

Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Genetika és Biotechnológiai Intézet

**TRANSZPOZON ALAPÚ TRANSZGENEZISSEL ELŐÁLLÍTOTT TRANSZGÉNIKUS NYULAK GENETIKAI
JELLEMZÉSE**

Garai Éva Enikő

Mezőgazdasági biotechnológus MSc II. évf.

Konzulens: Dr. Hiripi László, tudományos munkatárs

Tanszékvezető: Dr. Kiss Erzsébet, egyetemi tanár

Gödöllő

2011

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK.....	3.
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5.
2.1. Transzgénikus emlősállatok, valamint hasznosításuk.....	5.
2.2. Transzgénikus állatok felhasználása a mezőgazdaságban.....	5.
2.3. A transzgénikus állatok alkalmazása a gyógyászatban.....	8.
2.4. Transzgénikus állatok az iparban.....	10.
2.5. Főbb transzgénikus technikák emlősökben.....	10.
2.5.1. Mikroinjektálás.....	11.
2.5.2. Klónozás.....	12.
2.5.3. Retrovírus mediálta génbevitel.....	12.
2.5.4. Spermiummal történő génbevitel.....	12.
2.5.5. Embrionális őssejtekkel való transzgénikus állat előállítás.....	13.
2.6. Transzgénikus technikák nyúlban.....	13.
2.7. Az eukarióta transzpozonok.....	14.
2.8. A DNS transzpozonok felhasználása transzgénikus állatok előállítására.....	15.
2.9. A Sleeping Beauty jellemzése és alkalmazása transzgénikus területen.....	16.
2.10. A Sleeping Beauty transzgenezis nyúlban.....	16.
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	18.
3.1. Genomiális DNS izolálása nyúl szövetekből.....	18.
3.2. Teljes RNS izolálása nyúl szövetekből.....	18.
3.3. Nukleinsav elektroforézis.....	18.
3.4. Fehérje izolálás.....	19.
3.5. PCR (Polimeráz láncreakció).....	19.
3.6. Felhasznált oligonukleotidok.....	19.
3.7. cDNS szintézis és RT-PCR (Reverz transzkripció-polimeráz láncreakció)....	20.
3.8. Western hibridizáció.....	20.
3.9. Az YFP fehérje detektálása lámpával.....	21.
3.10. A transzgénikus állatvonalak fenntartása és szaporítása.....	21.
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS.....	23.
4.1. A transzgén (Venus) kimutatása az alapító utódaiból.....	23.
4.2. A transzgén utódlásának megvitatása, összevetve a várható mendeli arányokkal.....	24.

4.3.	A transzgén detektálása különböző szövetekben RNS szinten.....	25.
4.4.	A transzgén kifejeződésének vizsgálata fehérje szinten Western hibridizációval.....	28.
4.5.	A transzgén kifejeződésének vizuális megjelenítése.....	28.
5.	KÖVETKEZTETÉS	31.
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	32.
7.	IRODALOMJEGYZÉK	35.

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

A genetikai állomány megváltoztatása az emlősállatokban már több mint huszonöt éves múltra tekint vissza. Mára nemcsak az alap kutatás, hanem a gyógyászat, az ipar és a mezőgazdaság is hasznosítja a genetikailag módosított állatok által elért eredményeket, illetve közvetlenül felhasználja őket a gyakorlatban.

Annak ellenére, hogy az alkalmazott eljárások már rutinszerűek, a technológiai fejlesztés folyamatos. Ez nemcsak annak köszönhető, hogy egyre hatékonyabb eljárások látnak napvilágot, hanem az állati jólét biztosítása is kikényszeríti az egyre jobb hatásfokkal működő technikai újításokat.

1950-ben Barbara McClintock fedezte fel, hogy a kukoricának olyan génjei vannak, amelyek egyik kromoszómáról a másikra ugrálnak, ezzel a kukoricaszem színében változásokat okoznak. Mivel ezzel a megállapítással megelőzte a korát – a DNS szerkezetét sem ismerték ekkor – sokáig nem vették komolyan. Miután Watson és Crick 1953-ban nyilvánosságra hozták a DNS kettős spirál szerkezetét felgyorsultak az ilyen irányú kutatások. Azonban még így is több mint 30 év kellett mire elfogadták Barbara McClintock felvetését – ekkor, 1983-ban Nobel-díjjal jutalmazták. Megfogalmazta, hogy a kukorica nem stabil mutánsai a mozgékony genetikai elemeknek köszönhetőek, amelyek képesek egyik DNS-ről a másikra áthelyeződni úgy, hogy közben géneket ki- és bekapcsolnak, egymás hatását felerősítik, illetve befolyásolják.

Mára a géntechnológiai eljárásoknak köszönhetően a mozgékony genetikai elemeket széleskörűen alkalmazzák a gyakorlatban. Az egyik felhasználási területe ezeknek az elemeknek, hogy megpróbálják velük fokozni a transzgenezis hatékonyságát, köszönhetően annak, hogy képesek beintegrálódni a genomba.

Kísérleteink során a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban a világon elsőként a transzgénikus nyulak létrehozására alkalmas Sleeping Beauty transzpozon rendszert vizsgáltuk. Célunk az volt, hogy megállapíthassuk, hogy az alkalmazott módszer milyen hatékonysággal öröklődik az alapító egyedekből a következő generációba, valamint molekuláris módszerekkel tanulmányoztuk, hogy az alkalmazott riporter gén hogyan nyilvánul meg RNS továbbá fehérje szinten az utódokban.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Transzgénikus emlősállatok, valamint hasznosításuk

Transzgénikus, vagy genetikailag módosított minden olyan állat, amely emberi segítséggel bejuttatott, vagy megváltoztatott nukleinsavat hordoz a genomjában. Szűkebb értelemben akkor tekintjük őket felhasználható, és valódi transzgénikus állatoknak, ha örökítik is a genetikai módosítást. Transzgénikus állatokat két esetben érdemes létrehozni. Teljesen új tulajdonságok bevitele esetén, másrészt olyan gének esetében ahol egy közeli másik gén negatívan befolyásolja a kialakítandó tulajdonságot. Ebben az esetben a hagyományos tenyésztési eljárásokkal nem, vagy csak nagyon nehezen hozható létre a kívánt fenotípus. Ezeken a problémákon segítenek a transzgénikus technikák (BŐSZE, 2000).

2.2. Transzgénikus állatok felhasználása a mezőgazdaságban

A transzgénikus állatok felhasználásának egyik első kísérlete a növekedési erély fokozását tűzte ki célként. PALMITER és mtsai (1982) az emberi növekedési hormon génjét juttatták be egér embriókba egy megfelelő szabályozó régió felhasználásával. A folyamat eredményeként a „szuperegérként” elhíresült állat jött létre, amely társaihoz képest kétszer nagyobb volt. Más állatfajban azonban nem sikerült elérni ilyen drasztikus méretnövekedést, viszont az előállított növekedési hormonnal „dúsított” sertéseknél és juhoknál takarmányértékesítési javulást mutattak ki. Ehhez azonban hosszú távon számos egészségügyi probléma kapcsolódott (REXROAD és mtsai, 1991), mint keringési és kiválasztási zavarok és a termékenységük is csökkent. Sertéseknél ízületi- és bőrgyulladást, valamint gyomorfekélyt is leírtak. POURSEL és mtsai (1993) kísérletükben a vágott fűlsertés zsírtartalmát tekintve 85%-os csökkenést kaptak a megnövekedett súlygyarapodás mellett.

Az utóbbi években próbálkoznak a miosztatin gén mutációjával szuperizmoltt állatokat létrehozni, mivel bizonyították, hogy a pietrain és kék-fehér belga szarvasmarha fajtákban is ilyen mutáció okozza a nagyobb izomtömeget. A miosztatin gén egy nagyhatású fehérjét kódol, mely az izomnövekedést szabályozza (MCIPHERON és mtsai, 1997).

A gyapjú minőségének javítására új-zélandi és ausztráliai kutatócsoportok olyan transzgénikus juhok létrehozását tervezték, amelyek nagyobb tömegű és jobb minőségű gyapjút képesek előállítani. A legelők méretének és az állatszám csökkenésével nagyobb szükség lenne ezen állatokra. Sikerült a gyapjú növekedését fokozniuk közvetlenül a szőrtüszőkben az

úgynevezett keratin promóter szabályozásával IGF1 gén termékét túltermeltetve, azonban ez a gyapjú kisebb szálerősségű és durvább tapintású volt és az F2 generációban már nem mutattak ki különbséget (SU és mtsai, 1998). Mivel a gyapjú termelődésének szabályozása nagyon bonyolult folyamat, ezért a jelenlegi kutatások inkább ezen folyamatok feltárását, és nem a közvetlen hasznosítását célozzák.

A betegségekkel szembeni ellenállás fokozása az állattenyésztésben fontos feladat, hiszen az ágazat költségeiből 10-20%-ban részesednek az állategészségügyi költségek. Ezért lenne jó néhány betegséggel szemben rezisztenciát kialakítani, illetve javítani a jelenlegi védekezést a fertőző betegségekkel szemben. Funkciónyerést eredményező genetikai módosítással javítható az ellenálló képesség, ilyenkor általában új gént visznek be, mely kialakítja a rezisztenciát. Történtek kísérletek vírus-burokfehérjék túltermeltetésére, ezáltal kialakítva rezisztenciát juhokban. A bárányok ki is fejezték a vírusfehérjét, de az utódok ellenállóságáról nincsenek információk. Néhányan az immunválaszban szerepet játszó fehérjét termeltettek túl (CHEN és mtsai, 1988) míg mások specifikus rezisztenciagéneket alkalmaztak (KOLB és mtsai, 1992). DE GROOT és mtsai (2001) az IgA ellenanyag szállító receptorának fehérjét fejeztették ki egerek emlőszövetében, de ezzel a tejösszetétel is megváltozott. Szarvasmarhákkal termeltettek emberi laktoferrint és lizozimot, s ennek következtében ellenállóak lettek a tögygyulladás (masztitisz) fertőzéssel szemben (BAWDEN és mtsai, 1994).

Funkcióvesztéssel is kialakítható rezisztencia, mely során egy gént távolítanak el, vagy csökkentik működésének hatékonyságát, így növelve az ellenálló képességet. Funkcióvesztés kialakítható antiszensz RNS gátlás kihasználásával, vagy a ribozim molekulákkal történő gátlás segítségével is (CANTOR és mtsai, 1993).

