzację w genomie dwóch innych prosiąt. Efektywności integracji wprowadzonych genów uzyskano na poziomie 0,4%, obliczonej w stosunku do zygot poddanych iniekcji (tab. 1). Wynik ten jest porównywalny z danymi uzyskiwanymi przez innych autorów (13,15,16,17). Dwie serie doświadczeń przeprowadzono wprowadzając do zygot wektory o podwyższonym do 4ng/μl stężeniu (ok. 1000-1500 kopii wektora/mikroiniekcję). Podniesienie stężenia wprowadzanego roztworu DNA nie spowodowało znaczącego podniesienia efektywności integracji.

3. Bydło

Omówione rezultaty dotyczyły dwóch gatunków zwierząt hodowlanych, u których efektywność transgenezy jest znacznie wyższa niż gatunku o największym znaczeniu gospodarczym, tj. u bydła. Liczba publikacji dotyczących prac nad transgenezą u tego gatunku jest niewielka (18). Wiąże się to z szeregiem specyficznie odmiennych zagadnień, na jakie napotyka się w pracy na zygotach i zarodkach bydłecych. Uzyskanie transgenicznej krowy z trans-

formowanego oocyty bądź zygoty wymaga doprowadzenia ich do stadium rozwojowego, w którym zostanie on przeszczepiony biorcej. Obecny stan wiedzy z zakresu hodowli *in vitro* umożliwia długotrwałą hodowlę pozaustrojową (19,20). Wcześniej stosowana inkubacja w jajowodach biorcej pośrednich dawała niezadowalające rezultaty (21). Problemy spowodowane były głównie stratami w odzysku wprowadzonego materiału. Okazało się również, że długotrwała inkubacja w jajowodach królika czy owcy nie zabezpiecza w pełni warunków koniecznych dla rozwoju zygot do stadium moruli/blastocysty (21,22,23). Uniemożliwia ponadto kontrolę tempa rozwoju zarodków. Wszystkie wspomniane niedogodności udało się rozwiązać przez zastosowanie hodowli *in vitro*. W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień na temat zastosowania hodowli wspomagających lub tzw. kondycjonowanych pożywek do długotrwałej hodowli *in vitro* zarodków zwierząt gospodarskich, a zwłaszcza bydła (24,25,26,27,28,29). Problemy związane z długotrwałą hodowlą *in vitro* zygot tego gatunku poddanych zabiegowi mikroiniekcji DNA mają szczególne znaczenie. Rutynowo stosowana technika niechirurgicznego przenoszenia zarodków u bydła wymaga doprowadzenia ich do stadium moruli/blastocysty, tj. do 6-7 dnia rozwoju. W hodowli *in vitro*, z współhodowlą z bydlęcym nabłonkiem jajowodowym, można uzyskać średnio 32% blastocyst z zygot uzyskanych *in vivo*, poddanych mikroiniekcji (30). Podobnie przedstawia się odsetek blastocyst uzyskiwanych z zygot wyprodukowanych *in vitro*, poddanych następnie mikroiniekcji (31). Innym specyficznym problemem w odniesieniu do bydła, które znacząco wpływa na efektywność metody, jest liczba przydatnych do mikroiniekcji zygot, jakie można uzyskać od jednej superowulowanej dawczyni oraz niski stopień uzyskiwanej integracji. Kwestię tę próbuje się pokonać w różny sposób. Coraz powszechniej stosowana jest technika produkcji zygot *in vitro*. Z zapłodnionych *in vitro* oocytów uzyskuje się jednorodny materiał w postaci zygot. Są one jednak znacznie „słabsze”, od zygot uzyskiwanych *in vivo*. W związku z tym, większy odsetek zygot ulega uszkodzeniu w trakcie przeprowadzania mikroiniekcji. Słabsze są również ich zdolności rozwojowe. Wyrównanie strat, jakie powstają w trakcie manipulacji eksperymentalnych i hodowli, można stosunkowo łatwo osiągnąć w wyniku odpowiedniego zwiększenia liczby produkowanych zygot.

