

А.И. БУДЕВИЧ, В.Н. КУЗНЕЦОВА, Н.Л. ЗАРЕМБА,  
Д.А. ШЕМЕТКОВ, П.Е. САХОНЧИК

## ДИНАМИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ПОКАЗАТЕЛЯ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА В МОЛОКЕ ТРАНСГЕННЫХ КОЗ-ПРОДУЦЕНТОВ

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук  
Беларуси по животноводству»

**Введение.** Молочная железа сельскохозяйственных животных является естественной биофабрикой различных биологически активных веществ, содержащихся в молоке. Динамика их содержания достаточно хорошо изучена и является основой для использования в технологиях изготовления продуктов пищевой, фармакологической и другой направленности [1, 2]. Вместе с тем, разработка методов доставки чужеродных генетических конструкций в геном животных дала возможность их применения для получения иных и даже нетипичных соединений (белков, гормонов и др.) в больших количествах, являющихся в ряде случаев дефицитными и дорогостоящими.

Так, в работе Мага et al. [3] трансгенные козы, экспрессирующие ген человеческого лизоцима, секретировали данный антимикробный белок (rhLZ) в молоко, количество которого в 1000 раз превышало содержание нативного лизоцима в обычном молоке. Экспрессия трансгена не влияла на содержание общего белка и жира в молоке, а также на ежедневную продукцию молока.

В исследованиях Baldassare et al. [4] показано варьирование концентрации в молоке трансгенных коз рекомбинантного человеческого белка бутирилхолинэстеразы (rBChE) от 1 до 5 г/л при сравнении отдельных особей между собой, а также для каждой особи на протяжении периода лактации. Также для всех трансгенных животных было характерно сокращение продукции молока и укорочение периода лактации.

В настоящее время одним из широко разрабатываемых «белков интереса» является лактоферрин – протеин с определенной тканевой локализацией и многочисленными метаболическими и регуляторными функциями [1]. Для этого белка показаны антибактериальные, противогрибковые, противовирусные, противораковые свойства [5]. В этой связи теоретический и практический интерес представляет характер изменения концентрации лактоферрина человека в молоке трансген-

ных коз в зависимости от периода лактации, имеющий существенную значимость в случае организации промышленного производства рекомбинантных белков.

В настоящее время основным методом количественного определения рекомбинантных белков в молоке трансгенных животных является твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), основанный на взаимодействии белков с иммобилизованными на носителе специфичными антителами. Это довольно быстрый и чувствительный метод, позволяющий определять микроколичества (от нескольких нанограмм) белков и других иммуногенных веществ в различных физиологических жидкостях [6, 7].

В связи с вышеизложенным, целью исследований явилось изучение динамики количественного показателя лактоферрина человека в молоке коз-продуцентов.

**Материал и методика исследований.** В опытах использовались трансгенные по лактоферрину человека козы-продуценты (n=23) 1-2-й лактации живой массой 30-40 кг. Было сформировано две группы животных по поколениям. В I опытную группу были включены трансгенные самки F<sub>1</sub>, родившиеся от первичных трансгенных козлов, во II – козы F<sub>2</sub>, полученные от сыновей первичных трансгенных производителей.

Отбор проб молока проводился во время утренней дойки по 1,5 мл от каждой головы на 1-й, 2-й, 3-й, 4-й и 5-й день лактации, а затем на 10-й, 15-й, 25-й, 30-й, 35-й и 60-й дни. Пробы замораживались и хранились при -20 °С. Перед проведением анализа их оттаивали и хорошо перемешивали.

Определение концентрации лактоферрина осуществлялось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением коммерческого набора реагентов «Лактоферрин-ИФА-Бест» (кат. № D-4156; ЗАО «Вектор-Бест», РФ) согласно методике, предложенной производителем набора, с собственными модификациями. Разведение молока производилось в буферном растворе для разведения сывороток, входящем в состав набора реагентов с рабочим соотношением 1:200000.

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением поликлональных антител к лактоферрину. В лунках, при добавлении исследуемого образца, во время первой инкубации происходило связывание лактоферрина с поликлональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Во время второй инкубации конъюгат поликлональных антител к лактоферрину с пероксидазой связывался с лактоферрином, иммобилизованным в ходе первой инкубации. Во время инкубации с раствором

тетраметилбензидина происходило окрашивание раствора. Степень окраски была пропорциональна концентрации лактоферрина в анализируемых образцах. После измерения величины оптической плотности раствора на основании калибровочного графика рассчитывалась концентрация лактоферрина в анализируемых образцах.