Leghatásosabbnak bizonyult azonban a betegséget okozó gének kiütése. Egérben végeztek kísérletet a prion fertőzések megakadályozására, a PrP gén kiütésével (WEISMANN és mtsai, 2003). Azóta ezeket a kísérleteket sikerült haszonállatokra is sikeresen kiterjeszteni.

A tej összetételének megváltoztatása is egy a lehetséges célok közül a mezőgazdaságban. A kutatások irányai a feldolgozás megkönnyítését, tápérték növelését, a tejcukor intolerancia mérséklését célozzák meg (BŐSZE, 2000). A tejet kazeinek és savófehérjék alkotják. Elképzelhető ezek egymáshoz viszonyított arányának megváltoztatása, mellyel pl. növekedhetne a Ca-tartalom és jobb lenne a tej hőstabilitása is. Megállapították, hogy egy fehérje túltermeltetése nem okoz egészségkárosodást (CLARK, 1996). A kappa-kazein növelése a micellaméret csökkenését okozza, és stabilabb aggregátumok alakulnak ki, így jobb alvadási tulajdonságokat hoz létre, mely a sajtgyártásban kívánatos (WALL és mtsai, 1997). Sikeres kísérleteket végeztek mind a kappa-kazein mind a béta-kazein túltermeltetésével elsősorban egérben, mint modellállatban. Különböző

szabályozórégiókat és génkonstrukció típusokat teszteltek. Az eredmények mind azt mutatták, hogy ez az irány a mezőgazdaságban valóban hasznosítható, de a fehérjék egy határon túl termeltetése már okozhat problémákat a laktáció normál lefolyásában. A kutatások eredményeként sikerült a problémát végül szarvasmarhában is megoldani és hatékonyan túltermeltetni mind a kappa-, mind a béta-kazeineket, ezáltal technológiai szempontból értékesebb tejet létrehozni transzgénikus állatok felhasználásával (BROPHY és mtsai, 2003).

A béta-laktoglobulin a tehéntej egyik savófehérjéje, mely allergén hatású az emberi szervezet számára. Egér modellben sikerült megoldani azt, hogy a túltermeltetett fehérjét ribozim transzgénikus technikával gátolták, ezáltal csökkentve az allergén anyag mennyiségét. Ez a kutatás haszonállatokban egyelőre nem folytatódott, de ígéretes cél lehet egy funkcionális élelmiszer előállítása (PINTADO és mtsai, 1999).

A felnőtt lakosság nagy része nem képes lebontani a tejcukrot, amely emésztési problémákat okoz számukra. Az alfa-laktalbumin szerepet játszik a tejcukor előállításában. Sikerült az alfa-laktalbumin kiütése egérben, azonban a mutáns állatok teje nagyon tömény lett, így a tejelválasztás is megszűnt. Ennek az lehet az oka, hogy a tejcukor a tej ozmotikus koncentrációját is szabályozza. Ribozim transzgénikus technikával sikerült a tejcukor mennyiségét a fent említett fehérje gátlásával csökkenteni 50-80%-kal. Úgy tűnik azonban, hogy a hagyományos kémiai eljárások fejlődése ebben az esetben gyorsabb, és hatékonyabban, olcsóbban és a fogyasztók számára elfogadhatóbb módon képes a tejipar csökkent laktóz tartalmú tejkészítményeket előállítani.

A tejzsír mennyisége szoros pozitív korrelációban áll a tejfehérje mennyiségével, ezért a hagyományos tenyésztés és nemesítés során nem igazán változtatható. Transzgénikus módszerrel a telített és telítetlen zsírsavak arányát sikerült megváltoztatni a telítetlen irányába (sztearoil-koenzim A termeltetésével) (PINTADO és mtsai, 1999).

2.3. A transzgénikus állatok alkalmazása a gyógyászatban

A transzgénikus állatok felhasználásának legjelentősebb és legsikeresebb területe a gyógyászati alkalmazások széles köre. A transzgénikus állatok mára alapvető fontosságúak az alapkutatásokban, illetve a modellállatok létrehozásában. Sok emberi betegség illetve azok egyes részfolyamatai vizsgálhatók transzgénikus állatokon. Ezen alkalmazások segítik a folyamatok pontos molekuláris szintű megértését. Felhasználásukkal csökkenthető az új hatóanyagok, módszerek mellékhatásainak mértéke az emberi gyógykezelések során (DOYLE és mtsai, 2011). Természetesen a legfontosabb modellállatok a rágcsálók (egér, patkány), azonban újabban egyre jobban előtérbe kerülnek a háziállatok is ilyen szempontból. Elsősorban a sertést kell itt

megemlíteni, mely sok vonatkozásban jobban tükrözi az emberi betegségeket, mint az egyéb laboratóriumi állatok. Például az agykéreg, valamint egyéb agyi betegségek modellállatának sokkal alkalmasabb a sertés illetve a minisertés (KRAUGH és mtsai, 2009).

A modellállatokon túl két nagyon ígéretes területet szeretnék bemutatni a dolgozatban, a xenotranszplantációt, valamint a transzgénikus bioreaktorokat.

A xenotranszplantációs kísérletek célja, hogy transzgénikus állatok szerveit fel tudják használni az emberi szerv pótlásaként. A kísérleteket leginkább minisertéseken végzik (KLYMIUK, 2010). A fajok közötti betegségek átvitelének lehetősége a sertés esetében kicsi, mivel származástaniilag viszonylag távol áll az embertől. Könnyen hozzáférhető faj, szervei anatómiája és mérete hasonló elrendezésű, és új fertőzőes betegségek megjelenése nem valószínű, mert háziasítása óta szorosan együtt él az emberrel. Különböző stratégiákat dolgoztak ki a kutatók, hogy transzgénikus módszerekkel olyan szerveket állíthassanak elő, melyek nem okoznak hiperakut (azonnali) kilökődést, és ily módon a későbbiekben beültethetők legyenek emberi szervek helyére, ezáltal enyhítve a donorok hiánya okozta hosszú várólisták problémáját (GALLI, 2010).

A legígéretesebb és legeredményesebb terület a transzgénikus bioreaktorok hasznosítása. Fehérje jellegű hatóanyagok kiválaszthatók transzgénikus állatok testváladékaiba. Mivel az általuk termelt fehérjét tisztítani kell, ezért nagy mennyiségben termelődő testfolyadékokban termeltetik, pl. vizeletben (ló), tejben (szarvasmarha, kecske, juh), esetleg vérben. Az emlő-specifikus vektorok elterjedésének és a tej kevésbé bonyolult fehérje-összetételének, valamint a termelődő nagy mennyiségének köszönhetően a tejben való termeltetés terjedt el.

1. táblázat: Klinikai kísérleti fázist elért hatóanyag termeltetések (BŐSZE, 2000)

Termék	Felhasználás	Gyártó	Fejlesztési fázis
Alfa-1-antitripszin	Cisztikus fibrózis Tüdőtágulás	PPL	Klinikai II. fázis
Alfa-1 proteináz inhibitor	Örökletes rendellenesség	GTC	Fejlesztés alatt
Antitrombin III	Szív koronáriák bypass	GTC	Klinikai III. fázis
Béta interferon	Szklerózis multiplex	GTC	Fejlesztés alatt
Epe só stimulálta lipáz	Cisztikus fibrózis Akut hasnyálmirigy- gyulladás	PPL	Klinikai kipróbálásra előkészítve
C-1 észteráz inhibitor	Akut szívinfarktus	PHARMING	Klinikai kipróbálásra előkészítve

A táblázat (1. táblázat) csak néhány kiválasztott, és már klinikai kísérleti fázist elért hatóanyag termeltetését mutatja transzgénikus állatokban az ezredfordulón. Az elért eredményekről azonban érdemes megjegyezni, hogy már százas nagyságrendű azon hatóanyagok száma, melyet kísérleti körülmények között termeltetnek transzgénikus állatokban. Ezekbe a kísérletekbe magyar kutatók is bekapcsolódtak, és a Mezőgazdasági Biotechnológiai Központban is különböző hatóanyagokat termeltettek transzgénikus egerek és nyulak tejében. A legfrissebb eredményeket ezen a területen BŐSZE és mtsai foglalják össze a 2008-as cikkükben. A kísérletek sikerét mi sem jelzi jobban, mint hogy 2009-ben az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerbiztonsági Hivatala (FDA) engedélyezte az első genetikailag módosított állat által termelt rekombináns fehérjét, ATryn néven. Ez a készítmény az emberi antitrombin III fehérje, melyet egy ritka genetikai betegségben szenvedők kezelésére lehet alkalmazni (<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/FractionatedPlasmaProducts/ucm134046.htm>). A készítmény már Európában is elérhető.

2.4. Transzgénikus állatok az iparban

A transzgénikus állatok által termelt anyagok mára már az ipart is elérték. Transzgénikus kecsék tejében termelt pókselymet szeretnék felhasználni nagy szilárdságú és könnyű anyagok helyettesítésére (WILLIAMS és mtsai, 2003).

2.5. Főbb transzgénikus technikák emlősökben

A főbb módszerek közé – mellyel transzgénikus emlősellatot lehet létrehozni – tartozik a mikroinjektálás, a genetikailag módosított embrionális őssejtek segítségével való kiméra létrehozás, a retrovírusok felhasználása, a spermiumokkal való génbevitel, valamint a klónozás genetikailag módosított testi sejtek felhasználásával (BŐSZE és GÓCZA, 2005).

2.5.1. Mikroinjektálás

A mikroinjektálás technikája során a megtermékenyített petesejteket kimossák a nőivarú állat petevezetőjéből. Ezeknek a megtermékenyített, még osztódás előtt álló zigótáknak elsősorban apai előmagjába juttatják közvetlenül a kis mennyiségű híg DNS oldatot. (Általában az apai előmag nagyobb és jobban látható.) A bevinni kívánt gén beépülése a kromoszómába véletlenszerűen zajlik.

