

**Обзоры, проблемы, итоги**

УДК 636.5:636.082.2:577.21

doi: 10.15389/agrobiology.2013.6.3rus

**МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ И СЕЛЕКЦИЯ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ**  
(обзор)

Л.Г. КОРШУНОВА, Р.В. КАРАПЕТЯН, В.И. ФИСИНИН

Обсуждаются положительные результаты, полученные селекционерами на практике благодаря использованию научных разработок по трансгенезу. Показано современное состояние и перспективы использования трансгенеза в птицеводстве. Рассмотрен разработанный авторами метод получения трансгенной птицы посредством микроинъекции чужеродной ДНК в яйцеклетки кур и перепелок. В основе метода лежит хирургическая операция, обеспечивающая доступ к яйцеклеткам птиц для проведения микроинъекций ДНК и формирование третичных оболочек яйцеклетки естественным образом в половых путях птицы. Описаны методики микроинъекций в яйцеклетки на разных стадиях их развития. Этим методом получены трансгенные куры с геном гормона роста человека,  $\beta$ -галактозидазы, человеческого  $\beta$ -интерферона и перепела с геном гормона роста крупного рогатого скота. Пересадка гена гормона роста крупного рогатого скота повысила массу яиц и иммунный статус перепелов и их потомков в ряду поколений. Использование трансгенеза для переноса полезного гена даже от одной линии птицы к другой (что достижимо обычными селекционными методами) дает выигрыш по времени минимум в 7-8 лет и, возможно, экономии денежных средств за счет исключения возвратных скрещиваний, необходимых для удаления ненужных генов, которые передаются при естественной половой гибридизации. В настоящее время трансгенез во многом сходен с мутацией — в значительной степени направленной, но сохраняющей множество неопределенностей. Процесс встраивания трансгена имеет вероятностный характер, поэтому для достижения наследуемого трансгенеза может потребоваться получение большого числа первичных трансгенных особей.

**Ключевые слова:** методы, трансгенез, сельскохозяйственная птица, селекция.

Методы и приемы селекции сельскохозяйственной птицы. Повышение продуктивности птицы и увеличение валового производства продуктов птицеводства в значительной степени зависят от качества племенной птицы. Племенная работа — это фундамент, обеспечивающий подъем промышленного птицеводства. В период экстенсивного развития отрасли при наличии большого числа пород и породных групп с невысокой продуктивностью была доказана эффективность скрещивания разных пород для увеличения продуктивных показателей (1, 2). На этапе становления интенсивного птицеводства ученые-селекционеры обосновали целесообразность создания промышленных линий (3, 4). Современное промышленное птицеводство базируется на использовании высокопродуктивной гибридной птицы, полученной в результате скрещивания сочетающихся линий кур (5, 6), индеек и цесарок (7, 8), уток и гусей (9), отселектированных и дифференцированных по отдельным признакам.

Селекционная работа всегда была направлена на совершенствование существующих и создание новых методов и приемов. В 1950-1960-е годы удалось доказать возможность изменения некоторых характеристик птицы при многократных (в нескольких поколениях) «переливаниях» крови и создании «вегетативных гибридов» (гемогбридизация) (10, 11). Таким методом были созданы ленинградские белые куры (особым породы леггорн вводили кровь австралорпов) (12), цесарки (серо-крапчатые цесарки получили кровь от петухов московской белой породной группы) (13), австралорп черно-пестрый (экспериментальная популяция, созданная с использованием внутримышечной инъекции крови и ее элементов от полосатых плимутроков черным австралорпам) (14).

Исследователи неоднократно обращались к получению межвидовых гибридов. Известны межвидовые гибриды: петух × цесарка, курица × перепел, курица × индейка, курица × фазан, курица × павлин и др. В промышленном птицеводстве используются межвидовые гибриды муларды (получены от скрещивания мускусных селезней с утками домашних пород). Муларды обладают высокой скоростью роста и небольшой ожиренностью тушек, способностью к откорму на жирную печень. Следует отметить невысокий вывод мулардов (30-35 %), что стало сдерживающим фактором при их использовании. В большинстве случаев межвидовые гибриды бесплодны, поэтому большого практического значения не имеют. Бесплодие гибридов проявляется в виде утраты плодовитости только одним полом (так, у птиц бесплодны самки) (15, 16).

