

Stratégia odberu vzoriek transgénnych živočíchov a kritériá pre plánovanie protokolu ich vzorkovania

Pri detekcii genetickej modifikácie živočicha je každý jedinec posudzovaný a analyzovaný samostane, vzorkovanie sa neuskutočňuje v zmysle štatistickej významnosti. V tomto prípade je namieste uvádzať termín „odber vzorky z transgénneho živočicha“ alebo termín „vzorkovanie“ je treba chápať v tomto význame. Pri určovaní stratégie odberu vzoriek je potrebná aktuálna znalosť dosiahnutých výsledkov v rozvoji techník produkcie geneticky modifikovaných živočíchov a možnostiach ich detekcie.

Genetické modifikácie zvierat

Bunky geneticky modifikovaných (ďalej len „transgénnych“) zvierat majú genetickú informáciu upravenú metódami molekulárnej genetiky. Tieto metódy zaistia u ich buniek prijatie, zabudovanie a následný prepis sekvencií DNA z buniek darcovských organizmov.

Genetické modifikácie zvierat je súbor rýchlo rozvíjajúcich sa technológií s rôznym predmetom záujmu a množstvom aplikácií. Môžu byť použité:

- na základný biomedicínsky výskum na zlepšenie poznania v oblasti genetiky a fyziológie,
- na tvorbu modelov pri výskume ľudských chorôb,
- na produkciu proteínov alebo iných substancií pre terapeutické účely,
- ako alternatívne zdroje tkanivových kultúr a orgánov pre xenotransplantácie,
- na získanie prípadne zlepšenie požadovaných vlastností chovných zvierat vrátane rýb, ako napríklad odolnosť voči chorobám alebo zvýšenie produktivity.

Vo všeobecnosti sú významné dva typy GM zvierat:

- Zvieratá, ktoré sú geneticky modifikované s cieľom produkovať hospodárske zvieratá s novými, lepšími vlastnosťami. Je možné získať zvieratá odolnejšie voči chorobám, je možné vyrábať nové druhy potravín. Tieto zvieratá môžu byť eventuálne celé použiteľné do potravinového reťazca.
- Zvieratá schopné produkovať špecifické substancie v mlieku, vajčičkách alebo krvi, alebo slúžiace ako modely pre medicínsky výskum. Pomocou

transgénnych zvierat je možné vyrábať niektoré látky, ktoré nie je možné vyrábať v bakériách, prípadne je možné vyrábať ich lacnejšie než v baktériách. či rôznym spôsobom využívať na výskum a liečbu ľudských ochorení.

Techniky produkcie transgénnych zvierat

Genetické modifikácie sa realizujú niekoľkými spôsobmi. Je možné

- vnieť do živého organizmu cudzí gén,
- zablokovať jeho vlastný gén („knockout“),
- vlastný gén zvierat'a presmerovať do inej časti tela, takže telu nie je cudzí, ale uplatňuje sa v časti tela, v ktorej sa bežne neprejavuje.

Z hľadiska zákona o GMO poznáme dva typy GM živočíchov:

- živočích, ktoré majú modifikáciu stabilne inkorporovanú do genómu a teda dedičnú – transgénne živočích
- živočích s nededičnými transgénymi konštruktami – zvyčajne označované pojmom „génová terapia“.

Pri tvorbe transgénnych živočíchov sú rozhodujúce faktory

- vhodný génový konštrukt,
- vhodne zvolený objekt pre prenos génov,
- účinný prostriedok na prenos génu.

Génový konštrukt

Génový konštrukt je úsek DNA pripravený v laboratóriu. Skladá sa predovšetkým zo štruktúrneho génu a regulačnej sekvencie vlastnej hostiteľovi. Štruktúrny gén určuje, aká bielkovina sa bude v tele transgénneho živočícha podľa štruktúrneho génu tvoriť.

Regulačná sekvencia určuje kde, kedy a za akých podmienok sa prenášaný gén uplatní. Za transgénne sú považované aj živočích, ktorých vlastné štruktúrne gény sú spojené s rekombinantnou regulačnou sekvenciou, zabezpečujúcou požadovanú expresiu štruktúrneho génu v časti tela, kde sa bežne neexprimuje.

Do konštrukt je možné vložiť aj markerový gén. Napr. GFP –green fluorescent protein, ktorý vyvolá po osvetlení buniek ultrafialovým svetlom zelené fluoreskovanie buniek a zvierat, ktoré génový konštrukt prijali. Prípadne je možné použiť selekčný

marker, ktorý umožní odolnosť voči niektorým látkam. Bunky, ktoré neprijali konštrukt v prítomnosti týchto látok hynú, čo umožňuje ich jednoduchú selekciu.