A zigóta osztódásával a transzgén bejut az utódsejtekbe. Általában 1-50, de akár 1000 kópiában is integrálódhat a transzgén. A módosított embriókat álvemhes anyákba ültetik. Ha a génbeépülés nem egysejtes állapotban történik, a megszületett állat mozaikos lesz, tehát nem tartalmazza minden sejtje a transzgént. Ilyenkor előfordul, hogy az ivarsejtekben sincs jelen, így nem örökíti az adott gént az utódjaiba. Ez a probléma bizonyos fajok esetén elérheti a 30%-ot is. Előnye, hogy nagy DNS szakaszok is bejuttathatók ily módon (pl. mesterséges kromoszómák). A módszer jól jellemzett és olcsónak tekinthető, és gyakorlatilag minden fontos emlősfajban működik. Hátrányai közt említhető meg hogy kis hatékonyságú, a génbevitel véletlenszerű, és nehezen irányítható a génkifejeződés mértéke. A módszer hatékonyságát különböző fajokban az alábbi táblázat tartalmazza (2. táblázat).

2. táblázat: A mikroinjektálás hatékonysága különböző fajokban (BŐSZE, 2000)

Fajok	Embriók száma/ szuperovuláció	Vemhesülési arány (%)	Donorok száma/ recipiens	Születési arány (%)	Transzgenikus állatok (születés %-ában)	F2 generáció születéséig eltelt idő (hónap)
Egér	20	50	2	10-20	15	7,5
Nyúl	20	50	2	10	10	17
Sertés	15	40	2	5-8	10	38
Juh	4	40	1-5	15	5	52
Szarvas-marha	5	20	1	10	5	100

2.5.2. Klónozás

Klónozás során testi sejtet vagy annak sejtmagját ültetik át sejtmag nélküli petesejtbe. A testi sejtek jól transzformálhatók, így transzgenikus állat előállításra alkalmasak. Az első klónozott transzgenikus állatot SCHNIEKE és mtsai hozták létre 1997-ben. A módszer előnyei, hogy minden beültetésre kerülő embrió transzgenikus és a leendő állat ivara befolyásolható. Az előzetes szelekciónak köszönhetően nincs mozaikosság. Rövidebb idő alatt előállítható a kívánt jellemzőkkel rendelkező állat. Célzott génbevitelre és génkiütésre alkalmas. Negatívuma, hogy

nagy a születési halálozás és nagyon kicsi a hatékonyság, valamint a sejtek re-programozásának folyamatát sem ismerik pontosan (SUMER, 2011).

2.5.3. Retrovírus mediálta génbevitel

A retrovírusok közé tartozó vektorokkal már igen korán, 1985-től végeztek transzgénikus kísérleteket. A retrovírusok képesek nem és lassan osztódó sejteket is megfertőzni. A retrovírusok családjába tartozó lentivírusok tűnnek a legalkalmasabb és leghatékonyabb virális vektoroknak. A vektort a korai zigóta perivitellinális terébe juttatják be mikroinjektálással. A vektor tartalmaz virális szabályozó szakaszokat is a beépíteni kívánt génen kívül, ami biztosítja a vírus bejutását és beépülését a sejtmagba. Előnye a nagyon jó hatékonyság (40-60%), valamint az, hogy egy helyre csak egy kópia épül be a transzgénből, mely néha fontos lehet. Hátránya, hogy csak kis DNS szakaszok vihetők be (max. 10 kb), és gyakori hogy sok helyre integrálódik. Nem minden fajban működik nagy hatékonysággal. Továbbá előfordul géncsendesítés metiláció miatt (PFEIFER, 2009). Nagy biológiai biztonságú labor kell hozzá.

2.5.4. Spermiummal való génbevitel

A spermium alkalmas a nukleinsavak kötésére. 1989-ben LAVITRANO és mtsai adtak hírt arról, hogy ezt kihasználva sikerült transzgénikus egereket létrehozniuk. A technika azonban nehezen ismételhető, így sokan megkérdőjelezzik hatékonyságát. A spermatozoák idegen DNS-sel való inkubálása után transzgénikus állatokat állítottak elő több fajban (baromfi, nyúl, sertés, szarvasmarha, juh). Néhányan extrakromoszomális sokszorozódni képes struktúraként állapították meg az idegen DNS jelenlétét, míg mások stabil kromoszomális beépülést igazoltak. A módszer egy továbbfejlesztett változata az intracitoplazmatikus spermium injektálás (PERRY és mtsai, 1999). E során a spermiumokat lefagyasztják, majd felengedés után DNS oldatban inkubálják, végül a sejtmagokat a megtermékenyítetlen petesejtbe injektálják.

2.5.5. Embrionális őssejtekkel való transzgénikus állat előállítás

Az embrionális őssejteket felhasználó technika során az embrionális őssejtekbe (ES sejtek) közvetlenül viszik be a transzgént. Az ES sejteket az egér hólyagsíra állapotú embriójának belső embriócsomójából izolálják. A DNS bevitel általában elektroporációval történik. Miután molekuláris módszerekkel kiválogatták a megfelelő, transzgénikus sejteket, sejtenyészetben

fenntartják őket. A sejtenyészet sejtjeit azután hólyagsíra állapotú embriókba juttatják be, vagy speciális technikával aggregáltatják 8 sejtés embriókkal (NAGY és mtsai, 1990). A kialakult kiméra embriókat álvemhes nőstényekbe ültetik. A megszületett kiméra utódok szerencsés esetben ivarsejtkimérák lesznek, és a következő generációban már lesznek olyan utódok, melyek minden sejtjükben hordozzák a transzgént. A technika óriási előnye, hogy célzott génbevitelre alkalmas homológ rekombináció segítségével, emiatt irányítható a génkifejeződés mértéke. Szövet- és fejlődésspecifikus célzott módosítás is kivitelezhető a technikával. A módszer hátránya az, hogy kevés fajban működik (csak rágcsálókban), drága, és nagy szakértelmet igényel. A jövőben nagy változás várható az indukált pluripotens sejtek (IPS) megjelenésével.

2.6. Transzgénikus technikák nyúlban

A nyúl embriológiai kutatások már igen korán elkezdődtek. Az első embrió átültetést is nyúlban végezték 1890-ben. Az első transzgénikus nyúl létrehozása is korán megtörtént 1985-ben HAMMER és mtsai fejlesztésével. Mesterséges kromoszóma alapú transzgenezist 1998-ban sikerült nyúlban először létrehozni. Az embrionális őssejt (ESC) technológia egészen már három évtizede működik, s bár nyúlban is több próbálkozás történt jó minőségű ES sejtek alapítására, élő transzgénikus kiméra utód embrionális őssejtből történő előállítása csak az idén sikerült (ZAKHARTCHENKO és mtsai, 2011). Az első klónozott transzgénikus nyúl létrehozása kínai kutatóknak sikerült, felnőtt fibroblasztból (LI S és mtsai, 2009). Magyar kutatók alkalmazták először sikeresen a lentivírus alapú transzgenezist házinyúlban (HIRIPI és mtsai, 2010).

2.7. Az eukarióta transzpozonok

Az eukarióta transzpozonokat vagy más néven mozgékony genetikai elemeket kezdetben „szemét” DNS-nek gondolták, de rájöttek, hogy korántsem lényegtelen a szerepük. A gerincesek nagy részében már inaktiválódtak, azonban molekuláris genetikai módszerekkel újra aktív állapotba hozhatók.

A gerinces állatok genomjának mintegy 40%-át alkotják ismétlődő transzpozonok és mobil szekvenciák, melyek szétszórva találhatók az egész genomban. A transzpozonok alapvetően két nagy csoportba sorolhatók: az RNS és a DNS transzpozonokéba. Az RNS transzpozonok vagy más néven retrotranszpozonok RNS intermedieren keresztül reverz transzkriptázt kódolva két lépésben helyeződnek át. Ide sorolhatók a virális eredetű transzpozonok, a SINE elemek (rövid szétszórtan ismétlődő elemek), a LINE elemek (hosszú szétszórtan ismétlődő elemek). A SINE elemek kb. 200-

300 bp nagyságúak, tehát kis méretűek, 10-100 ezer kópiában találhatók meg a haploid genomban. A LINE elemek kb. 1000 bp hosszúak, amelyből a fele (500 bp) kódolja a SINE elemek mobilizálásához szükséges reverz transzkriptáz enzimet. Az RNS alapú transzpozonok felhasználása a biotechnológiában eszközként nem terjedt el annyira, mivel felépítésük és működésük bonyolultabb, mint a DNS alapú transzpozon rendszereké (CALLINAN és mtsai, 2006).

A DNS transzpozonok mérete átlagosan 1000-5000 bp. 5' és 3' terminális ismétlődést tartalmaznak. Működésükhöz elengedhetetlen az aktív transzpozáz, mely a szekvencia kivágásához és másolásához szükséges, illetve a két terminális rész, amely a beillesztést segíti. Integráció során a célszekvencia megduplázódik, mely minden DNS transzpozon ismertetőjegye. Két nagy családba oszthatók, attól függően, hogy replikálódnak-e az inszerció során. A nem replikálódó család további alcsaládokra osztható a bázissorrend, a terminális ismétlődés, valamint a célszekvencia-duplikálódás bázissorrendje alapján. Működési mechanizmusuk a kivágódás-beillesztés. Mivel egyszerű felépítésűek, jól jellemzettek, a mai biotechnológiában mint eszközöket hasznosítják mindenhol, ahol DNS beépítésre szükség lehet (MARTÍN MUÑOZ-LÓPEZ és mtsai, 2010).

2.8. A DNS transzpozonok felhasználása transzgénikus állatok előállítására

Rengeteg transzpozonról kimutatták, hogy képes katalizálni transzpozíciót gerinces és egyéb állati szervezetekben. A rovar eredetű piggyBac és Minos emlős sejtekben működik, a Sleeping Beauty (SB), Frog Prince, Hsmar1, Harbinger3_DR is alkalmazható az újraaktiválás után gerincesekben. A Tol1 és Tol2 szintén gerincesekben működőképesek. Ac/Ds transzpozon pedig zebradánióban jelent járható utat. Ahhoz azonban hogy transzgénikus élőlényeket hozzunk létre transzpozonok segítségével, nem elég hogy működnek a megfelelő sejtekben. Szükség van arra is, hogy ezt megfelelő hatékonysággal tegyék meg. Ennek hiányában nem érdemes dolgozni velük. Sejtkultúrában ritka genetikai események is nyomon követhetők, de ehhez megfelelő számú embrió nem áll rendelkezésre gerinces állatokból. Transzgénikus kísérletekben a transzpozázát általában mRNS formában juttatják be a koinjektálás módszerével a petesejtekbe/zigótákba. A fenti módszerrel sikerült transzgénikus halakat létrehozni Tc3, Mos1, Tol2 és SB transzpozonokkal, transzgénikus karmosbékát SB és Tol2 rendszerrel, transzgénikus egereket SB, piggyBac, Tol2 transzpozonokkal. A fenti kísérletek részletes leírását lásd IVICS és IZSVÁK 2010-ben megjelent cikkében.

