

АКВАКУЛЬТУРА И ИСКУССТВЕННОЕ ВОСПРОИЗВОДСТВО

УДК 575:639.371.5

ИТОГИ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ КАРПА

© 2012 г. **Е.В. Иванёха¹, Л.Н. Дума¹, А.В. Рекубратский¹, В.В. Дума¹,
С.М. Расторгуев², В.А. Барминцев²**

*1 – ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного
рыбного хозяйства», Московская обл., Дмитровский р-н, пос. Рыбное, 141821*

*2 – ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного
хозяйства и океанографии», Москва, 107140*

Статья поступила в редакцию 25.05.12

Окончательный вариант 28.08.12

Получены генетически модифицированные карпы с геном гормона роста белого толстолобика. В потомствах от производителей со стабильно интегрированным трансгеном прослежена его передача в неизменной форме до поколения F₃. Сформированы 2 полностью трансгенных потомства F₃, у которых трансген без перестроек сохранялся до возраста 4 года. Для создания быстрорастущей формы карпа необходима дальнейшая селекция полученного материала.

Ключевые слова: генетическая модификация, карп, трансген, гормон роста, стабильность, селекция.

Разведение генетически модифицированной (ГМ) рыбы могло бы привести к значительному увеличению продукции рыбоводства и снижению нагрузки на естественные рыбные ресурсы. Созданы трансгенные формы рыб с повышенной скоростью роста, устойчивостью к болезням и абиотическим стрессам. Направленное улучшение рыбоводно-биологических характеристик рыб приводит к повышению их продуктивности и, как следствие, к повышению производительности товарного рыбоводства.

Однако отношение к генетически модифицированным организмам (ГМО) неоднозначное, высказываются сомнения в их пищевой и экологической безопасности. Некоторые исследователи утверждают, что отрицательные эффекты ГМО на здоровье человека могут проявиться не сразу и иметь необратимый характер (Кузнецов, Куликов, 2005). Как отмечают оппоненты, миллионы людей во всем мире употребляют ГМ продукты уже более 15 лет, и никаких побочных эффектов до сих пор не выявлено (Key et al., 2008). Несколько исследований указывают на негативные последствия употребления продуктов питания, содержащих ГМО, для животных (Ermakova, 2006; Ewen, Pusztai, 1999; de Vendomois et al., 2009). Эти работы подверглись критике за недостоверность и невоспроизводимость результатов (Маршалл, 2007; Mowat, 1999; Feldbaum, 1999; FitzGerald, 1999; FSANZ response..., 2009). Подавляющее большинство исследований подтвердило безопасность ГМО, что отмечается в докладе Департамента по исследованиям и инновациям Европейской комиссии (GMO Pundit..., 2010; European Commission ..., 2010).

Тем не менее, многие страны законодательно исключили из сферы торговли ГМ пищевые продукты или ограничили содержание ГМ источников в продуктах питания.

На сегодняшний день отсутствуют не только экспериментальные доказательства вредных последствий от употребления ГМО в пищу, но и научно обоснованные гипотезы о возможности таких последствий. Однако доказать

абсолютную безопасность всех без исключения ГМО в принципе невозможно. В каждом конкретном случае необходимо доказывать безопасность вполне конкретного ГМО или полученного из него продукта.

Гораздо сложнее оценить экологическую безопасность ГМО и прогнозировать последствия проникновения ГМ рыб в естественные сообщества. Возможный вариант снижения потенциальных рисков для окружающей среды – разведение трансгенных рыб в замкнутых системах, чтобы исключить их «утечку» в природные водоемы. Гарантией экологической безопасности ГМ рыб при случайном попадании из рыбоводного водоема в естественную среду считается их стерильность (Karpuscinski, 2005).

Всего в мире, по сведениям из разных источников, генетически модифицировано от 16 до 20 видов рыб, включая карпа, лососей и сома (ГМ лосось..., 2011; Du et al, 1992; Devlin et al, 1994; Hostetler et al, 2003; Wu et al, 2003; Karpuscinski, 2005; GloFish, 2006).

В 2003 г. на рынке появилась первая ГМ аквариумная рыбка данио (*Danio rerio*, Cyprinidae). Их отличием от натуральных особей является красная, зеленая или оранжевая флуоресцентная окраска тела. Данио с геном GFP медузы *Aequorea victoria* имеют зеленый цвет, с геном RFP красного коралла (из рода *Discosoma*) – красный, а рыбки, в геноме которых присутствуют оба гена – желтые. Благодаря наличию этих генов, кодирующих флуоресцирующие белки, рыбки ярко светятся в ультрафиолетовом свете. Они стали первым общедоступным ГМ домашним животным (GloFish, 2006).

Недавно американская компания «Yorktown Technologies» заявила о начале продаж светящихся суши из ГМ рыбок с геном GFP. Эти рыбки создавались в качестве декоративных объектов аквариумистики, но стали первым ГМ продуктом питания животного происхождения (Американцы готовят..., 2012).

