

Молекулярная генетика

Рубрика

<https://doi.org/10.31043/2410-2733-2020-3-3-11>
УДК 612.398.145.3:[636.39:602.6]

Д. М. Богданович, Е. В. Петрушко, В. Н. Кузнецова

Концентрация рекомбинантного лактоферрина человека в молоке трансгенных коз третьего и четвертого года лактации

Аннотация. Исследован показатель концентрации рекомбинантного лактоферрина человека (рчЛФ) в молоке 22 трансгенных коз разного возраста: среднее содержание рчЛФ в молоке животных-продуцентов 4-го года лактации было выше аналогичного показателя коз 3-го года лактации на 13,7% (6,07 и 5,24 г/л, соответственно).

Установлено, что наибольшее количество рекомбинантного гликопротеина вырабатывалось молочной железой животных во 2 и 4 кварталах исследуемого годового периода — 6,40 и 6,33 г/л для продуцентов 3-его года и 8,14 и 7,02 г/л для коз 4-ого года лактации, соответственно. Выявлена корреляция между содержанием целевого белка в молоке и сезоном года ($p < 0,01$) — максимальная продукция рчЛФ в молоко коз установлена для позднего весеннего и зимнего периодов.

Отмечена вариабельность в содержании белка в молоке между особями. У животного №0747 за время исследования установлен относительно низкий уровень изучаемого показателя — 0,11–2,52 г/л, тогда как максимальная его величина выявлена у продуцента №0403 — 4,52–9,06 г/л (разница более чем в 4 раза). Диапазон индивидуальной вариабельности по показателю содержания рчЛФ в молоке коз 3-ей и 4-ой лактации составил 0,11–9,06 г/л.

Анализ концентрации рчЛФ в молоке и мониторинг его динамики позволяют получать данные, которые в дальнейшем могут использоваться при составлении селекционных программ, планировании производства молока, а также для улучшения генофонда стада трансгенных животных.

Ключевые слова: трансгенные козы, рекомбинантный человеческий лактоферрин, молоко, лактация, сезонная изменчивость.

Авторы:

Богданович Дмитрий Михайлович — кандидат сельскохозяйственных наук; e-mail: dmb7878@mail.ru;

Петрушко Елена Владимировна — научный сотрудник; e-mail: petrushkoalena@mail.ru;

Кузнецова Виктория Николаевна — научный сотрудник; e-mail: genlab2009@gmail.com.

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству»; Республика Беларусь, 222160, Минская область, г. Жодино, ул. Фрунзе, 11.

Введение. Лактоферрин (ЛФ) впервые обнаружен в качестве железосвязывающего белка в коровьем молоке [1]. Данный гликопротеин вырабатывается эпителиальными клетками и нейтрофилами, присутствует в различных секретах организма, таких как молоко, слезы, слюна, сок поджелудочной железы и секреты репродуктивных органов [2–6].

Обширные исследования показали, что молекула ЛФ обладает иммуностимулирующим, иммуномодулирующим, противовирусным, регенеративным, антиоксидантным, противовоспалительным

действием, а также антибактериальной (бактериостатической и бактерицидной) и противоопухолевой активностью [3; 7–13].

Практическая ценность промышленного получения ЛФ связана с его использованием в ряде потребительских товаров: детских смесей, пищевых продуктов для человека и домашних животных, а также в составе косметических средств для ухода за кожей и средств гигиены полости рта, некоторых фармацевтических и ветеринарных препаратов [14–16].

Среди всех биологических жидкостей организма максимальная концентрация ЛФ установлена в молоке. Тем не менее, его содержание в женском молоке и молоке животных различается. В молозиве женщин содержится около 6 мг/мл ЛФ, тогда как концентрация данного белка в молозиве коров составляет около 1 мг/мл. Количество лактоферрина как в коровьем, так и в женском молоке резко снижается в первые дни лактации (после прохождения молозивного периода) до уровней 0,09 и 2 мг/мл соответственно [17; 18]. Концентрация искомого белка в молоке свиней, мышей и лошадей варьируется от 0,2 до 2 мг/мл, тогда как в молоке крыс, кроликов и собак он не обнаруживается [19–21].

В козьем молоке лактоферрин содержится в небольших количествах. Динамика его содержания в молоке коз продемонстрирована Hiss et al. [22]. Максимальная концентрация белка, измеренная в образцах молозива, составляла 387 мкг/мл, через неделю снижалась на 20%, до 32-й недели находилась в диапазоне 10–28 мкг/мл, после 33-й недели повышалась и к 44-й неделе достигала значения 107 мкг/мл. В результате был сделан вывод, что время отбора проб и порядковый номер лактации оказывает значительное влияние на содержание ЛФ ($P < 0,05$ и $P < 0,01$, соответственно). Повышение его концентрации в молозивный период и в период окончания лактации связано, вероятно, с физиологическими изменениями, происходящими в организме животных.

