

УДК 636.52/.58.082.12:575.1

ТРАНСГЕНЕЗ У КУР МИКРОИНЪЕКЦИЕЙ ДНК В ЗИГОТУ

Коршунова Л. Г., главный научный сотрудник, д-р биол. наук

Фисинин В. И., директор, академик РАН, д-р с.-х. наук, профессор

Карапетян Р. В., заведующий лабораторией, канд. биол. наук

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» (ФГБНУ ВНИТИП)

Аннотация: Цель работы заключалась в оценке эффективности метода микроинъекции ДНК в зиготу кур для получения трансгенной птицы. Была использована генная конструкция, содержащая репортерный ген β -галактозидазы с цитомегаловирусным промотором. Частота получения трансгенных особей в эксперименте составила 25%; при этом значительная часть эмбрионов (75%) была мозаична по интегрированному трансгену.

Summary: The work aim is DNA microinjection method evaluation into hen zygote for transgenic bird receiving. The gen construction has been used containing the reporter β -galactosidase gen with cytomegalovirus promoter. Transgenic individual receiving frequency has been 25 percent in the experiment. Significant part of embryos that is 75 percent has been mosaic for transgen integrated.

Ключевые слова: цыпленок, эмбрион, зигота, микроинъекция, β -галактозидаза.

Key Words: chick, embryo, microinjection, β -galactosidase.

Принципиальные возможности, которыми обладает современная молекулярная генетика, позволяют изменять генотип и фенотип целого организма. Конечно, человек воздействовал на генотипы растений и животных тысячелетия, с тех пор как он начал заниматься сельским хозяйством. Но новейшая биология дает мощные и специфические средства воздействия на живые организмы. Поскольку не существует видового барьера для интеграции чужеродных генов, могут быть созданы линии трансгенных особей совершенно нового типа. В настоящее время намечены несколько направлений создания трансгенной птицы [1]. Самым очевидным и уже реализованным на практике является использование трансгенных птиц в качестве «фабрик» по производству определенных белков для медицинских и промышленных целей [2]. Второе направление — получение промышленных линий с наследственной устойчивостью к конкретным инфекционным заболеваниям [3, 4]. Наиболее сложным представляется повышение продуктивных качеств путем трансгенеза с использованием ростовых и прочих количественных признаков, которые, как правило, имеют полигенную основу [5–7].

В настоящее время существуют различные методы генетической мо-

дификации птицы [8]. Методы трансгенеза обладают большим потенциалом в приложении к практическому птицеводству. Использование трансгенеза для переноса полезного гена даже от одной линии птицы к другой (что достижимо и обычными селекционными методами) может дать большую экономию времени и средств за счет исключения возвратных скрещиваний, необходимых для удаления ненужных генов, передающихся при естественной половой гибридизации. Получение трансгенной птицы для хозяйственного использования предполагает создание линий. С этой точки зрения птица обладает большим преимуществом перед сельскохозяйственными млекопитающими благодаря быстрому половому созреванию и высокой плодовитости. Использование трансгенеза для передачи полезного гена от одной породы или линии к другой даже у быстроразмножающейся птицы сэкономило бы многие годы, необходимые на многочисленных скрещиваниях.

Для получения трансгенных животных чаще всего прибегают к микроинъекции ДНК в яйцеклетки. Причем исследователи стремятся к тому, чтобы трансген содержался во всех клетках животного и обязательно в половых — для передачи по-

томству. Поэтому перенос генов производят на самых ранних стадиях развития организма. Подходящим временем является пребывание его в состоянии одной-единственной клетки — зиготы. Однако особенности размножения птиц создают серьезные проблемы для исследователей. Курица образует в сутки одну оплодотворенную яйцеклетку, которая слишком велика и нежна для таких манипуляций с ней, которые производят с яйцеклетками млекопитающих при их инъекции чужеродной ДНК. Для нормального эмбрионального развития птичьей яйцеклетке необходимы третичные оболочки: белковая, подскорлупные и скорлупа. Дробление куриной яйцеклетки начинается уже в белковом отделе яйцевода, а в свежеснесенном яйце имеется уже 50–60 тыс. клеток. В основе разработанного нами метода лежит хирургическая операция, которая обеспечивает доступ к яйцеклетке, проведение в нее инъекции ДНК и имплантацию обратно в яйцевод для формирования полноценного инкубационного яйца. Самой ответственной и трудоемкой стадией в этой технологии является имплантация яйцеклетки в яйцевод. Только из половины имплантированных яйцеклеток получались морфологически нормальные яйца [9].

