

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТРАНСГЕННЫХ СВИНЕЙ РАЗНЫХ ПОКОЛЕНИЙ ПРИ ИНТЕГРАЦИИ ГЕНА СОМАТОЛИБЕРИНА ЧЕЛОВЕКА

Л.К. ЭРНСТ¹, Н.А. ВОЛКОВА², Н.А. ЗИНОВЬЕВА²

При сравнительном изучении степени влияния интеграции гена рилизинг-фактора гормона роста человека на совокупность фенотипических признаков у трансгенных животных в ранних и поздних поколениях при одинаковых условиях выращивания установлено, что такие особи характеризуются повышенным содержанием гормона роста в крови и превосходят интактных аналогов по живой массе и ее среднесуточному приросту. Показано, что у трансгенных свиней наблюдается увеличение массы органов желудочно-кишечного тракта и репродуктивных органов, отмечается снижение толщины шпика с увеличением числа генераций.

Ключевые слова: свиньи, рекомбинантная ДНК, рилизинг-фактор гормона роста человека.

Keywords: pigs, recombinant DNA, human growth hormone releasing factor.

Создание трансгенных сельскохозяйственных животных с измененными хозяйствственно цennыми признаками представляет практический интерес (1). Направленное изменение генома млекопитающих методами трансгенеза позволяет получать селекционный эффект по отдельным признакам в значительно более короткие сроки, чем при использовании традиционных методов, и дает возможность создавать генетические варианты, которые раньше не существовали у животных соответствующего вида (интеграция трансгена) либо до последнего времени не поддавались селекции (устойчивость к инфекциям). В частности, важная роль отводится генам, кодирующими каскад белков из группы гормона роста. В настоящее время по указанным генам уже модифицированы кролики, свиньи и овцы (2-6), в том числе 12 поколений свиней, трансгенных по гену соматолиберина человека, получены и изучаются во Всероссийском НИИ животноводства (ВИЖ) (7-12).

Предполагается, что дополнительный синтез белков соматотропного ряда будет положительно влиять на скорость роста животных. Однако возможности направленной изменчивости при трансгенезе иногда рассматриваются очень упрощенно, недооценивается сложность взаимодействий, обусловливающих модификации фенотипа при изменении генотипа. Пока что недостаточно изучено влияние интеграции чужеродных генов на биохимические, физиологические и морфологические признаки, а также на степень и направленность корреляций между ними. Еще меньше известно о динамике фенотипических показателей в ряде поколений, которая позволяет оценить селекционное значение той или иной трансгенной особи. При этом следует ожидать, что организм будет стремиться к сохранению постоянства (стабилизирующий отбор).

Целью настоящей работы было сравнение степени влияния интеграции генов из группы гормона роста на совокупность фенотипических признаков у трансгенных животных разных (ранних и поздних) поколений при одинаковых условиях содержания и выращивания.

Методика. Исследования проводили в условиях вивария ВИЖ на свиньях, трансгенных по гену соматолиберина человека (рилизинг-фактор гормона роста), находящемуся под контролем металлотионеинового промотора мыши (7-12). Трансгенность определяли с помощью ПЦР-анализа, на основании данных которого формировали опытную и контрольную группы. Выделение ДНК из образцов ушной ткани и постановку ПЦР выпол-

няли согласно описанию (13).

Динамику роста и развития трансгенных и интактных свиней изучали в условиях контрольного откорма (с 30 до 120 кг с последующим убоем) в двух независимых экспериментах на животных разных генераций: I опыт — 2-я и 8-я, II опыт — 3-я и 9-я генерации. Контрольную группу в обоих опытах формировали по принципу аналогов (соответствие по живой массе, породности, условиям выращивания и т.д.). Оценивали живую массу и ее среднесуточный прирост, мясные качества в разные периоды онтогенеза (морфологический состав и качество туш — длину туши, процентное содержание мяса и сала, толщину шпика), а также сравнивали массу печени, желудка, кишечника, почек, матки, яичников, щитовидной железы и гипофиза у трансгенных особей и их нетрансгенных аналогов.

