

Развитие клонированных эмбрионов свиней *in vitro* в зависимости от интервала между слиянием и дополнительной активацией

Научный руководитель – Сингина Галина Николаевна

Лопухов Александр Викторович

Сотрудник

Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста, Лаборатория экспериментальной эмбриологии, поселок Дубровицы, Россия
E-mail: vubi_myaso@mail.ru

Соматическое клонирование - одна из важнейших вспомогательных репродуктивных технологий, позволяющая копирование ценных в селекционном отношении животных, а также создание редактированных животных с нокаутом/нокином по целевому гену, обладающих повышенной продуктивностью, резистентностью или продуцирующих рекомбинантные белки для терапии заболеваний человека. Результативность соматического клонирования в большой степени определяется событиями, происходящими в период между слиянием цитопласта (энуклеированный ооцит) и кариопласта (соматическая клетка) и активацией полученного цитогбрида (ооцит, слившийся с соматической клеткой), в частности, перепрограммированием ядра донорской клетки. В настоящей работе была проведена оценка влияния параметров искусственной активации на жизнеспособность и качество клонированных эмбрионов свиней. Объектами исследования служили ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК), выделенные из яичников свиней не позднее 3 часов после их убоя. Отобранные группы (по 25-30 клеток в каждой) культивировали *in vitro* в течение 22 часов в модифицированной среде ТС 199 с 10% фетальной бычьей сыворотки, ЛГ и ФСГ, следующие 22 часа - в той же среде без гормонов. После этого удаляли клетки кумулюса в 0,1% растворе гиалуронидазы и отбирали ооциты с первым полярным тельцем (ППТ). Удаление ядра у созревших ооцитов проводили путем отбора ППТ и 20-30% ооплазмы инъекционным капилляром диаметром 15 мкм на микроманипуляторе Narishige. В качестве кариопластов использовали фетальные фибробласты. Кариопласт переносили в перивителлиновое пространство энуклеированного ооцита через отверстие в зоне пеллюцида, сформированное при энуклеации. Комплексы цитопласт-кариопласт объединяли 2 импульсами постоянного тока напряжением 25 В и продолжительностью 30 мкс. Часть полученных цитогбридов дополнительно активировали 5 мМ иономицином через 1,0 или 2,0 ч после слияния и культивировали *in vitro* до стадии бластоцисты. Эксперименты были выполнены в 4-х независимых повторностях. Данные обрабатывали при помощи программного пакета SigmaStat. Не выявлено различий по дроблению и развитию до стадии бластоцисты между цитогбридами, активированными в результате электрической стимуляции и дополнительной химической активации через 1,0 час после слияния. Удлинение интервала между слиянием и дополнительной активацией комплексов цитопласт-кариопласт в 5 мМ иономицине с 1,0 до 2,0 часов приводило к снижению числа клонированных зигот, приступивших к первому делению дробления на 18,6% и развившихся до стадии бластоцисты на 7,8% ($p < 0,05$). В этом же случае наблюдалось существенное ухудшение дробления (в 1,3 раза, $p < 0,05$) и выхода бластоцист (в 2,1 раза, $p < 0,01$) по сравнению с одномоментной со слиянием электроактивацией. Следовательно, дополнительная химическая активация не оказывает положительного влияния на развитие цитоплазматических гибридов свиней, а увеличение интервала между слиянием и дополнительной активацией приводит к снижению эффективности соматического клонирования свиней.