

А. Н. Ветох, Н. А. Волкова

Особенности роста и развития эмбрионов кур под влиянием тканеспецифичной экспрессии интегрированных рекомбинантных генов

Аннотация. Изучено влияние интеграции и экспрессии рекомбинантных генов на рост и развитие эмбрионов кур. Объектом исследований служили эмбрионы, полученные от трансгенных кур с тканеспецифичной экспрессией интегрированного маркерного гена eGFP. Для тканеспецифичного выражения интегрированного гена были использованы регуляторные элементы гена овальбумина в комплексе с промотор-энхансерами CMV (цитомегаловирус человека) и Mo-MLV (вирус лейкемии мышей Молони). В качестве контроля использовали эмбрионы, полученные от нетрансгенных кур. Были исследованы весовые и линейные показатели роста и развития эмбрионов на 7, 10, 14 и 18 дни инкубации. Установлено влияние трансгенеза на интенсивность роста и развития эмбрионов кур. У трансгенных эмбрионов по сравнению с контролем наблюдалось снижение весовых показателей. Различия между экспериментальными группами по массе эмбрионов были наиболее значительными во второй половине эмбриогенеза и достигали на 14 день инкубации 13%, на 18 день инкубации — 17%. Аналогичная тенденция отмечалась и по линейным показателям развития эмбрионов. Трансгенные эмбрионы по сравнению с контролем характеризовались меньшей длиной тела: данные различия достигали 4,1; 5,4; 8,3 и 7,8% на 7, 10, 14 и 18 дни инкубации, соответственно. Установленные различия по весовым и линейным показателям между экспериментальными группами свидетельствуют о негативном влиянии интегрированных рекомбинантных генов на рост и развитие эмбрионов кур. Наиболее выраженные изменения по изучаемым показателям были установлены у трансгенных эмбрионов с интегрированным геном eGFP под контролем промотора гена овальбумина и промотор-энхансера гена Mo-MLV.

Ключевые слова: куры, эмбрионы, рост, развитие эмбрионов, рекомбинантная ДНК, трансгенез, тканеспецифичная экспрессия гена, eGFP.

Авторы:

Ветох А. Н. — младший научный сотрудник; e-mail: anastezuya@mail.ru;

Волкова Н. А. — доктор биологических наук, руководитель лаборатории; e-mail: natavolkova@inbox.ru.

ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; 142132, Российская Федерация, г.о. Подольск, Московская обл., пос. Дубровицы, 60.

Введение. Генетическая модификация сельскохозяйственных животных, в том числе птицы, является одним из приоритетных направлений современной биотехнологии и агротехнологий, направленных на решение широкого спектра фундаментальных и прикладных задач. На сегодняшний день достигнуты определенные успехи в области трансгенеза сельскохозяйственной птицы: созданы эффективные системы генетической модификации эмбриональных и соматических клеток, отработаны методические подходы по введению рекомбинантной ДНК в эмбрионы кур [1–5]. Основные направления в исследованиях связаны, преимущественно, с разработкой методических подходов, обеспечивающих высокую эффективность получения генетически модифицированной сельскохозяйственной птицы с интегрированными рекомбинантными генами, кодирующими белки фармако-

логического назначения. Наряду с получением трансгенных кур с интегрированными бактериальными и репортерными генами LacZ, GFP, β -лактамазы [6–8], ведутся работы по введению в геном сельскохозяйственной птицы структурных генов человека. Имеются сообщения о получении трансгенных кур с интегрированными генами $\alpha 2b$ -интерферона, β -интерферона, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, гормона роста и ряда других [9–13].

Вместе с тем интеграция рекомбинантных генов в геном сельскохозяйственной птицы может оказывать значительное влияние на рост и развитие трансгенных особей как в эмбриональный, так и постнатальный периоды развития. Степень данного влияния зависит от характера выражения интегрированных генов. Определенный интерес представляет оценка влияния интегрированных

рекомбинантных генов на эмбриогенез кур. Исходя из этого, целью исследований являлось изучение весовых и линейных показателей роста и развития эмбрионов, полученных от трансгенных кур с тканеспецифичной экспрессией интегрированных генов.