Не всегда научные разработки быстро находят широкое применение на практике. В этом отношении показателен пример с генами *K-k* и *S-s*, описанными А.С. Серебровским еще в 1926 году (17, 18). Только спустя десятилетия особенность оперяемости цыплят, связанная с наличием этих генов, стала широко использоваться. Большинство современных высокопродуктивных кроссов кур аутосексны, что позволяет в суточном возрасте разделить особей по полу с точностью до 98-99 % по развитию перьев крыла или цвету пуха, а не по половым бугоркам (19, 20). Долгое время генетикам был известен ген карликовости (*dw*), определяющий невысокую массу и укороченную длину ноги птицы, описанный Ф.Б. Хаттом (21), и только в последние десятилетия материнские формы яичных и мясных кур, несущие этот ген, начали вовлекать в селекционный процесс. Живая масса у кур-носителей гена *dw* невысока, что обеспечивает снижение затрат корма на производство племенной и промышленной продукции (22, 23). Понятие «генеогеография» с уточнением связанных с ним вопросов ввел А.С. Серебровский в 1928 году. В настоящее время названное направление получило развитие: проводится анализ распространения генетических маркеров в популяциях крупных регионов, генотипирование ДНК и классических маркеров, в частности однородительских (митохондриальная ДНК, Y-хромосомы), генетико-биохимических и других систем. Конечной целью таких исследований служит поддержание и эффективное использование в селекции того огромного генетического потенциала, который все еще сохраняется у отечественных сельскохозяйственных видов животных (24). В связи с этим возникает необходимость в разработке и использовании для паспортизации животных и птицы высокопроизводительных систем ДНК-анализа (25).

Текущее столетие для птицеводов — век генетики и селекции. Если на международных конкурсных испытаниях в 1925 году у кур средняя яйценоскость 176 шт. оценивалась как высокая, то в 2002-2005 годах на конкурсы выставлялась птица белых и коричневых яичных кроссов с продуктивностью 330-340 шт. в год и выходом яичной массы 21 кг, что в 12 раз больше массы их тела (26).

В настоящее время селекция птицы небезуспешно ведется традиционными методами. Селекционные достижения вплотную приблизились к физиологическому пределу яйценоскости. Селекционеры намерены сместить акцент в программах в сторону повышения жизнеспособности и стрессоустойчивости птицы. Это требует крупных вложений в проведение исследований, связанных с изучением физиологических и биохимических процессов в организме, обеспечивающих поддержание высокой продуктивности в разных условиях внешней среды (27, 28).

Современное птицеводство вплотную подошло к использованию новейших биотехнологий, в том числе к применению методов генной инженерии в селекционно-генетической работе.

Современное состояние и перспективы использования трансгенеза в птицеводстве. Создание трансгенной птицы для хозяйственного использования предполагает получение линий. С этой точки зрения птица обладает большим преимуществом перед сельскохозяйственными млекопитающими благодаря быстрому половому созреванию и высокой плодовитости. Многие лаборатории мира работают над получением трансгенной птицы. Однако особенности ее размножения создают серьезные проблемы для исследователей. Курица образует в сутки одну яйцеклетку, которая очень велика и нежна для каких-либо манипуляций, как это делается с яйцеклетками млекопитающих при инъекции в них чужеродной ДНК. Для нормального эмбрионального развития птичьей яйцеклетке необходимы третичные оболочки — белковая, подскорлупные и скорлупа. Дробление куриной яйцеклетки начинается в белковом отделе яйцевода, а в свежеснесенном яйце уже имеется 50-60 тыс. клеток. Поэтому впервые трансгенную птицу получили с помощью ретровирусных векторов.

Ретровирусы были первыми претендентами на роль векторов для переноса генов, поскольку в норме они включаются в геномную ДНК хозяина и реплицируются (29). Многие исследователи пытались внести чужеродные гены в зародышевую линию, инфицируя эмбрионы как сохраняющими способность к репликации, так и утратившими ее ретровирусными векторами (30, 31). Успешное встраивание трансгена в этих опытах составило от 0,8 до 5,0 %. Введение рекомбинантного вектора вируса лейкоза птиц в бластомеру инкубируемых куриных эмбрионов дало положительный результат по переносу генетического материала в зародышевую линию (32). С рекомбинантным вирусом были получены полные трансгены (33, 34). Исследования по дальнейшей разработке технологии использования ретровирусов с целью трансгенеза у птицы представляются важными и продолжаются в настоящее время (35).

Существуют методические подходы для безвирусного трансгенеза у птицы. Один из них — создание химер подсадкой в эмбрионы чужих клеток. Таким способом были получены соматические химеры и химеры зародышевой линии (36-39). Их выращивают и отводят от них потомство. У выращенных химерных особей некоторая часть потомков, происходящих из трансгенных зародышевых клеток, оказываются трансгенными. Однако при культивировании эмбриональных клеток были обнаружены молекулярные механизмы, защищающие геном от интеграции и экспрессии чужеродных генов. Имеющиеся данные свидетельствуют о подавлении и сбоях в экспрессии трансгенов (40-42) и указывают на сложность внутриклеточных механизмов, разрешающих транскрипцию и трансляцию чужеродных последовательностей ДНК. Можно утверждать, что в настоящее время так называемая РНК-интерференция представляет собой весьма острую проблему для совершенствования трансгенеза (43).

Технология получения трансгенных эмбриональных химер пока остается основной при создании коммерчески значимых трансгенных линий птицы. Это сложный и дорогостоящий подход, предполагающий выделение и культивирование первичных половых клеток, их последующую трансфекцию чужеродной ДНК и подсадку в ранние эмбрионы (44-46).