Дальнейшее совершенствование этого метода позволило проводить инъекции ДНК в яйцеклетки без их извлечения из половых путей птицы, вследствие чего существенно возросла эффективность метода [10]. Основное его достоинство заключается в отсутствии необходимости использовать сложную аппаратуру и среды для культивирования эмбрионов *in vitro*, выделять и пересаживать бластодермальные или примордиальные клетки.

С целью быстрой оценки эффективности трансгенеза и экспрессии трансгена в опыте использовали генную конструкцию, содержащую репортерный (индикаторный) ген β -галактозидазы с цитомегаловирусным промотором [11].

Материалы и методы

Опыты проводили на курах породы белый леггорн. Кур содержали в индивидуальных клетках при искусственном осеменении. У кур учитывали овulatoryные циклы, ежедневно регистрируя время снесения ими яиц. На операцию брали кур с ожидаемой овуляцией через 15–20 мин после снесения яйца. Под местной анестезией у кур вскрывали брюшную полость, обеспечивая доступ к воронке яйцевода. Инъекцию раствора ДНК проводили стеклянной микропипеткой диаметром острия 2–4 мкм в объеме 150–300 пиколитров в центр зародышевого диска яйцеклетки через стенку воронки яйцевода. К сожалению, контролировать глубину погружения микропипетки в яйцеклетку не представлялось возможным из-за отсутствия подходящей оптики. После микроинъекции брюшную полость зашивали и помещали кур на свои места в клетки. Снесенные на следующий день яйца инкубировали. В опыте использовали смесь кольцевых и линейных (*Hind III*) молекул плазмиды *pCMVlacZ*. Эмбрионы вскрывали на 4–6-е сут. инкубации, окрашивали и рассматривали под стереомикроскопом. Об экспрессии интегрированного гена β -галактозидазы судили по появлению синей окраски тканей эмбрионов, которая развивается благодаря образующимся под воздействием β -галактозидазы

нерастворимым кристаллам хромофора из субстрата *X Gal* [12, 13].

Результаты и обсуждение

Из 21 яйца, содержащего инъецированные геном β -галактозидазы яйцеклетки, эмбриональное развитие наблюдалось в 16. Из них трансгенными оказались четыре, в том числе один был полностью окрашенным, т.е. полностью трансгенным (*табл.*).

Частота получения трансгенных особей в этом эксперименте составила 25%; при этом значительная часть эмбрионов (75%) была мозаична по интегрированному трансгену.

Таким образом, разработанная хирургическая операция и приемы манипуляции с яйцеклеткой кур, позволяющие проводить в яйцеклетку микроинъекции ДНК, обеспечивают ее дальнейшее нормальное эмбриональное развитие. Микроинъекцией ДНК в

Таблица

Экспрессия гена β -галактозидазы в куриных эмбрионах (шт.)

Показатель	Стадия развития эмбрионов, сут.		
	4	5	6
Исследовано эмбрионов	3	9	4
Окрашившихся эмбрионов:	1	2	1
полностью	–	1	–
частично	1 (хорда, кишечник)	1 (кишечник)	1 (хорда, кишечник, глазные пузыри)

По визуальной оценке, ген β -галактозидазы экспрессировал и соответственно присутствовал во всех тканях этого эмбриона. Три эмбриона окрасились частично: были хорошо видны окрашенные хорда и зачатки внутренних органов — свидетельство того, что мозаичность (химерность) получаемых трансгенных цыплят по интегрированному трансгену довольно частое явление (*рис.*).