Материалы и методы исследований. Исследования проводили на базе ФНЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста. Материалом для исследований служили эмбрионы, полученные от трансгенных кур и их нетрансгенных аналогов. Трансгенные куры были получены с использованием лентивирусных векторов, содержащих маркерный ген eGFP. Для тканеспецифичного выражения интегрированного гена были использованы регуляторные элементы гена овальбумина в комплексе с промотор-энхансерами CMV (цитомегаловирус человека) и Mo-MLV (вирус лейкемии мышей Молони).

Были сформированы 3 опытные группы: I группа — трансгенные эмбрионы кур с тканеспецифичной экспрессией гена eGFP под контролем промотора гена овальбумина, II группа — трансгенные эмбрионы кур с тканеспецифичной экспрессией гена eGFP под контролем промотора гена овальбумина и промотор-энхансера гена CMV, III группа — трансгенные эмбрионы кур с тканеспецифичной экспрессией гена eGFP под контролем промотора гена овальбумина и промотор-энхансера гена Mo-MLV. В качестве контроля использовали эмбрионы, полученные от нетрансгенных кур.

Была изучена динамика роста и развития трансгенных эмбрионов кур в сравнении с контролем. Для оценки эмбрионов использовали весовые и линейные показатели: вес эмбрионов, длина тела, туловища, головы, ног, крыльев. Оценку проводили на 7, 10, 14 и 18 дни инкубации.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета анализа в Excel 2013.

Результаты исследований и их обсуждение. Проведенные исследования не выявили патологических отклонений и нарушений в развитии как трансгенных, так и нетрансгенных эмбрионов кур.

Вместе с тем были установлены некоторые различия по ряду весовых и линейных показателей роста и развития между экспериментальными группами.

На ранних этапах эмбрионального развития между трансгенными и нетрансгенными эмбрионами не было установлено достоверных различий по динамике роста. Трансгенные эмбрионы в ряде случаев как превосходили, так и уступали по данному показателю эмбрионам контрольной группы. Во второй половине эмбриогенеза данные различия были более выраженными. У трансгенных эмбрионов отмечалась тенденция снижения интенсивности роста по сравнению с контролем (табл. 1). 14-дневные трансгенные эмбрионы имели меньший вес по сравнению с эмбрионами контрольной группы на 11–13%. У 18-дневных эмбрионов данные различия достигали 17%.

Анализ линейных показателей развития трансгенных и нетрансгенных эмбрионов кур также выявил различия по изучаемым показателям (табл. 2). Трансгенные эмбрионы уступали эмбрионам контрольной группы по длине тела. Различия по данному показателю достигали, соответственно, на 14 день инкубации — 8,3%, на 18 день инкубации — 7,8%. Уменьшение длины тела у трансгенных эмбрионов происходило, преимущественно, за счет уменьшения длины туловища. Различия между экспериментальными группами по длине головы, ног и крыльев были незначительными.

Сопоставляя весовые и линейные показатели роста и развития трансгенных эмбрионов кур I, II и III опытных групп, следует отметить более выраженные в сравнении с контролем различия по изучаемым показателям у трансгенной птицы с интегрированным геном eGFP под контролем промотора гена овальбумина и промотор-энхансера гена Mo-MLV.

Заключение. Анализ весовых и линейных показателей роста и развития эмбрионов кур опытных и контрольной групп выявил достоверные различия по ряду показателей. У трансгенных эмбрионов по сравнению с контролем наблюдалась

Таблица 1. Изменение массы трансгенных и нетрансгенных эмбрионов кур в течение эмбриогенеза, г.

Группа	Возраст, дн			
	7	10	14	18
I	0,5±0,1	1,7±0,2	7,9±0,5*	19,3±0,9*
II	0,6±0,1	1,9±0,1	7,7±0,5	18,1±0,6*
III	0,7±0,1	1,7±0,2	7,8±0,4	18,7±0,7*
контроль	0,6±0,1	1,7±0,1	8,9±0,8	21,8±0,4

Примечание: * — $P \geq 0,95$ (разница с контролем)

тенденция снижения массы во второй половине эмбриогенеза: на 14 и 18 дни инкубации данные различия достигали 13% и 17%, соответственно. Аналогичная тенденция установлена и по линейным показателям развития эмбрионов. Трансгенные эмбрионы по сравнению с эмбрионами контрольной

группы характеризовались меньшей длиной тела на 6–8%. Наиболее выраженные изменения по изучаемым показателям были установлены у трансгенных эмбрионов с интегрированным геном eGFP под контролем промотора гена овальбумина и промотор-энхансера гена Mo-MLV.

Таблица 2. Линейные показатели развития трансгенных и нетрансгенных эмбрионов кур

Показатель	Группа			
	I	II	III	Контроль
7 день инкубации				
Длина тела, мм	25±0,5	24±0,3	25±0,7	25±0,6
Длина головы, мм	10±0,7	9±0,5	9±0,2	10±0,1
Длина туловища, мм	11±0,6	11±0,4	12±0,4	12±0,6
10 день инкубации				
Длина тела, мм	36±0,2	35±1,4	38±1,8	37±1,6
Длина головы, мм	14±0,5	13±0,6	12±0,5	12±0,3
Длина туловища, мм	17±0,5	17±0,8	18±0,4	17±0,6
14 день инкубации				
Длина тела, мм	57±1,4	55±1,4*	56±1,2*	60±2,1
Длина головы, мм	17±0,3	16±0,4	15±0,8	15±0,6
Длина туловища, мм	31±1,2	30±0,3	32±1,2	33±1,0
Длина ноги, мм	36±0,9	37±0,8	38±0,9	39±0,7
Длина крыла, мм	21±0,3	23±0,2	22±0,6	22±0,5
18-дневные эмбрионы				
Длина тела, мм	85±1,1	83±0,6*	84±1,1*	90±0,8
Длина головы, мм	21±0,6	20±0,8	19±0,9	18±0,3
Длина туловища, мм	47±0,7	46±1,2	46±0,8	49±0,5
Длина ноги, мм	58±1,0	59±1,1	61±1,2	62±1,4
Длина крыла, мм	30±0,8	31±0,8	32±0,8	32±0,9

Примечание: * – $P \geq 0,95$ (разница с контролем).

Исследования были проведены в рамках выполнения задания Федерального агентства научных организаций (ФАНО) № АААА-А18-118021590138-1 в 2018 году

Литература

1. Scott B. B. Applications of avian transgenesis / B. B. Scott, T. A. Velho, S. Sim, C. Lois // ILAR J. — 2010. — Vol. 51(4). — P. 353-61.
2. Scott B. B. Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors / B. B. Scott, C. Lois // PNAS. — 2005. — Vol.102 (45). — P. 16443–16447.
3. Kodama D. Chicken oviduct-specific expression of transgene by a hybrid ovalbumin enhancer and the Tet expression system / D. Kodama, D. Nishimiya, K. Nishijima, Y. Okino, Y. Inayoshi, Y. Kojima, K.-I. Ono, M. Motono, K. Miyake, Y. Kawabe // J Biosci Bioeng. — 2012. — Vol. 113 (2). — P. 146–153.
4. Smith C. A. Robust and ubiquitous GFP expression in a single generation of chicken embryos using the avian retroviral vector, RCASBP / C. A. Smith, K. N. Roeszler, A. H. Sinclair // Differentiation. — 2009. — Vol. 77(5). — P. 473–482.
5. Tyack S. G. A new method for producing transgenic birds via direct in vivo transfection of primordial germ cells / S. G. Tyack, K. A. Jenkins, T. E. O'Neil, T. G. Wise, K. R. Morris, M. P. Bruce, S. McLeod, A. J. Wade, J. McKay, R. J. Moore, K. A. Schat, J. W. Lowenthal, T. J. Doran // Transgenic Res. — 2013. — Vol.22. — P. 1257–1264.