W związku z występującymi ograniczeniami w opisanych metodach proponowaliśmy alternatywną technologię. Polega ona na wykorzystywaniu do zabiegu mikroiniekcji DNA niedojrzałych oocytów bydlęcych. W proponowanej metodzie egzogeny DNA wprowadza się na drodze mikroiniekcji do pęcherzyka zarodkowego niedojrzałych oocytów bydlęcych, które poddaje się procesom dojrzewania i zapłodnienia *in vitro*. Z przeprowadzonych prac nad zapłodnieniem *in vitro* u bydła wynika, że niedojrzałe oocyty bydlęce wykazują większą odporność na manipulacje eksperymentalne niż produkowane *in vitro* zygoty (32,33,34). Okazało się również, że stosunkowo łatwo, bez stosowania procedury wizualizacji, można przeprowadzić zabieg mikroiniekcji do pęcherzyka zarodkowego niedojrzałych oocytów bydlęcych (30). Jest on stosunkowo dobrze widoczny pod mikroskopem wyposażonym w system Nomarskiego

(DIC), a ponadto jest większy o około 1/4 od przedjądrza. Poddane mikroiniekcji niedojrzałe oocyty bydłce można następnie poddać procesom dojrzewania oraz zapłodnienia *in vitro* i hodować do stadium moruli/blastocysty. W zaproponowanym systemie można monitorować rozwój transformowanego materiału.

3.1. Mikroiniekcja DNA do zygot i zarodków 2-komórkowych

Metoda uzyskiwania *in vivo* zapłodnionych komórek jajowych u bydła jest najczęściej stosowanym rozwiązaniem. Pozwala ono dzięki synchronizacji i superowulacji na stosunkowo efektywną produkcję zygot. Uzyskanie w doświadczeniach średnio 6 zygot od jednej superowulowanej dawczyni jest wynikiem zadowalającym. Czas uzyskiwania zygot określono na 40-44 godziny od podania HCG. Przy zastosowaniu tej metody sporą część materiału stanowiły jednak zarodki 2-komórkowe.

Do jednego z przedjądrzy zygoty lub do obydwu jąder komórkowych zarodka 2-komórkowego, które uprzednio poddano wirowaniu w celu uwidocznienia przedjądrzy lub jąder komórkowych, wprowadzano konstrukcje genetyczne Mt-bGH-10Δ6 i Mt-bGH-M8. Wirowanie przed mikroiniekcją oraz sam zabieg mikroiniekcji spowodowały podobny jak w przypadku zygot królika czy świni procent uszkodzonych zygot, tj. 10%.

183 zygoty i 38 zarodków 2-komórkowych poddano mikroiniekcji genem bGH-M8 i inkubowano przez 6 dni w podwiązanych jajowodach królika lub owcy. W porównaniu z danymi dotyczącymi inkubacji nie manipulowanych zarodków, okazała się ona nieefektywna. Liczba odzyskanych zarodków oraz odsetek zarodków w stadium moruli/blastocysty był znacznie niższy od prezentowanych w literaturze (21). Po sześciu dniach inkubacji w podwiązanych jajowodach królika z 53 zygot po mikroiniekcji stadium blastocysty osiągnął jeden zarodek (1,9%). Odsetek blastocyst, jaki uzyskaliśmy po inkubacji 130 zygot i 38 zarodków 2-komórkowych, nie przekroczył 10%. Podobny odsetek zarodków w stadium blastocysty uzyskaliśmy inkubując 83 zygoty i 19 zarodków 2-komórkowych w nie podwiązanych jajowodach owcy (6,0% dla zygot i 5,2% dla zarodków 2-komórkowych po mikroiniekcji). Za powód strat w odzysku przydatnych do przenoszenia zarodków można przyjąć zarówno zabieg przeprowadzonej mikroiniekcji, jak i czas trwania inkubacji. Dlatego też w dalszym etapie doświadczenia do hodowli zygot i zarodków 2-komórkowych po iniekcji zastosowaliśmy hodowlę *in vitro*. System hodowli *in vitro* we współhodowli z komórkami nabłonka jajowodowego bydła spowodował kilkudziesięcioprocentowy wzrost liczby zarodków, które osiągnęły stadium moruli/blastocysty. W rezultacie hodowli *in vitro* 208 zygot uzyskano 32% zarodków w stadium moruli/blastocysty. Szczególnie widoczna poprawa nastąpiła w przypadku hodowli zarodków 2-komórkowych, gdzie z 58 hodowanych zarodków do blastocysty rozwinęło się 43,4%. Zastosowanie współhodowli umożliwiło obserwację tempa rozwoju zarodków w trakcie hodowli.