2.9. A Sleeping Beauty jellemzése és alkalmazása transzgénikus területen

A transzpozon rendszerek közül kiemelkedően fontos a Sleeping Beauty rendszer, melyet 2009-ben az év molekulájának választottak. Felfedezőjük egy külföldön és hazánkban egyaránt aktív kutatópáros, Izsvák Zsuzsanna és Ivics Zoltán. A két magyar szerző halfajok genomiális vizsgálata során bukkant rá a gerincesek törzsfejlődése során inaktiválódott TC1/mariner típusú transzpozonra. Ez a típus elég gyakori, a humán genom 3%-át alkotja, kb. 20.000 inaktív ilyen típusú transzpozont hordozunk. Molekuláris biológiai módszerekkel (mutagenézissel) aktiválták (IVICS és mtsai, 1997). A molekulát továbbfejlesztették, és további mutagenézis lépésekkel aktivitását százszorosára növelték. Így már alkalmassá vált transzgénikus állatok létrehozására (MÁTÉS és mtsai, 2009). A Sleeping Beauty transzpozon hordozza minden DNS transzpozon alapvető vonásait, az I. „nem replikálódó” osztályba tartoznak. Célszekvenciájuk mindig AT dinukleotid, ezért beépülése gyakorlatilag véletlenszerűnek tekinthető (200 millió potenciális beépülési helye létezik).

A rendszer segítségével sikerült transzgénikus zebrafániót, transzgénikus kételtűt (*Xenopus*), transzgénikus egeret és patkányt, továbbá célzott génmódosítást egér és patkány esetében létrehozni (IVICS és IZSVÁK, 2010). Legújabban transzgénikus, célzottan génmódosított sertést is létrehoztak felhasználva a Sleeping Beauty technológiát (GARRELS és mtsai, 2011).

2.10. A Sleeping Beauty transzgenezis nyúlban

A Sleeping Beauty transzpozont a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban – a világon elsőként – felhasználták transzgénikus nyulak létrehozására. A transzgenezis során a mesterséges CAG promóter szabályozásával a sárga fluoreszkáló gén egy specifikus formáját (Venus protein) expresszálták a nyulak minden sejtjében. A Sleeping Beauty transzpozázt RNS formában koinjektálták a markergén konstrukcióval együtt egysejtes nyúlzigótákba. A transzgenezis határfoka jelentősen meghaladta a hagyományos mikroinjektációs transzgenezis határfokát. Ez esetükben 15%-os hatékonyságot jelentett a megszületett utódok esetében. Kísérleteinkben a fenti nyulakban vizsgáltam a transzgén öröklődését, valamint a markergén megjelenését RNS és fehérje szinten egyaránt.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Genomiális DNS izolálása nyúl szövetekből

A genomiális DNS tisztításához LAIRD és mtsai (1991) módszerének módosított változatát használtuk. A nyúl különböző szöveiből származó mintákat 55°C-on egy éjszakán keresztül rázattuk lízis pufferben (50mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA, 10mM NaCl, 1% SDS, 0.1 mg/ml Proteináz-K). A megemésztett szöveket centrifugáltuk (1 perc, 13000 rpm), majd a felülúszót 250 µl fenollal és ugyanennyi kloroformmal extraháltuk, végül centrifugálással szétválasztottuk a fázisokat. Levágott hegyű pipettával a vizes fázist átmértük új csövekbe, majd hozzáadtunk 500 µl izopropanolt és 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, és a fehér alsó csapadékot 1 ml 70%-os etanollal mostuk. Újabb centrifugálás után az etanolt eltávolítottuk, majd megszáritottuk a mintákat. A kiszáradt mintát 50 µl MQ vízben feloldottuk. A feloldott DNS koncentrációját ezután spektrofotométerrel megmértük (Nanodrop ND-1000), majd vízzel beállítottuk 100 ng/ml koncentrációra.

3.2. Teljes RNS izolálása nyúl szövetekből

A frissen fagyasztott nyúl szövetmintákat a Qiagen RNeasy® Plus Mini kitjével izoláltuk, mely tartalmaz genomi DNS eliminátor oszlopokat is. A tisztítást a kit utasításai szerint végeztük. A pontos protokoll megtalálható a gyártó honlapján (<http://www.qiagen.com>). A mintákat guanidin-isothiocyanát pufferben homogenizáltuk Precellys homogenizátorral, majd a genomi DNS eliminálása után RNS kötő oszlopra vittük fel. Mosási lépések után a tiszta RNS-t RNáz mentes vízzel eluáltuk az oszlopról 30 µl térfogatban, majd spektrofotométerrel megmértük a koncentrációját.

3.3. Nukleinsav elektroforézis

A DNS horizontális agaróz gélelektroforézist a standard technikának megfelelően végeztük el. A PCR termékeket 2%-os rutin agaróz gélben (Invitrogen) futtattuk és etídium-bromiddal festettük meg 0,25 µg/ml koncentrációban.

3.4. Fehérje izolálás

A frissen fagyasztott nyúlászövet mintákhoz 7-8 térfogatnyi jéghideg PBS-t adtunk (foszfát pufferelt sóoldat). A szöveteket kerámiagolyós Precellys homogenizátorral 5000/perc rázatással 20 másodpercig homogenizáltuk, majd lecentrifugáltuk. A felső fázist minta pufferrel (1.2 g SDS, 6 mg brómfenolkék, 4.7 ml glycerol, 1.2 ml Tris 0.5M pH 6.8, 0.93 g DTT/10 ml) 5 percen keresztül forraltuk. A kivont fehérje mintákat -70°C-on tároltuk felhasználásukig.

3.5. PCR (Polimeráz láncreakció)

Polimeráz láncreakció, a DNS szakaszok in vitro enzimatisz fellszaporítása, amplifikációja hőstabil DNS polimeráz felhasználásával. A PCR reakció három lépésből áll, a DNS olvadásából (denaturációból), a primerek kötődéséből (annealingből) és a polimerizációból (extenzióból). Ez a három szakasz ismétlődik 30-40 alkalommal.

A PCR körülmények: 100 ng templát DNS, 20 µl végtérfogatban; RedTaq ReadyMix, mely primereken és a templáton kívül minden szükséges anyagot tartalmazó mastermix 10 µl, Primerek 0.4 µM végkoncentráció primerenként. Az amplifikálás körülményei: 4 perc kezdeti denaturálás 94°C-on; 30 másodperc 94°C, 30 másodperc 60°C, 30 másodperc 72°C, 30 cikluson keresztül, majd 72°C 3 percig.

3.6. Felhasznált oligonukleotidok

RT-PCR kontroll primerek:

GAPDHny-F 5' caacatcaagtggggtgatg 3'

GAPDHny-R 5' gaggcagggatgatgttctg 3'

Venus gén kimutatásához használt oligonukleotidok a genomi PCR-ben:

Venus_gF 5' gtctctcttgaagtcgatgc 3'

Venus_gR 5' gctacgtgcaggagagaacc 3'

Venus gén jellemzéséhez használt oligonukleotidok az RT-PCR reakcióban:

Venus_rF 5' ggtccctcttctcgtaggg 3'

Venus_rR 5' tacaagaccagagccgaggt 3'

3.7. cDNS szintézis és RT-PCR (Reverz transzkripció-polimeráz láncreakció)

Az izolált RNS-ből 300-500 ng-ot használtunk fel az első szál cDNS-ek átírásához. Az átírást az ABI High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit segítségével végeztük el, a gyártó utasításainak megfelelően. A kit MultiScribe reverz transzkriptázzal dolgozik, random hexamereket használva. Reakciókörülmények: 25°C 10 perc, 37°C 120 perc, 85°C 5 perc. A cDNS szintetizálását követően elvégeztük a kívánt minta amplifikálását 1 µl átírt cDNS-ből, a 3.4.-es fejezetben megadott reakciókörülmények között. A Venus amplifikálásához az Venus_rF és Venus_rR primereket használtuk, endogén kontrollként használva a GAPDhny-F és GAPDhny-R primereket.

3.8. Western hibridizáció

A transzgén expressziójának vizsgálatát protein szinten Western blot analízissel végeztük. A minta előkészítését követően (3.3. fejezet) a fehérjét 10% SDS-poliakrilamid gélen elválasztottuk. Tömörítő gél: 0.5 M TrisCl 0.4% SDS, pH 6.8; szeparáló gél: 1.5 M TrisCl 0.4% SDS, pH 8.8. A gél 0.5% SDS tartalmú Tris-glicin pufferben (Sigma, pH 8.3), 25-35 mA áramerősség mellett futtattuk. A fehérjeminták szétválasztása után a gél 2×15 percig transzfer-pufferben (16.67mM Tris, 128mM glicin, 10% metanol) mostuk és a blottoláshoz előkészítettük a Hybond-p membránt, amelyet 2 percig metanolban, 5 percig desztillált vízben, végül 15 percig transzfer-pufferben nedvesítettünk. A fehérjét transzfer-pufferben, elektromos blottoló készülékkel vittük át a membránra. A készülék használata során 30 percig 100 V feszültséget állítottunk be. A blottolás után a membránt 1 órán keresztül TBS-T pufferben (Tris pufferelt sóoldat, 0.05% Tween 20 detergens) blokkoltuk, amelyben 5% zsírmentes tejport oldottunk fel. A membránra átvitt fehérjét a GFP/EGFP/Venus ellen termelt ellenanyaggal 1:250 hígításban reagáltattuk egy órán keresztül ugyancsak 5% tejpor tartalmú TBS-T pufferben. Az inkubálást követően a membránt 4×10 percig TBS-T oldatban mostuk. A megkötődött elsődleges ellenanyagot peroxidázzal kapcsolt, számarban előállított anti-kecske IgG antitesttel (Abcam) inkubáltuk 1:2000 hígításban, majd ismét 3×10 percig TBS-T pufferrel mostuk a membránt. A megkötődött másodlagos antitestet luminol alapú kemilumineszcenciás szubsztrát oldat (0.25 mg/ml luminol, 33 µg/ml para-kumarinsav, 0.01% H₂O₂, 0.01M Tris/HCl pH 8.5) hozzáadásával detektáltuk (Amersham). A kemilumineszcens jelek előhívásához Hyperfilm (Amersham) filmet használtunk.

