

Formulár ZK - Záverečná karta projektu

Riešiteľ: Doc. Ing. Peter Chrenek, PhD.	Evidenčné číslo projektu: APVT-27-027902
Názov projektu: Vývojová potencia a alokácia transgénnych buniek v chimerických embryách a králikoch	

Na ktorých pracoviskách bol projekt riešený:	Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu (SCPV) Nitra
Ktoré zahraničné pracoviská spolupracovali pri riešení (názov, štát):	

Udelené patenty alebo podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory vychádzajúce z výsledkov projektu:	
Publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu (uved'te i publikácie prijaté do tlače alebo pripravované): <i>Uvádzajte maximálne päť najvýznamnejších publikácií.</i>	Chrenek P., Makarevich A.: Production of rabbit chimeric embryos by aggregation of zona-free nuclear transfer blastomeres. Zygote 13, 39-44, 2005.
	Chrenek P., Makarevich A., Jurcik R., Ryban L., Bauer M., Rafay J., Paleyanda R.K., Binder B.B.: Production of transgenic rabbits expressing recombinant human clotting factor VIII in mammary gland. Proc. 2 nd Inter Conf. Vet. Res. Div., NRC, Cairo, Egypt, June 2005, p. 293.
	Chrenek P., Ryban L., Vetr H., Makarevich A., Kirchnerova K., Binder B.: Rabbit transgenic mammary gland as a bioreactor for rhFVIII production. Biotechnology 2006, scientific Pedagogical Publishing, C. Budejovice, Czech Republic, ISBN 8085645-53-X, 2006, 55-57.
	Chrenek P., Makarevich A.V., Boulanger L., Chesne P., Jurcik R., Renard J.P. Allocation of rabbit nuclear transfer derived transgenic cells in chimeric embryos. Pripravovaný rukopis do časopisu Journal of Biotechnology (2007).
V čom vidíte uplatnenie výsledkov tohto projektu:	Rozširuje poznatky v oblasti kvality genetických modifikovaných embryí a schopnosti lokalizácie transgénnych buniek v embryoblaste a trofoblaste preimplantačného vývojového štádia v procese tvorby chimér.

Podpisom záverečnej karty riešiteľ vyjadruje svoj súhlas ku zverejneniu údajov v nej uvedených.

Podpis riešiteľa:

Dátum:

Charakteristika výsledkov

Evidenčné číslo: APVT-27-027902

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - slovensky:

Cieľom projektu bolo získať transgénne králičie embryá mikroinjekciou EGFP génu do prvojadra oplodneného vajíčka s následným využitím EGFP pozitívnych blastomér na produkciu chimerických králičích embryí a vyhodnotiť lokalizáciu transgénnych buniek v rôznom vývojovom štádiu (blastocysta, embryonálny disk a živonarodený králik). Chimerické králičie embryá sme pripravili technikou agregácie transgénnych a netransgénnych embryí alebo prenosom transgénnych (TR) buniek do hostiteľského (netransgénneho, N) embrya rovnakého 8-16-bunkového vývojového štádia. Celkovo 120 chimerických embryí bolo vyprodukovaných, z toho 120 embryí (100%) v podmienkach in vitro dosiahlo štádium blastocysta. Použitím fluorescenčného mikroskopu sme u 90 chimerických embryí (75%) detegovali expresiu EGFP génu. Priemerný počet buniek celkovo na chimerické embryo v štádiu blastocysta bol 275 ± 13.10 , z toho v ICM oblasti 58 ± 2.76 . Počet pozitívnych (transgénnych buniek s expresiou EGFP génu) v ICM sme zistili 52 ± 5.02 , čo predstavuje 55% úspešnosť zastúpenia EGFP pozitívnych buniek. Celkovo 50 chimerických embryí bolo vyprodukovaných (technikou prenosu 2-3 transgénnych blastomér s EGFP génom) v štádiu 8-16-blastomér a prenesených do recipientiek. Recipientky boli na 6 deň po prenose usmrtené a embryá v štádiu embryonálneho disku boli vyplavené. Vyplavili sme 20 (40%) embryí v štádiu embryonálneho disku, z toho 5 (25%) malo EGFP pozitívne bunky integrované v embryonálnom disku. Z celkového počtu 50 prenesených chimerických králičích embryí, sme získali 12 (24%) králikov, z toho dva králiky (jeden živonarodený a jeden mŕtvonarodený) boli PCR metódou analyzované ako pozitívne na prítomnosť EGFP génu. PCR metódou sme u pozitívneho samca detegovali prítomnosť transgénu vo všetkých odobraných orgánoch. Naše výsledky poukázali na schopnosť transgénnych buniek participovať na produkcii ICM, embryonálneho disku ako aj živonarodenom králikovi.

Ciele projektu, na základe dosiahnutých výsledkov, boli naplnené.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - anglicky:

The aim of our project was to obtain rabbit transgenic embryos by microinjection of EGFP gene into pronucleus of fertilized eggs and using transgenic blastomeres to produce chimeric rabbit embryos with localization of EGFP positive cells at different developmental stage (blastocyst, embryonic shield and newborn rabbit). Chimeric embryos were produced by the aggregation technique or by transfer of 2-3 positive blastomeres into host non-transgenic rabbit embryos at the same 8-16-cell developmental stage. All chimeric embryos (120/120, 100%) developed up to blastocyst stage. Using fluorescent microscope, in 90 chimeric embryos (75%) we detected green signal (EGFP expression). Average total number of cells in chimeric embryos at blastocyst stage was 275 ± 13.10 , of which 58 ± 2.76 cells were found in the ICM area. The number of EGFP positive cells in the ICM area was 52 ± 5.02 (55%).

After the transfer of 50 chimeric rabbit embryos at 8-16- cell stage, 20 embryos (40%) were flushed from 5 recipients on Day 6 of pregnancy, of which 5 embryos (25%) at embryonic shield stage were EGFP positive. When the same chimeric embryos were transferred to next 5 recipients, 12 (24%) rabbits were born, one of them, based on PCR assay, was EGFP positive and second was positive, but dead immediately. Using PCR assay we detected EGFP presence in different tissue samples (testis, liver, kidney, lung and muscle). Our results showed, that transgenic rabbit cells are able to colonize the ICM, embryonic shield and newborn rabbit. Based on our results, the aims of our project were fulfilled.

Podpis riešiteľa: