

УДК 598.26:57.085.23:577.213

А.В. Самойлов¹, Н.М. Сураева²**ТРАНСФЕКЦИЯ *IN VITRO* ЭКЗОГЕННОЙ ДНК КЛЕТОК ЯЙЦЕВОДА КУР**¹ФГБНУ ВНИИ технологии консервирования, Московская область, г. Видное²ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва**Контактная информация**

Сураева Наталья Михайловна, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(495)324-60-26

e-mail: nsuraeva@yandex.ru

Статья поступила 14.11.2014, принята к печати 09.02.2015.

Резюме

Получение фармакологических белков из белка яйца трансгенной птицы представляет собой довольно сложную и дорогостоящую технологию, в одну из основных задач которой входит создание экспрессирующего вектора. Целью исследований являлось получение и оценка временной экспрессирующей системы на основе первичной культуры трансфицированных экзогенной ДНК эпителиальных клеток куриного яйцевода.

Было изучено три способа выделения клеток яйцевода кур, при этом только при получении клеток методом инкубации фрагмента яйцевода курицы в растворе Трипсина-Версена при 38 °С, при механическом удалении верхнего слоя клеток с его внутренней поверхности удалось получить гомогенную, стабильную первичную культуру, способную к многократным пассажам. Через 2–3 суток монослой пассировали и еще через 1–2 суток уже использовали для трансфекции. Получение культуры не требовало поэтапной или комплексной обработки яйцевода ферментами, дополнительного оборудования и реактивов для удаления стромальных клеток.

Культура клеток яйцевода была успешно трансфицирована с помощью генной конструкции на основе вектора pIRES EGFP2 (фирма Clontech, США) и препарата липосом «Lipofectamin® 2000», при этом число экспрессирующих белок GFP эпителиальных клеток яйцевода составил 5–8 % от общего числа трансфицированных клеток.

С помощью разработанной временной экспрессирующей системы в течение 4–5 суток в условиях *in vitro* было проведено тестирование экспрессии экзогенного гена.

Ключевые слова: клетки яйцевода кур, трансфекция, экспрессия экзогенной ДНК.A.V. Samoilov¹, N.M. Suraeva²**TRANSFECTION OF EXOGENOUS DNA IN CHICKEN OVIDUCT CELLS IN VITRO**¹FSBSI Institute of Canning Technology, Vidnoe, Moscow region²FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow**Resume**

Effective production of pharmaceutical proteins using transgenic poultry may be achieved only from a construction of expression vector for chicken oviduct bioreactor. This study was focused on development of temporary expression system by using primary oviduct epithelial cells in which transfected gene expression can be studied.

The present work was aimed to study three manners for preparation of primary oviduct cells, but only one was effective. Selective digestion of chicken oviduct tissue pieces in trypsin at 38° C and mechanical withdrawal of upper cell layer resulted in the isolation of purity primary culture. Experiments indicated that monolayer cultured for 2–3 d were fit to be passaged. Then after 1–2-d, the cells were transfected. Based on our result with primary culture, we did not used complicated enzyme treatment and extra equipment in order to increase the purity of epithelial cells.

Liposomes «Lipofectine® 2000» were used for primary oviduct cells transfection of a plasmid designed based on the pIRES EGFP2 vector (Clontech, United States). The ratio of cells carrying GFP activity was 5–8% of the total number of cultured cells.

This researches was focused on development in vitro of temporary expression system in which transfected gene expression can be tested for 4–5 d.

Key words: chicken oviduct cells, transfection, expression of exogenous DNA.**Введение**

Технологии получения рекомбинантных белков открывают новые возможности получения белковых фармацевтических препаратов необходимой структуры с низкой себестоимостью производства. Трансгенная птица с тканеспецифичной экспрессией рекомбинантного белка в белке яйца является потенциальным продуцентом для широкомасштабного производства терапевтических препаратов [6]. Яйцевод курицы, используемый в качестве биореактора, способен значительно быстрее и с меньши-

ми затратами, чем, например, молочные железы трансгенных коз или коров, синтезировать так необходимые медицине человеческие белковые препараты. При этом эффективная интеграция и экспрессия чужеродного гена в синтезирующих белок яйца эпителиальных клетках яйцевода возможна только с генной конструкцией, обладающей набором необходимых элементов, что может быть достигнуто за счет подбора регуляторных участков генных векторов экспериментальным путем на большой популяции трансгенных животных [1; 3]. Другой подход к решению этой проблемы может