Для минимизации потенциальных рисков от ГМО в современной аквакультуре разрабатываются различные биотехнологические приемы. Так, для обеспечения пищевой безопасности ГМ рыб созданы «all-fish» молекулярные конструкции, состоящие из структурных и регуляторных элементов только рыбного происхождения. Рыбы с такими конструкциями в геноме не будут продуцировать какие-либо новые белки, за исключением разновидностей рыбных биомолекул (Wu et al., 2003). Для обеспечения экологической безопасности при случайном побеге ГМ рыб в естественные водоемы разводят стерильных трансгенных особей.

Созданы трансгенные карпы с «all-fish» конструкцией, включающей ген гормона роста белого амура (gcGH) и промотор b-актина карпа (CA). У них отмечено значительное повышение скорости роста и эффективности использования корма, причем как у обычных диплоидов, так и у стерильных триплоидов. Белый амур и карп относятся к одному семейству, гомология аминокислотных последовательностей их гормонов роста достигает 97%. Результаты лабораторных исследований и полевых испытаний показали, что «all-fish» трансгенные карпы вполне безопасны для окружающей среды и здоровья человека (Wu et al., 2003). Информация о разрешении коммерциализации этого продукта отсутствует.

Стерильные самки ГМ атлантического лосося с промотором антифризного гена американской бельдюги и геном гормона роста чавычи (AquaBounty Technologies Inc., США) достигают товарной массы за 18-24 мес., тогда как

нетрансгенные лососи – за 30 мес. Результаты проведенных исследований показывают, что ГМ лосось не имеет биологически значимых различий с диким видом, т.е. он безопасен для потребителей. В 2011 г. FDA США приняло решение поддержать коммерциализацию данного продукта на рынке страны (ГМ лосось, 2010; ГМ лосось ..., 2011).

Цель наших исследований заключалась в модификации карпов генами хозяйственно ценных признаков, изучении стабильности и экспрессии трансгенов в полученных генерациях и эффективности их наследования в потомствах трансгенных производителей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектами генно-инженерных исследований являлись карпы (*Cyprinus carpio*). Сперму и яйцеклетки получали от производителей, содержащихся в прудах экспериментальной базы ФГУП «ВНИИПРХ» «Якоть».

Для генетической модификации рыб использовались следующие конструкции:

- «all-fish» рекомбинантная ДНК-конструкция ptMTa-scGH, содержащая ген гормона роста белого толстолобика *Hypophthalmichthys molitrix* (scGH) и промотор металлотионеина радужной форели (ptMTa);

- pCMV-csIGF1, содержащая кДНК гена инсулиноподобного фактора роста I кеты *Oncorhynchus keta* (IGF-I);

- экспрессирующий ретровирусный вектор pLNS, содержащий РНК-копию гена эритропоэтина Еро;

- ДНК-конструкция на основе вектора pIRES2-EGFP (Clontech, США) со встроенными сайтами LoxP для сайт-специфической рекомбинации, содержащая ген зеленого флуоресцирующего белка EGFP.

Генетическая модификация рыб проводилась посредством микроинъекций растворов конструкции в оплодотворенные яйцеклетки на стадии двух бластомеров. Для микроинъекций ретровирусного вектора pLNS с РНК-копией гена Еро использовали как целые клетки, трансформированные этим вектором (их вводили в перивителлиновое пространство), так и клеточный гомогенат (его вводили или в желток, или в бластодиск).

Идентификация трансгенных карпов проводилась с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими праймерами.

Для идентификации карпов с трансгеном scGH использовали праймеры AL4 (5'-AGCTGTCTGCGTGAACGCGCG-3') и GM35 (5'-AGCTGGTGCAGGTGTTGAACACG-3'). ПЦР проводили в следующем режиме: предварительная денатурация ДНК – 95°C – 13 мин; синтез ПЦР-продуктов: 5 циклов – 94°C – 40 сек, 62°C – 40 сек, 72°C – 40 сек; 5 циклов – 94°C – 40 сек, 60°C – 40 сек, 72°C – 40 сек; 35 циклов – 94°C – 30 сек, 58°C – 15 сек, 72°C – 15 сек, окончательная достройка цепей – 72°C – 10 мин.

Образцы соматических тканей (фрагменты плавников) и зрелых половых продуктов фиксировали в 96%-ном этаноле. Для выделения и очистки ДНК применяли фенольно-хлороформную (Blin, Stafford, 1976) и солевую (Miller et al., 1988) экстракцию. Разделение продуктов специфической амплификации проводили

методом горизонтального электрофореза в 1%-ном агарозном геле (Маниатис и др., 1984).

Для индукции гиногенеза икру трансгенных самок осеменяли генетически инактивированной посредством УФ-облучения (300 Дж/м^2) спермой. Для восстановления диплоидности гиногенетических гаплоидов подвергали тепловому шоку или через $0,2 \tau_0$ после осеменения (мейотический гиногенез), или через $1,7 \tau_0$ – (митотический гиногенез).

Для получения стерильных трансгенных триплоидов диплоидные яйцеклетки карасекарповых гибридов осеменяли спермой трансгенного самца карпа.