Получение трансгенной птицы с использованием искусственного

осеменения (традиционный и распространенный в птицеводстве прием) рассматривается как очень перспективное. Способность сперматозоидов связывать чужеродную ДНК была показана в работе В.С. Brackett с соавт. в 1971 году (47). Впервые трансгенез с помощью сперматозоидов в качестве векторов для переноса экзогенной ДНК был продемонстрирован на мышцах в 1989 году (48), и на него возлагали большие надежды. ДНК связывается со сперматозоидами определенным образом. У большинства видов животных место связывания преимущественно локализовано в пост-акросомальной области головки сперматозоида (49). Для увеличения эффективности переноса гена с помощью сперматозоидов (sperm-mediated gene transfer, SMGT) предложено несколько подходов. Так, при применении липофектина 51,6 % сперматозоидов петуха содержали экзогенную ДНК (50). В результате искусственного осеменения кур семенем, трансфицированным с помощью липофектина, экзогенная ДНК выявлялась в бластомере 67 % оплодотворенных яиц. Однако включения чужеродной ДНК в геном вылупившихся цыплят не наблюдали, хотя у этих цыплят была отмечена эписомальная интеграция чужеродной ДНК.

Было предложено дополнить метод SMGT использованием рестрикционных ферментов (restriction enzyme mediated integration, REMI). Линейная ДНК вместе с рестриктазой вводится в клетку-мишень посредством липофекции или электропорации. Предполагается, что рестриктаза затем разрезает геномную ДНК для облегчения интеграции экзогенной ДНК с соответствующими липкими концами. При использовании описанной технологии на курах 90 % цыплят (17 из 19) экспрессировали GFP (green fluorescent protein) и у 80 % их потомков (25 из 30) проявлялся тот же эффект (51). С помощью сперматозоидов петуха как векторов были получены трансгенные куриные эмбрионы с генами  $\beta$ -галактозидазы. Эффективность трансформации яйцеклеток составила 23 % от числа оплодотворенных яиц (52, 53). Методом искусственного осеменения трансфицированной спермой с применением липосом созданы трансгенные куры с геном гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (52). Однако все упомянутые способы характеризуются плохой воспроизводимостью, что свидетельствует о необходимости дальнейшей научной проработки проблемы (54).

Микроинъекция ДНК в извлеченную яйцеклетку с последующей трансплантацией в яйцевод курицы. Интерес представляет метод непосредственной инъекции ДНК в яйцеклетку. У птицы можно получить свежее оплодотворенную яйцеклетку, вскрыв брюшную полость на определенной этапе овуляторного цикла (установленное время после снесения курицей яйца). Однако добиться нормального эмбрионального развития этой яйцеклетки составляет проблему. Здесь возможны два варианта. Один из них реализован при разработке системы культивирования куриных яйцеклеток *in vitro* в условиях, максимально приближенных к естественным. Яйцеклетку, извлеченную из верхней части белкового отдела яйцевода, инкубируют в скорлупе другого яйца (55, 56). Создание трансгенных цыплят таким методом — достаточно сложная задача, а показатель вылупления низок (в пределах 15 %). Однако анализ на трансгенность эмбрионов и цыплят, полученных в этих экспериментах, обнадеживает. При использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР) показано, что образцы ДНК почти от половины эмбрионов и цыплят, проживших последние 12 сут культивирования, содержат трансген. Двое из вылупившихся цыплят содержали трансген в хориоаллантоисной мембране,

крови и пульпе ребра. У одного петушка количество трансгена сохранялось до половой зрелости. Его сперма также содержала трансген (конструкцию репортерного гена), который был успешно передан к 3,4 % его потомства (14 из 412 полученных от него цыплят) (57).

Во Всероссийском научно-исследовательском и технологическом институте птицеводства разработан другой метод получения трансгенной птицы при микроинъекции чужеродной ДНК в яйцеклетки, когда образование оболочек яйцеклетки происходит естественным образом в половых путях птицы (58-60). Основное достоинство такого подхода заключается в отсутствии необходимости использовать сложную аппаратуру и среды для культивирования эмбрионов *in vitro*, выделения и пересадки бластодермальных или примордиальных клеток. Основу предложенного метода трансгенеза составляет хирургическая операция. Принципиальная возможность такой операции была продемонстрирована ранее (61).

