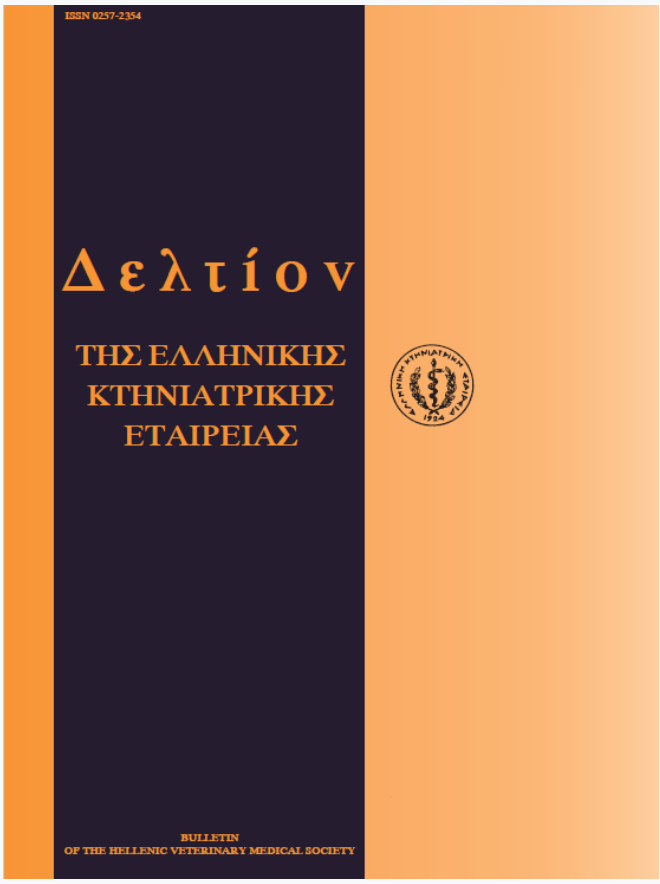
ePublishing
ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗΣ
NATIONAL DOCUMENTATION CENTRE

Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας

Τόμ. 50, Αρ. 2 (1999)



Παραγωγή διαγονιδιακών προβάτων: Μικροέγχυση της γονιδιακής κατασκευής P77 (pas1-καζεΐνη- χυμοζίνη) των βοοειδών σε ζυγωτά-έμβρυα προβάτων φυλής Χίου

E. VAINAS (Ε. ΒΑΪΝΑΣ), U. BESENFELDER, V. CHRISTODOULOU (Β. ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ), B. KUEHHOLZER, G. C. AMIRIDIS (Γ.Σ. ΑΜΟΙΡΙΔΗΣ), S. BELIBASAKI (Σ. ΜΠΕΛΙΜΠΑΣΑΚΗ), G. BREM

doi: 10.12681/jhvms.15707

Copyright © 2018, E VAINAS, U BESENFELDER, V CHRISTODOULOU, B KUEHHOLZER,, GS AMIRIDIS, S BELIBASAKI, G BREM

Άδεια χρήσης Creative Commons Αναφορά-Μη Εμπορική Χρήση 4.0.

Βιβλιογραφική αναφορά:

VAINAS (Ε. ΒΑΪΝΑΣ) E., BESENFELDER, U., CHRISTODOULOU (Β. ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ) V., KUEHHOLZER, B., AMIRIDIS (Γ.Σ. ΑΜΟΙΡΙΔΗΣ) G. C., BELIBASAKI (Σ. ΜΠΕΛΙΜΠΑΣΑΚΗ) S., & BREM, G. (2018). Παραγωγή διαγονιδιακών προβάτων: Μικροέγχυση της γονιδιακής κατασκευής P77 (pas1-καζεΐνη- χυμοζίνη) των βοοειδών σε ζυγωτά-έμβρυα προβάτων φυλής Χίου. *Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας*, *50*(2), 138–143. https://doi.org/10.12681/jhvms.15707

https://epublishing.ekt.gr | **e-Εκδότης:** EKT | **Πρόσβαση:** 09/02/2026 08:04:56

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛ. ΚΤΗΝ. ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 1999, 50(2):138-143

Παραγωγή διαγονιδιακών προβάτων: Μικροέγχυση της γονιδιακής κατασκευής P77 (pα$_{S1}$-καζεΐνη- χυμοζίνη) των βοοειδών σε ζυγωτά-έμβρυα προβάτων φυλής Χίου

Ε. Βαϊνάς[1], U. Besenfelder[2], Β. Χριστοδούλου[3], B. Kuehholzer[4], Γ.Σ. Αμοιρίδης[5], Σ. Μπελιμπασάκη[1] και G. Brem[2].