Для оценки продуктивности трансгенных карпов были проведены ростовые опыты в аквариумах и прудах. Контрольными группами служили карпы того же происхождения, у которых трансген не был выявлен. Чтобы учесть возможные различия условий выращивания в разных прудах, в ростовых опытах практиковали совместное выращивание контрольных и опытных групп или использовали метод «общего контроля». В последнем случае в каждый пруд совместно с экспериментальными группами были посажены карпы из общей для всех «контрольной» группы, которые отличались от исследуемых рыб характером чешуйного покрова.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для генетической модификации карпов были использованы 4 разных трансгена. Общее число полученных методами геной и геномной инженерии генераций приведено в таблице 1. Здесь же показано, в скольких из них обнаружены трансгенные карпы, а также в скольких были обнаружены особи со стабильно интегрированным трансгеном (у которых трансген не утрачивается с возрастом).

Таблица 1. Генерации карпов, модифицированных разными трансгенами (TG).

Table 1. Generations of common carp modified with different transgenes (TG).

Трансген	Генерация	Число полученных генераций	Число генераций с TG+	Число генераций со стабильной интеграцией TG
Ген scGH	Po	4	2	1
Ген scGH	F _h	6	5	2
Ген scGH	F1	11	9	2
Ген scGH	F1 Gmei	2	2	0
Ген scGH	F1 Gmit	1	1	0
Ген scGH	F2	7	5	1
Ген scGH	F3	1	1	1
Ген scGH	F3 Gmei	1	1	1
Ген scGH	FbTG	1	0	0
Ген csIGF1	Po	1	0	0
Ген Epo	Po	1	0	0
Ген EGFP	Po	2	1	0

Модификация карпов геном гормона роста белого толстолобика scGH проводилась для создания быстрорастущих форм. В соответствии с этой задачей используется «all-fish» рекомбинантная конструкция ptMTa-scGH, которая включает промоторно-энхансерную область гена металлотионеина «a» радужной форели

(tMTa) и хромосомную копию гена гормона роста белого толстолобика (scGH). Рыбы с такой конструкцией в геноме будут продуцировать только новую для карпа разновидность рыбного гормона роста. Карп и белый толстолобик принадлежат к одному семейству, для их гормонов роста характерна высокая степень гомологии аминокислотных последовательностей. Более того, эти полипептиды очень чувствительны к кислотам, щелочам и нагреванию, так что их физиологическая функция будет нарушена при рутинной кулинарной обработке (Wu et al., 2003).

Методом микроинъекций было получено несколько генераций первично трансгенных карпов (исходная генерация, P_0). Молекулярно-генетический анализ соматических тканей, а также икры и спермы половозрелых рыб, выявил наличие трансгена у части этих первичных трансформантов. От положительных по трансгену (TG+) производителей затем были получены несколько потомств Fh («гибридных» потомств от скрещивания трансгенных самцов с интактными самками) и F1 (потомства первого поколения от скрещивания трансгенных производителей). Среди них выявлено по 2 генерации, в которых встречались карпы со стабильно интегрированным трансгеном scGH (табл. 1, 3). Кроме того, от трансгенных самок P_0 были получены гиногенетические потомства – с применением как мейотического (Gmei), так и митотического гиногенеза (Gmit). Ожидается, что у гиногенетических потомков трансгенных самок трансген должен присутствовать в гомозиготном состоянии. Это даст возможность получать от таких карпов тотально трансгенное потомство. При мейотическом гиногенезе в гомозиготное состояние переходит 60% генов, а митотический диплоидный гиногенез дает возможность получить 100% гомозиготность. Трансгенные особи выявлены во всех 3 гиногенетических потомствах, но только в первый год жизни (табл. 1).

От трансгенных производителей Fh и F₁ было получено несколько потомств F₂, в одном из которых идентифицированы стабильно трансгенные карпы. От них получены два разных потомства F₃ – от обычного скрещивания производителей и диплоидное гиногенетическое потомство с применением индуцированного мейотического гиногенеза. В обоих потомствах обнаружены рыбы, сохраняющие трансген в течение нескольких лет (табл. 1, 3).

Начаты опыты по получению стерильных трансгенных триплоидов, для чего самок карасекарповых гибридов скрещивали с трансгенными самцами (потомство FbTG). Первый опыт оказался неудачным – трансгенные особи в полученном потомстве не обнаружены (табл. 1).

Модификация карпов геном инсулиноподобного фактора роста I кеты, csIGF-I, как и в предыдущем случае, использовалась для создания с помощью трансгенеза быстрорастущей формы. IGF являются медиаторами СТГ 1-го порядка. Предполагается, что именно через инсулиноподобные факторы роста реализуется действие СТГ на организм в целом, и на пролиферацию дифференцирующихся клеточных пулов, в частности. Следовательно, одним из фенотипических проявлений экспрессии IGF является стимуляция роста. У полученных карпов P_0 трансген не был выявлен (табл. 1).

Генетическая модификация карпов геном эритропоэтина Epo проводилась для повышения их устойчивости к дефициту кислорода. Эритропоэтин оказывает выраженное стимулирующее действие на эритропоэз. Благодаря этому резко повышается способность организма связывать кислород и транспортировать его в

органы и ткани. В практике индустриального рыбоводства повышение устойчивости рыб к недостатку кислорода при плотных и сверхплотных посадках – одна из первостепенных задач. В результате проведенных экспериментов было получено ограниченное число жизнеспособных личинок исходной генерации P_0 . К сожалению, все они были отрицательными по трансгену *epo* (табл. 1).

Ген зеленого флуоресцирующего белка EGFP использовался как ген-репортер в составе молекулярной конструкции со встроенными сайтами LoxP. Он отвечает за синтез белка, который, поглощая световую энергию в ультрафиолетовой и синей области спектра, излучает видимый зеленый свет ($\lambda_{\text{max}} = 510$ нм). По его флуоресценции можно идентифицировать особей с трансгеном EGFP уже на стадиях эмбрионов и личинок.

Применение молекулярных конструкций с сайтами узнавания (LoxP) для сайт-специфической рекомбиназы (Cre) бактериофага P1 является перспективным направлением генной инженерии. Особенностью данных конструкций является возможность в дальнейшем заменять встроенный трансген на любой другой ген, действие которого на организм необходимо исследовать. Замена происходит с помощью сайт-специфической рекомбинации в присутствии Cre-рекомбиназы с очень высокой эффективностью (Pan et al., 2005).

Для удобства использования различных генов в генно-инженерных исследованиях была создана универсальная молекулярная конструкция, содержащая ген-репортер *egfp*, фланкированный сайтами loxP для сайт-специфической рекомбинации. По этим сайтам предполагалось заменять репортерный ген EGFP на любой целевой ген, входящий в состав другой конструкции с сайтами LoxP. В случае успешной рекомбинации ген *egfp* будет замещаться на другой, что приведет к исчезновению флуоресценции. Следовательно, и в этом случае станет возможным отбор особей, положительных по новому трансгену.

Было получено 2 генерации P_0 , в одной из которых при облучении монохроматическим ультрафиолетом с длиной волны 365 нм обнаружена флуоресценция личинок (рис. 1). На фотографии справа хорошо видны светящиеся личинки. Результаты молекулярно-генетического анализа личинок были отрицательными, что по-видимому свидетельствует об экстра-хромосомном функционировании трансгена (ген экспрессирует, но истинной интеграции его в геном не произошло). Однако при высадке сеголетков в пруды при солнечном освещении у них наблюдалась слабая зеленоватая флуоресценция на голове и вдоль спины, т.е. имела место экспрессия интегрированного трансгена EGFP. Следовательно, в этой генерации P_0 истинно трансгенные особи все же выявлены по экспрессии трансгена на более поздних стадиях развития вопреки результатам молекулярно-генетического анализа (табл. 1). Это дополнительный аргумент в пользу гена-репортера *egfp*. К сожалению, эта генерация была утрачена в процессе выращивания, а во второй генерации P_0 трансгенные карпы не выявлены ни по экспрессии репортерного гена EGFP, ни по результатам ПЦР-скрининга. Повторить этот опыт пока не удалось.

Дальнейшее изучение экспрессии и стабильности трансгена проводилось на карпах с геном гормона роста белого толстолобика scGH.

С трансгенными генерациями были проведены ростовые опыты. В таблице 2 приведены самые обнадеживающие результаты. Для сеголетков и годовиков

показано отношение массы трансгенных карпов к массе контрольных, для двухлетков и трехлетков – относительный прирост трансгенной группы в процентах от контроля. Среди этих потомств не удалось найти ни одного с устойчивым повышением скорости роста.

Одно из трансгенных потомств F_1 как в двухлетнем, так и трехлетнем возрасте более чем на 20% опережало по скорости роста контрольное потомство (табл. 2). Однако при дальнейшем выращивании скорость роста трансгенных и контрольных потомств была практически одинаковой. Для остальных 4-х трансгенных потомств более высокий по сравнению с контролем прирост отмечен только в один из сезонов выращивания.

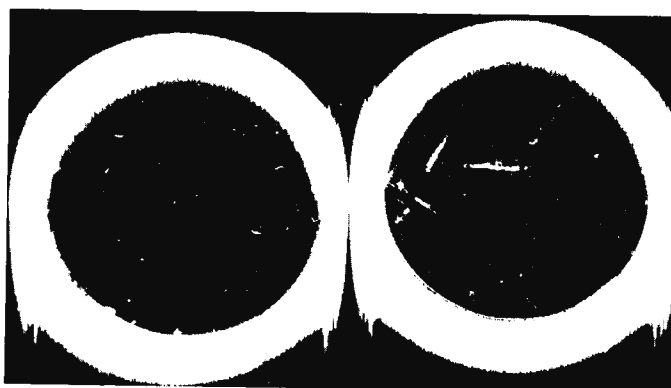


Рис. 1. Модифицированные геном *egfp* (справа) и интактные (слева) личинки карпа при освещении ультрафиолетом ($\lambda=365$ нм).

Fig. 1. Modified with gene *egfp* (at the right) and intact (at the left) common carp larvae under ultraviolet lighting ($\lambda=365$ nm).

Таблица 2. Показатели роста трансгенных карпов (в %% от контроля).

Table 2. Transgenic common carps growth indices (% of the control group).

Генерация	Сеголетки mTG/mK, %	Годовики mTG/mK, %	Двухлетки	Трехлетки
			$\Delta\text{Мотн. scGH} / \Delta\text{Мотн. K, \%}$	$\Delta\text{Мотн. TG} / \Delta\text{Мотн. K, \%}$
P_0	-	132,4	101,5	-
F_h	-	194,0	99,6	-
F_1	81,0	-	127,7	-
F_2	73,3	-	121,3	97,8
F_1	-	-	132,1	122,5

Введенные в клетки гены встраиваются в разные участки генома, часть из них никогда не начинает экспрессироваться, а часть может прекратить работу.