Было установлено, что у используемых в эксперименте кур овуляция происходит через 20-25 мин после снесения яйца. Спустя примерно 5 мин после овуляции яйцеклетка захватывается воронкой яйцевода. Прохождение яйцеклеткой воронки яйцевода до входа в белковый отдел занимает несколько минут. В воронке происходит ее оплодотворение. После вскрытия брюшной полости курицы под местной новокаиновой анестезией яйцеклетку осторожно выдавливали из воронки яйцевода в подогретую чашечку с жидкой фракцией куриного яичного белка, разбавленного соевым раствором, и помещали под стереомикроскоп. Жидкость необходима для предотвращения обсыхания яйцеклетки на воздухе; добавка яичного белка, как показал наш опыт, увеличивает механическую прочность вителлиновой мембраны яйцеклетки. Пронуклеусы в куриной яйцеклетке не видны, поэтому инъекцию проводили в цитоплазму, в зону расположения ядерного материала, то есть в центр бластодиска. После инъекции яйцеклетку помещали обратно в яйцевод курицы через его воронку с использованием специально разработанного приспособления или без него (58). При естественном овуляторном процессе у курицы незадолго до овуляции воронка яйцевода активизируется, она достаточно эластична и прочна для того, чтобы ее можно было растянуть вручную и в образовавшееся отверстие вставить трансплантируемую яйцеклетку. Однако такое состояние воронки сохраняется очень недолго, в течение примерно 5 мин. Утратившая активность воронка уменьшается в размерах, становится чрезвычайно рыхлой и рвется при попытке растянуть ее до нужных для вхождения яйцеклетки размеров. Этого времени часто не хватало, и для преодоления такого ограничения было изготовлено приспособление, позволяющее растянуть, зафиксировать воронку яйцевода и при необходимости продвинуть трансплантируемую яйцеклетку в яйцевод давлением воздуха. Брюшную полость зашивали, кур возвращали в их клетки. Яйца, снесенные прооперированными курами на следующий день, собирали и инкубировали. В результате 49 операций было получено шесть цыплят.

Инъекции ДНК (линеаризованная плаزمид, содержащая металлопротеинный промотор и ген гормона роста человека) описанным способом дали следующие результаты. В крови у двух цыплят иммуноферментным и радиоиммунологическим методами был обнаружен гормон роста человека в концентрации 0,5-1,0 нг/мл. Дот- и блот-гибридизационному анализу была подвергнута ДНК, выделенная из полученных биопсией тканей гребня, кожи, мышц, печени и крови цыплят. У одного из двух цыплят, положительных по тесту на гормон, в ДНК из гребня и кожи бы-

ли обнаружены последовательности гена гормона роста человека, но в количествах существенно меньше одной копии на геном. По-видимому, полученные особи были мозаичными (как между тканями, так и по ткани) по интегрированному трансгену, причем в клетки зародышевой линии трансген не встроился, поскольку в потомстве этих цыплят трансгенные особи не были обнаружены (62).

Микроинъекции ДНК в куриную яйцеклетку без извлечения ее из яйцевода. Дальнейшее совершенствование этой технологии позволило проводить инъекции ДНК в яйцеклетки без их извлечения из половых путей птицы, вследствие чего существенно возросла эффективность метода. Самая ответственная и трудоемкая стадия в описанной выше технологии — имплантация яйцеклетки в яйцевод. Только из половины имплантированных яйцеклеток получали морфологически нормальные яйца. Чтобы избежать эту процедуру, проводили инъекции ДНК в бластодиск яйцеклетки, не извлекая ее (через прозрачную стенку воронки яйцевода). У кур учитывали овуляторные циклы, ежедневно регистрируя время снесения ими яиц. На операцию брали кур с ожидаемой овуляцией (через 15–20 мин после снесения яйца). Под местной анестезией вскрывали брюшную полость. Раствор ДНК инъецировали стеклянной микропипеткой (диаметр острия 2–4 мкм) в объеме 150–300 пкл в центр зародышевого диска яйцеклетки через стенку воронки (к сожалению, контролировать глубину погружения микропипетки в яйцеклетку не удалось из-за отсутствия подходящей оптики). После микроинъекции ДНК (линеаризованная плаزمида, содержащая металлотioneиновый промотор и ген гормона роста человека) брюшную полость зашивали и помещали кур в клетки. Снесенные на следующий день яйца инкубировали, полученных цыплят выращивали.

Гибридизационный анализ ДНК у полученных из таких яиц кур выявил нуклеотидные последовательности инъецированной плазмиды у четырех из 21 особи. Интенсивность сигналов на радиоавтографах различалась не только между особями, но и для ДНК из разных тканей каждой курицы. Количество интегрированного трансгена, судя по сравнительной денситометрии полос с сигналами от плазмиды, варьировало для разных препаратов ДНК от нескольких копий до существенно меньших значений, чем одна копия на геном. Это служит свидетельством мозаичности полученных трансгенных кур. Концентрация соматотропина человека у них в крови составила 1,5–2,0 нг/мл. Анализ радиоавтографа блот-гибридизации ДНК из разных тканей трансгенных кур показал, что произошла тандемная (несколько повторов) интеграция трансгена, характерная для трансгенных животных, получаемых при микроинъекциях ДНК в яйцеклетки (63–65).

Микроинъекции ДНК в крупные фолликулы яичника кур. Описанные выше подходы позволяют за операцию получить от одной курицы максимум одну жизнеспособную яйцеклетку с инъецированным чужеродным генетическим материалом. Вариантом, позволившим резко увеличить это число, стало инъецирование в яйцеклетки, находящиеся в яичнике, то есть в фолликулы (59, 66). В яичнике курицы имеется 4–5 крупных фолликулов, которые мы могли использовать для проведения в них микроинъекций. Однако при таком подходе возрастают технические трудности. Хирургический доступ к яичнику более сложен, чем к яйцеводу, а фолликулярная оболочка толще и жестче стенки воронки яйцевода, но в целом преимуществ у такого варианта значительно больше, чем не-

достатков. В том числе отпадает необходимость устанавливать овуляторные циклы птицы, что существенно упрощает подготовку и выполнение эксперимента. Сложности визуального контроля за проведением микроинъекций, на наш взгляд, легко преодолеть, используя оптику и микрохимию, применяемые в офтальмологии или отоларингологии. Таким образом, гипотетически за одну операцию от одной курицы можно получить 4-5 яйцеклеток с инъецированным инородным генетическим материалом, причем без проблем, связанных с их возможным неоплодотворением или ненормальным образованием третичных оболочек.

Прежде чем проводить микроинъекции ДНК в фолликулы, следовало убедиться, что из фолликула с инъецированным материалом формируется яйцеклетка и полноценное яйцо. С этой целью на начальном этапе работы в желток фолликулов вводили краситель — метиленовый синий или тушь. Яйца от прооперированных кур собирали в течение 12 сут и вскрывали (67). Данные выполненных экспериментов свидетельствовали, что из обработанных фолликулов действительно образуются яйца. После 7-х сут краситель в яйцах не наблюдали. Следует отметить, что хирургическое вмешательство и инъекции могут нарушать иерархию фолликулов, согласно которой самый крупный должен овулировать первым. Достаточно часто краситель появлялся не в первых снесенных яйцах, а позднее, хотя три самых крупных фолликула обязательно помечали красителем. Вскрытие также показало, что некоторые фолликулы рассасываются. Довольно часто в яйцах наблюдали лишь следы красителя, то есть он достаточно интенсивно выводился из фолликула в процессе созревания последнего. Поэтому возможно, что некоторые яйца, зарегистрированные как не содержащие красителя, в действительности происходили из меченых фолликулов. Полученные результаты не позволяют сделать какие-либо строгие выводы об иерархии фолликулов, порядке их овуляции и т.д. Однако не вызвало сомнений, что в среднем не менее 50 % яиц, снесенных курицей в первые 7 сут после операции, происходят из фолликулов с инъецированным материалом.

На следующем этапе выполнялись опыты по введению чужеродной ДНК (67). Всех полученных цыплят исследовали на трансгенность. Человеческий гормон роста обнаруживался в крови у 10 из 40 особей. У двух в ДНК были выявлены нуклеотидные последовательности гена гормона роста человека. По-видимому, это стало результатом мозаичности полученных трансгенных особей.

Тем же методом получены трансгенные куры с геном  $\beta$ -галактозидазы (частота трансгенных особей составила 25 %). Из них значительная часть оказалась мозаичной по интегрированному трансгену (68, 69).

Изучение наследования трансгенности. Интеграция трансгена в геном клеток зародышевой линии, из которых формируются гонады, — одно из важнейших условий, поскольку это необходимо для передачи генетической модификации по наследству.

Для размножения были взяты три курицы, трансгенные по гену гормона роста человека, которых осеменяли спермой интактных петухов. Из 78 особей первого поколения трансгенными были пять (6 %). Во втором поколении частота появления трансгенов вместо теоретически ожидаемых 50 % составила 16 %. Возможное объяснение заключается в низкой жизнеспособности эмбрионов, получаемых от трансгенных кур: у них выводимость равнялась примерно 20 % против 90 % в контроле. Подавляющее большинство эмбрионов погибали на ранних стадиях развития.

Возможно, к нарушениям развития приводила неконтролируемая экспрессия трансгена в клетках организма (67).

Были получены перепела с геном гормона роста крупного рогатого скота. Трансгенные перепела имели некоторые фенотипические особенности по сравнению с обычными. Самой заметной из них оказались яйца высокой весовой категории (14-21 г) (70). У использованных в эксперименте перепелов эстонской породы масса яиц — 10-13 г (71). Проведенная многосторонняя оценка их качества показала, что химический и биохимический состав яиц оставался прежним (72, 73). Увеличение массы яиц у трансгенных перепелов наследовалось в ряде генераций (74).

Генная конструкция, интегрированная в геном перепелов, повлияла на функции эндокринной системы. Полученные данные по нарастанию титров антител в крови и желтке яиц в ответ на введение антигена свидетельствовали о повышении иммунного статуса у трансгенных перепелов, выраженном в ускоренной выработке антител к вводимому антигену. В качестве антигена использовали вакцинный вирус ньюкаслской болезни (штамм Ла-Сота) (75).