Белок-аналог человеческого ЛФ к настоящему времени получен в различных системах экспрессии: микроскопических грибах, трансгенных растениях и сельскохозяйственных животных [23]. Получение рекомбинантных белков человека из молока животных-продуцентов является одним из приоритетных направлений генной инженерии в современной биотехнологии, так как среди этих систем только молочная железа домашних животных способна осуществлять посттрансляционные модификации, которые необходимы для обеспечения биологической активности и стабильности белка, такие как гликозилирование [24–26].

Так, козы-продуценты рчЛФ были получены многими исследователями [3; 27–30]. Уровень экспрессии рекомбинантного белка в молочной железе коз в каждом случае различался. По данным Zhang et al. [27] и Han et al. [28], его содержание в молоке составляло от 0,765 до 2,6 г/л. В исследованиях Yua et al. [29] сообщается о синтезе в молоко более 30 мг/мл рчЛФ со стабильным уровнем концентрации в течение всего лактационного периода.

В 2003–2007 годах коллективом российских и белорусских ученых была реализована научно-техническая программа Союзного государства «БелРосТрансген», результатом которой стали козы, трансгенные по гену лактоферрина человека. Самцы-основатели трансгенной линии были получены в результате пронуклеарной микроинъекции плазмидной генной конструкции, содержащей последовательность гена LTF под контролем бета-казеинового промотора козы [33]. В дальнейшем потомки первичных трансгенных животных составили стадо продуцентов рчЛФ. Рекомбинантный белок, содержащийся в молоке коз-продуцентов, биоэквивалентен лактоферрину женского молока со всеми присущими ему терапевтическими эффектами: антибактериальными, противовирусными, иммуномодулирующими, регенеративными. Средний уровень продукции белка интереса в молоке таких животных составил 3,3 г/л, 5,76 и 5,47 г/л для продуцентов первого, второго и третьего лактационного периода, соответственно [2; 3; 30].

В молоке генномодифицированных коз содержится в 3 раза больше лактоферрина, чем в грудном молоке [31].

Развитие направления по созданию и содержанию генно-модифицированных животных с повышенным содержанием рекомбинантного лактоферрина человека продолжается в настоящее время. В этой связи значительный интерес может представлять дальнейшее изучение уровня синтеза гликопротеина молочной железой животных-продуцентов последующих лактаций.

Таким образом, анализ концентрации рчЛФ в молоке и мониторинг его динамики позволят более целенаправленно работать со стадом, своевременно вносить коррективы в планы размножения животных, находить и учитывать взаимообусловленные признаки, способствующие повышению продукции целевого белка, что, в свою очередь, будет содействовать эффективному использованию трансгенных животных в технологической цепочке разработки и создания продуктов различного назначения на основе дефицитных и уникальных субстанций человека [30].

Материалы и методы исследований. Исследования проводились в РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» (г. Жодино, Республика Беларусь) в течение 2018 г.

Молоко, предназначенное для исследований, было получено от здоровых коз-продуцентов рчЛФ третьего ($n=11$) и четвертого ($n=11$) годов лактации, живой массой 30–40 кг, вымя которых до и после доения подвергалось обработке в соот-

ветствии с гигиеническими требованиями. Формирование групп животных осуществлялось по принципу пар-аналогов с последующим содержанием коз в одинаковых условиях и идентичным рационом кормления в течение всего периода исследований.

Отбор проб молока проводился во время дневной дойки с первых недель лактации, исключая молозивный период, двукратно в каждом месяце от каждого животного. Способ доения — с использованием индивидуального передвижного доильного аппарата.

Полученное молоко фильтровалось, тщательно перемешивалось, после чего проводился отбор образцов в стерильные полипропиленовые микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл. Аликвоты образцов замораживались и хранились при -20°C до проведения анализа.

Измерение концентрации рчЛФ в молоке проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием фотометра Tescan Sunrise (Tescan, Австрия) и набора реагентов для определения концентрации лактоферрина, разработанного ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (г. Санкт-Петербург), согласно методике, предложенной производителем набора. Принцип метода измерения заключался в последовательной сорбции ЛФ из образцов с известными концентрациями (6,25–400 нг/мл) и тестируемых проб разведенного молока в лунках планшета, поверхность которых была предварительно покрыта аффинными антителами к ЛФ, с последующей реакцией вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой из корней хрена.

После каждого этапа избыток реагентов удалялся промывкой буферным раствором. С помощью хромогенного субстрата выявлялась пероксидазная метка, выполнялось фотометрическое измерение оптической плотности растворов в лунках при длине волны 492 нм. По калибровочному графику зависимости оптической плотности от концентрации рчЛФ производился расчет концентрации рекомбинантного белка в тестируемых образцах.

