УДК 575.113:598.261.7

ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ ІНТРАЦИТОПЛАЗМАТИЧНОЇ ІН'ЄКЦІЇ СПЕРМАТОЗОЇДА ДЛЯ ПЕРЕНОСУ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ В ЯПОНСЬКОГО ПЕРЕПЕЛА (COTURNIX JAPONIKA)

Ю .І. ЛЕСНЯК, *аспірант,*
Л. І. КАЛАКАЙЛО, *провідний інженер,*
В. Г. СПИРИДОНОВ, *доктор сільськогосподарських наук,*
С. В. МІДИК, *кандидат ветеринарних наук*
Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК
Національний університет біоресурсів і природокористування України
E-mail: bioclar@ukr.net

Дане дослідження було проведене з метою впровадження нових методичних підходів в трансгенезі перепелів: шляхом використання інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда (ICSI). Оцінювалась здатність до запліднення і трансфекції перепелиних ооцитів за допомогою мікроін'єкції сперматозоїдів оброблених Triton X-100 з використанням екстракту сперми та CRISPR/Cas-GFP вектору.

Ключові слова: *внутрішньоклітинна ін'єкція сперматозоїда, ембріогенез, ооцит, сперматозоїд, мікроін'єкція, трансфекція, GFP, бластодерма*

Актуальність. Метод ICSI вже довгий час успішно застосовується для трансгенезу у ссавців. Найбільшою перевагою даної методики є її відносно висока ефективність для мікроін'єкції великих фрагментів ДНК.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Отримання трансгенного організму включає три стадії: створення генної конструкції, впровадження її в геном організму, аналіз і селекцію модифікованих організмів. Найбільш розробленою на сьогоднішній день є перша стадія цього процесу. Так, якщо стає відомим, що будь яка ознака тварини або рослини пов'язана з певним геном, то виділити, розмножити цей ген і виготовити з нього конструкцію для трансгенезу не є сьогодні серйозною проблемою.

Складнішою є друга частина роботи. Доставка генних конструкцій в геном тварин здійснюється різними способами, найбільш відпрацьованими з яких є: мікроін'єкція ДНК в ядро заплідненої яйцеклітини; застосування ретровірусів як засобу доставки чужорідної ДНК в геном, оскільки вони здатні вбудовуватися в хромосоми клітин; отримання ембріональних химер – внесення в ембріон генетично трансформованих чужорідною ДНК первинних статевих клітин, виділених з іншого ембріона.

Кожен з цих методів має свої переваги та недоліки.

*Науковий керівник – доктор сільськогосподарських наук, професор В. Г. Спиридонов

Для отримання трансгенних тварин найчастіше вдаються до мікроін'єкції ДНК в яйцеклітину. При цьому дослідники прагнуть, щоб трансген містився у всіх клітинах тварини і обов'язково в статевих – для передачі потомству. Тому перенесення генів здійснюють на найбільш ранніх стадіях розвитку організму. Найкращим часовим моментом для цього є стадія зиготи, коли організм складається з однієї клітини. Також важливим моментом для ефективного отримання трансгенних тварин є використання сперматозоїдів в якості вектора для переносу чужорідної ДНК в ооцит.

Мета дослідження – отримати генетично трансформованих ембріонів перепелів за допомогою інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїдів в комплексі з Triton X-100 (TX-100), екстрактом сперми (EC) та CRISPR/Cas-GFP вектором.

Матеріали і методи дослідження. Підготовка сперми для проведення інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда в комплексі з розчином Triton X-100 та CRISPR/Cas-GFP вектором. Для введення гену був використаний CRISPR/Cas-GFP вектор. Для роботи із зібраним еякулятом використовували середовище NIM (nuclear isolation medium), як описано Мідзусімою та співавт. П'ятдесят мікролітрів 0,5 % розчину Triton X-100 додавали до 450 мкл суспензії сперми в NIM. Сперматозоїди центрифугували протягом 1 хв за 20000 об/хв за температурі 2 оС, ретельно промивали в 1 мл охолодженого до нульової температури середовища NIM і розсуспендовували. В подальшому сперму доводили до концентрації 2 × 105 сперматозоїдів на мілілітр у середовищі NIM. Частина сперми використовувалася для ICSI. Один мікролітр фрагменту ДНК змішували з 9 мкл суспензії сперми піпетуванням, в подальшому інкубуючи протягом 1 хв на льоді. Потім дану суміш змішували з 12 % полівінілпіролідоном.