Одно из возможных направлений использования трансгенеза в практическом птицеводстве заключается в создании линий кур с наследственной устойчивостью к вирусным заболеваниям (например, при формировании в организме некоторого постоянного фона интерферона — антивирусного агента, синтезируемого в клетках в ответ на вирусное заражение). Добиться постоянного синтеза интерферона можно при введении в геном генной конструкции, в которой ген интерферона находится под контролем какого-либо постоянно действующего активного гена-регулятора. Им может быть металлотионеиновый промотор мыши (MT1), который активируется ионами тяжелых металлов. Их естественного фона в организме достаточно для экспрессии гена, находящегося под контролем MT1 (при необходимости индукцию можно усилить, добавляя в корм соли цинка).

В нашей работе (76) в яйцеклетки кур породы белый леггорн инъецировали генную конструкцию рMT-hIFN $\beta$ 1, содержащую ген человеческого  $\beta$ -интерферона под контролем металлотионеинового промотора мыши. ДНК анализировали на наличие нуклеотидных последовательностей гена человеческого  $\beta$ -интерферона ПЦР-амплификацией с помощью праймеров 3'-ССААСААГТГТСТССТССАААТТГС-5' (прямой) и 3'-САТТССА-ГССАГТГСТАГАТГААТС-5' (обратный). В качестве положительного контроля использовались ДНК человека и плазида рMT-hIFN $\beta$ 1. После инъекции генной конструкции в 29 яйцеклеток получили 25 внешне нормальных яиц (во всех наблюдалось эмбриональное развитие), из 10 вывелись цыплята, из которых были выращены семь (два петуха и пять кур). ПЦР-анализ ДНК, выделенной из крови всех полученных особей, показал наличие у петушков последовательностей инъецированной генной конструкции. Следует отметить, что ген интерферона имеет очень маленький размер и для него сложно подобрать высокоспецифичные праймеры. Поэтому в ПЦР синтезировалось большое количество неспецифических продуктов. Соответственно, они отсутствовали в реакции, где матрицей служила сама генная конструкция. Ожидаемый фрагмент ДНК длиной 300 п.н. синтезировался в положительном контроле — на ДНК из клеток крови человека и на генной конструкции, а также на ДНК из крови цыплят № 3503 и № 3506. Этот амплифицированный фрагмент гена человеческого интерферона должен содержать один сайт рестрикции



PstI, поэтому для дополнительной проверки синтезированную в ПЦР ДНК подвергали обработке указанной рестриктазой, при которой полученный ампликон размером 300 п.н. расщеплялся на два теоретически ожидаемых фрагмента длиной 200 и 100 п.н.

Таким образом, разработанные хирургические операции и приемы манипуляции с яйцеклеткой у птицы позволяют проводить микроинъекции ДНК в яйцеклетку и обеспечивают ее дальнейшее нормальное эмбриональное развитие. Методом микроинъекции ДНК в яйцеклетки получены трансгенные куры и перепела. Показана экспрессия и наследование трансгена. Следовательно, для трансгенеза птицы необязательно использовать ретровирусы и задача создания трансгенных популяций выполнима. Целью может быть фенотип, который по хозяйственно значимым признакам (например, по скорости роста, эффективности конверсии корма, яйценоскости, с уменьшенной ожиренностью тушки, повышенной устойчивостью к заболеваниям и т.д.) превосходит имеющиеся в птицеводстве. Трансгенная птица с генами, обеспечивающими производство полезных фармацевтических белков, накапливающихся в яйце, также может широко использоваться (77, 78).

Итак, применение трансгенеза для переноса полезного гена даже от одной линии птицы к другой (что достижимо обычными селекционными методами) дает минимум 7-8-летний выигрыш и, возможно, экономию денежных средств за счет исключения возвратных скрещиваний, необходимых для удаления ненужных генов, которые передаются при естественной половой гибридизации. В настоящее время трансгенез во многом сходен с мутацией — в значительной степени направленной, но сохраняющей множество неопределенностей. Процесс встраивания трансгена имеет вероятностный характер, поэтому для обеспечения наследуемого трансгенеза может потребоваться получение большого числа первичных трансгенных особей. Применение генетической модификации в животноводстве вообще и в птицеводстве в частности по большей части находится на раннем этапе. Основная часть результатов остается на уровне научных разработок, и пока не настало время их активного внедрения в практику.

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский  
и технологический институт птицеводства РАСХН,  
141300 Россия, Московская обл., г. Сергиев Посад, ул. Птицградская, 10,  
e-mail: lg@vnitip.ru; vnitip@vnitip.ru*

*Поступила в редакцию  
30 января 2013 года*

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]. 2013. № 6. pp. 3-15*

## METHODS FOR GENETIC MODIFICATION IN POULTRY (review)

*L.G. Korshunova, R.V. Karapetyan, V.I. Fisinin*

*All-Russian Research and Technological Institute of Poultry, Russian Academy of Agricultural Sciences,  
10, ul. Ptitsegradskaya, Sergiev Posad, Moscow Province, 141300 Russia, e-mail: lg@vnitip.ru; vnitip@vnitip.ru  
Received January 30, 2013 doi: 10.15389/agrobiol.2013.6.3eng*