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η δυνατότητα ενσωμάτωσης της γονιδιακής κατασκευής P77 των βοοειδών σε ζυγωτά και έμβρυα δύο κυττάρων προβάτων φυλής Χίου. Η γονιδιακή κατασκευή P77 των βοοειδών περιλαμβάνει 2,9 kb από τον προαγωγέα του γονιδίου της α$_{S1}$ - καζεΐνης που συγχωνεύθηκαν με το γονίδιο της χυμοζίνης ανάμεσα στο 2 και 9 εξόνιο. Η έγχυση της γονιδιακής κατασκευής έγινε με μικροχειριστήριο υπό παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο σε έναν από τους δύο προπυρήνες του ζυγωτού ή στον πυρήνα του ενός βλαστομεριδίου του εμβρύου. Σε κάθε πυρήνα έγινε μικροέγχυση διαλύματος 1 pl, το οποίο περιείχε περίπου 1000 αντίγραφα της αλληλουχίας DNA. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 193 ζυγωτά και 87 έμβρυα δύο κυττάρων, τα οποία συλλέχθηκαν από 49 προβατίνες δότες φυλής Χίου. Τα 175 ζυγωτά και τα 76 έμβρυα δύο κυττάρων, στα οποία η μικροέγχυση διενεργήθηκε με επιτυχία, μεταφέρθηκαν με λαπαροσκοπικές τεχνικές στους ωαγωγούς 68 προβατινών δεκτών μετά από *in vitro* καλλιέργεια 1-5 ωρών. Οι 22 (32,4%) από τις προβατίνες δέκτες γέννησαν 29 αρνιά που αντιστοιχούν στο 11,6% του συνόλου των ζυγωτών - εμβρύων που μεταφέρθηκαν. Η ανάλυση της γενετικής σύστασης των αρνιών που γεννήθηκαν έγινε με τεχνικές PCR σε δείγματα δέρματος. Σε ένα θηλυκό αρνί διαπιστώθηκε ενσωμάτωση της γονιδιακής κατασκευής P77 των βοοειδών στο γονιδίωμά του. Η ανάπτυξη και ενήβωση του διαγονιδιακού αρνιού είναι φυσιολογική, βρίσκεται δε σε κατάσταση εγκυμοσύνης, η οποία εξελίσσεται φυσιολογικά. Είναι το πρώτο διαγονιδιακό παραγωγικό ζώο που γεννήθηκε στην Ελλάδα.

Λέξεις ευρετηρίασης: πρόβατο, μεταφορά γονιδίων, P77, a$_{S1}$-καζεΐνη, χυμοζίνη

ABSTRACT. E. Vainas, U. Besenfelder, V. Christodoulou, B. Kuehholzer, G. S. Amiridis, S. Belibasaki and G. Brem. Production of transgenic sheep: Microinjection of the bovine P77 gene construct in Chios sheep breed zygotes. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society 1999, 50(2):138-143.* **The feasibility of integration of the bovine P77 construct into zygotes and two cell embryos of Chios sheep breed was examined. The P77 gene construct comprised bovine a$_{S1}$ casein promoter regulatory sequence fused to the fragment between exons 2 and 9 of the bovine chymosin gene. One of the two pronuclei of the zygote or a nucleus of a blastomere of a two cell embryo was microinjected with 1 pl of DNA solution containing approximately 1000 copies of the gene construct. In total 193 zygotes and 87 two cell embryos collected from 49 donor ewes were used. After 1 - 5 h culture microinjected zygotes (n=175) and two cell embryos (n=76) were transfered by a laparoscopic technique to the oviducts of 68 recipients. 22 recipients (32.4%) gave birth to 29 lambs which correspond to 11.6% of the total number of zygotes - embryos transferred. PCR analysis performed in skin samples of these lambs revealed that in one ewe lamb the P77 construct has been integrated in its genome. The growth and puberty of this lamb was physiological and is currently pregnant. This is the first transgenic farm animal born in Greece.**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '90 πραγματοποιήθηκαν σημαντικές εξελίξεις στο χώρο της διαγονιδιακής τεχνολογίας. Οι εξελίξεις αυτές πιστεύεται ότι θα οδηγήσουν πολύ σύντομα στη δημιουργία "βιοαντιδραστήρων", οι οποίοι θα έχουν τη δυνατότητα έκφρασης των αλλη-

[1]*ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε., Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης, National Agricultural Research Foundation (N.AG.RE.F), Veterinary Research Institute, Thessaloniki*

[2] *Institut fuer Tierzucht und Genetik, vet. M. Un. Wien*

[3] *ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε., Ινστιτούτο Κτηνοτροφίας, Παραλίμνη Γιαννιτσών. N. AG. RE.F, Animal Research Institute, Paralimni Giannitsa*

[4] *LBI fuer zyto-,immuno-und molekulargenetische Forschung, Wien*

[5] *Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Μαιευτική Κλινική Dept. of Obstetrics and Reproduction, Faculty of Vetertinary Medicine, University of Thessaly*

Ημερομηνία υποβολής: 10.09.98
Ημερομηνία εγκρίσεως: 06.11.98

λουχιών DNA για παραγωγή των επιθυμητών ουσιών από το μαστικό αδένα διαγονιδιακών παραγωγικών ζώων. Τα ζώα αυτά αναμένεται να αποτελέσουν την εναλλακτική λύση παραγωγής ουσιών για φαρμακευτική, διαγνωστική ή βιομηχανική χρήση. Οι ερευνητικές προσπάθειες έχουν επίσης ως στόχο την αύξηση της παραγωγικότητας των ζώων και την προστασία της υγείας των ζώων και του ανθρώπου[1,2,3].

Οι πρώτες επιτυχείς προσπάθειες παραγωγής διαγονιδιακών προβάτων έγιναν το 1985 από τον Hammer και τους συνεργάτες του. Η γονιδιακή κατασκευή που αποτελούνταν από το γονίδιο της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης (hGH) και τον προαγωγέα του γονιδίου της μεταλλοθειονίνης του ποντικού ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα προβάτων με σκοπό την παραγωγή hGH και τη βελτίωση του ρυθμού ανάπτυξης και της σύστασης του σφαγίου[4]. Ακολούθησε η ενσωμάτωση του γονιδίου της βόειας (bGH) και πρόβειας (oGH) αυξητικής ορμόνης στο γονιδίωμα προβάτων[5,6,7].