3.9. Az YFP fehérje detektálása lámpával

A Venus fehérje a sárgán világító fehérje (Yellow Fluorescent Protein) egy speciális változata, egy riporter gén, melyet mesterségesen állítottak elő (SHANER és mtsai, 2005) *Aequorea victoria* kristálymedúzából. Segítségével vizuálisan könnyedén kimutathatók azok a transzgénikus egyedek, melyek expresszálják a gént. Sötétben megfelelő lámpával megvilágítva, speciális szűrőn keresztül vizsgálva zöldes-sárgán világítanak az állat azon részei, amelyek kifejezik a transzgént. 515 nm hullámhosszú fénnel gerjesztve 528 nm hullámhosszú fénykibocsátás tapasztalható. A speciális lámpa és szűrő a Biological Laboratory Equipment, Maintenance and Service Kft. termékei.

3.10. A transzgénikus állatvonalak fenntartása és szaporítása

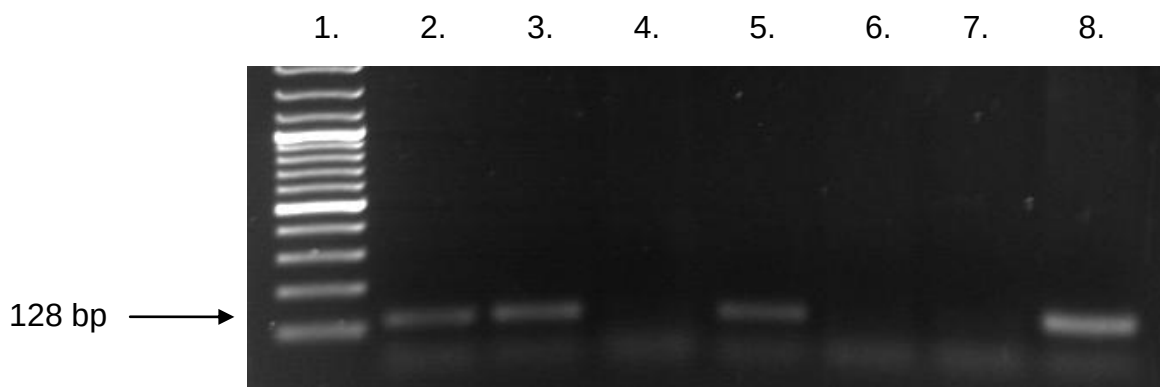
Az alapító transzgénikus nyúl egyedeket vad típusú egyedekkel keresztezve hemizigóta vonalat hozunk létre. A transzgén szegregációját több generáción keresztül nyomon követjük. Az F1 hemizigóta egyedeket egymással keresztezve létrehozuk az F2 utódokat, melyek között már homozigóta utódok is vannak a transzgénre nézve. Csak azt a vonalat fogadjuk el valódi transzgénikusnak, amelyben a transzgén az F1 generációt követően mendeli törvények szerint öröklődik, tehát kb. 25% homozigóta, 50% heterozigóta és 25% vad típusú. A transzgénikus vonalakat legegyszerűbben homozigóta vonalak formájában tartjuk fent.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. A transzgén (Venus) kimutatása az alapító utódaiból

Az alapító transzgénikus egyedeket vad típusú nyulakkal mesterségesen termékenyítettük, majd az adott párosításból megszületett utódokat molekuláris elemzésnek vetettük alá. A vizsgálatok az alapító egyedben meglévő Venus transzgén kimutatását célozták. A transzgént PCR módszerrel mutattuk ki. A molekuláris elemzéshez specifikus oligonukleotid primereket terveztünk a transzgén kódoló szakaszára Primer3 web alapú szabad felhasználású szoftverrel. A tervezés során a program egy 130 bp hosszúságú specifikus fragmentet feltételezett. A tervezést követően az oligonukleotid primereket leellenőriztük, hogy nem képesek-e máshova is kapcsolódni a nyúl genomban. Mivel a nyúl teljes genomja ismert, ezért ez a feladat könnyen kivitelezhető. Az ellenőrzéshez az UCSC genomserver Blat programját használtuk (www.genome.ucsc.edu).

Az utódokban elvégeztük a PCR elemzést, majd a mintákat agaróz gélben elválasztottuk, és az eredményéről fényképet készítettünk. Egy reprezentatív vizsgálat eredményét mutatja az *1. kép*. Az SB3JT alapító egyed 5 utódja, az alapító, valamint egy negatív kontroll, vad típusú nyúl PCR eredménye látható a képen.



1. kép: Az SB3JT alapító utódainak tesztelése PCR módszerrel. 1. DNS létra, 2-6 utódok, 7-negatív kontroll, 8-alapító egyed (pozitív kontroll)

A kísérletből jól látható, hogy az SB3JT alapító egyes utódaiban ugyanúgy kimutatható a transzgén jelenléte, mint az alapító egyedben. A tesztelt öt utódból három transzgénikus volt, ami azt mutatja, hogy a transzgén átadása a következő generációba jó hatékonysággal történik. Ez nagyon fontos felismerés, mivel a nyúl estében nem minden transzgénikus módszer alkalmazásában tapasztalható ugyanez. Lentivírus alapú transzgenezissel nagy hatékonysággal lehet transzgénikus

alapítókat létrehozni, ezek majdnem mindegyike mozaikos formában hordozza a transzgént, ráadásul a következő generációba csak kisebb mint 1% valószínűséggel jut be a transzgén (HIRIPI és mtsai, 2010). A hagyományos transzgenezis esetében nincs ilyen probléma, azonban a hatásfoka nagyon alacsony. Fenti kísérletünk igazolta, hogy a Sleeping Beauty mediálta transzgenezis – mely nagyon jó hatékonysággal rendelkezik – képes a transzgén átadására a következő generációba.

4.2. A transzgén utódlásának megvitatása, összevetve a várható mendeli arányokkal

Az öröklődést ezt követően részletesen is megvizsgáltuk. Összesen 4 alapítót tartottunk meg, ebből egy nőstény alapítótól még nem született egyetlen utód sem, ugyan három egymást követő mesterséges megtermékenyítést végeztek el rajta. Egy alapító pedig még nem volt ivarérett a vizsgálatok idején, így két transzgénikus alapító egyed összes F1 utódját teszteltük PCR módszerrel. Az SB3JT alapító 68 utódját, míg az SB3JTBT 27 utódját vizsgáltuk meg. A vizsgálatok eredményeit a 3. táblázat tünteti fel. A táblázatban az alapítóktól származó összes egyed megtalálható, valamint közülük a pozitív utódok száma. Jól látható, hogy mindkét vonal esetében a transzgénikus (pozitív) utódok száma kissé elmaradt a mendeli öröklődés szerint várt értéktől. F1 generációban a transzgénikus utódoknak a fele várhatóan hordozza a transzgént. A mendeli számarányoktól történő eltérés valószínű oka az lehet, hogy az alapítók kis mértékben mozaikosak. Ez, mint már említettem azt jelenti, hogy az állat nem minden sejtjében található meg a transzgén. A fenti probléma azonban nem a transzpozon közvetített transzgenezis sajátja, sokkal inkább a nyúlra, mint fajra jellemző. A transzgén beépülésnek az egysejtes stádiumban kell lezajlania, különben mozaikos lesz az alapító. Esetünkben az alapítók kismértékű mozaikossága vizuálisan is megfigyelhető. A nyúl korai embrionális fejlődése rendkívül gyors, az egyik leggyorsabb az emlősök között, így az egysejtes időszak is viszonylag rövid (SULTANA és mtsai, 2009). Emiatt rövidebb idő áll rendelkezésre a transzgén beépülésének. Ez jellemző a lentivírusos nyúl transzgenezisre, valamint a hagyományosan mikroinjektálással létrehozott transzgénikus alapítókra egyaránt (CASTRO és mtsai, 1999). Az eltérés a mendeli arányoktól azonban nem számottevő, így kijelenthetjük, hogy a transzpozonokkal történő génmódosítás jól használható transzgenezisre.

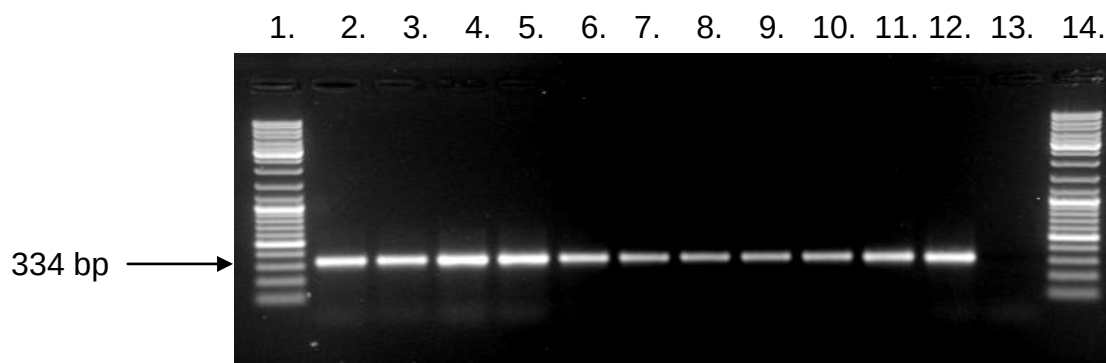
3. táblázat: A Venus transzgén öröklődésének részletes vizsgálata

Vonal neve	Utódok száma	Pozitív utódok száma	Mendeli öröklődés szerint várható utódok száma
SB3JT	68	25	34
SB3JTBT	27	10	13

4.3. A transzgén detektálása különböző szövetekben RNS szinten

A transzgén kimutatását RNS szinten RT-PCR, reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakcióval vizsgáltuk. Az RT-PCR reakcióban használt oligonukleotidok génspecifikusak, azonos módon terveztük, mint az 4.1. fejezet primereit.

