

ОСНОВНІ АСПЕКТИ ПЕРЕНОСУ ЧУЖОРІДНИХ ГЕНІВ В ГЕНОМ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЯПОНСЬКИХ ПЕРЕПЕЛІВ (*COTURNIX JAPONICA*)

Ю.І. ЛЕСНЯК, аспірант*

Л.І. КАЛАКАЙЛО, студентка магістратури

В.Г. СПИРИДОНОВ, доктор сільськогосподарських наук

М.Д. МЕЛЬНИЧУК, доктор біологічних наук, академік

Описано процес переносу генетичної конструкції (pEGFP-N1 вектор) у геном сперматозоїдів японських перепелів з використанням диметилсульфоксиду (DMSO). *Передачу та прояв введеної генетичної інформації* оцінювали за характерним флуоресцентним свіченням трансфікованих сперматозоїдів, *внаслідок експресії* зеленого флуоресцентного білка (green fluorescent protein (GFP)) та за допомогою ПЛР-аналізу.

Японський перепіл, сперматозоїд, генетична конструкція, еякулят, трансфекція.

За останні роки розроблено цілий ряд методів для отримання трансгенних тварин. Найпоширені способи складаються з: мікроін'єкції в пронуклеуси, пересадки ядер соматичних клітин та трансдукції з використанням ретровірусів. Останній найширше використовується, тим не менше, ретровірусний метод має ряд недоліків, таких як обмеження на розмір вбудованого гена та небезпечність використання цієї методики. Альтернативним і недорогим є метод введення чужорідної ДНК в сперматозоїд до запліднення. Хоча трансгенні тварини були отримані внаслідок використання спермопосередкованого переносу гена (sperm-mediated gene transfer (SMGT)), все ж ефективність цієї методики була низькою, що було спричиняло погане проникнення екзогенної ДНК у сперматозоїди. Недостатня ефективність SMGT була пов'язана з активацією захисних механізмів сперматозоїдів та насінневої плазми, в результаті чого відбувалась деградація екзогенної ДНК.

Мета досліджень – збільшення ефективності трансфекції сперматозоїдів внаслідок використання диметилсульфоксиду (DMSO) та композитів для відмивки від ДНКаз.

Матеріали та методика досліджень. Для визначення впливу сім'яної плазми на інтенсивність включення екзогенної ДНК у сперматозоїди, зразки сперми об'єднували і 10^9 сперматозоїдів

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

© Ю.І. Лесняк, Л.І. Калакайло,

В.Г. Спиридонов, М.Д. Мельничук, 2013

промивали відмиваючим розчином, центрифугуючи при 600 g шість разів.

Після кожного промивання супернатант видаляли для перевірки на ДНКазну активність, яку вимірювали за допомогою горизонтального гель-електрофорезу (1 %-на агароза), з використанням для візуалізації ДНК 0,5 мкг/мл бромистого етидію. Рухливість та активність сперми оцінювали за допомогою фазово-контрастної мікроскопії до і після кожної промивки.

Екзогенну ДНК, яка адсорбовувалась на поверхні сперматозоїдів, видаляли обробкою 20 U ДНКазою I (Invitrogen, USA) протягом 30 хв і трьох промивок у фосфатно-сольовому буфері (PBS) при 600g 5 хв.

Виділену із сперматозоїдів ДНК аналізували за допомогою ПЛР для виявлення інтерналізації (засвоєння) екзогенної ДНК.

Також ефективність трансфекції сперматозоїдів оцінювали за характерним флуоресцентним свіченням трансфікованих сперматозоїдів з використанням мікроскопії, внаслідок експресії зеленого флуоресцентного білка (green fluorescent protein (GFP)) (рис.1).



Рис.1. Свічення трансфікованого сперматозоїда внаслідок експресії зеленого флуоресцентного білка (green fluorescent protein (GFP)).