Σε πρόβατα φυλής Merino έγινε επιτυχής μεταφορά του γονιδίου της ακετυλοσερίνης - σουλφυδρυλάσης[8], της κερατίνης τύπου II[9], της βακτηριακής ακετυλοτρανσφεράσης[10] και του πρόβειου αυξητικού παράγοντα τύπου ινσουλίνης 1 (IGF1)[11], με σκοπό τη βελτίωση της ποσότητας και της ποιότητας του παραγόμενου μαλλιού.

Ερευνητικές προσπάθειες παραγωγής διαγονιδιακών προβάτων ανθεκτικών σε προσβολή από ιούς και μικροοργανισμούς έγιναν με μεταφορά του γονιδίου της ανοσοσφαιρίνης Α του ποντικού[12] και του γονιδίου που καθορίζει την πρωτεΐνη του φακέλου του ιού της προϊούσας πνευμονίας[13].

Η παραγωγή βιοφαρμακευτικών ουσιών για ανθρώπινη χρήση από διαγονιδιακά πρόβατα έγινε με μεταφορά του γονιδίου της ανθρώπινης α1-αντιθρυψίνης[14,15,16] και των γονιδίων που καθορίζουν τους παράγοντες IX[17,18] και VIII[19] , οι οποίοι συμμετέχουν στην πήξη του αίματος του ανθρώπου.

Κύριος στόχος της εργασίας αυτής, η οποία πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Κτηνοτροφίας Γιαννιτσών του ΕΘ.Ι.ΑΓ. Ε, ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας ενσωμάτωσης της γονιδιακής κατασκευής P77 των βοοειδών σε ζυγωτά και έμβρυα δύο κυττάρων προβάτων φυλής Χίου. Η γονιδιακή κατασκευή P77 των βοοειδών περιλαμβάνει την περιοχή του γονιδιώματος στην οποία βρίσκονται το γονίδιο της χυμοζίνης μεταξύ του 2 και 9 εξονίου και 2,9 kb του προαγωγέα του γονιδίου της α_{S1}-καζεΐνης[20]. Μεταφορά ανάλογης γονιδιακής κατασκευής έγινε σε κουνέλια[21] και σε πρόβατα φυλής Romanov[22].

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν 49 προβατίνες δότες εμβρύων φυλής Χίου και 68 προβατίνες δέκτες παράγωγα διασταυρώσεων μεταξύ των φυλών Χίου x Φρισλανδίας και Χίου x Berrichon. Οι προβατίνες δότες ήταν ηλικίας 2-6 ετών και προορίζονταν για εκποίηση. Οι προβατίνες δέκτες ήταν ηλικίας 1-3 ετών.

Ο συγχρονισμός του οίστρου όλων των προβατινών έγινε με την εισαγωγή ενδοκολπικών σπόγγων εμποτισμένων με 30 mg οξικής φθοριογεστόνης (Chrono - gest®, Intervet) για 12 ημέρες. Στα ζώα δέκτες χορηγήθηκαν 400 IU ίππειας χοριακής γοναδοτροφίνης (eCG) την ημέρα της αφαίρεσης των σπόγγων.

Η πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας στα ζώα δότες έγινε με χορήγηση 16 mg ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH-P, Shering, USA) σε 6 μειούμενες δόσεις ανά δωδεκάωρα διαστήματα. Η τελευταία έγχυση έγινε 12 ώρες μετά την εξαγωγή των σπόγγων[23].

Ο προσδιορισμός του χρόνου εκδήλωσης του οίστρου σε όλες τις προβατίνες γινόταν με τη χρησιμοποίηση ανιχνευτών κριών. Η επιβεβαίωση του οίστρου και της ωοθυλακιορρηξίας έγινε με προσδιορισμό της συγκέντρωσης της προγεστερόνης στο πλάσμα του αίματος και επισκόπηση των ωχρών σωματίων με τη χρήση λαπαροσκοπίου.

Η γονιμοποίηση των προβατινών δοτών έγινε με μία ενδομήτρια τεχνητή σπερματέγχυση (Τ.Σ.) με τη χρήση λαπαροσκοπίου 24-28 ώρες μετά την εκδήλωση των συμπτωμάτων του οίστρου. Σε κάθε κέρας έγινε έγχυση 0,3 ml αραιωμένου νωπού σπέρματος που περιείχε $300X10^6$ σπερματοζωάρια.

Η συλλογή των ζυγωτών - εμβρύων έγινε 18-24 ώρες μετά την Τ. Σ. με έκπλυση των ωαγωγών μετά από σφαγή των ζώων δοτών.

Η μεταφορά των ζυγωτών - εμβρύων στους ωαγωγούς των προβατινών δεκτών έγινε 1-5 ώρες μετά τη μικροέγχυση της γονιδιακής κατασκευής με λαπαροσκοπικές τεχνικές[24].

Η διάγνωση της εγκυμοσύνης στις προβατίνες δέκτες έγινε 32-35 ημέρες μετά τη μεταφορά των ζυγωτών - εμβρύων με υπερηχογραφία (κεφαλή γραμμικής σάρωσης 3 MHz).

Γονιδιακή κατασκευή P77

Το δομικό γονίδιο της χυμοζίνης των βοοειδών έχει μήκος 10,5 kb και περιέχει 9 εξόνια. Για τη δημιουργία της γονιδιακής κατασκευής P77 που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, έγινε αρχικά μία τράπεζα γονιδίων βοοειδών με ένα ολιγονουκλεοτίδιο, το οποίο αντιστοιχεί σε ένα μέρος του πρώτου εξονίου[25] και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε το ακέραιο γονίδιο της χυμοζίνης. Με ανάλογη μέθοδο κλωνοποιήθηκαν οι περιοχές 5′ και 3′ του προαγωγέα του γονιδίου της a_{S1}-καζεΐνης των βοοειδών.