Poprawa efektywności hodowli, jaką odnotowano stosując system współhodowli *in vitro* spowodowała, że w doświadczeniu z genem bGH-10Δ6 zastosowano tylko ten wariant hodowli. Konstrukcję genetyczną bGH-10Δ6 wprowadzono do jednego z przedjądrzy 212 zygot i jąder komórkowych 65 zarodków 2-komórkowych. Po sześciu dniach hodowli do stadium blastocysty rozwinęło się 33,5% zygot i 67,0% zarodków 2-komórkowych. Uzyskany w hodowli kontrolnej procent zarodków w stadium moruli/blastocysty był wyższy w porównaniu z grupą eksperymentalną tylko o 4%. Tempo rozwoju zarodków hodowanych po mikroiniekcji bGH-M8 i bGH-10Δ6 było porównywalne. Odsetek zarodków, które osiągnęły stadium moruli/blastocysty, był wyższy dla zarodków 2-blastomerowych. Związane jest to z tym, że część zygot hodowanych *in vitro* nie kontynuuje rozwoju, a spowodowane jest to blokiem rozwojowym, występującym podczas pierwszego podziału komórki jajowej (19,20,35,36,37). Stwierdziliśmy również, że iniekcja DNA, o koncentracji 2ng/μl, nie powoduje degeneracji zygot i zarodków 2-komórkowych bydła.

W rezultacie przeprowadzonych doświadczeń uzyskano 17 cieląt. W reakcji PCR przeprowadzonej na DNA wyizolowanym z tkanek uzyskanych cieląt wykazano obecność genu bGH-10Δ6 w genomie dwóch buhajków. DNA dwóch buhajków, które uzyskano w wyniku doświadczenia przeprowadzonego z konstrukcją genetyczną bGH-M8 zawierało ten gen. Hybrydyzacja produktów amplifikacji DNA czterech wymienionych osobników przeprowadzona za pomocą metody *Southern blot* dała wynik ujemny. Jedną z przyczyn braku hybrydyzacji można upatrywać w tym, że trzy z wymienionych osobników urodziły się po przeniesieniu blastocyst wyhodowanych z zarodków 2-blastomerowych poddanych mikroiniekcji i hodowanych *in vitro*. Prawdopodobieństwo uzyskania osobników mozaikowych z zarodków 2-komórkowych jest zwielokrotnione faktem wprowadzania egzogenego DNA do dwóch jąder komórkowych. Wprowadzony DNA może w jednej z komórek pozostać w formie nie zintegrowanej lub może zostać strawiony. Komórka, w jądrze której nastąpi pełna integracja egzogenego DNA, da początek połowie populacji komórek zarodka. Od tego w jakim stopniu „transgeniczne” komórki będą uczestniczyły w formowaniu tkanek przyszłego osobnika zależeć będzie stopień integracji i ewentualnej ekspresji wprowadzonego genu. Na tej podstawie można wysunąć przypuszczenie, że buhajki te są mozaikami.