Еще одно из возможных объяснений отсутствия устойчивого ростового эффекта – нестабильность трансгена scGH, причиной которой может быть его трансформация или полная элиминация из генома карпов. Элиминация трансгенов – обычное явление у генетически модифицированных организмов (Fladung, 1999; Srivastava et al., 1996; Yao et al., 2003; Romano et al., 2005).

Для оценки стабильности трансгена scGH у карпов из нескольких генераций от P_0 до F_3 проведен анализ их ДНК. На основании его результатов определены

количество положительных по трансгену рыб в этих генерациях в разном возрасте (табл. 3) и эффективность передачи трансгена потомству.

Половозрелые особи, у которых трансген scGH стабильно обнаруживался в соматических тканях и зрелых гаметах на протяжении ряда лет, были выявлены в одной из генераций P_0 . Число трансгенных особей в этой генерации первичных трансформантов к 6-ти годам снижалось на треть; в данном случае это могло быть связано не с элиминацией трансгена, а с гибелью значительной части рыб данной группы, в числе которых, возможно, оказались и трансгенные. У оставшихся трансгенных производителей ген scGH стабильно сохранялся до возраста 10 лет (табл. 3).

Таблица 3. Количество трансгенных (scGH+) рыб в генерациях в разном возрасте.
Table 3. Transgenic fish (scGH+) quantity in generations of different ages.

Генерация	Возраст	Анализ, шт.	scGH+, шт.	scGH+, %
P_0	0+	40	12	30,0
	6	20	8	40,0
	8	10	8	40,0
	9	10	8	80,0
	10	8	8	100,0
F_h	1	60	30	50,0
	7	50	8	16,0
F_1	Личинки	10	10	100,0
	3+	65	8	12,3
	4+	8	8	100,0
	5	8	8	100,0
	7	6	6	100,0
F_1	3	20	10	50,0
	5	10	0	0
	7	4	0	0
	3	108	64	59,3
	5	64	3	4,7
	6	36	1	2,8
	7	3	1	33,3
	9	1	1	100,0
F_3	Личинки	58	23	39,7
	0+	100	46	46,0
	2+	60	25	41,7
	3	124	57	46,0
F_3 , Gmei	Личинки	56	25	44,6
	0+	100	51	51,0
	2+	66	30	45,5
	3	67	33	49,3
	4	43	23	53,5

В потомствах F_h , F_1 и F_2 доля трансгенных особей с возрастом снижается (табл. 3). Это особенно наглядно проявилось у карпов F_2 и одного из потомств F_1 . Все они в возрасте 3 года были идентифицированы как трансгенные, среди пятигодовиков положительными по трансгену остались 3 карпа F_2 , среди семигодовиков трансген обнаружен только у одной самки F_2 . У остальных карпов F_1 и F_2 трансген в этом возрасте отсутствовал как в генеративных, так и в соматических тканях (табл. 3). Отсутствие трансгена у этих рыб можно объяснить его полной физической элиминацией или такой разновидностью трансформации, при которой невозможна специфическая амплификация целевой последовательности.

Сигналы с перестройками, которые свидетельствовали бы о других видах трансформации трансгена, при электрофорезе продуктов амплификации ДНК всех карпов из этих потомств не выявлены.

Таким образом, трансген оказался стабильно интегрированным в геноме только одной самки F_2 . От этой самки были получены два вида потомства F_3 – от обычного скрещивания с интактным самцом и с применением индуцированного мейотического гиногенеза. Результаты анализа ДНК карпов из двух потомств F_3 от трансгенной самки F_2 представлены в таблице 3.

В этих двух потомствах F_3 частота встречаемости трансгенных рыб, прослеженная к настоящему моменту до возраста 4 года, оставалась примерно одинаковой, начиная от стадии личинок. Небольшие вариации частоты трансгенных рыб в разном возрасте каждого из потомств могли быть обусловлены различиями состава и объема анализируемых выборок (табл. 3).

Эффективность передачи трансгена scGH потомству была довольно высокой, число трансгенных карпов в генерациях F_n было на уровне 50%, в F_1 – от 20 до 100%, в F_2 – 30, 68 и 64%. В обоих потомствах карпов третьего поколения также выявлена эффективная передача трансгена – количество трансгенных личинок в диплоидном гиногенетическом потомстве достигало 44,6%, в потомстве от обычного скрещивания – 39,7% (табл. 3).

Молекулярно-генетический анализ показал также, что трансген scGH передается карпам второго и третьего поколений в неизменной форме. На рисунках 2 и 3 представлены результаты электрофореза, проведенного с продуктами специфической амплификации ДНК карпов из поколений F_2 и F_3 .