Η γονιδιακή κατασκευή P77 περιλαμβάνει τη γενωμα-

τική περιοχή του γονιδίου της χυμοζίνης μεταξύ του 2 και 9 εξονίου και 2,9 kb του προαγωγέα του γονιδίου της a_{S1}-καζεΐνης. Το εξόνιο 1 και το ιντρόνιο 1 καθώς και η περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου της καζείνης που αναγνωρίζει το πεπτίδιο σήμα συγχωνεύθηκαν με τα εξόνια 2 έως και 9 του γονιδίου της χυμοζίνης[20].

Μικροέγχυση της γονιδιακής κατασκευής P77

Η αλληλουχία DNA που χρησιμοποιήθηκε για τη μικροέγχυση δεν περιλαμβάνει καμία ουσία του μέσου κλωνοποίησης. Οι ουσίες αυτές απομακρύνθηκαν μετά από διάσπαση του μέσου κλωνοποίησης για να αποφευχθεί η ενσωμάτωση προκαρυωτικών αλληλουχιών, οι οποίες ενδεχομένως θα επηρέαζαν αρνητικά την έκφραση της γονιδιακής κατασκευής P77.

Η συγκέντρωση της γονιδιακής κατασκευής ήταν 1000 αντίγραφα ανά pI του συμβατικού μέσου διάλυσης. Στον αρσενικό προπυρήνα του ζυγωτού και στον πυρήνα του ενός βλαστομεριδίου των εμβρύων δύο κυττάρων έγινε μηχανική μικροέγχυση 1 pI διαλύματος με μικροπιπέττα εσωτερικής διαμέτρου ≈1 μ υπό παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο (ZEISS ID 03) και σε μεγέθυνση 400X.

Ακολούθησε επώαση των ζυγωτών - εμβρύων για 1-5 ώρες ώστε να διαπιστωθεί η επιτυχής διενέργεια των μικροχειρισμών.

Απομόνωση του DNA

Η απομόνωση του DNA των αρνιών που γεννήθηκαν έγινε σε δείγματα δέρματος, τα οποία επωάσθηκαν για περίπου 24h στους 57 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης που περιείχε K-πρωτεϊνάση[27]. Ακολούθησε εκχύλιση του DNA με φαινόλη, καθίζηση με αιθανόλη (100%) και οξικό νάτριο (3: 0,1 v/v), έκπλυση με αιθανόλη (70%) στους -20 °C, εξαέρωση των εκχυλιστικών μέσων και επαναδιάλυση σε απεσταγμένο νερό. Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm και η καθαρότητα του DNA εκτιμήθηκε με σύγκριση των τιμών μεταξύ 260 και 280 nm.

Ανίχνευση της αλληλουχίας P77 με PCR

Η ανίχνευση της ξένης αλληλουχίας DNA στο γονιδίωμα των αρνιών που γεννήθηκαν έγινε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

Η αντίδραση γινόταν σε διάλυμα συνολικού όγκου 50 μl με την παρακάτω σύνθεση :

Αφετηρίες DNA (primers)	100	pMol
Μίγμα τεσσάρων δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs)	200	μMol/μl.
10X ρυθμιστικό διάλυμα	1:10	v/v
Mg^{2+}	1, 5	mMol/μ I
Taq-Πολυμεράση	1,0	U/μl
DNA	200-500	ng
Αποσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο	50	μl

Το μίγμα καλυπτόταν με παραφινέλαιο για να αποφευχθεί η εξάτμιση και η συμπύκνωση του προϊόντος. Η αντίδραση έγινε σε θερμοκυκλοποιητή. Η αποδιάταξη του DNA έγινε σε 94° C, ο ανασυνδυασμός σε 61 και 63° C και ο πολλαπλασιασμός στους 72°C για 45″. Έγιναν συνολικά 36 κύκλοι για τον πολλαπλασιασμό του DNA ως ακολούθως :

Αρ. κύκλου	Αποδιάταξη (χρόνος)	Ανασυνδυασμός (χρόνος)
1	5′	30″
2-5	15″	15″
6-36	5″	5″

Το τελικό προϊόν της αντίδρασης αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τις 49 προβατίνες δότες οι 44 (89,8%) εκδήλωσαν συμπτώματα οίστρου 24-26 ώρες μετά την εξαγωγή των σπόγγων, οι 3 μετά από 30 ώρες και οι 2 μετά από 36 ώρες. Από τις 68 προβατίνες δέκτες, οι 59 (86,8%) εκδήλωσαν συμπτώματα οίστρου 48-50 ώρες μετά την εξαγωγή των σπόγγων, οι 3 μετά από 54 ώρες και οι 6 μετά από 60 ώρες.

Ο μέσος αριθμός των ωχρών σωματίων ανά προβατίνα δότη (ΠΔ) ήταν 12,7 ± 6,66. Συλλέχθηκαν συνολικά 390 ωάρια - ζυγωτά - έμβρυα (62,6% των ωχρών σωματίων, 8,0 ± 5,21 ανά ΠΔ), από τα οποία τα 310 (79,5%, 6,3 ± 4,4 ανά ΠΔ) ήταν γονιμοποιημένα και τα 280 (71,8%, 5,7 ± 4,27 ανά ΠΔ) κρίθηκαν κατάλληλα για μικροεπεμβάσεις (Πίνακας 1).