Полученные результаты обработаны статистически с помощью приложений Microsoft Office Excel (Microsoft) и Statistica 13 (StatSoft). Установление взаимосвязи между сезоном года и измеренной концентрацией рчЛФ в молоке производилось с применением дисперсионного анализа Фридмана с конкордацией Кендалла. Сравнение средней продуктивности по целевому белку коз 3-й и 4-й лактации производилось с применением критерия Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение. Среднеквартальные значения концентрации рчЛФ, полученные по результатам измерений содержания лактоферрина, проводимых дважды в месяц в индивидуальных пробах молока коз-продуцентов 3-го и 4-го года лактации, отражены в таблицах 1 и 2.

Можно отметить (табл. 1), что в течение исследуемого периода был установлен высокий уровень концентрации рчЛФ в молоке животных-продуцентов 3-го года лактации — 3,17–6,40 г/л. Среднегодовое содержание белка интереса составило 5,24 г/л.

Определена корреляция ($p < 0,01$; $W = 0,72$) между сезоном года и содержанием целевого белка

Таблица 1. Концентрация рчЛФ в молоке трансгенных коз 3-го года лактации ($n=11$)

№ козы	Концентрация рчЛФ, г/л $\pm$ SEM				Среднее значение по году, г/л $\pm$ SEM
	1 кв.	2 кв.	3 кв.	4 кв.	
0744	3,65 $\pm$ 1,16	8,22 $\pm$ 1,12	6,93 $\pm$ 0,70	7,48 $\pm$ 2,32	6,57 $\pm$ 1,01
0302	3,83 $\pm$ 0,41	9,77 $\pm$ 2,96	6,11 $\pm$ 0,15	7,47 $\pm$ 0,66	6,80 $\pm$ 1,24
0495	3,66 $\pm$ 1,14	7,37 $\pm$ 1,25	4,88 $\pm$ 0,75	7,93 $\pm$ 0,31	5,96 $\pm$ 1,01
0403	4,52 $\pm$ 0,87	9,48 $\pm$ 1,45	7,70 $\pm$ 2,71	9,06 $\pm$ 2,17	7,69 $\pm$ 1,12
0915	2,16 $\pm$ 0,09	8,45 $\pm$ 1,19	5,45 $\pm$ 1,53	2,88 $\pm$ 0,37	4,74 $\pm$ 1,43
0747	0,11 $\pm$ 0,04	0,86 $\pm$ 0,12	2,52 $\pm$ 1,13	1,49 $\pm$ 0,84	1,25 $\pm$ 0,51
0831	3,87 $\pm$ 0,10	7,66 $\pm$ 1,58	5,05 $\pm$ 0,98	6,16 $\pm$ 0,72	5,69 $\pm$ 0,81
0475	2,64 $\pm$ 0,84	4,91 $\pm$ 1,12	3,5 $\pm$ 1,36	6,06 $\pm$ 1,61	4,28 $\pm$ 0,76
0448	2,58 $\pm$ 0,45	2,66 $\pm$ 1,01	1,70 $\pm$ 0,18	4,38 $\pm$ 0,97	2,83 $\pm$ 0,56
0775	3,78 $\pm$ 0,64	5,9 $\pm$ 0,87	5,07 $\pm$ 1,05	8,15 $\pm$ 1,26	5,73 $\pm$ 0,92
0304	4,12 $\pm$ 0,09	5,12 $\pm$ 0,84	6,64 $\pm$ 0,40	8,61 $\pm$ 0,65	6,12 $\pm$ 0,98
Среднее значение по кварталу, г/л $\pm$ SEM	3,17$\pm$0,38	6,40$\pm$0,85	5,05$\pm$0,56	6,33$\pm$0,74	5,24$\pm$0,56

в молоке коз 3-го периода лактации — максимальная продукция рчЛФ в молоко коз установлена для позднего весеннего (2 квартал) и зимнего (4 квартал) периодов.

Установлено, что в течение года в молоке, полученном от животных 4-го года лактации, содержание белка находилось в диапазоне 3,73–8,14 г/л. Среднегодовое содержание гликопротеина составило 6,07 г/л. Выявлена взаимосвязь ($p < 0,05$; $W = 0,55$) между сезоном года и уровнем продукции целевого белка — наибольшее количество рекомбинантного белка синтезируется в молоко продуцентов во 2 и 4 кварталах.

Сравнительный анализ показал, что старшие животные продуцировали на 0,83 г/л или на 13,7% больше белка в сравнении с младшими.

Максимальный уровень рчЛФ в молоке для животных обеих групп приходился на 2 квартал