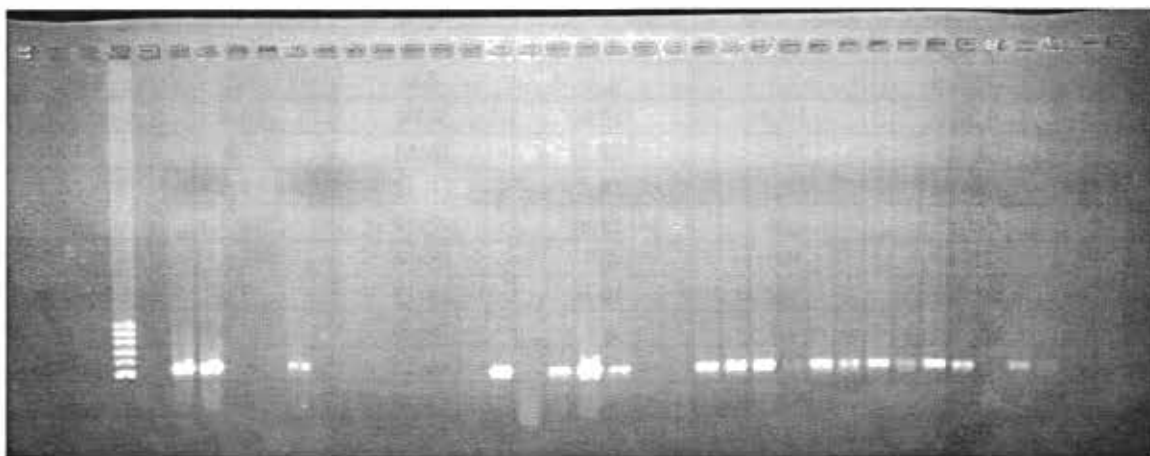


Рис. 2. Электрофореграмма амплификатов, полученных на матрице ДНК карпов поколения F_2 (сеголетки от группового скрещивания 7-годовиков F_1).

Примечание: Дорожка 1 – ДНК-маркер 100 bp; дорожки 3, 4 – положительный контроль (конструкция ptMTa-scGH); на остальных дорожках – амплификаты ДНК карпов F_2 .

Fig. 2. Electrophoregram of amplification products obtained on F_2 carps DNA matrix (underyearlings from 7-year carps F_1 group mating).

Note: Lane 1 – 100 bp DNA Ladder; lanes 3, 4 – positive reference sample (ptMTa-scGH construct); other lanes – amplification products of F_2 carps DNA.

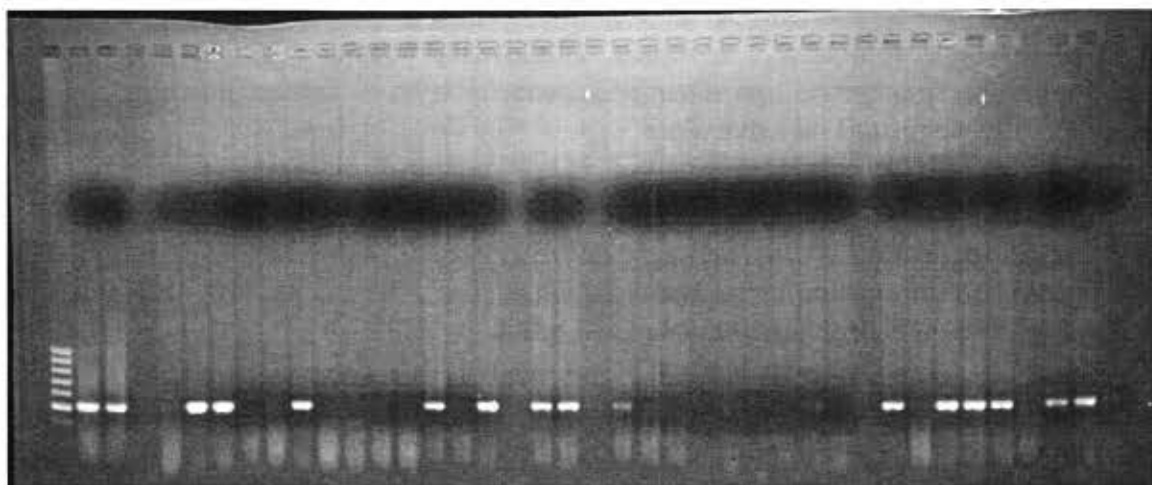


Рис. 3. Электрофореграмма амплификатов, полученных на матрице ДНК карпов поколения F_3 (гиногенетические 4-годовики).

Примечание: Дорожка 1 – ДНК-маркер 100 bp; дорожки 2, 3 – положительный контроль (конструкция ptMTa-scGH); на остальных дорожках – амплификаты ДНК карпов F_3 .

Fig. 3. Electrophoregram of amplification products obtained on F_3 carps DNA matrix (gynogenetic 4-year carps).

Note: Lane 1 – 100 bp DNA Ladder; lanes 2, 3 – positive reference sample (ptMTa-scGH construct); other lanes – amplification products of F_3 carps DNA.

Таблица 4. Распределение трансгенных (scGH+) и нетрансгенных (scGH-) сеголетков F_3 по массе.

Table 4. Mass distribution of transgenic (scGH+) and untransgenic (scGH-) underyearlings F_3 .