Μετά τη μικροέγχυση της αλληλουχίας P77 και επώαση των ζυγωτών εμβρύων για 1-5 ώρες κρίθηκαν κατάλληλα για μεταφορά τα 251, από τα οποία τα 175 (69,7%) βρίσκονταν στο στάδιο του ζυγωτού και τα 76 (30,3%) στο στάδιο του εμβρύου δύο κυττάρων. Ο αριθμός αυτός αντιστοιχεί στο 89,6% των κατάλληλων για μικροέγχυση εμβρύων και στο 64,4% των ωαρίων - ζυγωτών - εμβρύων που συλλέχθηκαν. Ο μέσος αριθμός των κατάλληλων για μεταφορά ζυγωτών-εμβρύων μετά από τη μικροέγχυση της αλληλουχίας P77 ανά προβατίνα δότη ήταν 5,12 ± 4,5.

Τα 251 ζυγωτά-έμβρυα μεταφέρθηκαν σε 68 προβατίνες δέκτες, οι οποίες βρίσκονταν σε στάδιο του οιστρικού κύκλου ανάλογο με το στάδιο εξέλιξης των ζυγωτών-εμβρύων. Σε κάθε προβατίνα δέκτη μεταφέρθηκαν 3-5 ζυγωτά-έμβρυα ανάλογα με την ποιότητα των ζυγωτών-εμβρύων, την ηλικία και τη σωματική διάπλαση της προβατίνας δέκτη.

Σε 23 προβατίνες δέκτες (33,8%) διαπιστώθηκε εγκυμοσύνη με τη χρήση υπερηχογραφίας 32-35 ημέρες μετά τή μεταφορά των ζυγωτών-εμβρύων. Εκτιμήθηκε ότι κυοφορούνταν 43 έμβρυα, αριθμός που αντιστοιχεί στο 17,1 % των μεταφερθέντων ζυγωτών-εμβρύων και στο 11, 0% των ωαρίων-ζυγωτών-εμβρύων που συλλέχθηκαν.

Πίνακας 1. Αντίδραση ωοθηκών, ζυγωτά-έμβρυα που συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν και αρνιά που γεννήθηκαν μετά από μικροέγχυση της γονιδιακής δομής P77.

	n	Μ.Ο. Π.Δ.	1 n=390	2 n=280	3 n=251
Προβατίνες δότες (ΠΔ)	49				
Ωχρά σωμάτια	623	12,7±6,66			
Ωάρια-ζυγωτά-έμβρυα	390	8,0±5,21			
Γονιμοποιημένα ωάρια	310	6,3±4,4	79,5		
Ζυγωτά-έμβρυα στα οποία έγινε μικροέγχυση	280	5,7±4,27	71,8		
Ζυγωτά-έμβρυα που μεταφέρθηκαν	251	5,12±4,5	64,4	89,6	
Κυοφορούμενα έμβρυα (Υπερηχογραφία)	43	0,9	11,0	15,4	17,1
Γεννηθέντα αρνιά	29	0,6	7,4	10,4	11,6
Διαγονιδιακά αρνιά	1	0,02	0,256	0,357	0,398

1. Ποσοστό (%) σύμφωνα με τα ωάρια-ζυγωτά-έμβρυα που συλλέχθηκαν
2. Ποσοστό (%) σύμφωνα με τα ζυγωτά-έμβρυα στα οποία έγινε μικροέγχυση
3. Ποσοστό (%) σύμφωνα με τα ζυγωτά-έμβρυα που μεταφέρθηκαν

Οι 22 (32,3%) από τις προβατίνες αυτές γέννησαν 29 αρνιά (16 αρσενικά και 13 θηλυκά), τα οποία αντιστοιχούν στο 11,6% των μεταφερθέντων εμβρύων και στο 7,4% των ωαρίων-ζυγωτών-εμβρύων που συλλέχθηκαν. Ο μέσος αριθμός των αρνιών που γεννήθηκαν ανά προβατίνα δότη ήταν 0,6.

Το μέσο σωματικό βάρος των 16 μονόδυμων αρνιών κατά τον τοκετό ήταν 4,87 ± 0,5 kg για τα 10 αρσενικά και 4,85 ± 0,29 για τα 6 θηλυκά, των 10 δίδυμων αρνιών ήταν 3,96% ± 0,15 kg για τα αρσενικά και 3,74 ± 0,85 για τα θηλυκά και των τρίδυμων ήταν 4,0 kg για το αρσενικό και 3,1 για τα δύο θηλυκά. Τα 28 αρνιά γεννήθηκαν ζωντανά και το 1 νεκρό. Η περαιτέρω ανάπτυξη όλων των αρνιών ήταν φυσιολογική. Όλα τα θηλυκά παράγωγα βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης, η οποία εξελίσσεται φυσιολογικά.

Η ανίχνευση της ξένης αλληλουχίας P77 των βοοειδών σε δείγματα δέρματος των 29 αρνιών που γεννήθηκαν, απέδειξε την ενσωμάτωση της στο γονιδίωμα ενός θηλυκού αρνιού. Το αρνί αυτό γεννήθηκε δίδυμο μετά από μεταφορά 4 ζυγωτών, στα οποία έγινε μικροέγχυση της αλληλουχίας, σε μια προβατίνα δέκτη. Το διαγονιδιακό αυτό αρνί αντιστοιχεί στο 3,45% των αρνιών που γεννήθηκαν, στο 0,4% των μεταφερθέντων εμβρύων και στο 0,26% των ωαρίων-ζυγωτών-εμβρύων που συλλέχθηκαν. Ο μέσος αριθμός των διαγονιδιακών παραγώγων ανά προβατίνα δότη ήταν 0,02. Το σωματικό βάρος του αρνιού κατά τον τοκετό ήταν 3,8 κιλά, η ανάπτυξη και η ενήβωση του ήταν φυσιολογική και κυοφορεί δύο έμβρυα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σύσταση του γάλακτος των παραγωγικών ζώων είναι δυνατό να τροποποιηθεί σημαντικά με την εισαγωγή ξένων αλληλουχιών DNA στο γονιδίωμά τους. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος του προβάτου μπορούν να κωδικοποιηθούν από ξένα γονίδια σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%. Οι ξένες πρωτεΐνες παράγονται συμπληρωματικά και φαίνεται ότι δεν επηρεάζουν τη φυσιολογική σύσταση του γάλακτος[28].

