

## Получение трансгенных эмбрионов и личинок *Danio Rerio*

Кузьменко А.В.

ГАОУ ВО ЛО «ЛГУ им. А. С. Пушкина» Лужский институт (филиал), Ленинградская область, г. Луга

Научный руководитель Решетникова О.В.

ВО ЛО «ЛГУ им. А. С. Пушкина» Лужский институт (филиал), Ленинградская область, г. Луга

Одним из направлений биотехнологии является генетическая инженерия, которая занимается созданием генетически модифицированных (трансгенных) животных с заданными качествами. Уникальность и видоспецифичность геномов живых организмов, обеспечивают полезные признаки, необходимые для выживания видов, адаптации, размножению и расселению по разным регионам. В этой связи возникали эволюционные механизмы, сохраняющие геномы разных видов от генетической трансформации [4].

Трансгенные животные — это экспериментально полученные животные, содержащие во всех клетках своего организма дополнительную интегрированную с хромосомами чужеродную ДНК (трансген), которая передается по наследству.

Цель работы: провести биомониторинг экспрессии гена у трансгенных рыб. Объект исследований: модельные объекты *Danio rerio* (зебрафиш) и *Misgurnus fossilis* (вьюн обыкновенный). Эксперимент по спариванию рыб, экспрессии гена GFP в течение раннего эмбрионального развития проводился в лаборатории молекулярной генетики ВНИИГРЖ.

Трансгенные эмбрионы с репортёрными генами используют для повышения эффективности трансгенеза и уменьшения стоимости трансгенных животных. Физиология и развитие клеток не изменяются при эктопической экспрессии репортёрных генов. В настоящее время известно достаточно большое количество репортёрных генов, среди которых наиболее часто используются люцифераза, хлорамфеникол ацетил трансфераза – CAT, пероксидаза и зеленый флуоресцентный белок - GFP. Свойства флуоресцентного белка - GFP позволяют наблюдать за проявлениями экспрессии на живом объекте без использования ПЦР-анализа и других сложных методик. С целью получения трансгенных эмбрионов и личинок данио рерио была использована генетическая конструкция pCXEGFP. Введение генетической конструкции pCXEGFP было осуществлено методом микроинъекции в желток эмбриона под бластодиск, начиная со стадии зиготы. Анализ экспрессии GFP гена проводили при помощи флуоресцентного прибора SteReo Lumar V12 (Zeiss) и фильтра ФИТЦ [1, 2, 5, 7].

Оплодотворённую икру зебрафиш получали *in vivo*, у вьюнов *in vitro*. На стадии зиготы методом микроинъекции была введена плаزمида pCEEGFP, содержащая репортёрный ген GFP под контролем промотора фактора элонгации человека с включением энхансера цитомегаловируса человека. В течение 72 часов велось наблюдение за развитием эмбрионов и личинок, изучалась экспрессия гена [3, 6, 7].

В ходе исследования были получены трансгенные рыбы двух видов. У всех трансгенных эмбрионов и личинок выявлен мозаичный характер экспрессии. Начало экспрессии зафиксировано на одной и той же стадии, но в разное время после оплодотворения, это связано с тем, что развитие данио рерио протекает более быстро. Ген GFP очень удобен для отслеживания экспрессии в раннем и позднем эмбриогенезе. Как в контроле, так в экспериментальных группах были выявлены эмбрионы с нормальной и аномальной морфологией. Начальные стадии экспрессии GFP гена были замечены после сорока восьми часов эмбрионального развития, причем флуоресцентные клетки преимущественно наблюдали в области локализации пищеварительной системы и органов зрения. У всех трансгенных мальков следует отметить мозаичный паттерн экспрессии репортёрного гена.

Экспрессия зелёного флуоресцентного белка сохраняется на протяжении восьми недель развития.

Таким образом, метод микроинъекции плазмид с флуоресцентными генами позволяет получать только мозаичные формы трансгенных рыб. Для получения полностью трансгенных рыб необходимы дальнейшие манипуляции, такие как получение потомства, от особей в половых клетках которых будет обнаружен трансген, или клонирование рыб с применением ядер, экспрессирующих флуоресцентные гены.

Список литературы:

1. Козикова Л.В. Трансгенные рыбы: проблемы и перспективы использования. // Генетика и разведение животных. -2014.-№ 1.-С. 42-44.
2. Козикова Л.В. Трансгенные животные: - СПб.: Проспект Науки, 2017.- 224 с.
3. Ковалев В., Ковалева Е. Как и зачем получили генетически модифицированных рыб? Трансгенные рыбы для развлечения, еды и науки. <http://vitawater.ru/aqua/papers/gm-fish2.shtml> (2006).<http://medicalxpress.com/news/2011-09-cats-aids-diseases.html>
4. Максименко О.Г., Дейкин А.В., Ходарович Ю.М., Георгиев П.Г. Использование трансгенных животных в биотехнологии: перспективы и проблемы // Acta Naturae (русскоязычная версия) . 2013. №1 (16). С.33-47.
5. Wongsrikeao P, Saenz D, Rinkoski T, Otoi T, Poeschla E. Antiviral restriction factor transgenesis in the domestic cat. // Nat Methods. 2011 Sep 11;8(10):853-859.
6. Kim M. I., Oh H. I. et al. Generation of transgenic dogs that conditionally express green fluorescent protein. //Genesis.- 2011. -Volume 49. -Issue 6. pages 472-478.
7. Pask AJ, Behringer RR, Renfree MB (2008) Resurrection of DNA Function In Vivo from an Extinct Genome. PLoS ONE 3(5): e2240.