6. Han J. Y. Primordial germ cell-mediated transgenesis and genome editing in birds / J. Y. Han, Y. H. Park // J Anim Sci Biotechnol. — 2018. — Jan 31;9:19. doi: 10.1186/s40104-018-0234-4. eCollection 2018.
7. Byun S. J. Oviduct-specific enhanced green fluorescent protein expression in transgenic chickens / S. J. Byun, S. W. Kim, K. W. Kim, J. S. Kim, I.-S. Hwang, H. K. Chung, I. S. Kan, I.-S. Jeon, W.-K. Chang, S.-B. Park, J.G. Yoo // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2011. — Vol. 75 (4) . — P. 646–649.
8. Chapman S. C. Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentivira vector / S. C. Chapman, A. Lawson, W. C. Macarthur, R. J. Wiese, R. H. Loechel, M. Burgos-Trinidad, J. K. Wakefield, R. Ramabhadran, T. J. Mauch, G. C. Schoenwolf // Development. — 2005. — Vol.132. — P. 935–940.
9. Mozdziak P. E. Development of transgenic chickens expressing bacterial betagalactosidase / P. E. Mozdziak, S. Borwornpinyo, D. W. McCoy, J. N. Petite // Dev. Dyn. V. — 2003. — Vol. 226. — P. 439–445.
10. Lillico S. G. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens / S. G. Lillico, M. J. Sherman, C. D. McGrew, C. D. Robertson, J. Smith, C. Haslam, P. Barnard, P. A. Radcliffe, K. A. Mitrophanous, E. A. Elliot et al. // PNAS. — 2007. — Vol. 104 (6). — P. 1771–1776.
11. Kwon S. C. Production of biofunctional recombinant human interleukin 1 receptor antagonist (rhIL1RN) from transgenic quail egg white / S. C. Kwon, J. W. Choi, H. J. Jang, S. S. Shin, S. K. Lee, T. S. Park, I. Y. Choi, G. S. Lee, G. Song, J. Y. Han // Biology of Reproduction. — 2010. — Vol. 82. — P. 1057–1064.
12. Kamihira M. High-level expression of single-chain FV-FC fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector/ M. Kamihira, K. Ono, K. Esaka, K. Nishijima, R. Kigaku, H. Komatsu, T. Yamashita, K. Kyogoku; S. Iijima // J. Virol. — 2005. — Vol. 79(17). — P. 10864–10874.
13. Kwon M. S. Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor / M. S. Kwon, B. C. Koo, B. R. Choi, Y. Y. Park, Y. M. Lee, H. S. Suh, Y. S. Park, H. T. Lee, J. H. Kim, J. Y. Roh, N.H. Kim, T. Kim // Mol. Reprod. Dev. — 2008. Vol. 75. — P. 1120–1126.
14. Rapp J. C. Biologically active human interferon a-2b produced in the egg white of transgenic hens / J. C. Rapp, A. J. Harvey, G. L. Speksnijder, W. Hu, R. Ivarie // Transgenic Res. — 2003. — Vol. 12. — P. 569–575.

Vetokh A., Volkova N.

Features of growth and development in chicken embryos under the influence of tissue-specific expression of integrated recombinant genes

Abstract. *The influence of integration and expression of recombinant genes on the growth and development in chicken embryos was studied. The subject of the study was embryos, which were obtained from transgenic chickens with tissue-specific expression of the integrated marker gene eGFP. For the tissue-specific expression of the integrated gene, the regulatory elements of the ovalbumin gene in combination with the promoter enhancers CMV (human cytomegalovirus) and Mo-MLV (leukemia virus of Moloney mice) were used. The embryos obtained from non-transgenic hens were used as a control. Weighed and linear indicators of growth and development in embryos on the 7th, 10th, 14th and 18th days of incubation were investigated. The influence of transgenesis on the intensity of growth and development in chicken embryos was established. Weight loss was observed in transgenic embryos compared to control. Differences between experimental groups by weight of embryos were the most significant in the second half of embryogenesis and reached 13% on day 14 of incubation, 17% on day 18 of incubation. A similar trend was observed in the linear indices of embryo development. A shorter body length than the control characterized transgenic embryos: these differences reached 4,1; 5,4; 8,3 and 7,8% on the 7th, 10th 14th and 18th days of incubation, respectively. The established differences in weight and linear indices between the experimental groups indicate the negative effect of integrated recombinant genes on the growth and development in chicken embryos. The most significant changes in the studied parameters were found in transgenic embryos with an integrated eGFP gene under the control of the ovalbumin gene promoter and the promoter-enhancer of the Mo-MLV gene.*

Keywords: chickens, embryos, growth, embryo development, recombinant DNA, transgenesis, tissue-specific gene expression, eGFP.

Authors:

Vetokh A. — Junior Researcher; e-mail: anastezuya@mail.ru;

Volkova N. — Dr. Habil. (Biol. Sci.), Head of the laboratory; e-mail: natavolkova@inbox.ru.

L. K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, 60, Dubrovitsy settlement, Podolsk District, Moscow Region, 142132, Russian Federation.