Inną przyczyną braku ekspresji wprowadzonych genów może być to, że osobnikom tym nie podawano egzogenego czynnika stymulującego promotor metalotioneinowy, jakim są jony cynku. Wymienione kwestie nasuwają pytanie czy bardziej opłacalne jest użycie do transgenezy zygot, których hodowla jest mniej efektywna, lecz odsetek mozaik jest niewielki, czy też transformować zarodki 2-blastomerowe, uzyskując lepsze wyniki w hodowli i większy odsetek mozaik? Częściową odpowiedź na to pytanie może dać analiza molekularna moruli i blastocyst przed ich przeniesieniem do biorecipientów pośrednich. Odpowiedź ta będzie jedynie częściowa ponieważ przeprowadzenie reakcji PCR pozwoli jedynie na stwierdzenie czy nowo wprowadzona informacja genetyczna zintegrowała się z DNA komórek badanego zarodka. Niewiadomą pozostanie

nadal liczba komórek, w których integracja nastąpiła, a także stopień ewentualnej ekspresji.

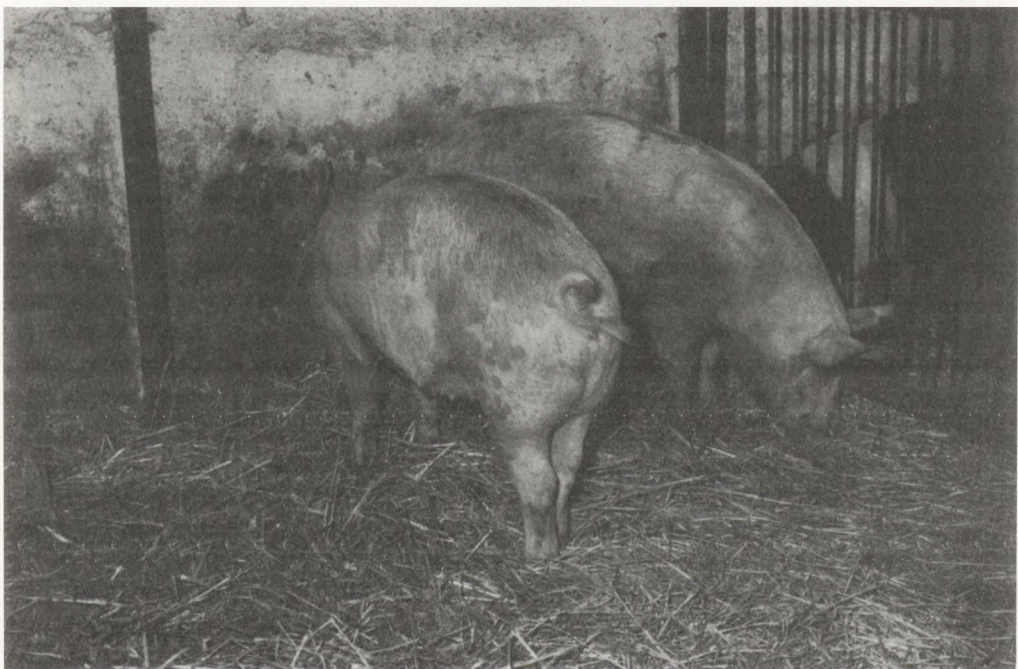
Stosując w transgenecie gen gatunkowo homologiczny (np. gen bydlęcy wprowadzany do genomu zygot i zarodków bydła), napotyka się poważne trudności w przeprowadzeniu analiz molekularnych. Powstaje wtedy konieczność zaprojektowania i użycia bardzo specyficznych primerów, które z dużym prawdopodobieństwem umożliwią stwierdzenie integracji. Aby stwierdzić czy dany osobnik jest transgeniczny należy uzupełnić analizę podstawową (PCR) analizami pomocniczymi. Najbardziej wiarygodnym testem na transgeniczność jest stwierdzenie obecności we krwi bądź tkankach zwierzęcia białka, które koduje nowo wprowadzony gen. Prowadząc prace, w których stosowaliśmy konstrukcje genetyczne kodujące gen hormonu wzrostu bydła, a zatem próbując uzyskać podwyższoną lub obniżoną ekspresję gatunkowo homologicznego białka, poważną trudnością na jaką napotkaliśmy było określenie podwyższonego czy też obniżonego poziomu hormonu wzrostu we krwi bydła i czynników z nim skorelowanych. Główną przyczyną jest brak dostatecznej liczby informacji porównawczej na ten temat.