U cicavcov sa používajú aj tzv. umelé chromozómy. Sú to konštrukty nesúce základné stavebné prvky chromozómu, tj. stredovú sekvenciu (centroméru) a koncové sekvencie (teloméry). Medzi ne sú vložené sekvencie obsahujúce rôzne gény. Do umelých chromozómov je možné vložiť väčší počet génov, ktoré pri vzájomnej súhre produkujú zložitejšie produkty, napr. umelé chromozómy s ľudskými génmi na tvorbu protilátok. Tieto boli vnesené do buniek hovädzieho dobytká a vzniknuté zvieratá produkujú v krvi ľudské protilátky využiteľné pre diagnostické účely ako i na liečbu.

Objekt prenosu génu

Gén býva prenášaný

- do tela dospelého jedinca
- do zárodka
- do bunkových línií

Ak je prenášaný do tela dospelého jedinca, je cudzí gén cielene vnášaný len do niektorých buniek ich tela. Väčšinou sú jedincovi odobraté niektoré bunky, je do nich vnesený génový konštrukt a sú vrátené späť do tela jedinca. Gény môžu byť zabudované do buniek aj priamo v tele živočícha. Bunky, ktoré sú vnesené do tela živočícha v ňom dlhodobo prežívajú, ale spravidla nedochádza k zabudovaniu génu do pohlavných buniek a vnesený gén nie je dedený potomstvom. Častejšie sú však gény vnášané do zárodka alebo do bunkových línií. V týchto prípadoch sa gén objaví buď vo všetkých bunkách transgénneho živočícha a potom je väčšinou dedený potomstvom. Gén sa však môže vyskytovať len v niektorých bunkách tela živočícha (živočích je označovaný ako chiméra, tz. telo je tvorené bunkami do ktorých sa zabudoval vnesený gén a z buniek do ktorých sa nezabudoval). Dedenie cudzieho génu je potom závislé na tom, akým spôsobom sa cudzí gén zabudoval do pohlavných buniek. Podľa podielu pohlavných buniek s cudzím génom môže byť dedený 0 až 100% potomstvom.

Spôsoby prenosu génu

Spôsob prenosu génu závisí od poznatkov o regulácii a expresii génu, ktorý je predmetom záujmu. Prenášaný gén je inkorporovaný do expresného vektora.

- transpozón – úsek DNA schopný z reťazca DNA sa vyštiepiť a následne sa inzerovať na iné miesto. Je možné ho modifikovať tak, aby obsahoval fúzovaný gén
- mikroinjekcie – priama injekcia expresného vektora do oplodnených vajíčok alebo hostiteľských buniek použitím tenkej sklenenej ihly
- retrovírusové vektory – vírus integrujúci sa do genómu a využívajúci replikačný a proteosyntetický aparát hostiteľskej bunky, je možné modifikovať tak aby obsahoval fúzovaný gén
- elektroporácia – vnesenie expresného vektora do oplodnených vajíčok alebo hostiteľských buniek pôsobením elektrických impulzov, spôsobujúcich prechodné póry v membráne hostiteľských buniek
- mikroprojektilová balistika - biolistika – „particle bombardment“ hostiteľské bunky sú transformované nastreľovaním inertných kovových projektilov (zo zlata, alebo volfrámu) nesúcich žiadané gény
- prenos jadier (klonovanie) – do vajíčka zbaveného jeho vlastnej genetickej informácie je vnesené jadro somatickej bunky, za vzniku ďalej sa vyvíjajúceho zárodka
- embryonálne kmeňové bunky
- transformácia gamét – gény môžu byť vnesené do oocytov alebo spermatocytov, následne sú transformované gaméty použité na fertilizáciu a vývin celého zvierat'a
- lipozómy – častice s vonkajšou dvojitou membránou z fosfolipidov a vodným jadrom, v prípade prítomnosti génového konštruktu vo vodnej fáze dôjde k jeho uzatvoreniu v jadre. Stena lipozómu je schopná splynúť s cytoplazmatickou membránou, vodné jadro je uvoľnené do vnútra bunky. Je možné ich zacieliť na určitý typ buniek v organizme zabudovaním určitých molekúl napr. protilátok do stien lipozómu.

Získané transgénne jedince sú krížené na získanie transgénnej línie.