References

1. Scott B. B. Applications of avian transgenesis / B. B. Scott, T. A. Velho, S. Sim, C. Lois // *ILAR J.* — 2010. — Vol. 51(4). — P. 353-61.
2. Scott B. B. Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors / B. B. Scott, C. Lois // *PNAS.* — 2005. — Vol.102 (45). — P. 16443–16447.
3. Kodama D. Chicken oviduct-specific expression of transgene by a hybrid ovalbumin enhancer and the Tet expression system / D. Kodama, D. Nishimiya, K. Nishijima, Y. Okino, Y. Inayoshi, Y. Kojima, K.-I. Ono, M. Motono, K. Miyake, Y. Kawabe // *J Biosci Bioeng.* — 2012. — Vol. 113 (2). — P. 146–153.
4. Smith C. A. Robust and ubiquitous GFP expression in a single generation of chicken embryos using the avian retroviral vector, RCASBP / C. A. Smith, K. N. Roeszler, A. H. Sinclair // *Differentiation.* — 2009. — Vol. 77(5). — P. 473–482.
5. Tyack S. G. A new method for producing transgenic birds via direct in vivo transfection of primordial germ cells / S. G. Tyack, K. A. Jenkins, T. E. O'Neil, T. G. Wise, K. R. Morris, M. P. Bruce, S. McLeod, A. J. Wade, J. McKay, R. J. Moore, K. A. Schat, J. W. Lowenthal, T. J. Doran // *Transgenic Res.* — 2013. — Vol.22. — P. 1257–1264.
6. Han J. Y. Primordial germ cell-mediated transgenesis and genome editing in birds / J. Y. Han, Y. H. Park // *J Anim Sci Biotechnol.* — 2018. — Jan 31;9:19. doi: 10.1186/s40104-018-0234-4. eCollection 2018.
7. Byun S. J. Oviduct-specific enhanced green fluorescent protein expression in transgenic chickens / S. J. Byun, S. W. Kim, K. W. Kim, J. S. Kim, I.-S. Hwang, H. K. Chung, I. S. Kan, I.-S. Jeon, W.-K. Chang, S.-B. Park, J.G. Yoo // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 2011. — Vol. 75 (4) . — P. 646–649.
8. Chapman S. C. Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentivira vector / S. C. Chapman, A. Lawson, W. C. Macarthur, R. J. Wiese, R. H. Loechel, M. Burgos-Trinidad, J. K. Wakefield, R. Ramabhadran, T. J. Mauch, G. C. Schoenwolf // *Development.* — 2005. — Vol.132. — P. 935–940.
9. Mozdziak P. E. Development of transgenic chickens expressing bacterial betagalactosidase / P. E. Mozdziak, S. Borwornpinyo, D. W. McCoy, J. N. Petite // *Dev. Dyn. V.* — 2003. — Vol. 226. — P. 439–445.
10. Lillico S. G. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens / S. G. Lillico, M. J. Sherman, C. D. McGrew, C. D. Robertson, J. Smith, C. Haslam, P. Barnard, P. A. Radcliffe, K. A. Mitrophanous, E. A. Elliot et al. // *PNAS.* — 2007. — Vol. 104 (6). — P. 1771–1776.
11. Kwon S. C. Production of biofunctional recombinant human interleukin 1 receptor antagonist (rhIL1RN) from transgenic quail egg white / S. C. Kwon, J. W. Choi, H. J. Jang, S. S. Shin, S. K. Lee, T. S. Park, I. Y. Choi, G. S. Lee, G. Song, J. Y. Han // *Biology of Reproduction.* — 2010. — Vol. 82. — P. 1057–1064.
12. Kamihira M. High-level expression of single-chain FV-FC fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector/ M. Kamihira, K. Ono, K. Esaka, K. Nishijima, R. Kigaku, H. Komatsu, T. Yamashita, K. Kyogoku; S. Iijima // *J. Virol.* — 2005. — Vol. 79(17). — P. 10864–10874.
13. Kwon M. S. Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor / M. S. Kwon, B. C. Koo, B. R. Choi, Y. Y. Park, Y. M. Lee, H. S. Suh, Y. S. Park, H. T. Lee, J. H. Kim, J. Y. Roh, N.H. Kim, T. Kim // *Mol. Reprod. Dev.* — 2008. Vol. 75. — P. 1120–1126.
14. Rapp J. C. Biologically active human interferon a-2b produced in the egg white of transgenic hens / J. C. Rapp, A. J. Harvey, G. L. Speksnijder, W. Hu, R. Ivarie // *Transgenic Res.* — 2003. — Vol. 12. — P. 569–575.