

Л. В. Козикова, Е. А. Полтева

Влияние процесса микроинъекции на выживаемость эмбрионов зебрафиш (*Danio rerio*) при получении трансгенных рыб

Аннотация. Рыбы относятся к удобным объектам исследования, т.к. они недороги в содержании, имеют прозрачные оболочки, позволяющие легко анализировать стадии развития, продуцируют много оплодотворенной икры, необходимой для введения генов. Целью данной работы стало изучение влияния введения генетических конструкций методом микроинъекции на жизнеспособность трансгенных модельных эмбрионов и личинок рыб с флуоресцентными репортерными генами. При помощи микроманипулятора были введены две разные генные конструкции, содержащие репортерный ген GFP, в качестве контроля была микроинъектирована дистиллированная вода. Достоинством этих конструкций служит прижизненная экспрессия зеленого флуоресцентного белка при УФ облучении и применении фильтра ФИТЦ. Анализ стадий развития, морфологических изменений рыб и экспрессию генов изучали на стереомикроскопе Lumar 12 фирмы Zeiss. Уже через сутки анализ ранних стадий развития рыб как в контроле, так в экспериментальных группах показал наличие нормальных и аномальных форм развития. Кроме того, во всех исследуемых группах эмбрионов были выявлены нежизнеспособные организмы. Таким образом, именно первые сутки являются основным критическим периодом выживаемости эмбрионов. Всего было проанализировано 335 эмбрионов, среди которых в контроле — 60, после введения воды — 11, после введения конструкции pCX-EGFP — 26 и 38 после введения генетической конструкции pCEEGFP.

Впервые показана различная жизнеспособность эмбрионов и личинок в контроле и при использовании разных векторов. Выявлены критические периоды жизни ранних стадий развития в экспериментальных и контрольных группах рыб. Получены трансгенные эмбрионы и личинки *Danio rerio* с мозаичным характером экспрессии зеленого флуоресцентного белка GFP. Следует отметить, что недостаточно изучено влияние генных модификаций на гомеостаз и продолжительность жизни генетически измененных организмов как на популяционном, клеточном, так и молекулярном уровнях. Необходимы дальнейшие исследования особенностей развития и продолжительности жизни трансгенных организмов.

Ключевые слова: трансгенные животные, плазмиды, репортерные гены, экспрессия генов, микроинъекция, генетические конструкции, эмбрионально-личиночное развитие, зебрафиш, выживаемость.

Авторы:

Козикова Лариса Васильевна — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики; e-mail: larkozik@list.ru;

Полтева Екатерина Андреевна — аспирантка лаборатории молекулярной генетики; e-mail: ketlin.liselse@yandex.ru

«Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; 196601, Россия, г. Санкт-Петербург, п. Тярлево, Московское шоссе, 55 а.

Введение. В настоящее время не утихает дискуссия о пользе или вреде генетически модифицированных продуктов. И мало кто задумывается о том, влияют ли биотехнические методы на сам организм. Для получения трансгенных животных применяют различные методы, но самым распространенным и информативным остается метод микроинъекции генетических конструкций в оплодотворенные яйцеклетки. Рыбы относятся к объектам исследования, имеющим определенные преимущества: они не так дороги в содержании по сравнению с крупными сельскохозяйственными животными, продуцируют много икры — яйцеклеток,

необходимых для их трансформации, можно легко контролировать их эмбриональное и постнатальное развитие. В настоящее время список полученных трансгенных рыб огромен, он включает в себя как модельные организмы, так и объекты товарного выращивания [1, 2]. Тем не менее, при введении генов в ранние эмбрионы существует немало проблем. В неполной степени изучены молекулярно-генетические особенности начальных стадий эмбриогенеза, что особенно важно для более эффективного переноса чужеродных генов. Некоторые трансгены могут активироваться в разные периоды онтогенеза в разных тканях, что зависит

от использования тканеспецифичных промоторов [3]. Известны единичные исследования влияния самих трансгенных технологий на жизнедеятельность генетически модифицированных животных [4, 5]. Сверхэкспрессия некоторых трансгенов, например, гена гормона роста, часто вызывает различные нарушения в организме. А сверхэкспрессия белка ферритина, участвующего в регуляции клеточного гомеостаза железа, приводила к уменьшению веса мышей и потере волос на туловище [6].