быть осуществлен за счет создания временной экспрессирующей системы для тестирования экспрессирующего вектора в условиях in vitro с использование первичных куриных культур клеток [7; 9]. При этом экономические затраты и время тестирования наиболее оптимальных экспрессирующих генных векторов будут значительно снижены. Однако эффективность такой временной экспрессирующей системы зависит от способа выделения указанной первичной культуры, возможности ее дальнейшего культивирования и трансфекции. Известно несколько методов выделения указанных клеток путем поэтапной или комплексной обработкой тканей яйцевода различными ферментами [7; 11; 12] с целью получения гомогенной популяции эпителиальных клеток. Однако после воздействия ферментов в указанных работах была получена гетерогенная культура клеток, состоящая как из эпителиальных, так из фибробластоподобных и иных клеток, и требовались дальнейшие этапы для получения гомогенной культуры. При этом после удаления фибробластных клеток эпителиальные уже не были способны к дальнейшему росту. Также известно, что эффективность трансфекции первичной культуры зависит от качества полученных клеток и подбора препарата для трансфекции [7].

Цель наших исследований состояла в разработке временной экспрессирующей системы на основе одностадийного метода выделения первичной культуры эпителиальных клеток куриного яйцевода и трансфекции экзогенным геном этих клеток с помощью препарата липосом «Lipofectamin® 2000».

Материалы и методы

В опытах использовали кур кросса «Хайсекс». Для получения клеток яйцевода куриц в возрасте 10 мес обезглавливали, асептически удаляли участок яйцевода от воронки яйцевода до перешейка и помещали в стерильный раствор PBS («Хеликон» Россия, Москва). Выделенные клетки осаждали центрифугированием при 60 g в течение 2 мин, удаляли надосадочную жидкость, добавляли 1 мл культуральной среды и повторяли промывку.

Культивирование первичной культуры

Для культивирования клеток яйцевода использовали культуральную среду следующего состава: DMEM («GIBCO», США), 8 % куриной сыворотки, 2 % FBS, 10^{-7} М/л β -эстрадиола (Sigma, США), 10^{-6} М/л кортикостерона (Sigma США), 50 мкг/л инсулина (Sigma, США) и антибиотик. Клетки культивировали при температуре 38 °C, 7% CO₂ в чашках Петри 3,5 см в диаметре с последующим пассированием на культуральные матрасы площадью 25 см².

Трансфекция чужеродной ДНК клеток яйцевода

Первичную культуру клеток яйцевода трансфецировали с помощью генной конструкции на основе вектора pIRES EGFP2 (фирмы Clontech, США) и препарата для трансфекции «Lipofectamin® 2000» (Invitrogen, США). Данный вектор предназначен для экспрессии в эукариотических клетках, содержит CMV-промотор и эукариотический селективный ген устойчивости к неомицину/канамицину, а также селективный ген зеленого белка (*gfp*). Трансфекцию клеток проводили согласно протоколу использования «Lipofectamin® 2000», конflu-

энтность монослоя составляла 80–90 %. Экспрессию гена *gfp* после трансфекции клеток оценивали под микроскопом в ультрафиолетовом свете.

Результаты и обсуждение

На первом этапе разработки тест-системы генной конструкции необходимо было разработать эффективный и простой в применении метод выделения первичной культуры куриных клеток яйцевода. Для сравнения нами были апробированы три модифицированных способа выделения куриных эпителиальных клеток яйцевода путем применения нашего предыдущего опыта по получению клеток яйцевода коровы и кролика, а также методик выделения различных клеток [4; 8; 10].

1 способ. Отсекали участок яйцевода длиной 7 см, промывали дважды раствором PBS, помещали в среду DMEM («GIBCO», США) и выдавливали эпителиальные клетки из просвета яйцевода в среду давящим поглаживанием от центра к концу тупой стороной скальпеля.

2 способ. Отсекали участок яйцевода длиной 7 см, промывали дважды раствором PBS, зажимали один конец корнцангом, а с другой стороны вливали 5 мл раствора Трипсина-Версена («БиолоТ», Россия) и зажимали второй конец, чтобы предотвратить вытекание раствора. Инкубировали в течение 40 минут при комнатной температуре, удаляли раствор Трипсина-Версена и выдавливали эпителиальные клетки из просвета яйцевода в среду DMEM давящим поглаживанием яйцевода от центра к концу тупой стороной скальпеля.

3 способ. Препарировали участок яйцевода площадью 4 см², промывали раствором PBS трижды, помещали в раствор Трипсина-Версена, инкубировали в течение 1–1,5 ч при температуре 38 °C, промывали раствором PBS, затем тупой стороной скальпеля осторожно снимали верхний слой клеток с внутренней поверхности яйцевода.