3.2. Mikroiniekcja DNA do pęcherzyka zarodkowego niedojrzałych oocytów bydlęcych

W pierwszej części doświadczeń z wykorzystaniem niedojrzałych oocytów bydlęcych do pęcherzyka zarodkowego wprowadzano bufor 45% oocytów poddanych mikroiniekcji osiągnęło mejozę. Fazę metafazy II podziału mejozytycznego, która jest miarą uzyskania pełnej dojrzałości i zdolności do zapłodnienia, ukończyło 32% oocytów. Opierając się na uzyskanej informacji, z której wynika, że ponad 1/3 manipulowanych oocytów jest zdolna do zapłodnienia, w dalszej fazie doświadczeń do GV wprowadzano egzogenną informację genetyczną. Po wprowadzeniu DNA i doprowadzeniu oocytów do dojrzałości poddawano je zapłodnieniu oraz długotrwałej hodowli. Mikroiniekcji poddano 252 niedojrzałe oocyty bydlęce. Dwadzieścia cztery procent uzyskanych komórek jajowych podzieliło się, z których 20% osiągnęło stadium moruli oraz 13% rozwinęło się do blastocysty. W efekcie przeniesienia wyprodukowanych na tej drodze zarodków uzyskano jedną ciążę. Można zatem stwierdzić, że zaproponowane postępowanie pozwala na uzyskanie 20% zarodków, które są zdolne do kontynuacji rozwoju *in vivo* w potencjalnie transgeniczne osobniki (32). Przewagą proponowanej metody nad techniką wykorzystującą produkowane *in vitro* zygoty jest to, że nie wymaga ona stosowania wirowania przed iniekcją DNA, ponieważ u 80% morfologicznie normalnych oocytów GV jest widoczny. Duża liczba oocytów, jaką można uzyskiwać z jajników jałówek i krów poddawanych ubojowi, ciągle dokonywany postęp w technikach zapłodnienia i hodowli *in vitro* w połączeniu z proponowaną metodą, mogą być skutecznie wykorzystane do produkcji transgenicznego bydła.



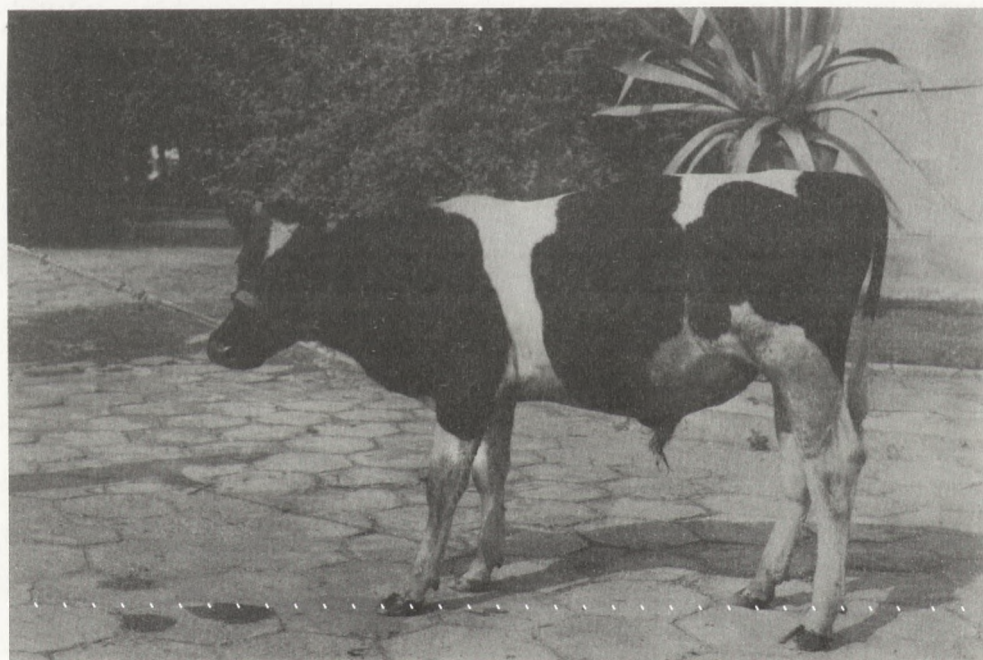
Fot. 1. Transgeniczne króliki — gen Mt-bGH-M8.