Целью данной работы стало изучение влияния введения генетических конструкций методом микроинъекции на жизнеспособность трансгенных модельных эмбрионов и личинок рыб с флуоресцентными репортерными генами. Наличие экспрессии *GFP* гена позволит с одной стороны отбирать эффективные генетические конструкции, с другой стороны, выявлять возможное влияние трансгенов на жизнеспособность рыб в течение эмбрионально-личиночного периода развития, а также учитывать локализацию и динамику экспрессии

генов в клетках в эмбриональном и постнатальном периодах развития организмов.

Материал и методы исследований. Для получения икры взрослые особи были помещены в нерестовый 15-литровый аквариум (солёность воды 1 г/л *NaCl*, добавлены кондиционер и очиститель, $t=29^{\circ}\text{C}$, режим освещения 13 часов день, 11 часов ночь) внутри сетчатой камеры в соотношении самцов к самкам 2:3. На следующий день производители были извлечены и помещены в общий аквариум, а эмбрионы собраны при помощи сифона. Для проведения микроинъекций рыб использовался микроманипулятор с микроиглами и предметные стекла. Методом микроинъекции в область бластодиска в оплодотворенные яйцеклетки были введены две разные генные конструкции, содержащие репортерный ген *GFP*, в качестве контроля была микроинъектирована дистиллированная вода. Анализ стадий развития, морфологических изменений рыб и экспрессию генов изучали на стереомикроскопе *Lumar 12* фирмы *Zeiss*. Статистические данные обрабатывали при использовании пакета программ *Excel 10 for Windows*.

Результаты исследований и обсуждение. На рис. 1 и рис. 2 представлены генетические конструкции, которые были микроинъектированы в зиготы и 2-х бластомерные эмбрионы *Danio rerio*. Профессор М. Okabe (г. Осака, Япония) предоставил генетическую конструкцию *pCX-eGFP*, кодирующую флуоресцентный зеленый белок (рис. 1). Эта генетическая конструкция кроме последовательностей гена *GFP* содержит *B*-актиновый промотор цыпленка, энхансер цитомегаловируса и поли-А сигнал *B*-глобина кролика.

Сотрудники Института молекулярной генетики РАН предоставили плазмиду *pCEEGFP*, содержащую репортерный ген *GFP* под контролем фактора элонгации человека с энхансером цитомегаловируса человека (рис. 2).

Достоинством этих конструкций служит прижизненная экспрессия зеленого флуоресцентного белка при УФ облучении и применении фильтра ФИТЦ.

После введения репортерных флуоресцентных генов в область бластодиска уже через сутки культивирования анализ эмбриональных стадий как в контроле, так в экспериментальных группах показал наличие нормальных и разных форм аномального развития (рис. 3). Кроме того, через 24 часа культивирования во всех исследуемых группах эмбрионов были выявлены нежизнеспособные организмы.

Ранее нами было убедительно продемонстрировано влияние холодной обработки эмбрионов (10°C) на понижение жизнеспособности эмбрио-