Содержание соматотропина в крови трансгенных свиней определяли с использованием диагностической системы на основе иммуноферментного анализа (ИФА) («Diagnostic Systems Laboratories Inc.», США). Используемые для анализа образцы сыворотки крови хранили при -20°C .

Гистологические препараты готовили по общепринятой методике (14). Для фиксации образцов органов и тканей использовали 10 % раствор формалина. Срезы для гистологических препаратов получали на ротационном микротоме («TemoShandon», Великобритания). Для оценки уровня экспрессии нуклеиновых кислот (НК) в клетках внутренних органов проводили окрашивание полученных гистопрепараторов по методу Фельгена (ДНК) и с использованием смеси галлоцианина и хромовых квасцов (ДНК + РНК) (14). Относительное содержание нуклеиновых кислот в клетках исследуемых органов определяли по методике И.Я. Шихова с соавт. (15). Относительное количество НК находили по формуле: $\text{НК} = [100 \times (1/B)] \times S$, где B — средняя яркость ядер, $100 \times (1/B)$ — относительная плотность ядер, S — площадь ядер. Относительное содержание РНК в цитоплазме клеток рассчитывали, как разность между количеством суммарных нуклеиновых кислот (окраска смесью галлоцианина и хромовых квасцов) и количеством ДНК в ядрах (окраска по Фельгену). Локализацию соматотропина в клетках гипофиза свиней выявляли иммуногистохимическим методом с помощью набора Novostatin Super ABC Kit («Novocastra», США) с последующей детекцией с использованием субстрата АЕС (3-амино-9-этилкарбозол) («Sigma», США). Относительное содержание соматотропина в клетках гипофиза определяли по той же формуле, что и для НК. Анализ и фотодокументирование гистопрепараторов осуществляли с помощью микроскопа фирмы «Opton» (Германия), оборудованного цифровым фотоаппаратом, с использованием компьютерной программы Image Scope (ООО «Системы для микроскопии и анализа», г. Москва).

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами (16) с применением программного обеспечения Microsoft Excel.

Результаты. Характер наследования генной конструкции у свиней разных поколений существенно не различался и определялся типом спаривания, а также происхождением. Так, если трансгенным был один из родителей, доля трансгенных особей в потомстве варьировала в среднем от 28,4 до 40,0 %, если оба родителя — она достигала 50,0-62,5 %. В то же время отмечалось индивидуальное влияние некоторых особей на эффективность наследования трансгена: методом анализирующего скрещивания трансгенных хряков с нетрансгенными самками была установлена высокая степень наследования рекомбинантной ДНК в потомстве хряка № 831 (51,0 %) и, наоборот, низкая — в потомстве хряка № 046 (10,0 %).

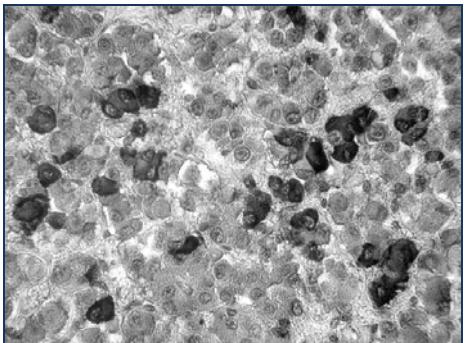
Количество собственного синтезируемого гормона роста — один из

1. Показатели экспрессии гормона роста у свиней, трансгенных по гену соматолиберина человека (опыт), и их нетрансгенных аналогов (контроль) в разных поколениях ($X \pm x$, виварий Всероссийского НИИ животноводства)