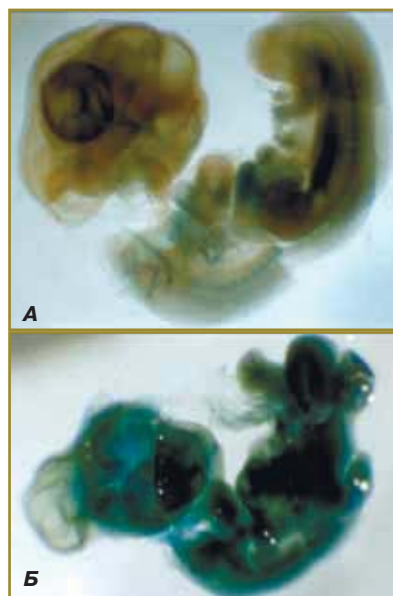


Рис. Эмбрионы кур после окрашивания на β -галактозидазную активность:

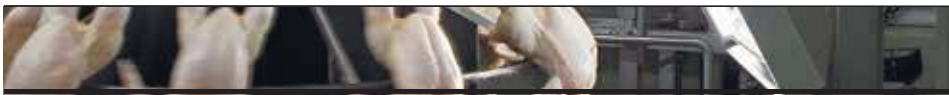
А — частичное окрашивание;

Б — полное окрашивание

зиготу получены трансгенные эмбрионы кур с геном β -галактозидазы. Показана экспрессия трансгенов. Практическое приложение работы видится в использовании генных конструкций, которые могут придать птице новые свойства или улучшить имеющиеся. Например, способность синтезировать в организме ценные фармакологические препараты или усваивать нетрадиционные корма. Возможно также создание трансгенной птицы с фенотипом, который превосходил бы уровень, уже достигнутый в птицеводстве. Скажем, характеризовался бы улучшением конверсии корма, уменьшением ожиренности тушки, увеличением устойчивости к заболеваниям. Возможно также существенное повышение продуктивных качеств сельскохозяйственной птицы, что является наиболее сложной задачей ввиду далеко неполных на сегодняшний день знаний об обусловленности на генном уровне процессов роста и развития. Успехи в этом направлении вполне возможны и могут быть достигнуты иногда достаточно неожиданно, как это произошло с трансгенными по гену бычьего соматотропина перепелами [14–16].

Литература

1. Коршунова Л.Г. Трансгенез и экспрессия генов у сельскохозяйственной птицы: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 2012. — 46 с.



2. Самойлов А.В. Разработка и совершенствование методов трансфекции экзогенной ДНК в эмбриональные клетки кур: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 2010. — 19 с.

3. Коршунова Л.Г., Карапетын Р.В., Зиадина О.Ф. Модификация генома кур по гену интерферона // Доклады Российской академии с.-х. наук. — 2014. — № 4. — С. 61–63.

4. Korshunova L.G., Karapetyan R.V., Ziadina O.F. Modification of chicken genome by interferon gene // Russian Agricultural Sciences. — 2014. — V. 40. — № 5. — P. 379–381.

5. Коршунова Л.Г. Биологические и продуктивные качества перепелов, трансгенных по гену бычьего соматотропина // Сельскохозяйственная биология. — 2011. — № 2. — С. 46–50.

6. Коршунова Л.Г., Карапетын Р.В. Гормональный и иммунный статус трансгенных перепелов // Ветеринария. — 2009. — № 5. — С. 15–16.

7. Коршунова Л.Г. Способ генетического улучшения продуктивных признаков птицы // Вестник РАСХН. — 2009. — № 3. — С. 72–73.

8. Коршунова Л.Г., Карапетын Р.В., Фисинин В.И. Методы генетической модификации и селекция сельскохозяйственной

птицы // Сельскохозяйственная биология. — 2013. — № 6. — С. 3–15.