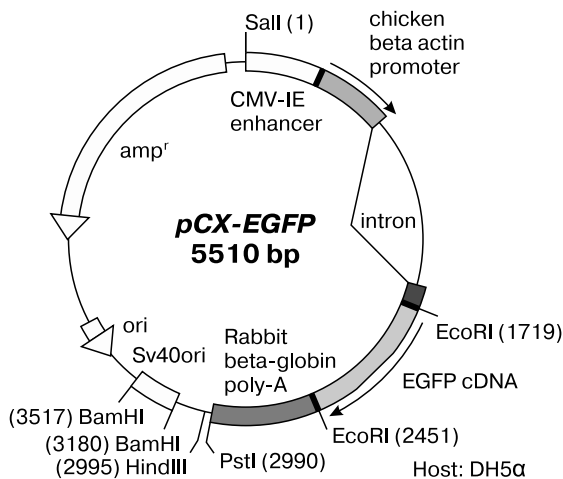


Рис. 1. Генетическая конструкция *pCX-EGFP*

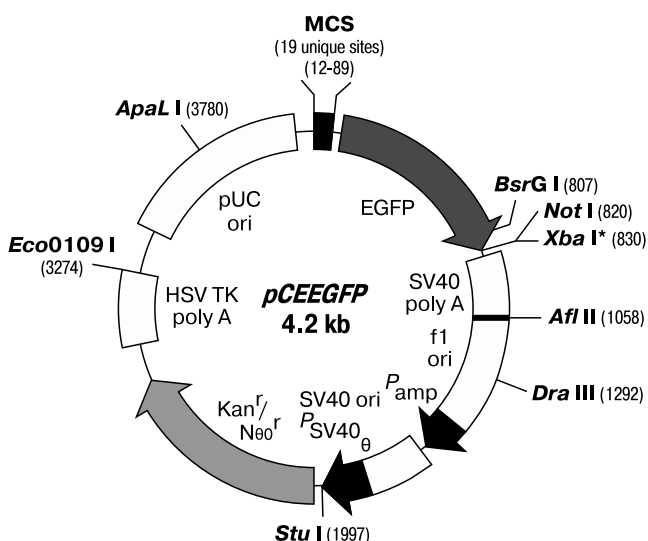


Рис. 2. Генетическая конструкция *pCEEGFP*

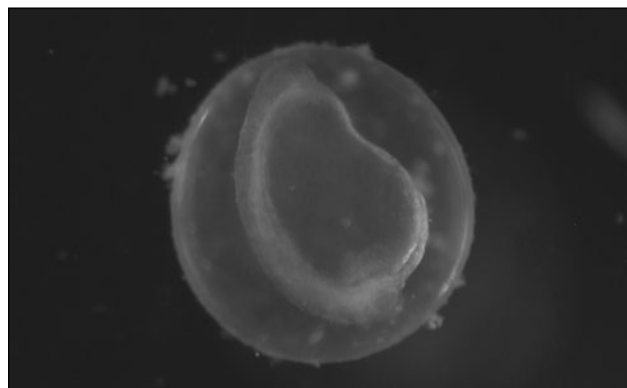
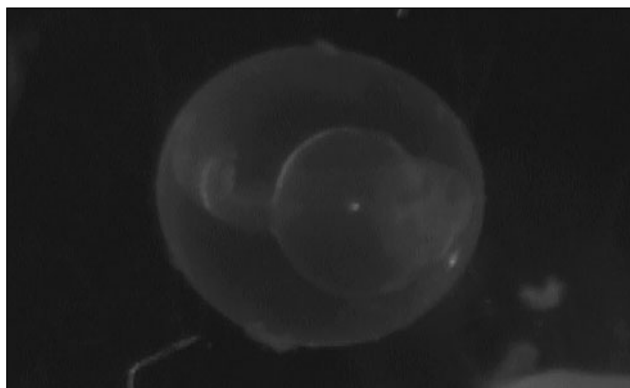


Рис. 3. Суточные эмбрионы *Danio rerio* (слева нормальная морфология, справа — аномальная форма развития)

нов и личинок рыб за счет увеличения количества аномальных форм развития [7]. Кроме того, была выявлена основная критическая точка жизнеспособности — первые 24 часа развития. В экспериментах по микроинъекции как генов, так и дистиллированной воды, также было показано, что через сутки количество аномальных и нежизнеспособных эмбрионов достоверно увеличивается по сравнению с контрольными не инъектированными эмбрионами. Всего было проанализировано 335 эмбрионов, среди которых в контроле — 60, после введения воды — 111, после введения конструкции *pCX-EGF* — 26 и 38 после введения конструкции *pCEEGFP*. Полученные данные представлены в таблице 1.

Из таблицы видно, что основным критическим периодом выживаемости эмбрионов являются сутки. Выявлена достоверная разница выживаемости эмбрионов рыб с контрольной группой у всех опытных групп (кроме группы после микроинъекции конструкции *pCX-EGFP* в первые сутки), что доказывает, что процесс введения как воды, так и генов оказывает негативное влияние на жизнеспособность эмбрионов и личинок (за исключением первых суток после введения генетической конструкции *pCX-EGFP*). Очевидно, что сам процесс микроинъекции травмирует часть зигот и двухбластомерных эмбрионов. Наиболее примечательна выживаемость при введении генетической конструкции *pCX-EGFP*. Наблюдается два пика

смертности, на первые сутки и на четвертые.