Поколение	ИФА, нг/мл ($Cv, \%$)		ИГХ, усл. ед. ($Cv, \%$)	
	опыт	контроль	опыт	контроль
2-е	6,20±1,11 (54)	3,31±0,44 (56)	106,7±5,1 (45)	98,3±2,9 (28)
3-е	7,15±1,34 (56)	3,11±0,37 (51)	91,4±4,2 (44)	82,8±3,7 (42)
8-е	4,60±1,10 (72)	3,31±0,44 (56)	100,5±4,7 (44)	98,3±2,9 (28)
9-е	6,16±1,12 (54)	3,11±0,37 (51)	99,3±4,2 (33)	82,8±3,7 (42)

П р и м е ч а н и е. ИФА и ИГХ — соответственно иммуноферментный и иммуногистохимический анализ, Cv — коэффициент вариации.

А



Б

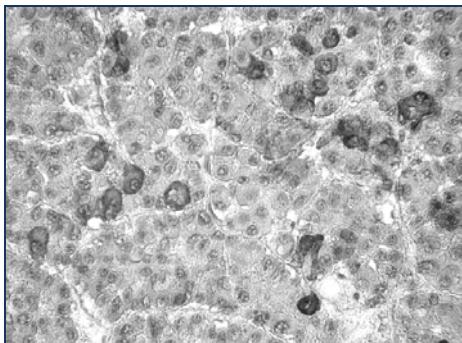


Рис. 1. Экспрессия гормона роста в клетках гипофиза у трансгенной по гену соматолиберина человека (А) и нетрансгенной (Б) свиньи (скоплению гормона соответствуют более темные участки). Иммуногистохимическое окрашивание с использованием хромогена АЕС (3-амино-9-этилкарбозол); увеличение $\times 400$ (виварий Всероссийского НИИ животноводства).

ключевых показателей, позволяющих охарактеризовать экспрессию интегрированного гена соматолиберина человека в организме трансгенных свиней. По данным иммуноферментного анализа, трансгенные животные превосходили своих нетрансгенных сверстников по содержанию гормона роста в крови в среднем в 1,5-2,0 раза (табл. 1). При этом особи ранних поколений (2-е и 3-е) характеризовались более высоким содержанием соматотропина, чем животные поздних генераций (8-я и 9-я). Результаты, полученные методом ИФА, были подтверждены иммуногистохимическими исследованиями: превышение относительного содержания соматотропина в клетках гипофиза у трансгенных животных достигало 20 % по сравнению с соответствующим показателем у контрольных особей (см. табл. 1, рис. 1).

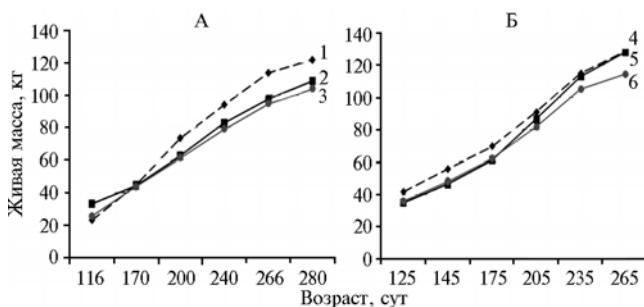


Рис. 2. Динамика роста у трансгенных по гену соматолиберина человека свиней разных поколений и их нетрансгенных аналогов (контроль) в двух независимых опытах по откармливанию: А — I опыт, 2-е и 8-е поколения (соответственно 1 и 2), Б — II опыт, 3-е и 9-е поколения (соответственно 4 и 5); 3 и 6 — контроль (виварий Всероссийского НИИ животноводства).

При оценке эффекта интеграции рекомбинантной ДНК на улучшение продуктивных свойств (в частности, на показатели роста) выявили, что трансгенные животные практически во все изучаемые периоды онтогенеза превосходили нетрансгенных сверстников по живой массе (рис. 2) и ее среднесуточному приросту. Наибольшая разница по показателям ме-

жду экспериментальными группами достигала соответственно 11,9 и 35,7 %. При этом животные из ранних генераций характеризовались повышенной скоростью роста по сравнению с особями из последующих генераций. Так, в двух независимых опытах по контролльному откорму свиньи 2-го и 3-го поколений в среднем превосходили животных 8-го и 9-го поколений по живой массе и ее среднесуточному приросту соответственно на 1,8-12,4 и 3,0-14,5 %.

