



Czynniki wpływające na efektywność uzyskiwania transgenicznych zwierząt: bydło, królik

*Jacek Jura
Zdzisław Smorąg
Lucyna Kątska
Maria Skrzyszowska
Barbara Gajda
Bożenna Ryńska*
Instytut Zootechniki
Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt
Balice k. Krakowa

Proces uzyskiwania zwierząt transgenicznych jest bardzo złożony. Na całość składa się wiele metod z zakresu inżynierii genetycznej, biologii molekularnej i embriologii. Złożoność procesu transgenezy powoduje, że na efekt końcowy, w postaci transgenicznego osobnika o stwierdzonej ekspresji wprowadzonego genu, wpływa bardzo wiele czynników (1). Trudno jednoznacznie orzec, które z nich są mniej lub bardziej istotne. Metody embriologiczne umożliwiają wprowadzenie nowej informacji genetycznej, uzyskanej metodami inżynierii genetycznej, doprowadzając do momentu, w którym za pomocą metod biologii molekularnej można stwierdzić, czy uzyskany osobnik jest transgeniczny. Pomimo że metody embriologiczne (zapłodnienie pozaustrojowe, długotrwała hodowla pozaustrojowa oraz techniki przenie-

szenia transformowanych zygot i zarodków) są już dobrze opanowane (np. u bydła i królika), efektywność transgenezy jest ciągle niezadowalająca (2,3,4).

W literaturze dotyczącej procesu transgenezy jest bardzo niewiele informacji, wyjaśniających w jakim stopniu poszczególne etapy wpływają na efektywność całego procesu. W prezentowanej pracy przedstawiamy wyniki doświadczeń przeprowadzonych na materiale bydłym i króliczym, których celem było określenie, jakie są zdolności rozwojowe *in vivo* blastocyst bydłych uzyskanych techniką *in vitro*, wyhodowanych z zygot poddanych mikroiniekcji różnymi stężeniami DNA oraz określenie wpływu krótkotrwałej hodowli *in vitro* zygot króliczych po mikroiniekcji DNA na ich rozwój *in vivo*. Ustalenie tych wyników pozwala bowiem określić liczbę możliwych do uzyskania (potencjalnie) transgenicznych osobników, a poprzez to wydajność całego procesu.

1. Materiał i metody

1.1. Bydło

1.1.1. Uzyskiwanie niedojrzałych oocytów bydłych

Niedojrzałe oocyty bydłe uzyskiwano z wyizolowanych pęcherzyków jajnikowych pobieranych z jajników jałówek i krów poddanych ubojowi. Jajniki transportowano do laboratorium w temperaturze 28-30°C. Pęcherzyki izolowano w czasie 2-3 godzin od uboju. Przed izolacją pęcherzyków jajniki przepłukiwano 3 krotnie w płynie PBS z dodatkiem kanamycyny (0,075 g/l) (Sigma, USA). Oocyty uzyskiwano przez rozerwanie wyizolowanych pęcherzyków jajnikowych o średnicy 2-5 mm, w medium TCM 199 z dodatkiem 10% FCS, zbuforowanego 25 mM HEPES (Sigma, USA). Uzyskane oocyty oceniano morfologicznie, przeznaczając do procesu dojrzewania (IVM) i zapłodnienia pozaustrojowego (IVF) tylko oocyty z prawidłową morfologicznie cytoplazmą i zwartymi komórkami *cumulus* (5).

1.1.2. Produkcja zygot *in vitro*

Oocyty do produkcji zygot metodą *in vitro* uzyskiwano zgodnie z metodyką podaną w punkcie 1. Wyselekcjonowane oocyty poddawano procesowi dojrzewania (IVM) w 2 ml medium TCM 199, o pH 7,4 (Sigma, USA) z dodatkiem 20% surowicy rujowej (produkcja własna) i 2 mM NaHCO₃, w obecności 3-5 x 10⁶ komórek granulocyty/ml. Komórki granulocyty uzyskiwano z wyizolowanych pęcherzyków jajnikowych o średnicy 3-5 mm. Kompleksy oocyty/komórki granulocyty hodowano 23-24 godziny w temperaturze 39°C, w atmosferze 5% CO₂ w powietrzu przy pełnej wilgotności (5,6). Po 24 godzinach hodowli z granuloczą dojrzałe oocyty poddawano procesowi zapłodnienia *in vitro*. Do inseminacji stosowano nasienie mrożone wyselekcjonowanych buhajów o sprawdzonej wcześniej powtarzalnej przydatności do zapłodnienia. Nasienie separowano me-