Достоверность разницы выживаемости эмбрионов рыб, полученных после микроинъекции воды и гена, была обнаружена в первые трое суток после микроинъекции конструкции *pCX-EGFP* (отмечено знаком*). Достоверной разницы выживаемости эмбрионов после микроинъекции воды и конструкции *pCEEGFP* на протяжении семи суток не выявлено. Следует отметить, что не только у рыб отмечено снижение жизнеспособности и появление различных аномалий после введения генетических конструкций методом микроинъекции. Ранее нами были получены трансгенные кролики с интегрированным геном гормона роста, у одного из которых были выявлены нарушения передних конечностей, а также наблюдали abortированные плоды большого размера [4]. В других работах цитогенетический анализ потомков трансгенных кроликов с интегрированным геном фактором VIII человека, находящегося под контролем гена *WAP* мыши, показал достоверное увеличение частоты хромосомных нарушений до 3,37% по сравнению с нетрансгенными кроликами. Показатели микроядерного теста как показателя геномной нестабильности также отражали увеличение частоты и количества эритроцитов с микроядрами в 2 раза у трансгенных кроликов и в 3 раза у свиней по сравнению с интактными кроликами [8]. Очевидно, что перенесенные экзогенные последовательности могут быть

Таблица 1. Выживаемость эмбрионов *Danio rerio* после микроинъекции воды и генов *GFP*

Период развития	Контроль без микроинъекции (%)	Микроинъекция воды (%)	Микроинъекция конструкции <i>pCX-GFP</i> (%)	Микроинъекция конструкции <i>pCEEGFP</i> (%)
1 сутки	86,67	49,55	77,78*	47,37
2 сутки	85,00	47,75	72,22*	44,74
3 сутки	83,33	46,85	69,05*	44,74
4 сутки	83,33	45,05	53,97	44,74
5 сутки	83,33	45,05	52,38	44,74
6 сутки	81,67	44,14	50,00	44,74
7 сутки	81,67	44,14	50,00	44,74

индукторами наследственной изменчивости. Можно также допустить, что интеграция и экспрессия чужеродной ДНК будет нарушать гомеостаз трансгенных организмов, что приводит к появлению патологических нарушений, нарушению воспроизводительной функции и сокращению продолжительности жизни [9]. В некоторых исследованиях показано, что у трансгенного гольца и его потомков с интегрированным геном гормона роста наряду с ускоренным ростом наблюдали такие модификации метаболизма как усиление окислительных процессов небелковых веществ, интенсивная утилизация липидов [10]. У рыб, трансгенных по гену гормона роста, другим негативным эффектом является нарушение осморегуляции, что ведет к понижению выживаемости по сравнению с нетранс-

генными организмами. По данным ряда авторов [11] у генетически измененных организмов с интегрированными генами гормона роста изменяется экспрессия генов, связанная с осморегуляцией, при этом увеличиваются объемы импорта ионов натрия в клетках, что вызывает нарушение осмотического давления, изменяется энергетический метаболизм, ведущий к ухудшению физиологического состояния. Необходимо отметить, что недостаточно изучено влияние генных модификаций на гомеостаз и продолжительность жизни генетически измененных организмов как на популяционном, клеточном, так и молекулярном уровнях. Рыбы представляются одним из самых лучших модельных объектов для проведения исследований в этом направлении.