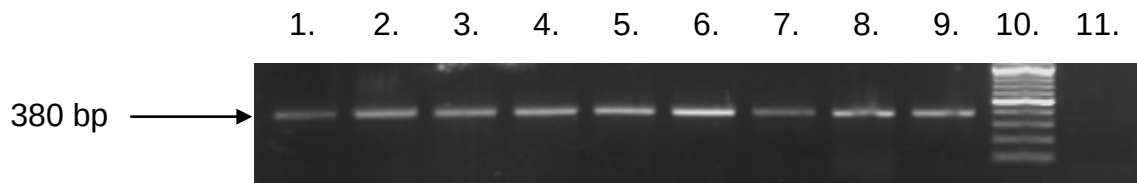
Az RT-PCR primereket célszerű szomszédos exon-intron határok közelébe tervezni, így könnyen kimutatható az esetleges DNS szennyeződés a mintákban. Az általunk használt Venus génkonstrukció azonban nem tartalmaz introni szekvenciát a Venus génben, így a génspecifikus primer tervezésénél erre nem volt módunk. Ezért az RNS izolálás során DNáz kezelést alkalmaztunk, valamint az endogén kontroll primer esetében már úgy jártunk el, hogy az esetleges DNS szennyeződés más méretű fragmentet hozzon létre, mint a cDNS-ről kapott amplikon. A kísérlet eredménye a 2. képen látható. Vizsgálatainkba bevontuk az agy, szív, tüdő, máj, lép, vese, here, hasnyálmirigy, izom, bőr és vékonybél mintákat, valamint egy nem transzgénikus nyúl májából származó kontroll mintát is. A kísérletet úgy terveztük, hogy egyrészt minden fontosabb szövet képviselve legyen a vizsgálatokban, másrészt olyan szöveteket választottunk, melyek mind a három csíralemezt (ektoderma, endoderma, mezoderma) reprezentálják. A kísérleten jól látható, hogy az általunk megvizsgált összes szövetben erős transzgén eredetű expresszió tapasztalható. Mivel az általunk használt génkonstrukció olyan promótert használ, mely gyakorlatilag minden sejtben működik, így a kapott eredmény megegyezik a várható eredménnyel. A CAG szabályozó szakasz melyet használtunk, egy mesterséges promóter, mely a virális eredetű CMV alap promótert és egy csirke Béta-globin enhancer elemet hordoz. Amellett, hogy széleskörű, általában erős expressziót is biztosít, melyet mutat az RT-PCR kép is, annak ellenére, hogy nem kvantitatív. A fenti promóter hagyományos mikroinjektálás esetén is jól működött nyúlban, ezért esett rá a választás (TAKAHASHI és mtsai, 2007).



2. kép: Az SB3JT alapító genomi PCR alapján pozitív transzgénikus utódjának szövetspecifikus RT-PCR vizsgálata Venus specifikus primerrel. 1. és 14. DNS létra, 2-12 szöveti minták a következő sorrendben: agy, szív, tüdő, máj, lép, vese, here, hasnyálmirigy, izom, bőr és vékonybél, 13. vad típusú nyúl mája - negatív kontroll.

Fontos eredmény, hogy a transzgén megjelenik mindhárom eredetű csíralemezben. Ez valószínűsíti, hogy az általunk nem vizsgált kisebb szövetek is hordozzák és megjelenítik a transzgént. A kísérlet mellé elvégeztük a minták reverz transzkriptáz mentes átírását, és felszaporítását, de természetesen ezekben a mintákban nem kaptunk semmilyen jelet sem. (Ez az adat nem kerül bemutatásra.)

Az átírt cDNS-ekről a következő lépésben endogén kontroll PCR-t is végeztünk. Endogén kontrollként a GAPDH (glicerinaldehyd-foszfát-dehidrogenáz) gént használtuk (*3. kép*). Ez egy úgynevezett háztartási gén, tehát minden sejt expresszálja és gyakorlatilag minden fejlődési fázisban megtalálható. A felvételen az agy, szív, tüdő, máj, lép, vese, here, izom és vékonybél szövetekben látható a gén kifejeződése, a létra másik oldalán pedig a negatív kontroll májszövet volt. Érdekes megfigyelni, hogy az azonos mennyiségű cDNS-ről itt sokkal gyengébb jelet kapunk, mint a transzgén esetében. Ez egyrészt köszönhető a háztartási gének általában folyamatos, de nem túl erős expressziójának, másrészt az erős CAG promóternek. A kapott jel minden esetben a cDNS-re jellemző, nem tapasztaltunk a DNS-re jellemző nagyobb molekulásúlyú jelet, ami az RNS tisztaságát is mutatja. Itt sem mutatjuk be a transzkriptáz mentes kontrollokat.

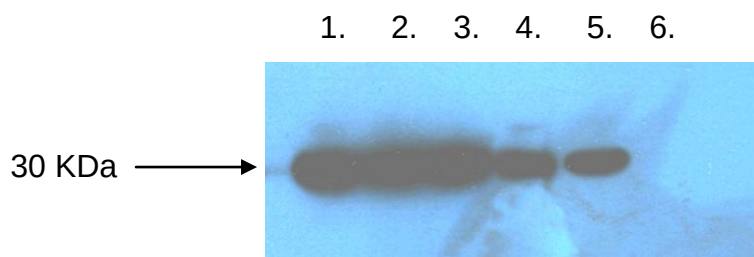


3. kép: Az SB3JT alapító genomi PCR alapján pozitív transzgénikus utódjának szövetspecifikus RT-PCR vizsgálata kontroll primerrel. 10. DNS létra, 1-9 szöveti minták a következő sorrendben: agy, szív, tüdő, máj, lép, vese, here, izom és vékonybél, 11. víz - negatív kontroll.

Vizsgálatainkat kiterjesztettük az SB3JTBT alapító egy kiválasztott pozitív utódjára is. Az eredmény megegyezett a fent leírttal. Megállapítottuk, hogy az általunk részletesen megvizsgált mindkét vonal nem csak örökíti, hanem ki is fejezi a transzgént.

4.4. A transzgén kifejeződésének vizsgálata fehérje szinten Western hibridizációval

A transzgén kifejeződése RNS szinten nem feltétlenül jelenti a transzgénről történő fehérje megjelenését is. A fehérje megjelenésének vizsgálatát Western hibridizációval vizsgáltuk. A fehérjét GFP/EGFP/Venus specifikus poliklonális antitesttel hibridizáltuk, az anyag és módszer részben leírtak szerint. A *4. képen* az előhívott felvétel látható. A kiválasztott szövetminták (tüdő, máj, szív, vese, bőr) mind pozitív eredményt adtak, az utolsó minta negatív májszövetből származott. A transzgénről átíródott fehérjének 30 kDa nagyságúnak kell lennie és ez is megegyezik a pozitív szövetek eredményeivel. A rövid előhívási idő (2 másodperc), és az antitest jelentős hígítása is mutatja, hogy a gén kifejeződése fehérje szinten is erősnek mondható. A fentiek igazolják, hogy a transzgénről intakt fehérje képződik.



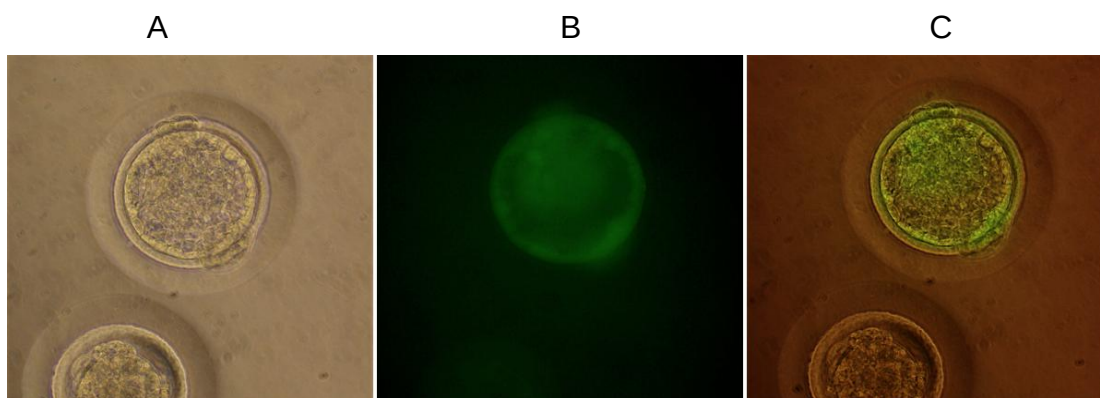
4. kép: Az SB3JT alapító pozitív transzgénikus utódjának Western hibridizációs vizsgálata. 1-5 szöveti minták a következő sorrendben: tüdő, máj, szív, vese, bőr, 6. vad típusú nyúl mája – negatív kontroll.

4.5. A transzgén kifejeződésének vizuális megjelenítése

Kísérleteinkben a termeltetett célgén a Venus nevű riportergén volt. A technológiai fejlesztéseknél, mint esetünkben célszerű riportergéneket alkalmazni, mivel könnyen nyomon követhetők. A zöld fluoreszcens fehérje és az ebből származtatott egyéb fehérjék, mint a Venus fehérje ráadásul élő szöveti környezetben is alkalmasak a vizsgálatokra. A megfelelő gerjesztő fény hatására a transzgént kifejező szervek „világítanak”.

Esetünkben kíváncsiak voltunk, hogy a transzgén kifejeződése mikor indul meg az embrionális fejlődés során. A kísérlethez nőstény nyulat szuperovuláltattunk, majd a szuperovuláltatás HCG lépését követően transzgénikus bak spermájával mesterségesen termékenyítettünk. Másnap egysejtes zigótákat gyűjtöttünk a nőstény petevezetőjéből, majd 37°C-on 5% CO₂ mellett PBS+20% FCS-ban (Fetal Calf Serum) tenyésztettük a zigótákat. Az embriókat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk különböző stádiumokban, és megállapítottuk, hogy legkorábban késői morula (szedercsíra) állapotú embrióban lehetséges a transzgén detektálása. Legkorábban fényképezhető expressziót a blasztociszta (hólyagcsíra) állapotban sikerült kapni (5. kép). Ez összevág mások eredményeivel, ahol a CMV típusú promóterek legkorábban morula – blasztociszta állapotban expresszálták a transzgént nyúlban. Érdeemes megemlíteni, hogy a nyúl saját génkifejeződése 8 sejtesen indul, addig a petesejt citoplazma RNS molekuláit hasznosítja az embrió. Ez az átkapcsolás más fajokban (pl. egérben) korábban megtörténik, már a kétsejtes állapotban.