Інтрацитоплазматична ін'єкції сперматозоїда (ICSI). Незапліднена яйцеклітина витягується з передньої частини ділянки магнуму (білкового відділу яйцеводу) протягом 1 години після попадання ооцита через воронку в яйцевід, в цій ділянці яйцеклітина покрита тонким шаром білку, без шкаралупи. Кожній яйцеклітині здійснювалась мікроін'єкція одного сперматозоїда разом із супровідними реагентами. ЕС вводили в кількості 2 нг. Загальний об'єм введеної суміші складав 1 нл. Всі процедури, які використовувалися для ICSI були виконані, як описано Hrabia та співавт. (2003) і Мідзусімою (2008). Розчин ЕС та інші супровідні реагенти затягувались першими в мікроін'єкційну голку, використовуючи при цьому інвертований мікроскоп (IX70, Olympus), за цим слідувало втягування сперматозоїда в цю ж мікроін'єкційну голку. Яйцеклітину поміщали в середовище DMEM в пластиковій чашці Петрі (35 18 мм, Nunclon), а потім здійснювали мікроін'єкцію в центральну частину зародкового диска ооциту на глибину 30-50 мкм, з використанням мікроманіпуляторів та стереомікроскопу (SZ11, Olympus). 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.

Комплексна система культивування включала три стадії і базувалась на використанні яєчної шкаралупи як ємності для культивування та рідкого білку, розведеного розчином солі – як живильного середовища. На першій стадії культивування, яка тривала упродовж 24 годин (після мікроін'єкції), ін'єктовану яйцеклітину поміщали в шкаралупу з віконцем, що містила невелику кількість живильного середовища, так, щоб зародковий диск не був закритий.

Протягом цієї стадії, ембріон розвивається на жовтку від однієї клітини до бластодерми з 60000 клітин. Потім шкаралупа заповнювалась розведеним білком, щоб повністю занурити ембріон, і віконце в шкаралупі закривалось липкою стрічкою. Друга стадія тривала 65 годин і за цей час мав розвинутися ембріон із функціонуючим серцем. Для третьої і найдовшої стадії, яка тривала до вилуплення, ембріон з його жовтком і живильним середовищем, переміщували в другу, більшу за розміром шкаралупу. Це забезпечувало штучний повітряний простір, необхідний протягом парафетального періоду, коли ембріон починає дихати атмосферним повітрям своїми легенями і готується до вилуплення. Перед початком легеневої вентиляції, за 1-2 доби до вилуплення, плівка якою закривали отвір в шкаралупі перфорувалась для пропуску повітря в повітряну камеру яйця. Оскільки яйцеклітини для мікроін'єкції отримували під час її руху вниз по яйцеводу, то під час інкубації протягом стадії I використовувався температурний режим яйцеводу, внаслідок чого температура в інкубаторі складала 41,5 ˚С за відносної вологості – 75 % та рівні вуглекислого газу – 5 %. В кінці першої стадії був короткий період при температурі – 24 ˚С (кімнатна температура), щоб імітувати яйцекладку (знесення яйця). Інкубаційні умови протягом II і III стадій були змінені в порівнянні з традиційно використовуваними у птахівництві: відносна вологість піднята приблизно до 75 %, потім здійснювали її зменшення приблизно до 65 % перед стадією вилуплення. На другій стадії, частота поворотів була збільшена до чотирьох разів на годину. Під час третьої стадії кут повороту зменшувався, щоб запобігти торканню ембріоном липкої плівки, яка закривала отвір в шкаралупі.

Результати дослідження та їх обговорення. Інтрацитоплазматична ін'єкція (ICSI) є опосередкованим методом перенесення генів і широко використовується у цілого ряду тварин, проте у птахівництві дуже мало досліджень було проведено у цьому напрямку. З цією метою було здійснено ряд досліджень із застосуванням методу ICSI на перепелиних ооцитах, це дало змогу продемонструвати, що перепелині яйцеклітини, ін'єктовані одним перепелиним сперматозоїдом були здатні запліднюватись і давати розвиток бластодерми. Для проведення ICSI використовували сперматозоїди трансфіковані за допомогою Triton X-100 (TX-100) та CRISPR/Cas-GFP вектору.

Під час мікроін'єкції сперматозоїда застосувався екстракт сперми (ЕС), який сприяв підвищенню рівня активації ооцитів, що давало значне збільшення кількості запліднених яйцеклітин (До складу ЕС входили три компоненти: 1) фосфоліпаза, 2) аконітатгідратаза, 3) цитрат синтаза, які у комплексному поєднанні суттєво підвищували відсоток запліднених яйцеклітин).

Також досліджувався вплив TX-100 на цілісність мембран сперматозоїдів. У випадку, коли не застосовувався TX-100 у 87,2 ± 4,2 % сперматозоїдів мембрани голівок були неушкодженими; в зразку, де застосовували TX-100, кількість сперматозоїдів з неушкодженими мембранами складала – 10,8 ± 2,8 %. Було досліджено вплив TX-100 на процес запліднення ооцитів та подальший їх розвиток протягом 24 годин після запліднення за допомогою методу ICSI. Також вивчався вплив ЕС на активацію та ефективність процесу запліднення в ооцитів.