Трансгенна передача екзогенної ДНК за допомогою обробки диметилсульфоксидом (DMSO). Еякулят перепелів розділили на три групи: 1 – *контроль I* – здійснювали відмивання сперми без застосування екзогенної ДНК; 2 – *контроль II* – проводили відмивання з використанням екзогенної ДНК; 3 – *з використанням DMSO*, після відмивання сперму інкубували з екзогенною ДНК та 3 %-ним диметилсульфоксидом (DMSO).

Трансфекція сперматозоїдів: плазмідну ДНК (10 μ g) обробляли 3 %-ним DMSO протягом 30 хв при кімнатній температурі. Зібрану перепелину сперму оцінювали за рухливістю та активністю

сперматозоїдів, після чого зразки еякуляту об'єднували. Близько 10^9 сперматозоїдів розводили в 600 мкл відмиваючого розчину для подальших етапів відмивання. Після цього сперматозоїди інкубували з трансфекційним розчином із загальним об'ємом 1 мл.

Після проведення трансфекції оцінювали рухливість та життєздатність сперматозоїдів. Кількість сперматозоїдів визначали за допомогою камери Маклера.

Результати досліджень. Рухливість сперматозоїдів зменшувалася з кожним наступним відмиванням. Наприклад, після трьох послідовних промивок вона значно знизилась порівняно із свіжою спермою (рис. 2).

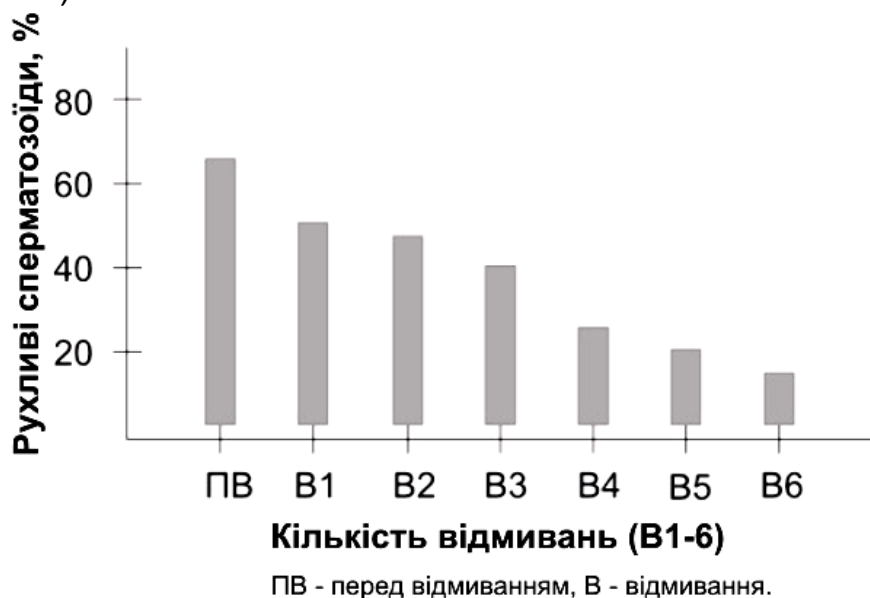


Рис.2. Порівняльна характеристика рухливості сперматозоїдів в залежності від кількості відмивань еякуляту

З кожним наступним промиванням ДНКазна активність суттєво зменшувалась, що значно спрощувало процес трансфекції. У контролі та після перших двох промивок у зв'язку з високим деструктивним впливом ДНКаз плазмідна активність була дуже низькою, проте починаючи з третього промивання вплив ДНКаз суттєво знижувався, а після шести відмивань рівень трансфекції сперматозоїдів з використанням DMSO суттєво підвищувався.

Обробка сперми за допомогою DMSO незначно зменшувала активність та фертильність сперматозоїдів, проте значно сприяла їх успішному трансфікуванню: ПЛР-аналіз показав присутність гена EGFP в ДНК сперматозоїдів.

Успішність трансгенної передачі в зразках еякуляту з використанням DMSO становила 38%.