### Abstract

The positive practical results in poultry breeding due to investigations on transgenesis and their prospects are discussed. The method for obtaining transgenic chickens and quail by microinjection of foreign DNA into eggs are described. It is based on a surgical operation, providing the access to the eggs to conduct microinjection of DNA and the natural formation of tertiary egg shells in the bird's genital tract. The microinjection into eggs at different stage of their development is considered in more detail. The transgenic chickens with humane growth hormone gene,  $\beta$ -galactosidase gene and humane  $\beta$ -interferon gene, and the transgenic quails with bovine growth hormone gene were produced by this technique. The quails with introduced bovine growth hormone gene and their off-

spring generations are characterized by an increased average egg mass and the higher immune status. Transgenesis used to transfer a target gene between two poultry lines, if compared with common breeding technologies, takes at least 7 to 8 years less and is probably less expensive, because there is no need in backcrosses to remove the unnecessary genes transmitted in the course of natural sexual hybridization. Nowadays, the transgenesis is very similar to directed, but indeterminate mutation. A transgene chances to insert genome, and that is why a lot of initial transgenic individuals are needed to achieve an inherited transgenesis.

Keywords: methods, transgenesis, poultry, breeding.

## REFERENCES

1. Kushner Kh.F. *Zhurnal obshchei biologii*, 1958, 19(5): 357-368.
2. Penionzhkevich E.E., Shakhnova L.V. *Materialy konferentsii po nasledstvennosti i izmenchivosti rastenii, zhitovnykh i mikroorganizmov* [Heredity and variability in plants, animals and microorganisms]. Moscow, 1959: 515-520.
3. Penionzhkevich E.E., Zlochevskaya K.V., Shakhnova L.V. *Razvedenie i plemennoe delo v ptitsevodstve* [Rearing and breeding in poultry]. Moscow, 1982.
4. Smetnev S.I. *Doklady TSKHA*, 1963: 24-28.
5. Egorova A.V., Shakhnova L.V., Elizarov E.S. *Materialy XVI konferentsii Rossiiskogo otdeleniya Vsemirnoi nauchnoi assotsiatsii po ptitsevodstvu «Dostizheniya v sovremennom ptitsevodstve. Issledovaniya i innovatsii»* [Progress in modern poultry. Research and innovations (Proc. XVI Conf. of Russian Branch of World's Poultry Science Association)]. Sergiev Posad, 2009: 27-29.
6. Gal'pern I.L. *Selektsionno-geneticheskie metody i programmy vyvedeniya novykh linii i sozdaniya konkurentnosposobnykh krossov yaichnykh i myasnykh kur* [Genetic methods of breeding and programs for creating new lines and competitive crosses of egg and meat hens]. St. Petersburg, 2010.
7. Zabiyakin V.A. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* [Agricultural Biology], 2008, 4: 15-22.
8. Roiter Ya. *Zhivotnovodstvo Rossii*, 2010, 1: 19-20.
9. Roiter Ya.S. *Ptitsevodstvo*, 2007, 6: 2-4.
10. Golubev A.K., Balukova V. *Nasledstvennost' i izmenchivost' sel'skokhozyaistvennoi ptitsy* [Heredity and variability in poultry]. Moscow, 1966: 7-21.
11. Gromov A.M., Feoktistov P.I. *Izmenenie nasledstvennosti u kur perelivaniem krovi* [Change of heredity in hens by blood transfusion]. Moscow, 1957.
12. Sopikov P.M. *Somaticheskaya gibridizatsiya kletok i potomstvo zhitovnykh (nauch. tr. Leningradskogo veterinarnogo instituta)* [Somatic cell hybridization and progeny in animals. Vol. 58]. Leningrad, 1978, tom 54: 91-98.
13. Gromov A., Guseva N., Vorontsova T., Andreeva G. *Ptitsevodstvo*, 1974, 2: 25-26.
14. Popov I.I., Paronyan I.A., Yurchenko O.P., Vakhrameev A.B. *Materialy XVII Mezhdunarodnoi konferentsii Rossiiskogo otdeleniya Vsemirnoi nauchnoi assotsiatsii po ptitsevodstvu «Innovatsionnye razrabotki i ikh osvoenie v promyshlennom ptitsevodstve»* [Innovations and their application in poultry industry (Proc. XVII Int. Conf. of Russian Branch of World's Poultry Science Association)]. Sergiev Posad, 2012: 91-93.
15. Penionzhkevich E.E. *Ptitsevodstvo*, 1963, 12: 11-14.
16. Roiter Ya.S., Guseva N.K., Konopleva A.P. *Materialy konferentsii «Orientirovannyye fundamental'nye issledovaniya i ikh realizatsiya v APK Rossii»* [Targeted fundamental research and implementation in russian agro-industrial complex (Proc. Conf.)]. Sergiev Posad, 2009: 136-139.
17. Moiseeva I.G., Avrutskaya T.B., Romanov M.N. *Materialy XVII Mezhdunarodnoi konferentsii Rossiiskogo otdeleniya Vsemirnoi nauchnoi assotsiatsii po ptitsevodstvu «Innovatsionnye razrabotki i ikh osvoenie v promyshlennom ptitsevodstve»* [Innovations and their application in poultry industry (Proc. XVII Int. Conf. of Russian Branch of World's Poultry Science Association)]. Sergiev Posad, 2012: 85-88.
18. Serebrovskii A.S. *Trudy Anikovskoi geneticheskoi stantsii narkomzema RSFSR*. Moscow, 1926: 3-74.
19. Karpenko L.S. *Ekonomicheskie i tekhnologicheskie aspekty promyshlennogo ptitsevodstva (nauch. tr. VNITIP)* [Economics and technology of industrial poultry]. Zagorsk, 1991: 145-152.
20. Shakhnova L. *Ptitsevodstvo*, 1991, 4: 24-26.
21. Khatt F.B. *Genetika zhitovnykh* [Animal genetics]. Moscow, 1969.
22. Egorova A.V., Ustinova E.S., Gofman A.Yu. *Materialy XVI konferentsii Rossiiskogo otdeleniya Vsemirnoi nauchnoi assotsiatsii po ptitsevodstvu «Dostizheniya v sovremennom ptitsevodstve. Issledovaniya i innovatsii»* [Progress in modern poultry. Research and INNOVATIONS (Proc. XVI Conf. of Russian Branch of World's Poultry Science Association)]. Sergiev Posad, 2009: 24-27.