tołą *swim-up* przez podwarstwianie pod 1 ml medium TALP bez jonów wapnia (Sigma, USA) i inkubowano przez jedną godzinę w temperaturze 39°C (5,6). Po okresie inkubacji nasienie przemywano stosując wirowanie w medium do kapacytacji (500 g x 10 minut). Przemyte nasienie inkubowano 15 minut z heparyną (100 mg/ml, 39°C, 5% CO₂) (Sigma, USA). Dojrzałe oocyty przemywano 3 krotnie w medium TALP i delikatnie usuwano komórki *cumulus* szklaną pipetą. Następnie oocyty, w grupach po pięć sztuk, umieszczano w 50 ml kroplach medium TALP do zapłodnienia (5), zawierającego mieszaninę penicylaminy/hypotauryny/epinefryny (Sigma, USA). Krople przykrywano olejem mineralnym (Sigma, USA). Do kropli dodawano kapacytowane nasienie o koncentracji $1,5 \times 10^6$ plemników/ml. Gamety inkubowano przez 20-22 godziny w temperaturze 39°C (5% CO₂, 100% wilgotności). Po okresie hodowli przeznaczone do mikroiniekcji zygoty oceniano morfologicznie i sprawdzano obecność ciałek kierunkowych. Podobnie postępowano z zygotami przeznaczonymi do hodowli kontrolnej, nie poddawany mikroiniekcji DNA.

1.1.3. Mikroiniekcja

Zygoty wyprodukowane na drodze zapłodnienia pozaustrojowego (*in vitro*) przed zabiegiem mikroiniekcji poddawano wirowaniu (20 000 g x 5 min) w celu uwidocznienia przedjądrzy (7,8). Zabieg mikroiniekcji przeprowadzano w komorze manipulacyjnej, wypełnionej medium TCM 199, zbuforowanym 25 mM HEPES (Sigma, USA). Mikroiniekcję przeprowadzano pod mikroskopem wyposażonym w system Nomarskiego, stosując obiektyw 40 x (9). Konstrukt genetyczny WAP-bGH wprowadzano do jednego z przedjądrzy zygot. Stężenia DNA wynosiły 2 ng/ml, 4 ng/ml lub 6 ng/ml. Wprowadzany konstrukt genetyczny składał się z części promotorowej zawierającej fragment kodujący białko kwaśnej serwatki (*Whey Acidic Protein* — WAP) połączony z odcinkiem genu kodującym bydlęcy hormon wzrostu (*bovine Growth Hormone* — bGH), który został wyprodukowany w Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moleculaire, INRA, Francja.

1.1.4. Hodowla *in vitro* do stadium blastocysty

Hodowlę pozaustrojową od stadium zygoty do stadium blastocysty, w przypadku wszystkich grup doświadczalnych oraz grupy kontrolnej, przeprowadzano we współhodowli z komórkami nabłonka jajowodowego (3,10). Komórki bydlęcego nabłonka jajowodowego pobierano na 72-48 godzin przed zabiegiem mikroiniekcji z wypreparowanych jajowodów jałówek rzeźnych, będących w fazie lutealnej cyklu rujowego. Komórki pobierano przez kilkukrotne, delikatne wprowadzenie do światła jajowodu szklanej pipety. Zgromadzone komórki przepłukiwano dwukrotnie medium TCM 199. Następnie, ustalano koncentracje tak, aby wynosiła $2-3 \times 10^6$ komórek/ml medium Menezo B₂ (bioMerieux, Francja) (5). Komórki nabłonka rozpipetowywano do naczynek czterooczkowych (0,5 ml/oczek), w których uprzednio przygotowano warstwę kolagenu, mającą ułatwić komórkom nabłonka przytwierdzenie się