Висновки

Отже, використання системи відмивань еякуляту від ДНКаз та подальша трансфекція з використанням DMSO дають можливість

ефективно отримувати рухливі та фертильні трансфіковані сперматозоїди.

Список літератури

1. Anzar M and Buhr MM 2006 Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. *Theriogenology* 65 683–690.
2. Barbosa VM, Cancado SV, Baiao NC, Lana AMQ, Lara LJC and Souza MR 2008 Effects of relative air humidity in the hatchery and breeder hen age on the incubation yield. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60 741–748.
3. Bianchi I, Calderam K, Maschio EF, Madeira EM, da Rosa UR, Corcini CD, Bongalhardo DC, Correa EK, et al. 2008 Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology* 69 632–638.
4. Campos VF, Komninou ER, Urtiaga G, Leon PM, Seixas FK, Dellagostin OA, Deschamps JC and Collares T 2011 NanoSMGT: transfection of exogenous DNA on sex-sorted bovine sperm using nanopolymer. *Theriogenology* 75 1476–1481.
5. Campos VF, Collares T, Deschamps JC, Seixas FK, Dellagostin OA, Lanes CF, Sandrini J, Marins LF, Okamoto M, Sampaio LA and Robaldo RB 2010a Identification, tissue distribution and evaluation of brain neuropeptide Y gene expression in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Biosci.* 35 405–413.
6. Campos VF, Collares T, Seixas FK, Kaefer K, Cavalcanti PV, Amaral M, Lucia T Jr, and Deschamps JC 2010b Association between the presence of a 38 kDa factor in the seminal plasma and inhibition of sperm motility in the jundia fish *Rhamdia quelen*. *Ci. Anim. Bras.* 11 402–409.
7. Canovas S, Gutierrez-Adan A and Gadea J 2010 Effect of exogenous DNA on bovine sperm functionality using the sperm mediated gene transfer (SMGT) technique. *Mol. Reprod. Dev.* 77 687–698.
8. Collares T, Campos VF, Seixas FK, Cavalcanti PV, Dellagostin OA, Moreira HL and Deschamps JC 2010 Transgene transmission in South American catfish (*Rhamdia quelen*) larvae by spermmediated gene transfer. *J. Biosci.* 35 39–47.
9. Ebara F and Fujihara N 1999 Reproductive characteristics of transgenic (TG) chickens carrying an exogenous gene. *Asian J. Androl.* 1 139–144.
10. Garcia-Vazquez FA, Garcia-Rosello E, Gutierrez-Adan A and Gadea J 2009 Effect of sperm treatment on efficiency of EGFP-expressing porcine embryos produced by ICSI-SMGT. *Theriogenology* 72 506–518.
11. Gavora JS, Benkel B, Sasada H, Cantwell WJ, Fiser P, Teather RM, Nagai J and Sabour MP 1991 An attempt at sperm-mediated gene-transfer in mice and chickens. *Can. J. Anim. Sci.* 71 287–291.
12. Han JY 2009 Germ cells and transgenesis in chickens. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32 61–80.
13. Harel-Markowitz E, Gurevich M, Shore L S, Katz A, Stram Y and Shemesh M 2009 Use of sperm plasmid DNA lipofection combined with REMI (restriction enzymemediated insertion) for production of transgenic chickens expressing eGFP (enhanced green fluorescent protein) or human follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.* 80 1046–1052.
14. Howarth B Jr 1983 Comparison of diluents for holding cock semen six hours at 41 C. *Poult. Sci.* 62 1084–1087.