Fot. 2. Transgeniczna locha i knur — gen Mt-bGH-10Δ6.



Fot. 3. Transgeniczne knury — gen Mt-bGH-M8.



Fot. 4. Buhaj ze zintegrowanym w genomie genem Mt-bGH-10Δ6.

Podsumowując można stwierdzić, że efektywność mikroiniekcji u zwierząt gospodarskich jest zadowalająca. Również zadowalające są wyniki uzyskane w hodowli *in vitro* zygot i zarodków. Efektywność uzyskiwania zwierząt transgenicznych, a co za tym idzie efektywność integracji, a w jej efekcie prawdopodobnej ekspresji nowo wprowadzonej informacji genetycznej, zależy od czynników natury molekularnej i embriologicznej. Jednak decydujący wpływ na cały proces transgenezy ma konstrukt genetyczny. Od jego budowy, a zwłaszcza od rodzaju zastosowanego promotora, zależy efektywność integracji, a w konsekwencji ekspresja nowo wprowadzonej informacji genetycznej.

Literatura

1. Gordon J. W., (1983), *Developmental Genetics*, 4, 1-20.
2. Wall R. J., Seidel G. E. Jr., (1992), *Theriogenology*, 38, 337-357.
3. Ward K. A., Nancarrow C. D., Murray J. D., Shanahan C. M., Byrne C. R., Rigby N. W., Townrow C. A., Leish Z., Wilson B. W., Graham N. M., Wynn P. C., Hunt C. L., Speck P. A., (1990), *Journal of Dairy Science*, 73, 2586-2592.
4. Wilmut I., Clark A. J., (1989), *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.*, 43, 265-275.
5. Brenig B., Brem G., (1991), *Reproduction in Domestic Animals*, 26, 14-21.
6. Hammer R. E., Pursel V. G., Rexroad C. E., Wall R. J., Bolt D. J., Ebert K. M., Palmiter R. D., Brinster R. L., (1985), *Nature*, 315, 680-683.
7. Pursel V. G., Rexroad C. E. Jr., (1993), *Journal of Animal Science*, 71, Suppl., 3, 10-19.
8. Rexroad C. E. Jr., (1992), *Animal Biotechnology*, 3(1), 1-13.
9. Wall R. J., Pursel V. G., Shamay A., McKnight R. A., Pittius C. W., Henninghausen L., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1696-1700.
10. Broad T. E., (1989), *The production of transgenic livestock by the introduction of new genes into embryos*, in: ICSV - Proceedings of the Society's 19th Seminar Massey University, Palmerstone North, New Zealand, 134-143.
11. Chen W. Y., Wight D. C., Wagner T. E., Kopchick J. J., (1990), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87, 5061-5065.
12. Horvat S., Medrano J. F., Behboodi E., Anderson G. B., Murray J. D., (1993), *Transgenic Research*, 2, 134-140.
13. Cundiff L. V., Bishop M. D., Johnson R. K., (1993), *Journal of Animal Science*, 71, Suppl., 3, 20-25.
14. Doi T., Striker L. J., Gibson C. C., Agodoa L. Y. C., Brinster R. L., Striker G. E., (1990), *American Journal of Pathology*, 137(3), 541-552.
15. Pursel V. G., Rexroad C. E. Jr., (1993), *Molecular Reproduction and Development*, 36, 251-254.
16. Ward K. A., (1991), *Current Opinion in Biotechnology*, 2, 834-839.
17. Williams B. L., Sparks A. E. T., Canseco R. S., Knight J. W., Johnson J. L., Valander W. H., Page R. L., Drohan W. N., Kornegay E. T., Pearson R. L., Wilkins T. D., Gwazdauskas F. C., (1992), *Theriogenology*, 38, 501-511.
18. Roschlau K., (1991), *Journal of Reproduction and Fertility, Suppl.*, 43, 293-295.
19. Camous S., Heyman Y., Meziou W., Menezo Y., (1984), *J. Reprod. Fert.*, 72, 479-485.
20. Yestone W. H., First N. L., (1986), *Theriogenology* 25, 152, Abstr.
21. Boland M. P., (1984), *Theriogenology*, 21, 126-137.
22. Ellington J. E., Farrel P. B., Simken M. E., Foote R. H., Goldman E. E., McGreyth A. B., (1990), *Journal of Reproduction and Fertility*, 89, 293-299.