do podłoża (11,12). Hodowlę wspomagającą inkubowano do momentu wprowadzenia zygot po mikroiniekcji (48-72 godz. od pobrania nabłonka). Na 6-8 godzin przed wprowadzeniem zygot całkowicie wymieniano medium, usuwając nie przytwierdzone do podłoża komórki nabłonka. Zygoty uzyskane *in vitro* po mikroiniekcji DNA hodowano przez 7-8 dni do stadium blastocysty. W trakcie hodowli, co 48 godzin, podmieniano 0,2 ml medium B₂ (9).

Po zakończeniu hodowli procent uzyskanych blastocyst liczono w stosunku do wyprodukowanych zygot.

1.1.5. Przenoszenie zarodków

Zarodki w stadium rozwojowym blastocysty przenoszono metodą niechirurgiczną. Zarodki wprowadzano do rogu macicy jałówek biorczyń przygotowanych hormonalnie. W celu synchronizacji cyklu rujowego biorczyń, na 78 godzin przed planowanym uzyskiwaniem oocytów, podawano im domięśniowo 2 ml analogu prostaglandyny PGF 2a (Gabbrostim, Vetem, Włochy). Na biorczyźnie wybierano jałówki o wyraźnych objawach rujowych oraz te, u których w 7 dniu cyklu stwierdzano obecność wyraźnego ciała żółtego na jednym z jajników (badanie rektalne). Zarodki wprowadzano za pomocą katetera typu Vorlein (Vorlein, Niemcy) do rogu macicy, po stronie którego na jajniku stwierdzono wcześniej obecność ciała żółtego. Badanie rektalne na ciąży przeprowadzano około 54-60 dnia po transplantacji (tylko u jałówek u których nie stwierdzono wcześniej wyraźnych objawów rujowych).

1.2. Królik

1.2.1. Superowulacja dawczyń, synchronizacja biorczyń

Do doświadczeń używano samice rasy nowozelandzkiej białej, będące w wieku 5-7 miesięcy i masie ciała 3-4 kg.

Superowulację u samic wywoływano przez domięśniowe podanie 100 jm preparatu PMSG-Serogonadotropin (Biowet, Polska). Po 72 godzinach dawczyni inseminowano i podawano dożylnie 100 jm preparatu HCG-Biogonadył (Biomed, Polska). Biorczyniami zygot były również samice rasy nowozelandzkiej białej, o wadze 3-4 kg. W celu synchronizacji biorczyń, w tym samym czasie co dawczyniom podawano im dożylnie preparat HCG-Biogonadył (Biomed, Polska) w ilości 50 jm i stymulowano przy użyciu szklanej bagietki.

1.2.2. Uzyskiwanie oraz ocena morfologiczna zygot przed zabiegiem mikroiniekcji

Przydatne do zabiegu mikroiniekcji DNA zygoty uzyskiwano z wypreparowanych jajowodów samic dawczyń w 18 godzin od podania HCG. Wypreparowane jajowody przepłukiwano uzupełnionym płynem PBS w ilości ok.

10 ml/jajowód, o temperaturze 37°C. Zygoty wyszukiwano pod mikroskopem stereoskopowym. Zygoty z wyraźnie uformowanymi ciałkami kierunkowymi oraz widocznymi przedjądrzami przenoszono do komory mikromanipulacyjnej wypełnionej płynem PBS uzupełnionym dodatkiem 10% FCS.

1.2.3. Mikroiniekcja

Mikroiniekcję przeprowadzano pod mikroskopem wyposażonym w system Nomarskiego, stosując obiektyw 40 x. Konstrukt genetyczny WAP-Fuc-Tiv wprowadzano do męskiego przedjądrza zygoty. Stężenie DNA wynosiło 2 ng/ml (stężenie standardowe). Wprowadzany konstrukt genetyczny został wyprodukowany w Edison Biotechnology Center, Ohio University, USA.