Измерение величины оптической плотности в лунках иммунологического планшета проводилось с помощью планшетного фотометра «Sunrise» (Tecan, Австрия) при длине волны 450 нм, референс-фильтр – 630 нм. Построение калибровочных кривых и расчет концентрации лактоферрина в пробах молока осуществлялось автоматически с использованием пакета программ «Magellan™ 6» (Tecan, Австрия).

Полученные данные были обработаны биометрически с помощью программ MS Excel и Origin Pro 8.

**Результаты эксперимента и их обсуждение.** На содержание лактоферрина человека было протестировано 268 образцов молока, взятых на разных сроках лактации от 23 трансгенных коз (таблица 1).

Таблица 1 – Пороговые и средние концентрации рекомбинантного лактоферрина человека в молоке животных-продуцентов

Порядковый № продуцента	Концентрация ЛФ, г/л		
	Минимальная	Максимальная	Средняя
1	0,4	7,65	5,09
2	0,4	12,33	5,96
3	0,4	11,3	3,96
4	0,9	14,73	6,69
5	1,22	8,92	5,94
6	2,87	7,27	5,05
7	1,04	10,34	5,34
8	1,43	10,83	4,84
9	0,4	12,25	8,07
10	0,2	11,93	5,94
11	1,86	13,85	9,00
12	0,66	8,18	4,95
13	0,35	11,5	3,73
14	2,37	6,07	4,9
15	2,11	11,25	5,24
16	2,65	12,87	6,1
17	1,11	8,19	4,40
18	1,17	14,51	4,24
19	0,88	11,32	5,26
20	1,6	8,14	4,23
21	0,87	4,5	2,69
22	4,15	11,95	9,25
23	2,46	18,9	9,69
<b>В среднем</b>	<b>1,37</b>	<b>10,82</b>	<b>5,68</b>

Из данных таблицы видно, что пороговые концентрации лактоферрина в выборке составили 18,9 и 0,2 г/л (максимальное и минимальное содержание белка, соответственно). Диапазон средних значений наличия лактоферрина для различных индивидуумов на протяжении периода лактации колебался от 2,69 до 9,69 г/л.

Среднее содержание рекомбинантного человеческого лактоферрина (rhLF) в молоке, рассчитанное для всего стада лактирующих животных, составило 5,68 г/л.

При изучении динамики содержания rhLF удалось выявить хорошо обособленный начальный этап лактации (молозивный период), начинающийся 1-м и заканчивающийся 5-10-м днями от начала лактации (рисунок 1). Среднее содержание rhLF в этот период для всей выборки составило 6,45 г/л. К 15-му дню лактации был отмечен скачок продукции лактоферрина до уровня молозивного периода с постепенным ее снижением к 25-му дню.

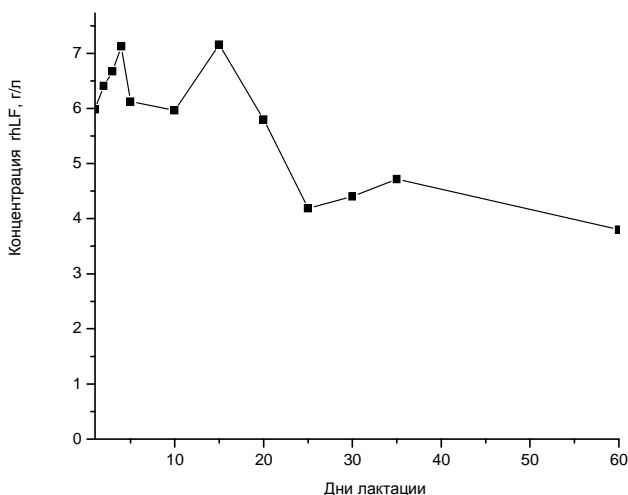


Рисунок 1 – Изменение средней концентрации rhLF в зависимости от длительности лактации

Анализ эффективности секреции rhLF в молоке в вышеуказанный период показал несущественные различия по данному показателю в двух опытных группах животных. У коз F<sub>1</sub> среднее содержание лактоферрина в первые 5 дней лактации было выше (7,10 г/л), чем у животных F<sub>2</sub> (6,55 г/л), о чем свидетельствует рисунок 2.