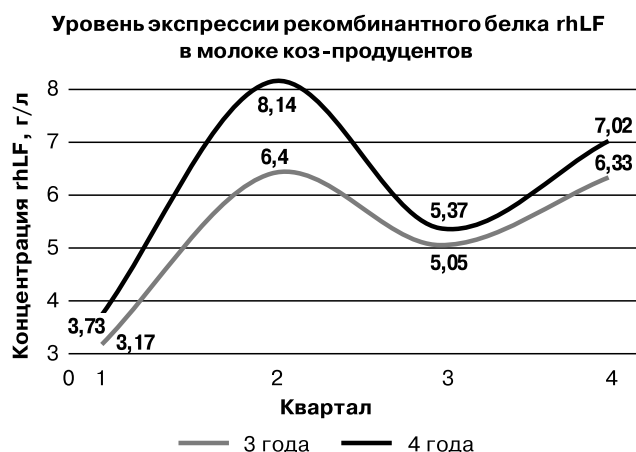


Рис. 1. Концентрация рчЛФ в молоке коз-продуцентов 3-го и 4-го года лактации

(рис.1): 6,4 г/л для животных 3-го и 8,14 г/л для животных 4-го года лактации. Разница между группами составила 1,74 г/л или 21%. Незначительное снижение уровня синтеза белка наблюдалось в 4-м квартале: 6,33 г/л для коз 3-го и 7,02 г/л для животных 4-го года лактации, соответственно, с разницей между группами 0,69 г/л или 10%.

Преимущество старших животных в выработке гликопротеина отмечалось также в 3-м квартале исследуемого периода. Для животных 3-й и 4-й лактации количество белка составляло 5,05 и 5,37 г/л, соответственно, с разницей 0,32 г/л или 6%.

Минимальная выработка рчЛФ приходилась на зимний период — 3,17 и 3,73 г/л, соответственно, для животных 3-го и 4-го года лактации (разница составила 0,56 г/л или 15%).

Сравнение средних концентраций рчЛФ в молоке коз 3-й и 4-й лактации не показало статистически значимых различий ($p > 0,05$).

Более высокий уровень продукции рчЛФ козами в поздний весенний и зимний — ранний весенний период может быть обусловлен как физиологическими особенностями животных-продуцентов (изменение уровня гормонов, соотношения катаболических и анаболических обменных процессов), так и средовыми факторами (изменение рациона, типа выпаса, изменение двигательной активности).

В свою очередь, отмечалась изменчивость в содержании целевого белка в молоке между особями (табл. 1). Так, у животного № 0747 за время исследования был установлен относительно низкий уровень рчЛФ — 0,11–2,52 г/л, тогда как

Таблица 2. Концентрация рчЛФ в молоке трансгенных коз 4-го года лактации ($n=11$)

№ козы	Концентрация рчЛФ, г/л $\pm$ SEM				
	1 кв.	2 кв.	3 кв.	4 кв.	Среднее значение по году, г/л $\pm$ SEM
3435	3,01 $\pm$ 0,18	5,36 $\pm$ 0,99	2,94 $\pm$ 0,29	6,25 $\pm$ 0,14	4,39 $\pm$ 0,84
0898	4,12 $\pm$ 1,23	9,73 $\pm$ 1,78	5,41 $\pm$ 1,42	9,97 $\pm$ 0,36	7,31 $\pm$ 1,49
0928	4,56 $\pm$ 0,66	6,88 $\pm$ 0,62	7,07 $\pm$ 0,27	9,35 $\pm$ 0,89	6,97 $\pm$ 0,98
0715	3,94 $\pm$ 1,01	7,92 $\pm$ 1,54	4,93 $\pm$ 0,47	8,6 $\pm$ 2,61	6,35 $\pm$ 1,13
0905	4,09 $\pm$ 0,98	7,55 $\pm$ 0,52	5,70 $\pm$ 1,30	6,92 $\pm$ 2,05	6,07 $\pm$ 0,76
0848	3,24 $\pm$ 0,34	5,59 $\pm$ 0,32	6,68 $\pm$ 1,24	7,33 $\pm$ 1,58	5,71 $\pm$ 0,90
0491	5,04 $\pm$ 1,00	10,32 $\pm$ 2,63	8,46 $\pm$ 0,30	8,19 $\pm$ 1,14	8,0 $\pm$ 1,10
0751	2,46 $\pm$ 0,07	8,91 $\pm$ 2,43	3,30 $\pm$ 1,16	6,23 $\pm$ 0,02	5,23 $\pm$ 1,47
3426	2,87 $\pm$ 0,05	9,51 $\pm$ 2,09	3,70 $\pm$ 1,78	3,73 $\pm$ 0,07	4,95 $\pm$ 1,53
0309	3,65 $\pm$ 1,04	8,7 $\pm$ 2,64	4,75 $\pm$ 1,67	6,59 $\pm$ 1,31	5,92 $\pm$ 1,11
0444	4,00 $\pm$ 0,14	9,1 $\pm$ 2,27	6,15 $\pm$ 2,75	4,08 $\pm$ 0,16	5,83 $\pm$ 1,20
Среднее значение по кварталу, г/л $\pm$ SEM	3,73$\pm$0,23	8,14$\pm$0,50	5,37$\pm$0,51	7,02$\pm$0,60	6,07$\pm$0,32

у животного № 0403 показана самая высокая концентрация белка — 4,52–9,06 г/л (разница более чем в 4 раза). Данный факт подтверждает необходимость мониторинга стада коз-продуцентов рчЛФ по показателю концентрации белка и проведения селекционной работы по разведению животных с его экономически значимым количеством в молоке. В аналогичных исследованиях [32] было высказано предположение о том, что одной из причин низкой продукции «белка интереса», вероятно, является интеграция трансгена в неактивную область хромосомы. В этой связи, вероятно, позиционный эффект индуцирует снижение секреции белка в клетках молочной железы.