Gmei			Обычное скрещивание		
масса, г	scGH- (%)	scGH+ (%)	масса, г	scGH- (%)	scGH+ (%)
5-10	0,0	1,5	7-8	1,9	0,0
10-15	3,8	1,5	8-9	3,7	2,2
15-20	10,3	13,6	9-10	16,7	8,7
20-25	15,4	22,7	10-11	7,4	10,9
25-30	14,1	12,1	11-12	18,5	10,9
30-35	6,4	13,6	12-13	11,1	19,6
35-40	9,0	4,5	13-14	9,3	10,9
40-45	7,7	10,6	14-15	13,0	13,0
45-50	3,8	6,1	15-16	3,7	8,7
50-55	2,6	3,0	16-17	3,7	6,5
55-60	10,3	6,1	17-18	5,6	6,5
60-65	7,7	1,5	18-19	3,7	2,2
65-70	2,6	1,5	19-20	0,0	0,0
70-75	3,8	1,5	20-21	1,9	0,0
75-80	1,3	0,0			
80-85	0,0	0,0			
85-90	1,3	0,0			
Средняя	38,95	32,77	Средняя	12,75	13,23
σ	18,49	14,39	σ	2,92	2,42
Max	89,8	71,0	Max	20,4	18,1
Min	11,7	9,8	Min	7,8	8,4

На электрофореграммах видны только полосы, соответствующие фрагменту нужной длины (~540 bp). Полосы, соответствующие компонентам с меньшей или большей молекулярной массой (что свидетельствовало бы о трансформации трансгена, при которой изменяется длина его последовательности), отсутствуют.

Как видно из распределения сеголетков F_3 по массе (табл. 4), в гиногенетическом потомстве средняя масса карпов и количество более крупных рыб в нетрансгенной (scGH-) группе были выше, чем в трансгенной (scGH+). В потомстве F_3 от обычного скрещивания количество самых крупных особей тоже было несколько выше в нетрансгенной группе. В таких случаях отбор быстрорастущих особей по массе тела, предшествующий молекулярно-генетическому анализу, приведет к утрате трансгенного материала, потенциал роста которого, возможно, еще не проявился, а также будет занижать число положительных по трансгену рыб при последующем его ПЦР-скрининге. Возможно, у части трансгенных карпов F_3 экспрессия трансгена scGH отсутствует или ее уровень далек от оптимального – слишком низкий или, наоборот, слишком высокий. Чрезмерная продукция соматотропина может привести к торможению роста.

В потомствах F_3 отбор по массе не проводился. По результатам молекулярно-генетического анализа соматических тканей карпов поколения F_3 были сформированы два потомства, состоящие только из положительных по трансгену scGH особей, общим числом 113 экз., из них 57 – от обычного скрещивания и 56 – гиногенетические. Теперь есть возможность проводить отбор трансгенных рыб с высоким потенциалом роста по массе.

Для дальнейшей селекционной работы необходимо проверить наличие трансгена в зрелых половых продуктах карпов F_3 и затем проводить поиск удачных комбинаций при скрещивании трансгенных производителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные на данном этапе исследований результаты показали, что трансген scGH в нетрансформированном виде стабильно сохраняется у небольшого числа половозрелых карпов из поколений P_0 , F_h , F_1 , F_2 . Показана возможность эффективной передачи неизмененного трансгена потомкам второго и третьего поколений, полученным от производителей, у которых трансген стабильно интегрирован в геноме. У карпов F_3 отсутствие элиминации или трансформации трансгена прослежено до возраста 4 года. Сформировано 2 полностью трансгенных потомства – от обычного скрещивания (57 рыб) и гиногенетическое (56 рыб). Они являются материалом для дальнейшей традиционной селекции. Со временем таким материалом должно стать новое поколение F_2 , полученное от группового скрещивания трансгенных производителей F_1 и имеющее частоту передачи трансгена 63,9%.

В ходе дальнейшей работы с трансгенными карпами планируется ряд селекционных мероприятий. Прежде всего, это оценка комбинационной способности трансгенных производителей, отбор особей, стабильно передающих трансген при оптимальном уровне экспрессии. Затем необходимо осуществлять линейное и семейное разведение отобранных производителей.

В линиях, способных стабильно передавать трансген потомству и обнаруживших опережающий рост, необходимо вывести трансген в гомозиготное

состояние. Это обеспечит дополнительный механизм сохранности трансгена в потомстве, а также даст возможность получать тотально трансгенное потомство для товарного выращивания. В уже полученном гиногенетическом потомстве нужно выявить и отобрать гомозиготных по трансгену производителей.

Отобранных по уровню экспрессии производителей, у которых трансген выведен в гомозиготное состояние, можно было бы использовать для получения промышленных быстрорастущих кроссов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Американцы готовят светящиеся суши из генетически модифицированной рыбы. 2012. Website: <http://www.rosbalt.ru/style/2012/02/28/950898.html>

Генетически модифицированный лосось. 2010. Website: <http://ehorussia.com/new/book/export/html/1182>

Генетически модифицированный лосось – за или против? 2011. Website: <http://www.fishindustry.net/farmed-salmon/2114-geneticheskii-modificirovannyi-losos-za-ili-protiv.html>

Кузнецов В.В., Куликов А.М. Генетически модифицированные организмы и полученные из них продукты: реальные и потенциальные риски // Российский химический журнал. 2005. Т. XLIX. № 4. С. 70-83.

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.