Використання TX-100 індукувало пошкодження мембран сперматозоїдів, що зменшувало запліднюючий потенціал сперми, проте у поєднанні із методом ICSI значно підвищувало ефективність переносу генетичної інформації. Для збільшення кількості запліднених ооцитів, під час інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїдів, використовували екстракт сперми (ЕС). Ооцити, яких запліднювали

1. Розвиток бластодерми протягом 24 годин після інтрацитоплазматичної ін'єкції в ооцит перепела сперматозоїда в комплексі з ТХ-100, ЕС та CRISPR/Cas-GFP вектором

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)

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 мікроін'єкції сперматозоїдів в комплексі із ЕС та CRISPR/Cas-GFP вектором, без ТХ-100: було отримано розвиток бластодерми в 38,9 % запліднених ооцитів, проте флуоресцентне випромінювання та експресія зеленого флуоресцентного білка (GFP) не спостерігались. Після використання інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїдів із використанням ТХ-100, ЕС та CRISPR/Cas-GFP вектору, розвиток бластодерми спостерігався в 42,2 % запліднених яйцеклітин, у 82,3 % ембріонів спостерігалось зелене флуоресцентне випромінювання, з них в 47,8 % було виявлено експресію GFP в бластодермі (табл. 1).

Ці результати вказують на те, що метод ICSI в комплексі із ТХ-100, ЕС та CRISPR/Cas-GFP вектором відкривають широкі перспективи для ефективного здійснення переносу генетичної інформації у перепелів.

Висновки і перспективи подальших досліджень:

1. Метод ICSI забезпечує високу ефективність для мікроін'єкції великих фрагментів ДНК в геном господаря.

2. Застосування екстракту сперми під час мікроін'єкції сперматозоїда, сприяє підвищенню рівня активації ооцитів, що дає значне збільшення кількості запліднених яйцеклітин.

3. Використання ТХ-100 індукувало пошкодження мембран сперматозоїдів, що зменшувало запліднюючий потенціал сперми, проте у поєднанні із методом ICSI значно підвищувало ефективність переносу генетичної інформації.

Література

1. Garcia-Vazquez FA, Garcia-Rosello E, Gutierrez-Adan A, Gadea J. Effect of sperm treatment on efficiency of EGFP-expressing porcine embryos produced by ICSI-SMGT. Theriogenology 2009; 72:506–518.
2. Iwao, Y. (2012). Egg activation in physiological polyspermy. Reproduction 144, 11-22.
3. Love J, Gribbin C, Mather Ch, Sang H. Transgenic birds by DNA microinjection. Bio/Technology 1994; 12:60–63.
4. Mizushima, S., Takagi, S., Ono, T., Atsumi, Y., Tsukada, A., Saito, N. And Shimada, K. (2008). Developmental enhancement of intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-generated quail embryos by phospholipase Cζ cRNA. J. Poult. Sci. 45, 152-158.
5. Moisyadi S, Kaminski JM, Yanagimachi R. Use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to generate transgenic animals. Comp Immun Microbiol Infect Dis 2009; 32:47–60.

6. Naito M, Sasaki E, Ohtaki M, Sakurai M. Introduction of exogenous DNA into somatic and germ cells of chickens by microinjection into the germinal disc of fertilized ova. Mol Reprod Dev 1994; 37:167–171.
7. Windbichler N., Papathanos P.A., Catteruccia F., Ranson H., Burt A., Crisanti A. Homing endonuclease mediated gene targeting in Anopheles gambiae cells and embryos. Nucl. Acids Res. 2007;35(17): 5922-5933. DOI 10.1093/nar/gkm632.
8. Yang H., Wang H., Jaenisch R. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Nat. Protocols. 2014;9:1956-1968.

SUMMARY

Y. Lesniak, L. Kalakaylo, V. Spiridonov, S. Midyk. *Effectiveness useing of the intracytoplasmic sperm injection for the transmission of genetic information in the japanese quail (coturnix japonika) // Biological Resources and Nature Managment.– 2017. – **9**, №1–2. – P.83–87*

This study was conducted in order to introduce new methodological approaches transgenesis quail by using intracytoplasmic sperm injection (ICSI). We researched the ability to fertilization and transfection oocytes of quail via microinjection of sperm treated by Triton X-100 with using an extract sperm and CRISPR/Cas-GFP vector.

Keywords: *intracytoplasmic sperm injection, embryogenesis, oocyte, sperm, microinjection, transfection, GFP, blastoderm*

АННОТАЦИЯ

Ю. И. Лесняк, Л. И.Калакайло, В. Г. Спиридонов, С. В. Мидык. *Эффективность применения интрацитоплазматической инъекции сперматозоида для переноса генетической информации в японских перепелов (coturnix japonika)// Биоресурсы и природопользование. – 2017. – **9**, №1–2. – С.83–87.*

Данное исследование было проведено с целью внедрения новых методических подходов в трансгенез перепелов: путем использования интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ICSI). Оценивалась способность к оплодотворению и трансфекции перепелиных ооцитов с помощью микроинъекции сперматозоидов обработанных Triton X-100 с использованием экстракта спермы и CRISPR/Cas-GFP вектора.

Ключевые слова: *внутриклеточная инъекция сперматозоида, эмбриогенез, ооцит, сперматозоид, микроинъекция, трансфекция, GFP, бластодерма*