Высокая индивидуальная вариабельность уровня продукции целевого белка может быть обусловлена способом получения первичных трансгенных козлов-основателей линии коз-продуцентов рчЛФ — пронулеарной микроинъекцией плазмидной генной конструкции, содержащей последовательность гена лактоферрина человека под контролем бета-казеинового промотора козы и некоторые регуляторные области [33]. Высока вероятность того, что интеграция трансгена в геном животных-хозяев носила случайный характер, к тому же в предыдущих исследованиях было установлено, что количество встроившихся в геном первичных трансгенных животных копий гена LTF, а также количество копий трансгена, передавшихся потомкам первичных трансгенных козлов, варьировалось в довольно широких пределах: 17–28 копий трансгена на диплоидный геном для первичных трансгенных животных Lac-2 и Lac-1 и 6–19 копий трансгена на диплоидный геном для продуцентов F₂–F₃ соответственно. При этом в результате скрининга трансгенных коз по показателю содержания биоаналога лактофер-

рина человека в молоке методом ELISA сильной прямой положительной корреляции между количеством копий трансгена на диплоидный геном и концентрацией рчЛФ в молоке животных-продуцентов, по которой можно косвенно судить об уровне экспрессии трансгена, установлено не было [34].

В свою очередь, необходимо отметить, что в молоке коз, трансгенных по гену лактоферрина человека, концентрация белка в исследуемом периоде находилась на более высоком уровне в сравнении с его естественным содержанием в женском грудном молоке (1–2 г/л): для коз-продуцентов 3-го года лактации — 5,24 г/л, для животных 4-го года лактации — 6,07 г/л [16–18].

Выводы:

1. Исследован показатель концентрации рекомбинантного лактоферрина человека в молоке 22-х трансгенных коз разного возраста: среднее содержание рчЛФ в молоке животных-продуцентов 4-го года лактации было выше аналогичного показателя коз 3-го года лактации на 13,7% (6,07 и 5,24 г/л соответственно).

2. Установлена корреляция между содержанием целевого белка в молоке и сезоном года — наибольшее количество рекомбинантного гликопротеина вырабатывалось молочной железой животных во 2-м и 4-м кварталах исследуемого годового периода — 8,14 и 7,02 г/л для коз четвертого года лактации и 6,4 и 6,33 г/л для продуцентов третьего года, соответственно.

3. Отмечена вариабельность в содержании «белка интереса» в молоке между особями. Диапазон индивидуальной вариабельности по данному показателю составил 0,11–9,06 г/л.

Литература

1. Sorensen M. The proteins in whey / M. Sorensen, S. P. L. Sorensen // Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim. — 1939. — Vol. 23. — P. 35–99.
2. Петрушко Е. В., Богданович Д. М. Качественная характеристика молока коз-продуцентов рекомбинантного лактоферрина человека третьего и четвертого года лактации // Перспективные аграрные и пищевые инновации: материалы Междунар. науч.-практ. конф., г. Волгоград, 6–7 июня 2019 г. Волгоград, 2019. Ч. 1. С. 161–171.
3. Богданович Д. М., Петрушко Е. В. Экспрессия рекомбинантного лактоферрина человека в молоке коз-продуцентов в течение года // Новости науки в АПК. Ставрополь: Агрус, 2018. № 2(11), т. 1 (по материалам VI Междунар. конф. «Инновационные разработки молодых учёных — развитию агропромышленного комплекса»). С. 168–172.
4. Masson P. L. An iron-binding protein common to many external secretions / P. L. Masson et al. // Clin. Chem. Acta. — 1966. — Vol. 14. — P. 735–739.
5. Masson P. L. Lactoferrin, an iron binding protein in neutrophilic leukocytes / P. L. Masson et al. // J. Exp. Med. — 1969. — Vol. 130. — P. 643–658.
6. Levay P. F. Lactoferrin: a general review / P. F. Levay et al. // Haematologica. — 1995. — Vol. 80. — P. 252–267.