15. Kang JH, Hakimov H, Ruiz A, Friendship RM, Buhr M and Golovan SP 2008 The negative effects of exogenous DNA binding on porcine spermatozoa are caused by removal of seminal fluid. *Theriogenology* 70 1288–1296.
16. Kim TS, Lee SH, Gang GT, Lee YS, Kim SU, Koo DB, Shin MY, Park CK and Lee DS 2009 Exogenous DNA uptake of boar spermatozoa by a magnetic nanoparticle vector system. *Reprod. Domest. Anim.* 45 e201–e206.
17. Koo BC, Kwon MS, Choi BR, Kim JH, Cho SK, Sohn SH, Cho EJ, Lee HT, et al. 2006 Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. *FASEB J.* 20 2251–2260.
18. Kuznetsov AV, Kuznetsova IV and Schit IY 2000 DNA interaction with rabbit sperm cells and its transfer into ova in vitro and in vivo. *Mol. Reprod. Dev.* 56 292–297.
19. Lanes CF, Sampaio LA and Marins LF 2009 Evaluation of DNase activity in seminal plasma and uptake of exogenous DNA by spermatozoa of the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Theriogenology* 71 525–533.
20. Latorre JR, Harris GC Jr and Johnson ZB 1988 Influence of storage container for frozen-thawed chicken semen and frequency of insemination on fertility and its duration. *Poult. Sci.* 67 333–335.
21. Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG and Spadafora C 1989 Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 57 717–723.
22. Li L, Shen W, Min L, Dong H, Sun Y and Pan Q 2006 Human lactoferrin transgenic rabbits produced efficiently using dimethylsulfoxide-sperm-mediated gene transfer. *Reprod. Fertil. Dev.* 18 689–695.
23. Li WM, Feng YP, Zhao RX, Fan YZ, Affara NA, Wu JJ, Fang J, Tong Q, Wang C and Zhang SJ 2008 Sex ratio bias in early dead embryos of chickens collected during the first week of incubation. *Poult. Sci.* 87 2231–2233.
24. Lillico SG, Sherman A, McGrew MJ, Robertson CD, Smith J, Haslam C, Barnard P, Radcliffe PA, Mitrophanous KA, Elliot EA and Sang HM 2007 Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 1771–1776.
25. Liu L, Cao F, Cai K, Zhang Y, Ding Z and Li J 2010 Generation of sperms containing EGFP-LacZ following transfection of chicken testis with a eukaryotic dual reporter vector. *Reprod. Domest. Anim.* 46 e39–e45.
26. Nakanishi A and Iritani A 1993 Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods. *Mol. Reprod. Dev.* 36 258–261.
27. Sato F, Soh T, Hattori MA and Fujihara N 2003 Evaluation of deoxyribonuclease activity in seminal plasma of ejaculated chicken semen. *Asian J. Androl.* 5 213–216.
28. Shen W, Li L, Pan Q, Min L, Dong H and Deng J 2006 Efficient and simple production of transgenic mice and rabbits using the new DMSO-sperm mediated exogenous DNA transfer method. *Mol. Reprod. Dev.* 73 589–594.
29. Smith K and Spadafora C 2005 Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. *BioEssays* 27 551–562.
30. Wall RJ 2002 New gene transfer methods. *Theriogenology* 57 189–201.

31. Wu Z, Li Z and Yang J 2008 Transient transgene transmission to piglets by intrauterine insemination of spermatozoa incubated with DNA fragments. Mol. Reprod. Dev. 75 26–32.

Описан процесс переноса генетической конструкции (pEGFP-N1 вектор) в геном сперматозоидов японских перепелов с использованием диметилсульфоксида (DMSO). Передачу и проявление введенной генетической информации оценивали по характерному флуоресцентному свечению трансфицированных сперматозоидов, вследствие экспрессии зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein (GFP)) и с помощью ПЦР-анализа.

Японский перепил, сперматозоид, генетическая конструкция, эякулят, трансфекция.

This paper describes a process of transferring genetic construction (pEGFP-N1 vector) into the genome of Japanese quail sperm using dimethyl sulfoxide (DMSO). Transfer and expression of the introduced genetic information was evaluated by the characteristic fluorescence of transfected spermatozoa due to expression of the green fluorescent protein (GFP) and by PCR analysis.

Japanese quail, sperm, genetic constructions, ejaculate, transfection.