Исследования проведены при поддержке ФАНО России, регистрационный номер темы №АААА-А18-118021590138-1

Литература

1. Wu J. L. Zebrafish eggs used as bioreactors for the production of bioactive tilapia insulin-like growth factors / J. L. Wu, S. Y. Hu, C. H. Liao, Y. P. Lin, Y. H. Li, H. Y. Gong, G. H. Lin, K. Kawakami, T. H. Yang, J. L. Wu // *Transgenic Res.* — 2011. — V. 20. — P. 73–83. doi: 10.1007/s11248-010-9388-3.
2. Исаева Н. М. Трансгенные рыбы: современное состояние проблемы. Н. М. Исаева, С. Ю. Морозов-Леонов // *Цитология и генетика.* — 2007. — № 4. — С. 72–79.
3. Onichtchouk D. Transgene deriving GFP expression from the promoter of the zona pellucid gene *zpc* is expressed in oocytes and provides an early marker for gonad differentiation in zebrafish / D. Onichtchouk, K. Aduroja, H. Belting et al. // *Dev. Dyn.* — 2003. — V. 228. — № 3. — P. 393.
4. Козикова Л. В. Трансгенные животные: учебное пособие. Л. В. Козикова. // СПб. Проспект Науки. — 2017. — 224 с.
5. Микодина Е. В. Генетически модифицированные организмы (ГМО) и биологическая безопасность рыб в аквакультуре. Е. В. Микодина // Мат. II Межд. Научно-практическая конф. «Повышение эффективности использования водных биологических ресурсов». М. — 2008. — С. 167–170.
6. Sumitaka H. Growth retardation and hair loss in transgenic mice overexpressing human H-ferritin gene / H. Sumitaka, H. Kazutoshi, M. Yukie, T. Satoshi, F. Takako, S. Tsuneo // *Transgenic Research.* — 2013. — V. 22. — Issue 3. — P. 651–658.
7. Козикова Л. В. Суперлосось и другие рыбы, устойчивые к холоду / Л. В. Козикова // *Генетика и разведение животных.* — 2018. — №1. — С. 20–24.
8. Kozikova L. V. Transgenic animals and their use in agriculture / L. V. Kozikova, J. Bulla, P. Babusik, L. Kuliskova, J. Pivko, P. Uhrin // 5th International symposium «Biological and technical intensification of production and increase of animal products quality» Nitra. Czechoslovakia. — 1990. — P. 25–27.
9. Pandian N. J. Guidelines for research and utilization of genetically modified fish / N. J. Pandian. // *Cur. Sci.* — 2001. — V. 81. — № 9. — P. 1172–1178.
10. Krasnov A. Changes in tissue Cellularity are associated with growth enhancement in genetically modified Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) carrying recombinant growth hormone gene / A. Krasnov, J. J. Agren, T. J. Pitkanen, H. Molsa // *Genet. Anal. Biomol. Eng.* — 1999. — V. 15. — P. 99–105.
11. Volcan A. D. Growth hormone transgenesis affects osmoregulation and energy metabolism in zebrafish (*Danio rerio*) / A. D. Volcan, C. Martinez, M. Gaspar et al. // *Transgenic Res.* — 2013. — V. 22. — Issue 1. — P. 75–88.

Kozikova L., Polteva E.

Influence of the microinjection process on the survival of embryos Zebrafish (*Danio rerio*) in the production of transgenic fish

Abstract. Fish belong to convenient objects of research, tk. they are not expensive in the content, they have transparent shells that allow easy analysis of developmental stages, produce a lot of fertilized eggs required

for introduction of genes. The purpose of this work was to study the effect of the introduction of genetic constructs by microinjection on the viability of transgenic model embryos and larvae of fish with fluorescent reporter genes. Using a micromanipulator, two different gene constructs containing the reporter gene GFP were introduced, as a control, distilled water was microinjected. The advantage of these constructs is the intravital expression of the green fluorescent protein under UV irradiation and FITC filter application. Analysis of developmental stages, morphological changes in fish, and gene expression were studied on a Lumar 12 stereo microscope by Zeiss. Within a day, analysis of the early stages of fish development both in control and in experimental groups showed the presence of normal and abnormal forms of development. In addition, non-viable organisms have been identified in all embryo groups studied. Thus, it is the first day that is the main critical period of embryo survival. A total of 335 embryos were analyzed, among them in control 60, after the introduction of water 111, after the introduction of the pCX-EGFP construct 126 and 38 after the pCEEGPF.