7. Влияние рекомбинантного лактоферрина человека на биологическую полноценность и санитарное качество спермы хряков / Д. М. Богданович, Т. Н. Бровко, И. Н. Шевцов, О. И. Гливанская, Н. А. Гродникова // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. Жодино, 2018. Т. 53, ч. 1: Генетика, разведение, селекция, биотехнология размножения и воспроизводство. Технология кормов и кормления, продуктивность. С. 21-28.
8. Zarembek K. A. Human polymorphonuclear leukocytes inhibit *Aspergillus fumigatus* conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion / K. A. Zarembek et al. // *Journal of Immunology*. — 2007. — Vol. 178. — P. 6367–6373.
9. Valenti P. Lactoferrin: an important host defense against microbial and viral attack / P. Valenti et al. // *Cellular and Molecular Life Sciences*. — 2005. — Vol. 62. — P. 2576–2587.
10. Actor J. K. Lactoferrin as a natural immune modulator / J. K. Actor et al. // *Current Pharmaceutical Design*. — 2009. — Vol. 15. — P. 1956–1973.
11. Legrand D. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses / D. Legrand et al. // *Cellular and Molecular Life Sciences*. — 2005. — Vol. 62. — P. 2549–2559.
12. Ward P. P. Lactoferrin and host defense / P. P. Ward et al. // *Biochem. Cell Biol.* — 2002. — Vol. 80. — P. 95–102.
13. Ward P. P. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview / P. P. Ward et al. // *Cellular and Molecular Life Sciences*. — 2005. — Vol. 62. — P. 2540–2548.
14. Wakabayashi H. K. Lactoferrin research, technology and applications / H. K. Wakabayashi et al. // *Int. Dairy J.* — 2006. — Vol. 16. — P. 1241–1251.
15. Stelwagen K. Immune components of bovine milk and colostrum / K. Stelwagen et al. // *J. Anim. Sci.* — 2009. — Vol. 87. — P. 3-9.
16. García-Montoya I. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview / I. García-Montoya et al. // *J. Anim. Sci.* — 2012. — Vol. 182. — P. 226–236.
17. Sanchez L. Concentration of lactoferrin and transferring throughout lactation in cow's colostrums and milk / L. Sanchez et al. // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. — 1988. — Vol. 369. — P. 1005–1008.
18. Montagne P. Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation / P. Montagne et al. // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2001. — Vol. 501. — P. 241–247.
19. Stumpf P. Secretory and defensive functions of the duct system of the lactating mammary gland of the African elephant (*Loxodonta africana*, proboscidea) / P. Stumpf, U. Welsch // *Zoomorphology*. — 2004. — Vol. 123. — P. 155–167.
20. Baker E. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin / E. Baker et al. // *Cell Mol. Life Sci.* — 2005. — Vol. 62(22) . — P. 2592–30.
21. Conesa C. Isolation of lactoferrin from milk of different species: Calorimetric and antimicrobial studies / C. Conesa et al. // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* — 2008. — Vol. 150. — P. 131–139.
22. Hiss S. Lactoferrin concentrations in goat milk throughout lactation / S. Hiss et al. // *Small Ruminant Research*. — 2008. — Vol. 80. — P. 87–90.
23. Conesa C. Recombinant human lactoferrin: a valuable protein for pharmaceutical products and functional foods / C. Conesa et al. // *Biotechnol Adv.* — 2010. — Vol. 28. — P. 831–838.
24. Будевич А. И., Богданович Д. М., Петрушко Е. В. Микробиологические показатели и количество соматических клеток при хранении молока коз-производителей rhlf второго и третьего года лактации // Новые подходы к разработке технологий производства и переработки сельскохозяйственной продукции: материалы Междунар. науч.-практ. конф., г. Волгоград, 6-7 июня 2018 г. Волгоград, 2018. С. 135–139.
25. Clark A. J. The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant proteins / A. J. Clark et al. // *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. — 1998. — Vol. 3. — P. 337-350.
26. Houdebine L. M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals / L. M. Houdebine et al. // *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. — 2009. — Vol. 32. — P. 107–121.
27. Zhang J. Expression of active recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats / J. Zhang et al. // *Protein Expr. Purif.* — 2008. — Vol. 57(2). — P. 127–135.
28. Han Z. S. High-level expression of human lactoferrin in the milk of goats by using replication-defective adenoviral vectors / Z. S. Han et al. // *Protein Expr. Purif.* — 2007. — Vol. 53. — P. 225–231.
29. Yua H. The dominant expression of functional human lactoferrin in transgenic cloned goats using a hybrid lactoferrin expression construct / H. Yua et al. // *Journal of Biotechnology*. — 2012. — Vol. 53. — P. 198–205.

30. Физико-химические показатели молока коз-производителей рекомбинантного лактоферрина третьего и четвертого года лактации / А. И. Будевич и др. // Зоотехническая наука Беларуси: сб. науч. тр., посвящ. 70-летию со дня основания Научно-практического центра Национальной академии наук Беларуси по животноводству. Жодино, 2019. Т. 54, ч. 2: Технология кормов и кормления, продуктивность. Технология производства, зоогигиена, содержание. С. 141-147.
31. Budzevich A. Recombinant human lactoferrin expressed in transgenic goats / A. Budzevich et al. // The Xth International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and applications, 08–12 May, 2011. Mazatlan, Mexico. O-VI-2. P. 66.
32. Maga E. A. Productions and processing of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland / E. A. Maga et al. // Journal of Dairy Science. — 2006. — Vol. 89. — № 2. — P. 518–524.
33. Goldman I. Production of human lactoferrin in animal milk / I. Goldman et al. // Biochemistry and Cell Biology. — 2012. — Vol. 90(3). — P. 513–519.
34. Semak I. V. Development of dairy herd of transgenic goats as biofactory for large-scale production of biologically active recombinant human lactoferrin / I. V. Semak et al. // Transgenic Research. — 2019. — Vol. 28. — Issue 5–6. — P. 465-478. DOI: 10.1007/s11248-019-00165-y.