1.2.4. Krótkotrwała hodowla *in vitro*

Po wykonaniu zabiegu mikroiniekcji DNA, część zygot przenoszono z komory manipulacyjnej do naczynka do hodowli, wypełnionego medium Menezo B2 (BioMerieux, Francja). Naczynko umieszczano w inkubatorze z laminarnym przepływem 5% CO₂ i temperaturze 39°C, na około 16 godzin. Pozostałe zygoty przenoszono do jajowodów zsynchronizowanych biorczyń w przeciągu 2 godzin od mikroiniekcji.

1.2.5. Przenoszenie zygot poddanych mikroiniekcji i zarodków 4-6 blastomerowych po hodowli *in vitro*

Zygoty lub zarodki 4-6 blastomerowe przenoszono metodą chirurgiczną do jajowodów zsynchronizowanych biorczyń. Przenoszenie zygot i zarodków przeprowadzano w pełnej narkozie operacyjnej. Zygoty i zarodki wprowadzano do jajowodu, od strony lejka, za pomocą cienkiej rurki poliuretanowej, połączonej ze strzykawką typu Hamilton 50 ml. Do jednego jajowodu wprowadzano nie więcej niż 12 zygot, które umieszczano w kateterze, w jak najmniejszej objętości płynu PBS uzupełnionego 20% FCS.

2. Wyniki

2.1. Bydło

Ze 168 oocytów w pierwszej grupie doświadczalnej (grupa I) poddanych procesom dojrzewania (IVM) i zapłodnienia pozaustrojowego (IVF) uzyskano 118 (70,2%) przydatnych do mikroiniekcji zygot, do przedjądrzy których wprowadzono wektor genetyczny o koncentracji 2 ng/ml. Po przeprowadzeniu mikroiniekcji podzieliło się 85 (50,6%) zygot. W rezultacie współhodowli *in vitro* z bydlęcym nabłonkiem jajowodowym w 7 dniu hodowli uzyskano 36 (30,7%) blastocyst. Jedną z uzyskanych blastocyst przeszczepiono do macicy zsyn-

chronizowanej biorczyń, która się nie zacieliła. Drugą grupę doświadczalną stanowiły zygoty uzyskane *in vitro*, do przedjądrzy których wprowadzano DNA o koncentracji 4 ng/ml. Procesom dojrzewania (IVM) oraz zapłodnienia pozaustrojowego poddano 839 oocytów bydłych, z których wyprodukowano 596 (71,0%) przydatnych do zabiegu mikroiniekcji DNA zygot. Po przeprowadzeniu zabiegu mikroiniekcji rozwój kontynuowało 260 (30,1%) zygot. Stadium blastocysty osiągnęło 100 (16,8%) zarodków. Siedemdziesiąt cztery uzyskane blastocysty przeszczepiono 36 zsynchronizowanym biorczyń. Dwie biorczyń zacieliły się. Uzyskano dwa cielęta. Efektywność transplantacji mierzona liczbą urodzonych cieląt w stosunku do liczby poddanych zabiegowi transplantacji biorczyń wyniosła w tej grupie doświadczalnej 5,5%. Z 220 oocytów (grupa III) wyprodukowano 151 (68,6%) zygot. Po zabiegu mikroiniekcji DNA o koncentracji 6 ng/ml, podzieliło się 58 (26,3%) zygot. Stadium blastocysty osiągnęło 21 (13,9%) zarodków. Zsynchronizowanym 11 biorczyń przeszczepiono 12 blastocyst. W rezultacie uzyskano jedno cielę. Efektywność transplantacji w tej grupie doświadczalnej wyniosła 9,0%.

Grupę kontrolną stanowiły 352 oocyty bydłce, które poddano procesom dojrzewania i zapłodnienia *in vitro*. W rezultacie przeprowadzonych procesów uzyskano 250 (71,0%) podzielonych zygot (zarodki 2-komórkowe), z których do stadium blastocysty rozwinęło się 81 (23,0%) zarodków. Pięćdziesiąt sześć wyprodukowanych blastocyst przeszczepiono 34 biorczyń. Siedem biorczyń zacieliło się. Uzyskano 8 cieląt. Skuteczność zabiegu transplantacji w grupie kontrolnej wyniosła 23,5%. Wyniki uzyskane dla poszczególnych grup doświadczalnych oraz dla grupy kontrolnej zestawiono w tabeli 1.