Όμως, παρά τις σημαντικές βελτιώσεις, οι οποίες έγιναν τελευταία στις επί μέρους μεθόδους και τεχνικές που εφαρμόζει η διαγονιδιακή τεχνολογία, εξακολουθούν να υπάρχουν σημαντικοί ανασταλτικοί παράγοντες χρησιμοποίησης διαγονιδιακών παραγωγικών ζώων για συνεχή και σταθερή παραγωγή των επιθυμητών ουσιών από το μαστικό τους αδένα. Τα προβλήματα αυτά εστιάζονται στο χαμηλό ποσοστό ενσωμάτωσης της ξένης αλληλουχίας DNA, στο μικρό αριθμό των παραγόμενων διαγονιδιακών ζώων και στη μη σταθερή μεταβίβαση της ξένης αλληλουχίας στους απογόνους διαγονιδιακών γεννητόρων[28,29].

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτει ότι οι προβατίνες της φυλής Χίου ανταποκρίνονται στις υψηλές απαιτήσεις των προγραμμάτων παραγωγής διαγονιδιακών προβάτων[19], σε ό,τι αφορά στο συγχρονισμό του οίστρου (το 89,8% των προβατινών δοτών εκδήλωσαν οίστρο στον επιθυμητό χρόνο), στην ανταπόκριση των ωοθηκών στην πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας (12,7 ± 6,66 ωχρά σωμάτια ανά προβατίνα δότη) και στον αριθμό των κατάλληλων για μικροεπεμβάσεις ζυγωτών - εμβρύων (5,7 ± 4,27 ζυγωτά - έμβρυα ανά προβατίνα δότη).

Η εκδήλωση του οίστρου των προβατινών δοτών στον επιθυμητό χρόνο διευκόλυνε σημαντικά τη διενέργεια όλων των επί μέρους εργασιών όπως είναι η ενδομήτρια Τ.Σ. και η συλλογή, οι μικροχειρισμοί και η μεταφορά των

εμβρύων.

Η ποιότητα και το στάδιο εξέλιξης των ζυγωτών - εμβρύων (το 62,3% των γονιμοποιημένων ωαρίων βρισκόταν στο στάδιο του ζυγωτού και το 28,1% στο στάδιο του εμβρύου των δύο κυττάρων), καθώς και η επιτυχής μικροέγχυση της γονιδιακής κατασκευής στο 89,6% των ζυγωτών - εμβρύων είχαν ως αποτέλεσμα τη μεταφορά 5,12 ± 4,5 ζυγωτών - εμβρύων ανά προβατίνα δότη, αριθμός που κρίνεται ικανοποιητικός[19,22].

Ο αριθμός των ζυγωτών - εμβρύων που εξελίχθηκαν μετά τη μεταφορά τους στις προβατίνες δέκτες (17,1 % την ημέρα 32-35) καθώς και ο αριθμός των αρνιών που γεννήθηκαν (11,6%) είναι ανάλογος με όσα αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία[6,11].

Ο αριθμός των διαγονιδιακών αρνιών που γεννήθηκαν παραμένει σε χαμηλά επίπεδα. Το ένα διαγονιδιακό αρνί αντιστοιχεί στο 3,45% των αρνιών που γεννήθηκαν, στο 0,40 των μεταφερθέντων ζυγωτών - εμβρύων, στο 0,36% των εμβρύων που ήταν κατάλληλα για μικροέγχυση και στο 0,26% των συλλεχθέντων ωαρίων - ζυγωτών - εμβρύων. Για την παραγωγή του διαγονιδιακού αρνιού χρησιμοποιήθηκαν 49 προβατίνες δότες (0,02 διαγονιδιακά αρνιά ανά δότη).

Χαμηλά ποσοστά παραγωγής διαγονιδιακών προβάτων αναφέρονται επίσης σε όλες τις ερευνητικές προσπάθειες, ανεξάρτητα από τη γονιδιακή δομή και το μέσο μεταφοράς της, καθώς και το έτος διεξαγωγής των πειραματισμών.

Μετά από μικροέγχυση του γονιδίου της bGH και της hGH που πραγματοποίησαν οι Rexroad και συν. (1991) σε 247 και 171 ζυγωτά προβάτου γεννήθηκαν 42 (17%) και 16 (9,4%) αρνιά, από τα οποία τα 11 (4,45 %) και 4 (2,3%) ήταν διαγονιδιακά και στα 3 (1,2%) και 2 (1,2%) αντίστοιχα εκφράσθηκαν τα ξένα γονίδια[6].

Στα πλαίσια ενός ευρέος προγράμματος παραγωγής ουσιών που επηρεάζουν την πήξη του αίματος του ανθρώπου οι Halter και συν. (1993) πραγματοποίησαν μικροέγχυση των αλληλουχιών pPβLacFVIII, pPβLacFVIIIMtI και pPMtFVIII σε 613, 73 και 57 ζυγωτά. Γεννήθηκαν 192 (31,3%), 17 (23,3%) και 21 (36,8%) αρνιά αντιστοίχως, από τα οποία τα 2 (0,33%) έφεραν την αλληλουχία pPβLacFVIII και 1 (1,75%) τη γονιδιακή δομή pPMtFVIII[19].