Такие продуктивные свойства, как морфологический состав и качество туш, у трансгенных и контрольных свиней тоже различались. В частности, были выявлены изменения длины туши, процентного содержания мяса и сала, толщины шпика (табл. 2). Следует отметить, что с увеличением числа генераций наблюдалось уменьшение толщины шпика у трансгенных особей: если животные из ранних генераций по этому показателю превосходили аналогов на 16,9 %, то животные из более поздних генераций — на 3,3-6,1 %.

2. Морфологический состав и показатели качества туш у свиней, трансгенных по гену соматолиберина человека, и их нетрансгенных аналогов (контроль) в разных поколениях (виварий Всероссийского НИИ животноводства)

Поколение	Длина полутуши, см ($X \pm x$)	Выход туши, %	Состав туши, %			Толщина шпика, см ($X \pm x$)
			мясо	сало	кости	
I опыт						
2-е	97,3±3,6	66,4	54,0	34,3	11,7	3,81±0,27
8-е	108,7±3,9	65,1	55,9	32,2	11,9	3,46±0,29
Контроль	96,0±0,7	66,1	56,3	31,3	12,4	3,26±0,31
II опыт						
3-е	100,7±2,9	64,5	52,8	37,8	9,4	3,54±0,27
9-е	98,5±5,0	67,3	55,6	34,1	10,3	3,13±0,39
Контроль	97,0±0,8	65,2	54,1	36,4	9,5	3,03±0,30

Причина. Среднюю толщину шпика определяли по четырем точкам: на холке, между 6-м и 7-м грудными позвонками, на пояснице и на крестце.

Трансгенные животные также превосходили нетрансгенных аналогов по массе печени, желудка, кишечника, почек, матки, яичников, щитовидной железы и гипофиза, причем по массе органов желудочно-кишечного тракта и репродуктивных органов это преимущество достигало 65,2 %.

При изучении гистоструктуры внутренних органов и тканей трансгенных животных мы не выявили каких-либо отклонений, связанных с воспалительными или патологическими процессами. В то же время в большинстве образцов были обнаружены морфометрические изменения по сравнению с контролем. Так, практически во всех исследованных поколениях у трансгенных особей отмечалось увеличение толщины печеночных балок (до +22,7 %, $p \leq 0,01$) и железистого слоя донной части желудка (до +11,2 %, $p \leq 0,01$), а также высоты ворсинок 12-перстной кишки (до +24,3 %, $p \leq 0,05$), что свидетельствует о более интенсивной пищеварительной функции. У трансгенных животных из ранних поколений наблюдалось увеличение диаметра ацинусов поджелудочной железы и фолликулов щитовидной железы соответственно на 7,3 ($p \leq 0,05$) и 6,5-19,1 %, тогда как подобные особи из более поздних генераций, наоборот, уступали интактным аналогам по этим показателям соответственно на 6,4-8,8 ($p \leq 0,01$) и 2,6-21,8 % ($p \leq 0,001$). Значительные изменения были выявлены в структуре органов сердечно-сосудистой и выделительной системы, а также в мышечной ткани, однако эти различия варьировали в ряде поколений (табл. 3).

Практически во всех изученных генерациях у трансгенных свиней размеры клеток большинства исследованных органов были увеличены, что связано преимущественно с ростом количества цитоплазмы. Изучение характера накопления нуклеиновых кислот в клетках таких органов выявило

более высокое содержание РНК у трансгенных животных по сравнению с контролем (до +34,6 %, $p \leq 0,001$), что свидетельствует об усилении синтеза белков.