TABELA 1
EFEKTYWNOŚĆ UZYSKIWANIA BLASTOCYST BYDŁĘCYCH Z ZYGOT *IN VITRO*
PO MIKROINEKTCJI WAP-bGH ORAZ EFEKTYWNOŚĆ TRANSPLANTACJI

Grupa	I	II	III	Kontrola
Koncentracja DNA	2 ng/ml	4 ng/ml	6 ng/ml	—
liczba oocytów	168	839	220	352
liczba zygot/%	118/70,2	596/71,0	151/68,6	—*
liczba podzielonych/%	85/50,6	260/30,1	58/26,3	250/71,0
liczba blastocyst/%	36/30,7	100/16,8	21/13,9	81/23,0
liczba biorczyń	1	36	11	34
liczba TPT ¹ blastocyst	1	74	12	56
liczba ciąż/cieląt (%)	0/0 (0)	2/2 (5,5)	1/1 (9,0)	7/8 (23,5)

¹ przeniesionych; * zygoty nie poddane mikroiniekcji.

2.2. Królik

Zabiegowi mikroiniekcji poddano 1090 zygot. Pięćset siedemnaście (potencjalnie) transgenicznych zygot przeniesiono w ciągu 2 godzin po mikro-

iniekcji do jajowodów 25 zsynchronizowanych biorczyń. W rezultacie przeniesienia uzyskano 24 (4,7%) żywo i 8 (1,5%) martwo urodzonych królików. Efektywność przenoszenia wyniosła 6,2%. Drugą grupę stanowiło 479 zarodków 4-6 blastomerowych, które uzyskano po hodowli *in vitro* (ok. 16 godzin) z zygot po przeprowadzeniu zabiegu mikroiniekcji. Zarodki te przeniesiono do jajowodów 21 zsynchronizowanych biorczyń. Uzyskano 57 (11,9%) żywo i 5 (1,0%) martwo urodzonych królików.

Efektywność przenoszenia wyniosła w tym przypadku 12,9%. Dane zestawiono w tabeli 2.

TABELA 2
WYNIKI PRZENOSZENIA ZARODKÓW KRÓLICZYCH
W ZALEŻNOŚCI OD POSTĘPOWANIA Z ZYGOTAMI PO MIKROINIEKCJI DNA

Postępowanie po mikroiniekcji DNA	Liczba przeniesionych zygot poddanych mikroiniekcji DNA	Liczba biorczyń	Liczba urodzonych królików żywych (%) / martwych (%)	Łącznie (%)
przenoszenie w ciągu 2 godz. po mikroiniekcji	517	25	24 (4,7) / 8 (1,5)	32 (6,2)
przenoszenie po ok. 16 godz. hodowli <i>in vitro</i>	479	21	57 (11,9) / 5 (1,0)	62 (12,9)

3. Omówienie wyników

Aby uzyskać jedną transgeniczną krowę zabiegowi mikroiniekcji należy poddać około 1000 zygot bydłych. Zygoty, po wprowadzeniu do ich przedjądrzy DNA, należy następnie doprowadzić do stadium rozwojowego blastocysty, tzn. stadium rozwojowego, które przy zastosowaniu niechirurgicznej metody transplantacji można przeszczepić zsynchronizowanym biorczyń. W przypadku królika efektywność procesu transgenezy jest dużo wyższa, chociaż ciągle niezadowalająca.

Do tej pory, odnotowano tylko dwa przypadki uzyskania pojedynczych osobników bydła, u których stwierdzono integrację wprowadzonego genu (13,14). Brak natomiast informacji potwierdzających uzyskanie ekspresji wprowadzonych genów.