The different viability of embryos and larvae in control and using different genetic constructs is shown for the first time. The critical periods of life of the early stages of development in the experimental groups of fish were first revealed. Transgenic embryos and *Danio rerio* larvae were obtained with the mosaic nature of the expression of the green fluorescent protein (GFP). It should be noted that the influence of gene modifications on the homeostasis and the life span of genetically modified organisms at the population, cellular, and molecular levels has not been sufficiently studied. Further research is needed on the development and life span of transgenic organisms.

Key words: transgenic animals, plasmids, reporter genes, gene expression, microinjection, genetic and construction, embryonic-larval development, zebrafish, survival.

Authors:

Kozikova L. V. — Dr. Habil. (Biol. Sci.), leading researcher at the Laboratory of Molecular Genetics; e-mail: larkozik@list.ru;

Polteva E. A. — Graduate student at the Laboratory of Molecular Genetics.

Russian research institute of farm animal genetics and breeding — branch of the L. K. Ernst Federal science center for animal husbandry; 196601, Russia, St. Petersburg, p. Tjarlevo, Moskovskoe shosse, 55 a; e-mail: ketlin.liselse@yandex.ru.

Supported by Federal Agency of Scientific Organizations, №AAAA-A18-118021590138-1

References

1. Wu J. L. Zebrafish eggs used as bioreactors for the production of bioactive tilapia insulin-like growth factors / J. L. Wu, S. Y. Hu, C. H. Liao, Y. P. Lin, Y. H. Li, H. Y. Gong, G. H. Lin, K. Kawakami, T. H. Yang, J. L. Wu // *Transgenic Res.* — 2011. — V. 20. — P. 73–83. doi: 10.1007/s11248-010-9388-3.
2. Isaeva N. M. Transgenic fishes: the current state of the problem / N. M. Isaeva, S. Yu. Morozov-Leonov. // *Cytology and Genetics.* — 2007. — № 4. — P. 72–79.
3. Onichtchouk D. Transgene deriving GFP expression from the promoter of the zona pellucid gene *zpc* is expressed in oocytes and provides an early marker for gonad differentiation in zebrafish / D. Onichtchouk, K. Aduroja, H. Belting et al. // *Dev. Dyn.* — 2003. — V. 228. — № 3. — P. 393.
4. Kozikova L. V. Transgenic animals: a study guide / L. V. Kozikova // St. Petersburg. Prospect of Science. — 2017. — 224 p.
5. Mikodina E. V. Genetically modified organisms (GMOs) and the biological safety of fish in aquaculture / E. V. Mikodina. // *Mat. II Int. Scientific and practical conf. «Increasing the efficiency of the use of aquatic biotechnology»*. M. — 2008. — P. 167–170.
6. Sumitaka H. Growth retardation and hair loss in transgenic mice overexpressing human H-ferritin gene / H. Sumitaka, H. Kazutoshi, M. Yukie, T. Satoshi, F. Takako, S. Tsuneo // *Transgenic Research.* — 2013. — V. 22. — Issue 3. — P. 651–658.
7. Kozikova L. V. «Supersalmon» and other fish that are resistant to cold. L. V. Kozikova. // *Genetics and breeding of animals.* — 2018. — № 1. — P. 20–24.
8. Kozikova L. V. Transgenic animals and their use in agriculture / L. V. Kozikova, J. Bulla, P. Babusik, L. Kuliskova, J. Pivko, P. Uhrin. // 5th International symposium «Biological and technical intensification of production and increase of animal products quality» Nitra. Czechoslovakia. — 1990. — P. 25–27.
9. Pandian N. J. Guidelines for research and utilization of genetically modified fish / N. J. Pandian. // *Cur. Sci.* — 2001. — V.81. — № 9. — P. 1172–1178.
10. Krasnov A. Changes in tissue Cellularity are associated with growth enhancement in genetically modified Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) carrying recombinant growth hormone gene / A. Krasnov, J. J. Agren, T. J. Pitkanen, H. Molsa // *Genet. Anal. Biomol. Eng.* — 1999. — V. 15. — P. 99–105.
11. Volcan A. D. Growth hormone transgenesis affects osmoregulation and energy metabolism in zebrafish (*Danio rerio*) / A. D. Volcan, C. Martinez, M. Gaspar et al. // *Transgenic Res.* — 2013. — V. 22. — Issue 1. — P. 75–88.