3. Морфометрические показатели гистоструктуры внутренних органов и тканей у свиней, трансгенных по гену соматолиберина человека, и их нетрансгенных аналогов (контроль) в разных поколениях ($X \pm x$, виварий Всероссийского НИИ животноводства)

Поколение	Толщина, мкм			Диаметр фолликулов щитовидной железы, мкм
	печеночных балок	мышечных волокон	кардиомиоцитов	
I опыт				
2-е	25,2±0,6	47,9±1,3	25,1±0,5	185±8,1
8-е	21,9±0,6	48,9±1,5	24,8±0,6	197±8,9
Контроль	26,7±0,7	52,4±1,5	24,6±0,7	176±7,8
II опыт				
3-е	20,7±0,2	69,6±2,0	22,5±0,3	188±9,6
9-е	25,4±0,6	68,6±1,8	23,2±0,5	224±16,2
Контроль	24,9±0,6	55,6±1,2	20,9±0,5	183±12,9

Из приведенных данных становится очевидным, что повышение содержания соматотропина в крови у трансгенных свиней в норме не может полностью проявиться на фенотипическом уровне, поскольку другие факторы, процессы и механизмы взаимодействия, обусловливающие проявление эффекта соматотропина, не претерпевают изменений. Например, возможно противоречие между количеством соматотропина и числом рецепторов этого гормона. Полученные результаты подтверждают разработанную И.И. Шмальгаузеном теорию организма как целостной системы в индивидуальном и историческом развитии. Согласно этой теории, все органы животного образуют единую систему, части которой зависят друг от друга и действуют и противодействуют одна по отношению к другой, поэтому никакое изменение не может обнаружиться в одной части без того, чтобы не вызвать соответствующие изменения во всех остальных частях. В то же время в организме трансгенных животных происходят определенные перестройки, изменяющие сложившуюся систему корреляций, что, несомненно, влияет на развитие особи.

Таким образом, интеграция гена соматолиберина человека в геном свиней оказывает множественное воздействие на различные признаки. При этом некоторые изменения проявляются в виде четкой тенденции в течение всех поколений (например, увеличение массы органов желудочно-кишечного тракта и репродуктивных органов и снижение толщины шпика с увеличением числа генераций). Вместе с тем следует отметить отсутствие стабильно наследуемых достоверных различий по показателям роста в раннем возрасте. Это может быть связано с длительной селекцией на ускорение роста, значительно снизившей естественные резервы повышения соответствующего показателя по сравнению с лабораторными животными. Полученные данные свидетельствуют о неоднозначности влияния интеграции и последующей экспрессии генов соматотропного каскада на организм трансгенных свиней, проявляющегося в изменении ряда показателей развития особей как на клеточном, так и на организменном уровне.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Эрнст Л.К., Волкова Н.А., Зиновьева Н.А. Некоторые аспекты использования трансгенных технологий в животноводстве. С.-х. биол., 2009, 2: 4-9.
2. Эрнст Л.К., Гольдман И.Л., Кадулин С.Г. Генная инженерия в животноводстве: трансгенные сельскохозяйственные животные, кормовые растения, микроорганизмы рубца. Биотехнология, 1993, 5: 2-14.
3. Murgay J.D., Nancarrow C.D., Marshall J.T. e.a. Production of transgenic