Bogdanovich D., Petrushko E., Kuzniatsova V.

The concentration of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats of the third and fourth year of lactation

Abstract. *The concentration of recombinant human lactoferrin (rhLF) in the milk of 22 transgenic goats of different ages was studied: the average concentration of rhLF in the milk of goats-producers of the 4th year of lactation was 13.7% higher than that of goats of the 3rd year of lactation (6.07 and 5.24 g/l, respectively).*

It was found that the maximum level of recombinant glycoprotein was produced by the mammary gland of animals in the 2nd and 4th quarters of the studied year period. Protein's concentration in milk measured in the 2nd and 4th quarters was 6.4 g/l and 6.33 g/l for producers of the third year of lactation and 8.14 g/l and 7.02 g/l for goats of the fourth year of lactation, respectively. The correlation between the season of the year and the content of the target protein in milk was detected ($p < 0.01$), it was found that the most active rhLF production in goat milk occurred in late spring and winter periods.

Variability in the content of the protein of interest in milk between individuals was noted. During the study a relatively low level of rhLF was established in animal №0747 – 0.11–2.52 g/l, while its maximum value was detected in the producer № 0403 – 4.52–9.06 g/l (more than 4 times difference). The range of individual variability in terms of rhLF content in the milk of goats of the third and the fourth lactation was 0.11–9.06 g/l.

Milk of genetically modified goats contains 3 times more lactoferrin than human breast milk.

Therefore, rhLF concentration testing in goat milk and tracking the dynamics of this indicator allows us to obtain data that can be used later for breeding pro-grams formation, milk production planning and also to improve the gene pool of transgenic animals.

Key words: transgenic goats, recombinant human lactoferrin, milk, lactation, seasonal variation.

Authors:

Bogdanovich D. — PhD (Agr. Sci.), Associate Professor; e-mail: dmb7878@mail.ru;

Petrushko E. — Researcher; e-mail: petrushkoalena@mail.ru;

Kuzniatsova V. — Researcher; e-mail: genlab2009@gmail.com.

RUE «Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Livestock»; Republic of Belarus, 222160, Minsk region, Zhodino, st. Frunze, 11.

References

1. Sorensen M. The proteins in whey / M. Sorensen, S. P. L. Sorensen // *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim.* — 1939. — Vol. 23. — P. 35–99.
2. Petrushko E. V., Bogdanovich D. M. Qualitative characteristics of milk from goats-producers of recombinant human lactoferrin in the third and fourth years of lactation // *Perspective agrarian and food innovations: materials of the Intern. scientific-practical Conf., Volgograd, June 6-7, 2019 Volgograd, 2019. Part 1.* P. 161–171.
3. Bogdanovich D. M., Petrushko E. V. Expression of recombinant human lactoferrin in the milk of goat producers during the year // *News of science in the agro-industrial complex. Stavropol: Agrus, 2018. No. 2 (11), vol. 1 (based on the materials of the VI International conference «Innovative developments of young scientists – the development of the agro-industrial complex»).* P. 168–172.
4. Masson P. L. An iron-binding protein common to many external secretions / P. L. Masson et al. // *Clin. Chem. Acta.* — 1966. — Vol. 14. — P. 735–739.
5. Masson P. L. Lactoferrin, an iron binding protein in neutrophilic leukocytes / P. L. Masson et al. // *J. Exp. Med.* — 1969. — Vol. 130. — P. 643–658.
6. Levay P. F. Lactoferrin: a general review / P. F. Levay et al. // *Haematologica.* — 1995. — Vol. 80. — P. 252–267.
7. Influence of recombinant human lactoferrin on biological usefulness and sanitary quality of boar sperm / D. M. Bogdanovich, T. N. Brovko, I. N. Shevtsov, O. I. Glivanskaya, N. A. Grodnikova // *Zootechnical science of Belarus: collection of scientific works. scientific. tr. Zhodino, 2018. Vol. 53, part 1: Genetics, breeding, selection, biotechnology of reproduction and reproduction. Feed and feeding technology, productivity.* P. 21–28.
8. Zarembek K. A. Human polymorphonuclear leukocytes inhibit *Aspergillus fumigatus* conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion / K. A. Zarembek et al. // *Journal of Immunology.* — 2007. — Vol. 178. — P. 6367–6373.
9. Valenti P. Lactoferrin: an important host defense against microbial and viral attack / P. Valenti et al. // *Cellular and Molecular Life Sciences.* — 2005. — Vol. 62. — P. 2576–2587.
10. Actor J. K. Lactoferrin as a natural immune modulator / J. K. Actor et al. // *Current Pharmaceutical Design.* — 2009. — Vol. 15. — P. 1956–1973.
11. Legrand D. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses / D. Legrand et al. // *Cellular and Molecular Life Sciences.* — 2005. — Vol. 62. — P. 2549–2559.
12. Ward P. P. Lactoferrin and host defense / P. P. Ward et al. // *Biochem. Cell Biol.* — 2002. — Vol. 80. — P. 95–102.
13. Ward P. P. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview / P. P. Ward et al. // *Cellular and Molecular Life Sciences.* — 2005. — Vol. 62. — P. 2540–2548.
14. Wakabayashi H. K. Lactoferrin research, technology and applications / H. K. Wakabayashi et al. // *Int. Dairy J.* — 2006. — Vol. 16. — P. 1241–1251.
15. Stelwagen K. Immune components of bovine milk and colostrum / K. Stelwagen et al. // *J. Anim. Sci.* — 2009. — Vol. 87. — P. 3–9.
16. García-Montoya I. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview / I. García-Montoya et al. // *J. Anim. Sci.* — 2012. — Vol. 182. — P. 226–236.
17. Sanchez L. Concentration of lactoferrin and transferring throughout lactation in cow's colostrums and milk / L. Sanchez et al. // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* — 1988. — Vol. 369. — P. 1005–1008.
18. Montagne P. Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation / P. Montagne et al. // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2001. — Vol. 501. — P. 241–247.
19. Stumpf P. Secretory and defensive functions of the duct system of the lactating mammary gland of the African elephant (*Loxodonta africana*, proboscidea) / P. Stumpf, U. Welsch // *Zoomorphology.* — 2004. — Vol. 123. — P. 155–167.
20. Baker E. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin / E. Baker et al. // *Cell Mol. Life Sci.* — 2005. — Vol. 62(22). — P. 2592–30.
21. Conesa C. Isolation of lactoferrin from milk of different species: Calorimetric and antimicrobial studies / C. Conesa et al. // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* — 2008. — Vol. 150. — P. 131–139.
22. Hiss S. Lactoferrin concentrations in goat milk throughout lactation / S. Hiss et al. // *Small Ruminant Research.* — 2008. — Vol. 80. — P. 87–90.