W pracach z zakresu transgenezy u bydła, podstawową metodą uzyskiwania zygot przydatnych do zabiegu mikroiniekcji DNA jest metoda ich pozaustrojowej produkcji (13). Z przeprowadzonych do tej pory eksperymentów, wiadomo, że zygoty bydłce uzyskiwane na drodze pozaustrojowej (*in vitro*) mają obniżone zdolności rozwojowe, w porównaniu do zygot uzyskiwanych *in vivo* (9). Mikromanipulacje, związane z procesem wprowadzania wektora genetycznego do przedjądrzy zygot bydłych, powodują dalsze osłabienie tych zdolności. Podniesienie koncentracji wprowadzanego do przedjądrzy zygot DNA (standardowa koncentracja wynosi 2 ng/ml), a co za tym idzie, zwiększenie

liczby kopii wprowadzanego wektora, mające na celu zwiększenie prawdopodobieństwa integracji wprowadzanego genu działa niekorzystnie. Okazało się bowiem, że podniesienie koncentracji wektora powoduje znaczne obniżenie liczby możliwych do uzyskania zarodków w stadium blastocysty (15). Najlepszym testem zdolności rozwojowych zarodków jest ich rozwój w warunkach *in vivo*, a w jego rezultacie urodzenie się normalnego osobnika. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że zdolności implantacyjne blastocyst bydłecych, uzyskanych z zygot *in vitro* po mikroiniekcji DNA, są dla wszystkich badanych grup doświadczalnych kilkukrotnie niższe od tych, jakie mają blastocysty wyhodowane *in vitro*, z zygot nie poddanych mikromanipulacjom (tab. 1). Liczba uzyskanych blastocyst, po wprowadzeniu standardowej koncentracji DNA (2 ng/ml) jest porównywalna do tej jaką uzyskano w grupie kontrolnej. Podniesienie koncentracji (4 lub 6 ng/ml) spowodowało spadek, prawie o połowę, liczby uzyskanych blastocyst. Po przeniesieniu blastocyst wyhodowanych z zygot po mikroiniekcji uzyskano dużo niższy procent zacielen w porównaniu do tego jaki otrzymano dla grupy kontrolnej. Wykazano także, że zdolności rozwojowe tych blastocyst *in vivo*, są również dużo słabsze. Na tej podstawie można wysunąć przypuszczenie, że niekorzystne działanie wprowadzonego DNA rozciąga się również na okres rozwoju zarodka w macicy, obniżając jego zdolność do implantacji. Częściowe potwierdzenie tego dałoby przeprowadzenie wstępnej analizy molekularnej metodą PCR, na pobranych w trakcie hodowli *in vitro* blastomerach, pochodzących od zarodków rozwijających się z zygot po mikroiniekcji DNA. Pozwoliłoby to, z jednej strony, na selekcję tylko tych zarodków u których stwierdzono by obecność wprowadzonego DNA, z drugiej, na lepsze wykorzystanie biocyrni. Ograniczeniem stosowania tej metody jest jednak to, że zarodki byłyby poddane dodatkowym manipulacjom niekorzystnie wpływającym na ich rozwój. Ponadto metoda PCR nie pozwala na stwierdzenie czy wprowadzony gen, w komórkach rozwijającego się zarodka występuje w formie zintegrowanej z jego genomem. Z przedstawionych przez nas rezultatów wynika, że uzyskana niska efektywności przenoszenia, (potencjalnie) transgenicznych blastocyst bydłecych, w porównaniu do tej jaką uzyskano dla blastocyst wyhodowanych z zygot nie poddanych mikroiniekcji DNA, jest wynikiem ich obniżonej zdolności do implantacji.