Az 5B képen jól látható, hogy az UV fénnel megvilágított embrióban az embriócsomó és a trofektoderma sejtei is expresszálják a transzgént. Ez azt feltételezi, hogy nemcsak a megszületett utód testi sejtei, hanem az extraembrionális szövetek is kifejezik majd a transzgént.



5. kép: Blasztociszta állapotú embriók expressziójának detektálása fluoreszcens mikroszkóppal. A – normál megvilágítás, B – UV megvilágítás, C – kevert kép.

A fényképeket Dr. Gócza Elen készítette.

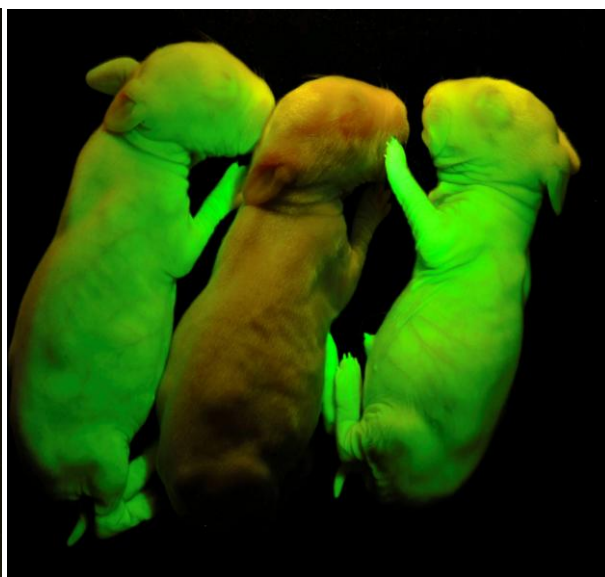
A megszületett utódokon is megfigyelhetjük UV fényben a transzgén jelenlétét. A 6. képen napos nyulak láthatóak. A kép első felén természetes fényben elhelyezve láthatóak a fiókák, ilyen fényviszonyok között nem fedezhető fel különbség a transzgénikus és a negatív egyedek között. A másik oldalon ugyanazok a kisnyulak láthatóak UV fényrel megvilágítva. Megállapíthatjuk tehát, hogy ebben az esetben a két szélső fióka transzgénikus, és a transzgén lámpával történő kimutatása könnyen megoldható.

Az általunk vizsgált két transzgénikus vonal minden egyes utódát alávetettük a lámpával történő transzgén detektálásnak, majd ezt követően eredményeinket összevetettük az 4.1.-4.2. pontokban ismertetett genomi PCR eredményekkel. Minden esetben pontos egyezést kaptunk, tehát azok az utódok melyek PCR pozitívak, a lámpával is detektálhatóan pozitívak, míg a negatívak mindkét esetben negatívak maradtak. Ez nagyon fontos eredmény, ami azt mutatja, hogy minden állat, mely hordozza a transzgént egyben expresszálja is azt. Lentivirális transzgenezis esetén (PFEIFER és mtsai, 2009), és hagyományos mikroinjektálásnál is előfordul, hogy bizonyos utódok annak ellenére, hogy transzgénikusak nem expresszálják a célgént, míg más utódok igen. Ennek oka leggyakrabban a DNS metilációhoz köthető transzgén csendesítés. Transzgén csendesítést a mi esetünkben egyetlen alkalommal sem tapasztalhattunk.

A



B



6. kép: Kisnyulak normál (A) és UV (B) megvilágítás mellett.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban sikeresen alkalmazták – elsőként a világon – a transzpozon irányította transzgenezist házinyúlban. Kísérleteinkben mi azt vizsgáltuk, hogy a bevitt transzgén hogyan öröklődik, és hogyan fejeződik ki az utódokban RNS és fehérje szinten.

Megállapítottuk, hogy az általunk használt riporter-gén nagyon jó hatékonysággal jutott a következő generációba. Bár az arány kissé eltér a mendeli öröklődés szabályainak várható értékétől, de ez annak köszönhető, hogy az alapító egyedek mozaikosak voltak.

RT-PCR vizsgálataink bizonyították, hogy a transzpozon által bevitt transzgén az utódok minden vizsgált szövetében megjelenik. A vizsgált szövetek mind a három csíralemezt reprezentálják. Az expresszió magas szintű volt. Fehérjevizsgálataink minden vizsgált szövetben a megfelelő méretű, érett fehérje megjelenését mutatták ki.

A fehérje vizuális megjelenítése alapján kijelenthetjük, hogy azon utódok, melyek hordozzák a transzgént, egyben expresszálják is azt, tehát a vizsgált transzgénikus vonalak egyikében sem tapasztaltunk transzgén csendesítésre utaló nyomot.

Kísérleteink alapján kijelenthető, hogy a Sleeping Beauty transzpozon mediálta transzgenezis nyúlban nemcsak egy nagyon hatékony transzgénikus technika, hanem könnyen örökíthető a következő generációba, magas szintű expresszió érhető el mind a három csíralemezben RNS és fehérje szinten egyaránt, és a módszer mentes a transzgén csendesítés hátrányos fellépésétől.

A továbbiakban vizsgálatainkat szeretnénk RNS szinten kiterjeszteni, és kvantitatív módszerekkel is meghatározni az expressziós szinteket a YFP-re tervezett specifikus TaqMan próbával.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az emlősállatok genetikai anyagának megváltoztatása fontos alap-, és alkalmazott kutatásokat érintő feladat. Bizonyos emlősállatokban, a hagyományos transzgénikus módszer, a DNS mikroinjektálás jó hatékonysággal működik. Más fajokban, mint például a házinyúlban, a transzgenezis hatásfoka nagyon alacsony. Ugyanakkor bizonyos betegségek modellezésére (például egyes szívbetegségek, érelmeszesedés) a transzgénikus nyulak alkalmasabbak, mint az egér. Ezért fontos feladat a házinyúl esetében a transzgenezis hatékonyságának növelése. Mivel a nyúl korai embrionális fejlődése speciális vonásokat mutat, ezért az új generációs transzgénikus technikák bevezetése sem jelenthet biztos megoldást. A lentivírus alapú transzgenezis, mely a modell- és háziállatok többségénél hatékony módszer, a nyúl esetében öröklődési és expressziós problémákat mutat annak ellenére, hogy az alapító egyedeket nagy hatékonysággal lehet létrehozni. Munkánk során a legújabban alkalmazott transzpozon alapú transzgenezissel előállított transzgénikus nyulak molekuláris jellemzését végeztük el.

A transzgenezis során egy halakból származó mesterségesen hatékonná tett transzpozont, a Sleeping Beauty-t alkalmaztuk. Kísérleteinkben a YFP (Yellow Fluorescent Protein) riportergént egy virális eredetű mesterséges szabályozó régióval jutattuk egysejtes állapotú nyúlzigótákba, a transzpozon hatékony közreműködésével. A promóter biztosítja gyakorlatilag minden sejtben a fehérje kifejeződését. A megszületett alapítókból transzgénikus vonalakat hoztunk létre. Feladatom a transzgénikus vonalakban a transzgén öröklődésének, valamint a transzgénikus utódokban a gén kifejeződésének vizsgálata volt.

A transzgén öröklődését PCR alapú kimutatással vizsgáltuk, és megállapítottuk, hogy az utódokba jó hatékonysággal adódik át a transzgén. Bár a várható mendeli arányoknál kisebb a transzgénikus utódok száma, ez azzal magyarázható, hogy a létrehozott transzgénikus alapító enyhén mozaikos (nem minden sejtje hordozza a transzgént).

Megállapítottuk, hogy azok az utódok, melyek pozitívnak bizonyulnak, minden esetben ki is fejezik a transzgént, azaz nem találtunk semmilyen géncsökkentésre utaló jelet ezzel a technológiával.

A transzgén szöveti megjelenését RT-PCR módszerrel vizsgáltuk RNS szinten, valamint Western hibridizációval fehérje szinten. Az általunk vizsgált szövetek mindegyikében sikerült kimutatni a transzgénről átíródó érett RNS-t valamint a fehérjét is.

Vizsgálataink bebizonyították, hogy a Sleeping Beauty transzpozon segítségével alkalmazott transzgénikus technikával nemcsak eredményesen lehet transzgénikus nyulakat létrehozni, de a

bejuttatott gén jó hatékonysággal is öröklődik, és a transzgén megjelenése a vártnak megfelelő mértékű és minőségű.

A továbbiakban vizsgálatainkat szeretnénk RNS szinten kiterjeszteni, és kvantitatív módszerekkel is meghatározni az expressziós szinteket a YFP-re tervezett specifikus TaqMan próbával.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm, hogy a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban lehetőséget kaptam a bemutatott vizsgálatokban való részvételre. Konzulensemnek, Dr. Hiripi Lászlónak a kísérlet végzése, az adatok értékelése és a dolgozat elkészítése folyamán nyújtott folyamatos segítséget. Továbbá Kerekes Andreának, Hoffmann Orsolyának, Major Péternek és Dr. Bender Balázsnak a kísérletek elvégzése során tanúsított segítőkészségüket, Dr. Gócza Elennek pedig, hogy az elkészített fényképeket a rendelkezésemre bocsájtotta.

