

Влияние параметров партеногенетической активации и слияния на получение клонированных эмбрионов крупного рогатого скота

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

Клонирование млекопитающих - одна из ключевых вспомогательных репродуктивных технологий, обеспечивающая размножение элитных пользовательских животных-рекордистов, спасение вымирающих видов и создание животных с редактированным геномом. Однако, данный способ получения эмбрионов *in vitro*, несмотря на более чем двадцатилетнюю историю, пока менее эффективен, чем, например, искусственное осеменение и экстракорпоральное оплодотворение. Низкая эффективность метода указывает на необходимость модификации отдельных этапов соматического клонирования. Настоящая работа была направлена на оптимизацию режимов слияния ооцита с соматической клеткой и параметров активации полученного цитогбрида для улучшения развития клонированных эмбрионов крупного рогатого скота. Объектами исследования служили ооцит-кумуляные комплексы (ОКК), выделенные из яичников коров не позднее 3 часов после их убоя. Отобранные по качеству ОКК (25-35 в группе) культивировали *in vitro* в течение 19 часов в среде ТС-199 с добавлением 10 мкг/мл ФСГ, 10 мкг/мл ЛГ и 10% фетальной бычьей сыворотки, затем обрабатывали 0,1% раствором гиалуронидазы, удаляли кумуляные клетки и отбирали ооциты с первым полярным тельцем (ППТ). Удаление ядра у созревших ооцитов проводили путем отбора ППТ и 20% ооплазмы инъекционным капилляром диаметром 15 мкм на микроманипуляторе Narishige. В ходе реконструирования фетальные фибробласты переносили в перивителлиновое пространство энуклеированных ооцитов через отверстие в зоне пеллюциды, сформированное при энуклеации. Слияние энуклеированного ооцита и соматической клетки проводили 2 последовательными импульсами электрического поля напряженностью 1,75 кВ/см² продолжительностью 20 мкс. Через 1 час не слившиеся комплексы повторно подвергали электрослиянию при тех же режимах. Полученные цитогбриды искусственно активировали (5 мМ иономицина в течение 5 мин + 2мМ ДМАП в течение 4 часов), после чего культивировали в среде NCSU-23, проводя анализ формирования клонированных эмбрионов. Активацию осуществляли через 24-25 или 26-28 часов от начала созревания. Эксперименты были выполнены в 3-5 повторностях. Данные обрабатывали при помощи программного пакета SigmaStat. Не выявлено негативного влияния повторного слияния на долю дробления и потенцию к развитию 2-х клеточных эмбрионов до стадии бластоцисты. В группе, активированной в период с 24 до 25 часов IVМ, доля дробления составила 70,4±7,7%, увеличение продолжительности созревания не влияло на данный показатель (69,4±9,2). В тоже время пролонгированное культивирование ОКК до 26-28 часов от начала IVМ приводило к снижению доли развития клонированных бластоцист с 29,5 до 7,8% (p<0,05). Таким образом показано, что повторное электрослияние не влияет на формирование и развитие клонированных эмбрионов крупного рогатого скота. Период активации цитогбридов, соответствующий 26-28 часам созревания ооцитов коров, отрицательно сказывается на эффективности клонирования.