Οι Clements και συν. (1994) πραγματοποίησαν μικροέγχυση της αλληλουχίας DNA που περιλάμβανε την περιοχή U3 του γονιδίου που καθορίζει το φάκελο του ιού Visna σε 300 ζυγωτά προβάτου. Από τα 87 (29%) αρνιά που γεννήθηκαν στα 3 (1%) διαπιστώθηκε ενσωμάτωση της ξένης αλληλουχίας[13].

Η αλληλουχία DNA που περιλάμβανε 14 kb pba_{S1} - καζεΐνης - χυμοζίνης μεταφέρθηκε σε 68 ζυγωτά προβάτου από τον Ernst και συν. (1995). Από τα 22 (32,4%) αρνιά που γεννήθηκαν τα 2 (2,9%) ήταν διαγονιδιακά[22].

Μετά από μικροέγχυση της αλληλουχίας DNA της βακτηριακής ακετυλοτρανσφεράσης (CAT) σε 364 ζυγωτά προβάτου από τους Damak και συν. (1996), γεννήθηκαν 31 (8,5%) αρνιά από τα οποία τα 4 (1,1%) ήταν διαγονιδιακά[10].

Οι Damak και συν. (1996) πραγματοποίησαν μικροέγχυση της γονιδιακής κατασκευής oIGF1 cDNA σε 591 ζυγωτά προβάτου. Σε 2 (0,34%) από τα 5 (0,85%) διαγονιδιακά αρνιά που γεννήθηκαν, διαπιστώθηκε έκφραση της ξένης γονιδιακής κστασκευής[11].

Το σωματικό βάρος γέννησης, η ανάπτυξη και η αναπαραγωγική ικανότητα της διαγονιδιακής αμνάδας που προέκυψε από τον πειραματισμό αυτό δεν επηρεάστηκαν από την ενσωμάτωση της γονιδιακής κατασκευής P77 στο γονιδίωμά της. Η διαγονιδιακή αμνάδα κυοφορεί 2 έμβρυα. Αναμένεται ο τοκετός, ώστε να διαπιστωθεί η έκφραση της ξένης γονιδιακής κατασκευής στο μαστικό της αδένα.

Ανάλογες αλληλουχίες DNA που αποτελούνταν από το γονίδιο της χυμοζίνης των βοοειδών και τμημάτων του προαγωγέα γονιδίου της a_{S1}, καζεΐνης και 14kb pba_{S1} - καζεΐνης - χυμοζίνης μεταφέρθηκαν επιτυχώς σε ζυγωτά κουνελιού[21] και προβάτων φυλής Romanov[22]. Το γάλα που συλλέχθηκε από ένα διαγονιδιακό κουνέλι σε διάστημα 42 ημερών περιείχε ποσότητα χυμοζίνης ικανής για την πήξη 10.000 kg γάλακτος αγελάδας[21]. Η ποσότητα χυμοζίνης που μπορεί να παραχθεί ανά έτος από ένα διαγονιδιακό πρόβατο φυλής Romanov (μέση γαλακτοπαραγωγή 100 kg γάλακτος ανά γαλακτική περίοδο) εκτιμάται ότι θα ήταν ικανή για την παραγωγή 30.000 kg τυριού από γάλα αγελάδας[22]. Η ενδεχόμενη έκφραση της γονιδιακής κατασκευής P77 στο μαστικό αδένα των προβάτων της φυλής Χίου αναμένεται να έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή πολλαπλάσιας ποσότητας χυμοζίνης, λόγω της υψηλής γαλακτοπαραγωγικής ικανότητας της φυλής.

Στις παραπάνω εργασίες δε γίνεται αναφορά στις συγκεντρώσεις της a_{S1} καζεΐνης στο γάλα των κουνελιών και προβάτων.

Τα συμπεράσματα της εργασίας αυτής συνοψίζονται στα εξής :

- Οι προβατίνες της φυλής Χίου ανταποκρίνονται πολύ ικανοποιητικά στις υψηλές απαιτήσεις των προγραμμάτων παραγωγής διαγονιδιακών προβάτων.
- Το πρώτο διαγονιδιακό αρνί φυλής Χίου που γεννήθηκε στην Ελλάδα πλεονεκτεί έναντι των διαγονιδιακών προβάτων των άλλων φυλών, λόγω της υψηλής γαλακτοπαραγωγικής ικανότητας της φυλής.
- Απαιτούνται πολύπλευρες έρευνες για τη βελτίωση του τελικού ποσοστού παραγωγής διαγονιδιακών προβάτων.