Tab. Príklady použitia prenosu génov do zvierat

Aplikácia	Plánovaný výsledok	Príklad vnesených génov, knock out, génové mutácie	Poznámky
Zvýšenie produkcie zvierat	Zvýšenie výnosu zrýchlením rastu alebo zlepšením konverzie krmiva	Gén rastového hormónu do lososa atlantického, kapra a tilapie nílskej	Na Kube je povolená tilapia nílska na konzumáciu, v Číne kapor, v USA je uvádzaný na trh losos
	Zintenzívnenie rastu	Knock out myostatínu u hospodárskych zvierat	
	Zvýšenie odolnosti proti ochoreniam	Gén laktoferínu do kaprov, lysostaphin do kráv, cecropin gén do sumca	
	Zvýšenie tolerancie voči podmienkam prostredia	Protimrazový proteín do lososa atlantického a karasa zlatého	Tolerancia voči nízkym teplotám bola zvýšená u karasa, ale nie u lososa
	Zvýšenie konverzie ingrediencií potravy	Gén fytázy do ošipaných	Tento spôsob bol použitý u mäsožravých rýb za účelom využívania rastlinnej potravy
Zvýšenie kvality produktov	Zmena nutričného profilu	Redukcia koncentrácie laktózy v mlieku	
	Odstránenie alergénov z potravy	Knock out génu kreviet kódujúceho proteín spôsobujúci alergie	
	Nové okrasné zvieratá	Gén fluorescenčných proteínov exprimujúci sa u rybičiek (<i>Danio</i>)	Na trhu v USA predávané pod názvom GloFish®
Nové produkty	Farmaceutiká na medicínske a veterinárne použitie	Gény monoklonálnych protilátok, lysozím, rastový hormón, inzulín a iné produkované v mlieku, krvi chovaných zvierat	
	Priemyselné produkty	Pavúcie vlákno produkované v mlieku kôz	
Bioindikátory	Senzory znečistenia	Expresia reportérových génov viazaných na metalotioneínový promótor do malých rybičiek vystavených pôsobeniu ťažkých kovov	
Medicína	Bunky, tkanivá a orgány na xenotransplantácie	Knock out (vypnutie) génu galaktozyltransferázy u ošipaných	
	Modely na objasnenie rôznych ľudských chorobných procesov	Génové mutácie zapríčínujúce kosáčikovitú anémiu, talasémiu,	
Zdravie zvierat	Prevenia pred transmisívnou spongiformnou encefalopatiou	Knock out (vypnutie) génu Prn-p u hovädzieho dobytku a oviec	Prevenia pred BSE
Biokontrola	Užitočný hmyz rezistentný voči pesticídom	Vnesenie génov rezistencie do predátorov a parazitoidov	Možnosť použitia chemických aj biologických prostriedkov voči hmyzu
	Kontrola prenosných chorôb	Vnesenie génov rezistencie voči parazitu <i>Plasmodium</i> do komárov <i>Anopheles</i>	Možnosť redukcie prenosu malárie

Metódy detekcie transgénnych živočíchov

Detekcia inkorporácie a expresie génu sa uskutočňuje:

- Základnou metódou je amplifikácia úseku transgénu ohraničeného vhodne zvolenými oligonukleotidmi aplikáciou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Prítomnosť sa následne detekuje elektroforetickou separáciou PCR produktu v agarózovom géli. V prípade pochybností sa uskutočňuje sekvenovanie amplifikovaného úseku a porovnanie so známou sekvenciou transgénu.
- Ak transgén obsahuje aj markerový gén je jednoduchšia identifikácia génového konštruktu v organizme živočícha napr. použitím PCR alebo Southern blottingu. Používajú sa markerové gény napr. green fluorescent protein GFP – zelený fluoreskujúci proteín, ktorý po ožiarení UV svetlom typicky fluoreskuje, čo umožní identifikáciu buniek a živočíchov, ktoré génový konštrukt prijali. Na tomto princípe je možné identifikovať transgénne rybičky *Danio rerio*, do ktorých boli vnesené gény GFP, RFP (red fluorescein protein) a YFP (yellow fluorescein protein).
- Analýza génovej expresie inkorporovaného génu.

Kritériá pre plánovanie protokolu vzorkovania transgénnych živočíchov

- vzorka sa odoberá v odôvodnených prípadoch, na základe aktuálnej znalosti dosiahnutých výsledkov v rozvoji techník produkcie geneticky modifikovaných živočíchov a možnostiach ich detekcie,
- miesto a čas odberu vzorky určuje inšpekcia po dohode s referenčným laboratóriom,
- odber vzorky sa uskutočňuje v teréne a záznamy o spôsobe odberu uskutočňuje vedúci kontrolnej skupiny alebo pracovník referenčného laboratória ako prizvaná osoba, alebo sa živočích živý transportuje do referenčného laboratória, kde sa uskutoční odber vzorky a vedú sa záznamy o spôsobe odberu a následných analýzach,
- podmienky prepravy a skladovania vzorky sú závislé od charakteru odobratej vzorky; vo všeobecnosti sa vzorky prepravujú bezodkladne do referenčného laboratória, nesmú byť vystavené vysokým teplotám, vatové tampóny sa uchovávajú v suchu.

Tab. Vybrané príklady živočíchov

Živočích	Odobratý materiál	Spôsob odberu	Doručenie do lab.
ryby	Chvostová plutva	Odrezaný kúsok do mikroskúmavky s etanolom	do 48 h
	Ster z tela	Vatové tampóny	do 48 h
Laboratórne myši a potkany	Kúsok chvosta	Odrezaný kúsok do mikroskúmavky s etanolom, alebo transportným médiom	do 48 h
	krv	Mikroskúmavka s antikoagulantom (EDTA, alebo citrát sodný)	do 72 h
Viaceré živočíchy	krv	Mikroskúmavka s antikoagulantom (EDTA, alebo citrát sodný)	do 72 h