23. Eyestone W. H., Northey D. L., Lebfried-Rutlege M. L., (1985), *Biology of Reproduction*, 32, 100, Abstr.
24. Eyestone W. H., First N. L., (1988), *Co-culture of bovine embryos with oviductal tissue*, Int. Congr. Anim. Reprod. AI., Dublin, Ireland, 4, 471.
25. Eyestone W. H., First N. L., (1989), *Journal of Reproduction and Fertility*, 85, 715-720.
26. Eyestone W. H., Vignieri I., First N. L., (1987), *Theriogenology*, 27, 228, Abstr.
27. Fukuda Y., Ichikawa M., Naito K., Toyoda Y., (1990), *Biology of Reproduction*, 42, 114-119.
28. Fukui Y., (1989), *Journal of Animal Science*, 67, 1318-1323.
29. Gandolfi F., Moor R. M., (1988), Interactions between somatic and germinal cells during early development, 11th Int. Congr. Reprod. AI, Dublin, Ireland, 5, 170-177.
30. Jura J., Kopchick J. J., Chen W. Y., Wagner T. E., Modliński J. A., Reed M. A., Knapp J. R., Smorag Z., (1994), *Theriogenology*, 41, 1259-1266.
31. McEvoy T. G., Sreenan J. M., (1990), *Theriogenology*, 33, 819-828.
32. Jura J., Kańska L., Smorag Z., Attal J., Houdebine L-M., (1993), *Animal Science Papers and Reports*, 11(2), 111-116.
33. Kay G. W., Hawk H. W., Waterman R. A., Wall R. J., (1991), *Animal Biotechnology*, 2(1), 45-59.
34. Moor R. M., Powell D. J., (1989), *Journal of Reproduction and Fertility*, 86, 289-295.
35. Heyman Y., Menezo Y., Chesne P., Camous S., Garnier V., (1987), *Theriogenology*, 27, 59-68.
36. Kuzan F. B., Wright R. W. Jr., (1982), *Journal of Animal Science*, 54, 811-816.
37. Murray A. W., (1992), *Nature*, 359, 599-604.

Transgenic farm animals — effectiveness of transgenesis via microinjection

Summary

The gene construct and the kind of its promotor have the major influence on the effectiveness of transgenesis via microinjection. A new successful transgenesis technique is described.

Key words:

growth hormone genes, microinjection, transgenesis.

Adres dla korespondencji:

Jacek Jura, Instytut Zootechniki, Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt,
Balice k. Krakowa.