23. Conesa C. Recombinant human lactoferrin: a valuable protein for pharmaceutical products and functional foods / C. Conesa et al. // *Biotechnol Adv.* — 2010. — Vol. 28. — P. 831–838.
24. Budevich A. I., Bogdanovich D. M., Petrushko E. V. Microbiological parameters and the number of somatic cells during storage of milk from goats-producers of rhlf in the second and third years of lactation // *New approaches to the development of technologies for the production and processing of agricultural products: materials of the Intern. scientific-practical Conf., Volgograd, June 6-7, 2018.* Volgograd, 2018. P. 135–139.
25. Clark A. J. The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant proteins / A. J. Clark et al. // *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* — 1998. — Vol. 3. — P. 337–350.
26. Houdebine L. M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals / L. M. Houdebine et al. // *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* — 2009. — Vol. 32. — P. 107–121.
27. Zhang J. Expression of active recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats / J. Zhang et al. // *Protein Expr. Purif.* — 2008. — Vol. 57(2). — P. 127–135.
28. Han Z. S. High-level expression of human lactoferrin in the milk of goats by using replication-defective adenoviral vectors / Z. S. Han et al. // *Protein Expr. Purif.* — 2007. — Vol. 53. — P. 225–231.
29. Yua H. The dominant expression of functional human lactoferrin in transgenic cloned goats using a hybrid lactoferrin expression construct / H. Yua et al. // *Journal of Biotechnology.* — 2012. — Vol. 53. — P. 198–205.
30. Physicochemical indicators of milk from goats-producers of recombinant lactoferrin of the third and fourth years of lactation / A. I. Budevich et al. // *Zootechnical science of Belarus: collection of articles. scientific. tr., dedicated. The 70th anniversary of the founding of the Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for animal husbandry.* Zhodino, 2019. Vol. 54, part 2: Feed and feeding technology, productivity. Production technology, animal hygiene, maintenance. P. 141–147.
31. Budzevich A. Recombinant human lactoferrin expressed in transgenic goats / A. Budzevich et al. // *The Xth International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and applications, 08–12 May, 2011. Mazatlan, Mexico.* O-VI-2. P. 66.
32. Maga E. A. Productions and processing of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland / E. A. Maga et al. // *Journal of Dairy Science.* — 2006. — Vol. 89. — № 2. — P. 518–524.
33. Goldman I. Production of human lactoferrin in animal milk / I. Goldman et al. // *Biochemistry and Cell Biology.* — 2012. — Vol. 90(3). — P. 513–519.
34. Semak I. V. Development of dairy herd of transgenic goats as biofactory for large-scale production of biologically active recombinant human lactoferrin / I. V. Semak et al. // *Transgenic Research.* — 2019. — Vol. 28. — Issue 5–6. — P. 465–478. DOI: 10.1007/s11248-019-00165-y.