9. Карапетын Р.В. Фенотипические проявления трансгенности перепелов, развившихся из яйцеклеток, инъецированных чужеродной ДНК // Сельскохозяйственная биология. — 1997. — № 4. — С. 89–96.

10. Коршунова Л.Г., Карапетын Р.В., Фисинин В.И. Трансформация генома птиц микроинъекцией ДНК в яйцеклетки на разных стадиях созревания // VI Конференция Балтийских стран по птицеводству. — Вильнюс, Литва, 1998. — С. 52–55.

11. Korshunova L.G., Karapetyan R.V., Fisinin V.I. Transgenesis in hens with DNA microinjection into zygote // 8th European Poultry Genetics Symposium. — Venice, Italy, 2013. — P. 47.

12. Карапетын Р.В., Коршунова Л.Г., Андреева Л.Е., Прокофьев М.И., Фисинин В.И. Инъекция гена бета-галактозидазы в яйцеклетки кур // Актуальные проблемы биотехнологии в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: тезисы докладов. — М., 1996. — С. 35–35.

13. Коршунова Л.Г., Карапетын Р.В. Исследование экспрессии гена б-галактозидазы в

трансгенных эмбрионах кур // Сб. науч. тр. ВНИТИП. — Т. 75. — Сергиев Посад: ВНИТИП, 2000. — С. 101–104.

14. Коршунова Л.Г. Качество яиц трансгенных перепелов // Птицеводство. — 2009. — № 4. — С. 35–36.

15. Коршунова Л.Г., Карапетын Р.В., Коршунов К.Р., Серикова В.А., Зиадина О.Ф. Сравнительная оценка яичной продуктивности потомков трансгенных и серых перепелов эстонской породы // Сб. науч. тр. ВНИТИП. — Т. 76. — Сергиев Посад: ВНИТИП, 2001. — С. 78–85.

16. Коршунова Л.Г., Карапетын Р.В., Петрина З.А., Зиадина О.Ф. Трансгенные технологии улучшения продуктивных качеств сельскохозяйственной птицы // Сб. научных трудов ВНИТИП. — Т. 84. — Сергиев Посад: ВНИТИП, 2010. — С. 18–24. □

Для контактов с авторами:

Коршунова

Людмила Георгиевна

e-mail: lg@vnitip.ru

Фисинин Владимир Иванович

Карапетын Рубен Ваагнович

Тел.: +7 (965) 244-41-26

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
ЛЕНЭКСПО



АГРОРУСЬ

XXIV МЕЖДУНАРОДНАЯ АГРОПРОМЫШЛЕННАЯ
ВЫСТАВКА-ЯРМАРКА



EXPOFORUM



25–28
АВГУСТА 2015

ВЫСТАВКА

559 УЧАСТНИКОВ | 49 РЕГИОНОВ РОССИИ
19 СТРАН | 14 150 СПЕЦИАЛИСТОВ АПК

22–30
АВГУСТА 2015

ЯРМАРКА

52 456 КВ. М | 117 307 ПОСЕТИТЕЛЕЙ
535 ФЕРМЕРСКИХ (КРЕСТЬЯНСКИХ) ХОЗЯЙСТВ

ИМПОРТОЗАМЕЩЕНИЕ •
ТЕХНИКА. ТЕХНОЛОГИИ. ОБОРУДОВАНИЕ •
РАЗВИТИЕ СЕЛЕКЦИОННЫХ СТАНЦИЙ •
И ПЛЕМЕННЫХ ХОЗЯЙСТВ

НОВОЕ
2015

• ЖИВОТНОВОДСТВО. КОРМА. ВЕТЕРИНАРИЯ
• РАСТЕНИЕВОДСТВО ЗАЩИЩЕННОГО ГРУНТА
• УДОБРЕНИЯ
• РЫБОВОДСТВО



ВК «ЛЕНЭКСПО», СПб, Большой пр. В. О., 103
тел. +7 (812) 240 40 40, доб. 231, 234, 235, 188, 254
farmer@expoforum.ru
www.agroporus.expoforum.ru

0+