- merino sheep by microinjection of metallotionein bovine growing hormone fusion genes. *J. Reprod. Fertil. Dev.*, 1989, 1: 147-155.
4. Purse V., Cambell R., Millier K. e.a. Growth potential of transgenic pigs expressing a bovine growth hormone gene. *J. Anim. Sci.*, 1988, 66: 267.
 5. Rexroad C.E., Hammer R.E., Behringher R.R. e.a. Insertion, expression and physiology of growth-regulating genes. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 1990, 41: 119-124.
 6. Wieghart M., Hoover J.L., McGaugh M.M. e.a. Production of transgenic pigs harboring a rat phosphoenolpyruvate carboxykinase-bovine growth hormone fusion gene. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 1990, 41: 89-96.
 7. Волкова Н.А., Шихов И.Я., Зиновьева Н.А. Фенотипические особенности свиней в период эмбриогенеза при интеграции гена рилизинг-фактора гормона роста человека. С.-х. биол., 2007, 2: 37-42.
 8. Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А., Волкова Н.А., Пархоменко Е.Г., Шатайло В.Н., Брем Г. Влияние интеграции гена рилизинг-фактора гормона роста на некоторые хозяйственно ценные признаки свиней. Зоотехния, 2007, 5: 2-5.
 9. Волкова Н.А., Волкова Л.А., Кленовицкий П.М., Гусев И.В., Багиров В.А., Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А., Брем Г. Цитогенетические профили свиней, трансгенных по генной конструкции соматолиберина человека. Докл. РАСХН, 2007, 5: 37-38.
 10. Эрнст Л., Зиновьева Н., Багиров В., Волкова Н., Волкова Л., Пархоменко Е., Ралков А. Мясные и откормочные качества трансгенных свиней. Свиноводство, 2007, 3: 2-5.
 11. Эрнст Л.К., Кленовицкий П.М., Багиров В.А., Волкова Н.А., Зиновьева Н.А., Гусев И.В., Данч С.С., Брем Г. Состояние хромосомного аппарата у свиней, трансгенных по гену соматолиберина человека MT1/RHGH. С.-х. биол., 2009, 2: 31-36.
 12. Ралков И.А., Волкова Н.А., Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К. Влияние интеграции гена соматолиберина на клеточную структуру некоторых внутренних органов свиней в онтогенезе. Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук, 2011, 4(27): 56-60.
 13. Зиновьева Н.А., Попов А.Н., Эрнст Л.К. и др. Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве. Дубровицы, 1998.
 14. Микроскопическая техника: Руководство /Под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. М., 1996.
 15. Шихов И.Я., Хамидзеев М.П., Лепнов А.С. и др. Методические рекомендации по количественному определению нуклеиновых кислот в клетках и тканях сельскохозяйственных животных. Дубровицы, 1985.
 16. Меркурова Е.К., Абрамова З.В., Бакай А.В., Кошиш И.И. Генетика. М., 1991.

¹Российская академия сельскохозяйственных наук,
117218 г. Москва, ГСП-7, ул. Кржижановского, 15, корп. 2,
e-mail: ernstrashn@mail.ru;

Поступила в редакцию
23 августа 2011 года

²ГНУ Всероссийский НИИ животноводства

Россельхозакадемии,
142132 Московская обл., Подольский р-н, пос. Дубровицы,
e-mail: natavolkova@inbox.ru

PHENOTYPIC FEATURES OF TRANSGENIC PIGS OF DIFFERENT GENERATIONS AFTER INTEGRATION OF GENE OF HUMAN GROWTH HORMONE-RELEASING FACTOR

L.K. Ernst¹, N.A. Volkova², N.A. Zinovieva²

Summmary

The comparative study of effect of integrated gene of human growth hormone-releasing factor on the aggregate of phenotypic signs in transgenic animals in the early and late generations at the similar conditions of keeping and growing permit to establish, that such individuals have heightened content of growth hormone in the blood and exceed of the intact analogs on live weight and its average daily gain. It was shown, that some stabilization of new correlations takes place in the next generations.

Новые книги

Костомахин Н.М. **Породы крупного рогатого скота:** Уч. пос. для вузов. М.: изд-во «КолосС», 2011, 120 с.

Описаны породы крупного рогатого скота, история их создания, методы разведе-

ния, современное состояние. Дана классификация пород по ареалу и направлениям продуктивности. Освещены вопросы акклиматизации пород, рассмотрены пути сохранения исчезающих пород и совершенствования генофонда сельскохозяйственных животных.