Маршалл Э. Генно-модифицированная соя и безопасность для здоровья – продолжение полемики. 2007. Website: <http://www.gmo.ru/sections/27>

Blin N., Stafford D.W. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes // Nucleic Acids Res. 1976. V. 3. N. 9. Pp. 2303–2308.

Devlin R.H., Yesaki T.E., Blagl C.A., Donaldson E.M., Swanson P., Chan W.K. Extraordinary salmon growth // Nature. 1994. V. 371. Pp. 209-210.

Du S.J., Gong Z., Fletcher G.L., Shears M.A., King M.J., Idler D.L., Hew C.L. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an “all fish” chimeric growth hormone gene construct // Bio/Technology. 1992. V. 10. Pp. 176-181.

Ermakova I. Influence of genetically modified soya on the birth-weight and survival of rat pups // Proceedings «Epigenetics, Transgenic Plants and Risk Assessment». 2006. Pp. 41-48.

European Commission Directorate-General for Research and Innovation; Directorate E — Biotechnologies, Agriculture, Food; Unit E2 — Biotechnologies. 2010. A decade of EU-funded GMO research (2001-2010). 268 p. Website: <http://ec.europa.eu/research/research-eu>

Ewen S.M., Pusztai A. Effects of diets containing genetically modified potatoes expressing lectin on rat small intestine // The Lancet. 1999. V. 353. Pp. 1353–1354.

Feldbaum C.B. GM food debate // The Lancet. 1999. Iss. 9191. V. 354. P. 1729.

FitzGerald A.J., Goodlad R.A., Wright N.A. GM food debate // The Lancet. 1999. Iss. 9191. V. 354. Pp. 1725-1726.

Fladung M. Gene stability in transgenic aspen (Populus). I. Flanking DNA sequences and T-DNA structure // Mol. Gen. Genet. 1999. V. 60. Pp. 574-581.

FSANZ response to de Vendomois et al. A comparison of the Effects of Three GM Corn Varieties on Mammalian Health // Int. J. Biol. Sci. 2009. V. 5. N. 7. Pp. 706-726.

GloFish. 2006. Website: <http://ru.wikipedia.org/wiki/GloFish>

GMO Pundit a.k.a. David Tribe: 440+ published safety assessments on GM foods and feeds. 2010. Website: <http://gmopundit.blogspot.com/2007/06/150-published-safety-assessments-on-gm.html>

Hostetler H.A., Peck S.L., Muir W.M. High efficiency production of germ-line transgenic Japanese medaka (*Oryzias latipes*) by electroporation with direct current-shifted radio frequency pulses // *Transgenic Research*. 2003. V. 12. Pp. 413–424.

Kapuscinski A.R. Current scientific understanding of the environmental biosafety of transgenic fish and shellfish // *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 2005. V. 24. N. 1. Pp. 309-322.

Key S., Ma J.K., Drake P.M. Genetically modified plants and human health // *J. R. Soc. Med.* 2008. V. 101. N. 6. Pp. 290-298.

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells // *Nucleic Acids Res.* 1988. V. 16. N. 3. P. 1215.

Mowat A. GM food debate // *The Lancet*. 1999. Iss. 9191. V. 354. P. 1725.

Pan X., Wan H., Chia W., Tong Y., Gong Z. Demonstration of site-directed recombination in transgenic zebrafish using the Cre/loxP system. // *Transgenic Research*. 2005. V. 14. Pp. 217–223.

Romano E., Soares A., Proite K., Neiva S., Grossi M., Faria J.C., Rech E.L., Aragzo F.J.L. Transgene elimination in genetically modified dry bean and soybean lines // *Genet. Mol. Res.* 2005. V. 4. N. 2. Pp. 177-184.

Srivastava V., Vasil V., Vasil I.K. Molecular characterization of the fate of transgenes in transformed wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 1996. V. 92. Pp. 1031-1037.

de Vendomois J. S., Roullier F., Cellier D., Séralini G.E. A Comparison of the Effects of Three GM Corn Varieties on Mammalian Health // *Int. J. Biol. Sci.* (Ivyspring International Publisher). 2009. V. 5. N. 7. Pp. 706–726.

Wu G., Sun Y., Zhu Z. Growth hormone gene transfer in common carp // *Aquat. Living Resour.* 2003. V. 16. Pp. 416–420.

Yao M.C., Fuller P., Xi X. Programmed DNA deletion as an RNA-guided system of genome defense // *Science*. 2003. N. 5650. Pp. 1581-1584.

RESULTS OF GENETIC ENGINEERING RESEARCH ON CARP

© 2012 y. E.V. Ivanekha¹, L.N. Duma¹, A.V. Recoubratsky¹, V.V. Duma¹,
S.M. Rastorguyev², V.A. Barmintsev²

1 – All-Russian Research Institute of Freshwater Fisheries, Rybnoe, Moscow area

2 – Russian Federal Research Institute of Fisheries & Oceanography, Moscow

Genetically modified carps with silver carp growth hormone gene have been produced. Unchanged transgene was transferred to the third generation F₃ in the progenies of breeders with stable transgene integration. Two all-transgenic progenies F₃ have been formed that keep transgene without rearrangements during 3-4 years. Further selection of gained stock is necessary to create fast-growing carp form.

Key words: genetic modification, carp, transgene, growth hormone, stability, selection.