При использовании первого и второго способов выделено только небольшое число эпителиальных клеток яйцевода со значительной примесью разрушенных. При последующем культивировании эти клетки не смогли дать рост первичной культуры и погибли, тогда как с помощью третьего способа удалось выделить достаточное число эпителиальных клеток без примеси стромальных клеток, которые при культивировании формировали монослой из клеток с четкими границами, вытянутой формы, без выраженного ядра. Через 2–3 сут монослой достигал 100 % конfluэнтности, и клетки пассировались из чашек в матрасы. Было проведено 5 пассажей, при этом морфологические характеристики клеток не изменились (рис. 1 на 3 пассаже; см. вклейку). Таким образом, разработанный нами способ получения куриной первичной культуры клеток яйцевода с использованием только одного фермента позволил получить гомогенную популяцию эпителиальных клеток, способную дать рост долгосрочной культуре. Этот способ, в отличие от предложенных методов [7; 11; 12] не требует поэтапной или комплексной обработки яйцевода ферментами, дополнительного оборудования и реактивов для удаления стромальных клеток.

С целью тестирования полученных клеток на способность к трансфекции экзогенным геном нами были применены липосомы в качестве переносчиков генной конструкции. В связи с тем, что в наших предыдущих работах по трансфекции куриных клеток, в том числе и при получении трансгенной пти-

цы с использованием опосредованного переноса с помощью сперматозоидов, более эффективным препаратом липосом оказался «Lipofectamin® 2000» [1; 2; 5], нами впервые был применен этот препарат для трансфекции плазмидой pIRES EGFP2 куриных эпителиальных клеток яйцевода.

«Lipofectamin® 2000» также оказался эффективным и на полученной культуре эпителиальных клеток яйцевода, при этом число экспрессирующих белок GFP эпителиальных клеток яйцевода составило 5-8 % от общего числа трансфицированных клеток (рис. 2).

Таким образом, с помощью разработанной нами временной экспрессирующей системы возможно в течение 4–5 суток в условиях *in vitro* про-

вести исследование по тестированию экспрессии экзогенного гена с использованием гомогенной культуры первичных куриных эпителиальных клеток яйцевода.

Выводы

Полученные результаты и разработанные подходы по выделению, культивированию и трансфекции *in vitro* чужеродным геном первичной культуры клеток яйцевода курицы позволили разработать временную экспрессирующую систему для эффективного и простого в применении тестирования экспрессирующего вектора в условиях *in vitro*.

Литература

1. Самойлов А.В., Сураева Н.М., Барышников А.Ю. и др. Использование сперматозоидов петуха в качестве переносчиков чужеродной ДНК с целью разработки и совершенствования методов получения продуцентов терапевтических белков // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 53–6.
2. Самойлов А.В., Кесян А.З., Сураева Н.М. Получение трансгенных кур с геном гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека методом опосредованного генного переноса с помощью сперматозоидов // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2013. – № 5. – С. 517–21.
3. Сураева Н.М. Современные подходы к проблеме введения чужеродных генов в половые клетки животных // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 4. – С. 29–37.
4. Сураева Н.М., Толмазова А.Г. Выделение и характеристика первичных половых клеток из гонад 6–9-суточных эмбрионов кур с целью совершенствования метода получения трансгенной птицы // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2004. – № 2. – С. 29–31.
5. Сураева Н.М., Барышников А.Ю., Фисинин В.И., Прокофьев М.И. Изучение эффективности различных способов переноса репортерного гена в эмбриональные клетки кур // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2008. – № 1. – С. 18–23.
6. Сураева Н.М., Самойлов А.В. Получение фармацевтических белков с помощью трансгенной птицы // Вестник РОНЦ им. Блохина Н.Н. РАМН. – 2009. – Т. 20, № 4. – С. 19–25.
7. Фрейни Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010. – 691 с.
8. Gao B., Sun H.C., Song C.Y. et al. Transfection and expression of exogenous gene in laying hens oviduct *in vitro* and *in vivo* // Journal of Zhejiang University Science. – 2005. – 6(2). – P. 137–41.
9. Kim S.H., Choi J.Y., Sohn C.R. et al. Induction of apoptosis in chicken oviduct cells by C2-11. ceramide // Mol. Cells. – 2005. – 19(2). – P. 185–90.
10. Li S., Zhenyu A M., Zhang A. et al. Induction of CXC chemokine messenger-RNA expression in chicken oviduct epithelial cells by salmonella enterica serovar enteritidis via the type three secretion system-1 // AVIAN DISEASES. – 2009. – 53. – P. 396–404.
11. Oishi I., Sungtae S., Yoshii K. et al. cre-loxp-regulated expression of monoclonal antibodies driven by an ovalbumin promoter in primary oviduct cells // bmc biotechnology. – 2011. – 11(5). – p. 1–8.
12. Prokofiev M.I., Ernst L.K., Suraveva N.M. et al. Bovine oocyte maturation, fertilization and further development *in vitro* and after transfer into recipient // Theriogenology. – 1992. – 38. – P. 461–9.