W przypadku prac przeprowadzanych nad uzyskiwaniem transgenicznych królików, powszechnie stosowanym sposobem, stosowanym również przez nas, było bezpośrednie, tzn. dokonywane w przeciągu około 2 godzin od zabiegu mikroiniekcji DNA przenoszenie transformowanych zygot do jajowodów zsynchronizowanych biocyrni. Postępowanie takie było jednak niezadowalające. Uzyskiwaliśmy bowiem około 6-7% żywo urodzonych królicząt w stosunku do liczby przeniesionych zygot. Dodatkowo około 3% uzyskiwanych królicząt było martwo urodzonych. Celem podjętych badań było otrzymanie zwiększonego stopnia implantacji przenoszonego materiału, a poprzez to zwiększenie efektywności uzyskiwania (potencjalnie) transgenicznych królików. Wprowadzenie krótkotrwałej hodowli *in vitro* (ok. 16 godzin) zygot po mikroiniekcji DNA do stadium zarodkowego 4-6 blastomerów spowodowało prawie dwukrotny wzrost liczby urodzonych królików. Efektywność przenie-

szenia zarodków była o 100% wyższa w porównaniu do rezultatów otrzymanych po przeniesieniu zygot nie hodowanych. Za stosowaniem opisanej metody przemawia również to, że ponad 90% poddanych mikroiniekcji zygot króliczych rozwija się w warunkach *in vitro* (tab. 2).

Literatura

1. Brinster R. L., Chen H. Y., Trumbauer M. E., Yagle M. K., Palmiter R. D., (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4438-4442.
2. Gordon J. W., (1989), Int. Rev. Cytol., 115, 171-229.
3. Ellington J. E., Farrel P. B., Simken M. E., Foote R. H., Goldman E. E., McGreyth A. B., (1990), Journal of Reproduction and Fertility, 89, 293-299.
4. Wall R. J., Seidel G. E. Jr, (1992), Theriogenology, 38, 337-357.
5. Kańska L., Ryńska B., Smorąg Z., (1995), Theriogenology, 43, 859-870.
6. Thomas W. K., Schnieke A., Seidel G. E. Jr, (1993), Theriogenology, 40, 679-688.
7. Kay G. W., Hawk H. W., Waterman R. A., Wall R. J., (1991), Animal Biotechnology, 2(1), 45-59.
8. McEvoy T. G., Sreenan J. M., (1990), Theriogenology, 33, 819-828.
9. Jura J., Kopchick J. J., Chen W. Y., Wagner T. E., Modliński J. A., Reed M. A., Knapp J. R., Smorąg Z., (1994), Theriogenology, 41, 1259-1266.
10. Boccart C., Mermillod P., Delecoeuillerie C., Dessy F., (1991), Theriogenology, 35(1), 187-205.
11. Eyestone W. H., Vignieri I, First N. L., (1987), Theriogenology, 27, 228 Abstr.
12. Fukuda Y., Ichikawa M., Naito K., Toyoda Y., (1990), Biology of Reproduction, 42, 114-119.
13. Hyttinen J. M., Peura T., Tolvanen M., Alhonen L., Sinervirta R., Halmekyto M., Myohanen S., Janne J., (1994), Bio/Technology, 12, 606-608.
14. Hoeschele I., (1990), Journal of Dairy Science, 73, 2601-2618.
15. Jura J., Smorąg Z., Skrzyszowska M., Kańska L., Gajda B., (1996), Journal of Physiology and Pharmacology, 47, 2, Suppl. 1, 156.
16. Krimpenfort P., Rademakers A., Eyestone W., van der Shans A., van den Broek S., Kooiman P., Kootwijk E., Platenburg G., Pieper F., Strijker R., de Boer H., (1991), Bio/Technology, 9, 844-847.

Factors affecting production of transgenic farm animals: cattle and rabbits

Summary

There are many factors affecting transgenic farm animals production. One of them is the effectiveness of the transfer of zygotes and embryos obtained after DNA microinjection. Low effectiveness of the transfer of potentially transgenic blastocysts in cattle is due to their decreased developmental potential in comparison to the blastocysts developed from not microinjected zygotes. A simple short term *in vitro* culture used for rabbit zygotes after microinjection increased twice the number of produced potentially transgenic rabbits.

Key words:

cattle, rabbit, zygote, microinjection, DNA, *in vitro* culture, transplantation.

Adres do korespondencji:

Jacek Jura, Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki, 32-083 Balice, k. Krakowa; e-mail: jjura@izoo.krakow.pl