Οι ερευνητικές δραστηριότητες, οι οποίες επικεντρώνονται τελευταία στην κλωνοποίηση διαγονιδιακών εμβρύων και ζώων, στην ανίχνευση του ξένου γονιδίου σε έμβρυα πριν από τη μεταφορά τους και στη δημιουργία χιμαιρικών ατόμων με τη μεταφορά αρχέγονων γεννητικών κυττάρων διαγονιδιακών εμβρύων, αναμένεται να συμβάλουν σημαντικά στην αύξηση του αριθμού των παραγόμενων διαγονιδιακών ζώων και στη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της διαγονιδιακής τεχνολογίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Rucker EB, Piedrahita JA. Cre-mediated recompination at the murine whey acidic protein (mWAP) locus. Theriogenology 1997, 47: 228
2. Lee CS, Choi YH, Oh KB, Kang YK, Lee KK. Temporal - and spatial specific expression of bovine b-casein/bovine growth hormone fusion gene in transgenic mice. Theriogenology 1997, 47 : 225
3. Gavin WG, Pollock D, Fell P, Yelton D, Cammuso C, Harrington M, Lewis-Williams J, Midura P, Oliver A, Smith TE, Wilburn B, Echelard Y, Meade H. Expression of the antibody hBR96-2 in the milk of transgenic mice and production of hBR96-2 transgenic goats. Theriogenology 1997, 47 : 214.
4. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. Production of transgenic Rabbits, Sheep and Pigs by microinjections. Nature 1985, 315:680-683 .
5. Rexroad CE, Hammer RE, Behringer RR, Palmiter RD, Brinster RL. Insertion expression and physiology of growth vepulating genes in ruminants J Reprod Fert 1990, (supp.) 41:119-124
6. Rexroad CE, Mayo K, Bolt DJ, Elsasser TH, Miller KF, Behtinger RR, Palmiter RD, Brinster RL. Transferrin and albumin directed expression of growth - related peptides in transgenic sheep. J anim Sci 1991, 69 (7) : 2995-3004.
7. Murray JD, Nancarow CD, Marshafl JT, Hazelton 1G, Ward KA. Production of transgenic merino sheep by microinjection of ovine metallotheionine - ovine growth hormone fusion genes. Reprod Fertil Develop 1989, 1:147-155.
8. Ward KA, Nancarrow CD. The genetic engineering of production traits in domestic animals. Experimentia 1991, 47: 913-922.
9. Powell BC, Walker SK, Bawden CS, Sivaprasad AV, Rogers GE. Transgenic sheep and wool growth : possibilities and current status. Reprod Fertil Develop 1994, 6(5) : 615-623.
10. Damak S, Jay NP, Barell GK, Bullock DW. Targeting gene expression to the wool follicle in transgenic sheep. Biotechnology, 1996, 14 (2): 181-184.
11. Damak S, Su-Hung Y, Jay NP, Bullock DW, Su HY. Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin like growth factor 1. Biotechnology, 1996, 14(2):185-188.
12. Lo D, Pursel V, Linton PJ, Sandgren E, Behringer R, Rexroad C, Palmiter RD, Brinster RL. Expression of mouse IgA by transgenic mice pigs and sheep. Eur J Immunol 1991, 21:1001-1006.
13. Clements JE, Wall RJ, Narayan O, Hauer D, Sheffer D, Powell AM, Zink MC, Rexroad CE. Transgenic sheep that express the visna virus envelope gene. Theriogenology 1994, 41:180.
14. Simons JP, Wilmut I, Clark AJ, Archibald AL, Bishop JO, Lathe R. Gene transfer into sheep. Biotechnology 1988, 6: 179-183.
15. Carver A, Wright G, Cottom D, Cooper J, Dalrymple M, Temperley S. Udell M, Reeves D, Percy J, Scott A, Barrass D, Gibson Y, Jeffrey Y, Samuel C, Colman A, Garner I. Expression of human alpha 1 antitrypsin in transgenic sheep. Cytotechnology 1992 9: 77-84.
16. McClenaghan M, Archibald AL, Hatris S, Simons JP, Writelaw CBA , Wilmut I, Clark AJ. Production of human alpha 1 - antitrypsin in the milk of transgenic sheep and mice: targeting expression of cDNA sequences to the mammaty gland. Animal Biotechnology 1991, 2:161-176.
17. CIark AJ, Bessos H, Bishop JO, Brown P, Harris S, Lathe R, McClenaghan M, Prowse C, Simons JP, Whitelaw CBA, Wilmut I. Expression of human anti-hemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep. Biotechnology 1989, 7:487-492.
18. Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KHS. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. Science, Washington, 1997, 278 (5346) : 2130-2133.
19. Halter R, Carnwath J, Espanion G, Herrmann D, Lemme E, Niemann H , Paul D. Strategies to express factor VIII gene constructs in the ovine mammary gland. Theriogenology 1993, 39:137-149.
20. Brem G, Hartl P. High-level expression of prochymosin in the milk of transgenic rabbits. In Frontiers of Biotechnology in Agriculture, Conference 1-4 August, 1991, Sea of Galilee, Israel
21. Brem G, Besenfelder U, Zinovieva N, Seregi J, Solti L, Hartl P. Mammary gland specific expression of chymosin constructs in transgenic Rabbits. Theriogenology 1995, 43(1) :175.
22. Ernst LK, Gol'dman IL, Zivov'-eva NA, Bashkeev ED, Gogolevskii PA, Kadulin SG, Brem G. Production of transgenic sheep carrying the gene construction alpha S1 casein/chymosin Doklady - Biochemistry 1995, 345(4):187-189.
23. Boscos C, Vainas E, Kouskoura Th, Samartzi F, Vafiadis D, Dellis S. Superovulatory response of Chios and Friesian ewes to two FSH-P dose IeveIs. Reprod dom anim. 1997 (32):195-198.
24. Kuehholzer B, Endoskopische Embryotransferverfahren bein Schaf. Wien vet. med. U, Diss. 1996.
25. Hidaka M, Sasaki K, Unzumi T, Beppu T. Cloning and structural analysis of the calf prochymosin gene. Gene 1986, 43:197-203
26. Bonsing J, Mackinlay AG. Recent studies on nucleotide sequences encoding the caseins. J Dairy Res 1987, 54:447-461
27. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current protocols in molecular biology John Willey and Sons, 1987, New York.
28. Colman A. Production of proteins in the milk of transgenic livestock : problems, solutions and successes. Am J Clin Nutr. 1996, 63 (4), 639-645.
29. Menck MC, Mercier Y, Lobo RB, Heyman Y, Renard JP, Thompson EM. In vivo luminescent selection of putative transegenic bovine blastocysts. Theriogenology 1997, 47 : 227.