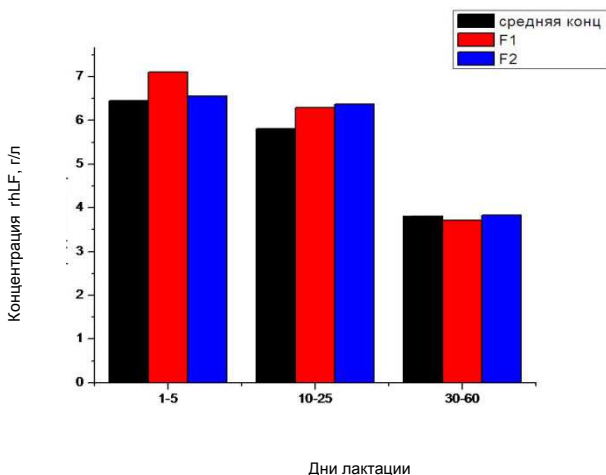


Рисунок 2 – Изменение концентрации rhLF в молоке на протяжении трех контрольных отрезков лактационного периода (черным цветом обозначена средняя концентрация rhLF для всей выборки, светло-серым – средняя концентрация rhLF в I опытной группе, серым – средняя концентрация rhLF во II опытной группе)

На протяжении следующего периода с 10-го по 25-й день от начала лактации наблюдалось повышение содержания rhLF в молоке животных к 15-му дню, причем достоверных различий в характере изменения концентрации рекомбинантного белка между I и II группами животных выявлено не было (рисунок 2). Среднее содержание rhLF в период с 10-го по 25-й день от начала лактации для группы F<sub>1</sub> составило 6,30 г/л, для коз F<sub>2</sub> – 6,38 г/л.

В период с 35-го по 60-й день отмечалось плавное снижение содержания рекомбинантного белка. В дальнейшем концентрация rhLF оставалась преимущественно на базальном уровне (т. е. на постоянном среднем уровне, характерном для данного животного, без колебаний концентрации) либо с последующим уменьшением концентрации (группа F<sub>1</sub>), либо с небольшим увеличением (группа F<sub>2</sub>) концентрации rhLF к 60-му дню лактации (рисунки 3, 4).

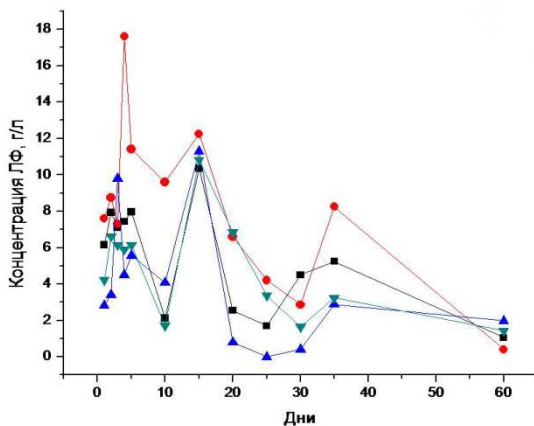


Рисунок 3 – Динамика концентрации rhLF в молоке трансгенных животных группы F<sub>1</sub> (с 35-го дня от начала лактации наблюдается снижение содержания рекомбинантного белка)

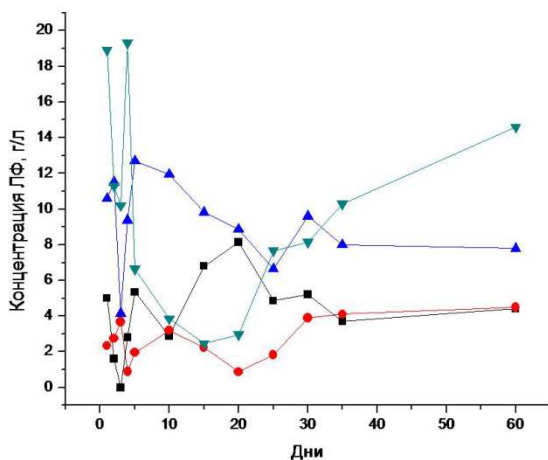


Рисунок 4 – Динамика концентрации rhLF в молоке трансгенных животных группы F<sub>2</sub> (с 35-го дня от начала лактации наблюдается медленное повышение содержания рекомбинантного белка, либо продукция лактоферрина остается на прежнем уровне без существенного снижения)

Различие в динамике изменения содержания rhLF в молоке животных двух опытных групп после 35-го дня лактации может быть объяснено тем, что животные F<sub>1</sub> старше и продуцируют по второй лактации, в результате чего механизмы регулирования активности экспрессии генов молочных белков (в том числе и искусственно внедренного гена человеческого лактоферрина) более устойчивы.