7. IRODALOMJEGYZÉK

BAWDEN WS, PASSEY RJ, MACKINLAY AG: The genes encoding the major milk-specific proteins and their use in transgenic studies and protein engineering. In: Biotechnology & Genetic Engineering Reviews 1994. 12 évf. 89. sz. p. 137

BŐSZE ZS: A géntechnológia tudományos eredményei és társadalmi hatásai, Transzgenikus gazdasági állatok. In: Magyar Tudomány 2000. 45. évf. 5. sz. p. 555-566

BŐSZE ZS, GÓCZA E (2005): Transzgénikus haszonállatok előállításának lehetőségei és céljai. In: Fésüs László, Heszky László, Hornok László (Szerk.) Mezőgazdasági Biotechnológia tankönyv, Agroinform Kiadó és Nyomda Kft. Budapest p. 265-279

BŐSZE Z, BARANYI M, WHITELAW CB: Producing recombinant human milk proteins in the milk of livestock species. (Review) In: Advances in Experimental Medicine and Biology 2008. 606. évf. 4. sz. p. 357-393

BROPHY B, SMOLENSKI G, WHEELER T, WELLS D, L'HUILLIER P, LAIBLE G: Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. In: Natural Biotechnology 2003. 21. évf. 2. sz. p. 157-162

CALLINAN PA, BATZER MA: Retrotransposable elements and human disease. (Review) In: Genome Dynamics 2006. 1. évf. p. 104-115

CANTOR GH, MCELWAIN TF, BIRKEBAK TA, PALMER GH: Ribozyme cleaves rex/tax mRNA and inhibits bovine leukemia virus expression. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1993. 90. évf. p. 10932-10936

CASTRO FO, LIMONTA J, RODRIGUEZ A, AGUIRRE A, DE LA FUENTE J, AGUILAR A, RAMOS B, HAYES O: Transgenic rabbits for the production of biologically-active recombinant proteins in the milk. In: Genetic Analysis 1999. 15. évf. 3-5. sz. p. 179-187

CHEN XZ, YUN JS, WAGNER TE: Enhanced viral resistance in transgenic mice expressing the human beta 1 interferon. In: Journal of Virology 1988. 62. évf. 10. sz. p. 3883-3887

CLARK AJ: Genetic modification of milk proteins. In: The American Journal of Clinical Nutrition 1996. 63 évf. 4. sz. p. 633-638

DE GROOT N, VAN KUIK-ROMEIJN P, LEE SH, DE BOER HA: Over-expression of the murine pIgR gene in the mammary gland of transgenic mice influences the milk composition and reduces its nutritional value. In: Transgenic Research 2001. 10. évf. 4. sz. p. 285-291

DENNING C, BURL S, AINSLIE A, BRACKEN J, DINNYES A, FLETCHER J, KING T, RITCHIE M, RITCHIE WA, ROLLO M, DE SOUSA P, TRAVERS A, WILMUT I, CLARK AJ: Deletion of the alpha(1,3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. In: Natural Biotechnology 2001. 19. évf. 6. sz. p. 559-562

DOYLE A, MCGARRY MP, LEE NA, LEE JJ: The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. In: Transgenic Research 2011. (júl. 29.) 20. évf. 4. sz.

GALLI C, PEROTA A, BRUNETTI D, LAGUTINA I, LAZZARI G, LUCCHINI F: Genetic engineering including superseding microinjection: new ways to make GM pigs. In: Xenotransplantation 2010. 17. évf. 6. sz. p. 397-410

HAMMER RE, PURSEL VG, REXROAD CE JR, WALL RJ, BOLT DJ, EBERT KM, PALMITER RD, BRINSTER RL: Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. In: Nature 1985. 315. évf. 6021. sz. p. 680-683

HIRIPI L, NEGRE D, COSSET FL, KVELL K, CZÖMPÖLY T, BARANYI M, GÓCZA E, HOFFMANN O, BENDER B, BOSZE Z: Transgenic rabbit production with simian immunodeficiency virus-derived lentiviral vector. In: Transgenic Research 2010. 19. évf. 5. sz. p. 799-808

IVICS Z, HACKETT PB, PLASTERK RH, IZSVÁK Z: Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. In: Cell 1997. 91. évf. 4. sz. p. 501-510

IVICS Z, IZSVÁK Z: The expanding universe of transposon technologies for gene and cell engineering. In: Mobile DNA 2010. 1. évf. 1. sz. p. 25-40

KLYMIUK N, AIGNER B, BREM G, WOLF E: Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. In: Molecular Reproduction and Development 2010. 77 évf. 3. sz. p. 209-221

KOLB E, LAINE E, STREHLER D, STAEHELI P: Resistance to influenza virus infection of Mx transgenic mice expressing Mx protein under the control of two constitutive promoters. In: Journal of Virology 1992. 66. évf. 3. sz. p. 1709-1716

KRAGH PM, NIELSEN AL, LI J, DU Y, LIN L, SCHMIDT M, BØGH IB, HOLM IE, JAKOBSEN JE, JOHANSEN MG, PURUP S, BOLUND L, VAJTA G, JØRGENSEN AL: Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. In: Transgenic Research 2009. 18. évf. 4. sz. p. 45-58

LAIRD PW, ZIJDERVELD A, LINDERS K, RUDNICKI MA, JAENISCH R, BERNIS A: Simplified mammalian DNA isolation procedure. In: Nucleic Acids Research 1991. 19. évf. 15. sz. p. 4293

LAVITRANO M, CAMAIONI A, FAZIO VM, DOLCI S, FARACE MG, SPADAFORA C: Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. In: Cell 1989. 57. évf. 5. sz. p. 717-723

LI S, GUO Y, SHI J, YIN C, XING F, XU L, ZHANG C, LIU T, LI Y, LI H, DU L, CHEN X: Transgene expression of enhanced green fluorescent protein in cloned rabbits generated from in vitro-transfected adult fibroblasts. In: Transgenic Research 2009. 18. évf. 2. sz. p. 227-235

MARTÍN MUÑOZ-LÓPEZ, JOSÉ L. GARCÍA-PÉREZ: DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. In: Current Genomics 2010. 11. évf. 2. sz. p. 115–128

MATES L, CHUAH MK, BELAY E, JERCHOW B, MANOJ N, ACOSTA-SANCHEZ A, GRZELA DP, SCHMITT A, BECKER K, MATRAI J, MA L, SAMARA-KUKO E, GYSEMANS C, PRYPUTNIEWICZ D, MISKEY C, FLETCHER B, VANDENDRIESSCHE T, IVICS Z, IZSVÁK Z: Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. In: Natural Genetics 2009. 41. évf. 6. sz. p. 753–761

MCPHERRON AC, LEE SJ: Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1997. 94. évf. 23. sz. p. 12457-12461

NAGY A, GÓCZA E, DIAZ EM, PRIDEAUX VR, IVÁNYI E, MARKKULA M, ROSSANT J: Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. In: Development 1990. 110. évf. 3. sz. p. 815-821

PALMITER RD, BRINSTER RL, HAMMER RE, TRUMBAUER ME, ROSENFELD MG, BRINBERG NC, EVANS RM: Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. In: Nature 1982. 300. évf. 5893. sz. p. 611-615

PERRY AC, WAKAYAMA T, KISHIKAWA H, KASAI T, OKABE M, TOYODA Y, YANAGIMACHI R: Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. In: Science 1999. 284. évf. 5417. sz. p. 1180-1183

PFEIFER A, HOFMANN A: Lentiviral transgenesis. In: Methods in Molecular Biology 2009. 530. évf. 3. sz. p. 391-405

PINTADO B, GUTIÉRREZ-ADÁN A: Transgenesis in large domestic species: future development for milk modification. In: Reproduction Nutrition Development 1999. 39. évf. 5-6. sz. p. 535-544

PURSEL VG, REXROAD CE JR: Recent progress in the transgenic modification of swine and sheep. In: Molecular Reproduction and Development 1993. 36. évf. 2. sz. p. 251-254

REXROAD CE: Production of sheep transgenic for growth hormone genes. In: Journal of Biotechnology 1991. 16. évf. p. 259-263

SCHNIEKE AE, KIND AJ, RITCHIE WA, MYCOCK K, SCOTT AR, RITCHIE M, WILMUT I, COLMAN A, CAMPBELL KH: Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. In: Science 1997. 278. évf. 5346. sz. p. 2130-2133

SHANER NC, STEINBACH PA, TSIEN RY: A guide to choosing fluorescent proteins. In: Nature Methods 2005. 2. évf. 12. sz. p. 905-909

SU HY, JAY NP, GOURLEY TS, KAY GW, DAMAK S: Wool production in transgenic sheep: results from first-generation adults and second-generation lamb. In: *Animal Biotechnology* 1998. 9. évf. 2. sz. p. 135-147

SULTANA F, HATORI M, SHIMOZAWA N, EBISAWA T, SANKAI T: Continuous observation of rabbit preimplantation embryos in vitro by using a culture device connected to a microscope. In: *American Association for Laboratory Animal Science* 2009. 48. évf. 1. sz. p. 52-56

SUMER H, LIU J, VERMA PJ: Cellular reprogramming of somatic cells. In: *Indian Journal of Experimental Biology* 2011. 49 évf. 6. sz. p. 409-415

TAFALLA C, ESTEPA A, COLL JM: Fish transposons and their potential use in aquaculture. In: *Journal of Biotechnology* 2006. 123. évf. 4. sz. p. 397-412

TAKAHASHI R, KURAMOCHI T, AOYAGI K, HASHIMOTO S, MIYOSHI I, KASAI N, HAKAMATA Y, KOBAYASHI E, UEDA M: Establishment and characterization of CAG/EGFP transgenic rabbit line. In: *Transgenic Research* 2007. 16. évf. 1. sz. p. 115-120

WALL RJ, KERR DE, BONDIOLI KR: Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. In: *Journal of Dairy Science* 1997. 80 évf. 9. sz. p. 2213-2224

WEISSMANN C, FLECHSIG E: PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. In: *British Medical Bulletin* 2003. 66 évf. 1. sz. p. 43-60

WIEBKE GARRELS, LAJOS MÁTÉS, STEPHANIE HOLLER, ANNA DALDA, ULRIKE TAYLOR, BJÖRN PETERSEN, HEINER NIEMANN, ZSUZSANNA IZSVÁK, ZOLTÁN IVICS, WILFRIED A. KUES: Germline Transgenic Pigs by Sleeping Beauty Transposition in Porcine Zygotes and Targeted Integration in the Pig Genome. In: *PLoS One* 2011. 6. évf. 8. sz.

WILLIAMS D: Sows' ears, silk purses and goats' milk: new production methods and medical applications for silk. In: *Medical Device Technology* 2003. 14. évf. 5. sz. p. 9-11

ZAKHARTCHENKO V, FLISIKOWSKA T, LI S, RICHTER T, WIELAND H, DURKOVIC M, ROTTMANN O, KESSLER B, GUNGOR T, BREM G, KIND A, WOLF E, SCHNIEKE A: Cell-mediated transgenesis in rabbits: chimeric and nuclear transfer animals. In: Biology of Reproduction 2011. 84. évf. 2. sz. p. 229-237

<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/FractionatedPlasmaProducts/ucm134046.htm> – U.S. Food and Drug Administration

<http://www.qiagen.com> – Qiagen Sample & Assay Technologies

www.genome.ucsc.edu – UCSC Genome Bioinformatics

<http://www.sulinet.hu/eletestudomany/archiv/1999/9915/genetikai/genetika.htm>

Olasz Ferenc, Kiss János: A biotechnológia „szerszámai” – Genetikai potyautasok. In: Élet és Tudomány 1999.