Зависимость уровня продукции и характера изменения динамики rhLF от возраста трансгенных животных-продуцентов была прослежена на парах мать (F<sub>1</sub>)-дочь (F<sub>2</sub>). Показано более медленное снижение концентрации rhLF до постоянного базального уровня у более молодых животных 2009 года рождения (F<sub>2</sub>), в сравнении с козами 2010 г. рождения (рисунок 5).

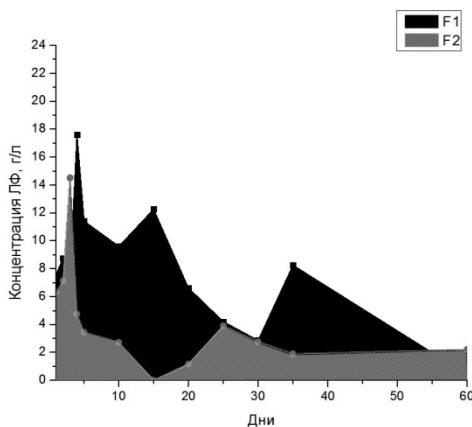


Рисунок 5 – Сравнение динамики содержания rhLF в парах дочь (F<sub>2</sub>)-мать (F<sub>1</sub>)

Таким образом, колебания содержания рекомбинантного человеческого лактоферрина в молоке трансгенных коз-продуцентов наблюдаются как у отдельных особей между собой, так и у одних и тех же особей в разные периоды лактации.

**Заключение.** 1. Установлено, что содержание рекомбинантного человеческого лактоферрина в молоке трансгенных коз-продуцентов изменяется следующим образом: в первые 5 дней от начала лактации продукция rhLF находится на довольно высоком уровне (6,55-7,10 г/л), после достижения пика к 35-40-му дню происходит плавное выравнивание концентрации рекомбинантного протеина в молоке с последующим его выходом на базальный уровень к 50-60-му дню лактации.

2. Установлено, что возраст, число лактаций и принадлежность к

потомству F<sub>1</sub> или F<sub>2</sub> влияют на характер экспрессии трансгена на начальном этапе лактации и, следовательно, на характер продукции рекомбинантного белка после 40-го дня лактации: для животных F<sub>1</sub> показано медленное снижение концентрации rhLF с последующим достижением базального уровня, для животных F<sub>2</sub> – плавное повышение концентрации rhLF либо сохранение последней на прежнем уровне.

3. На протяжении всего отрезка лактационного периода происходит экспрессия трансгена с продукцией целевого белка в молоко. Среднее содержание rhLF в молоке трансгенных животных составило 5,68 г/л.

#### Литература

1. Модификация белков молока сельскохозяйственных животных с использованием трансгена: биотехнологические возможности, проблемы и перспективы / Л. С. Попов [и др.] // Биотехнология. – 2000. – № 5. – С. 3-18.

2. Циновый, А. В. Физиологические изменения состава молока коров в зависимости от возраста, периода лактации и при первичных нарушениях функции молочной железы : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.13 / Циновый А.В. – Харьков, 2003. – 26 с.

5. Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves *Haemophilus* surface proteins at arginine-rich sites / D. R. Hendrixson [et al.] // Mol. Microbiol. – 2003. – Vol. 47. – P. 607-617.

4. Milk composition studies in transgenic goats expressing recombinant human butyrylcholinesterase in the mammary gland / H. Baldassare [et al.] // Transgenic Res. – 2008. – Vol. 17. – P. 863-872.

6. Production and processing of milk from transgenic goat expressing human lysozyme in the mammary gland / E. A. Maga [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2006. – Vol. 89. – P. 518-524.

3. Pharmacokinetics of recombinant human leukemia inhibitory factor in sheep / A. Se-grave [et al.] // The Journal of pharmacology and experimental therapeutics – 2004. – Vol. 309, № 3. – P. 1085-1092.

3. Production and processing of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland / E. A. Maga [et al.] // J. Dairy Sci. – 2006. – Vol. 89. – P. 518-524.

7. Production of recombinant albumin by a herd of cloned transgenic cattle / Y. Echelard [et al.] // Transgenic Res. – 2009. – Vol. 8, № 3. – P. 361-376.

(поступила 5.03.2012 г.)