23. Zlochevskaya K.V., Ustinova E.S., Gofman A.Yu. *Materialy 1-i Mezhdunarodnoi konferentsii-vystavki «Ptitsevodstvo-2000»* [Poultry 2000 (Proc. 1st Int. Conf.)]. Moscow, 2000: 82.
24. Marzanov N.S., Devrishov D.A., Marzanova S.N., Komkova E.A., Ozerov M.Yu., Kantanen Yu. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2011, 2: 3-14.
25. Fisinin V.I., Gladyr' E.A., Volkova V.V., Sevast'yanova A.A., Zinov'eva N.A. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh*, 2011, 1: 68-72.
26. Fisinin V.I. *Ptitsevodstvo Rossii — strategiya innovatsionnogo razvitiya* [Poultry in Russia: Strategy of innovations]. Moscow, 2009.
27. Gordeeva T.I. *Materialy XVII Mezhdunarodnoi konferentsii Rossiiskogo otdeleniya Vsemirnoi nauchnoi assotsiatsii po ptitsevodstvu «Innovatsionnye razrabotki i ikh osvoenie v promyshlennom ptitsevodstve»* [Innovations and their application in poultry industry (Proc. XVII Int. Conf. of Russian Branch of World's Poultry Science Association)]. Sergiev Posad, 2012: 51-55.
28. Korshunova L.G., Karapetyan R.V. *Doklady Rossel'khozakademii*, 2011, 6: 43-45.
29. Freeman B.M., Bumstead N. Transgenic poultry: theory and practice. *World's Poultry Science Journal*, 1987, 43(3): 180-189.
30. Bosselman R.A., Hsu R.Y., Boggs T., Hu S., Bruszewski J., Ou S., Kozar L., Martin F., Green C., Jacobsen F. et al. Germline transmission of exogenous genes in the chicken. *Science*, 1989, 243(4890): 533-535.
31. Crittenden L.B. Retroviral elements in the genome of the chicken: implications for poultry genetics and breeding. *Crit. Rev. Poultry Biol.*, 1991, 3: 73-109.
32. Salter D.W., Smith E.J., Hughes S.H., Wright S.E., Fadly A.M., Witter R.L., Crittenden L.B. Gene insertion into the chicken germ line by retroviruses. *Poult. Sci.*, 1986, 65(8): 1445-1458.
33. Crittenden L.B., Salter D.W. A transgene, *alb6*, that expresses the envelope of subgroup A avian leukosis virus reduces the rate of congenital transmission of a field strain of avian leukosis virus. *Poult. Sci.*, 1992, 71(5): 799-806.
34. Petropoulos C.J., Payne W., Salter D.W., Hughes S.H. Appropriate in vivo expression of a muscle-specific promoter by using avian retroviral vectors for gene transfer (corrected). *J. Virol.*, 1992, 66(6): 3391-3397.
35. Volkova N.A., Tomgorova E.K., Bagirov V.A., Beloglazov D.V., Zinov'eva N.A., Volkova L.A., Ernst L.K. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2009, 6: 44-48.
36. Brazolot C.L., Petite J.N., Etches R.J., Verrinder Gibbins A.M. Efficient transfection of chicken cells by lipofection, and introduction of transfected blastodermal cells into the embryo. *Mol. Reprod. Dev.*, 1991, 30(4): 304-312.
37. Petite J.N., Clark M.E., Liu G., Verrinder Gibbins A.M., Etches R.J. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development*, 1990, 108(1): 185-189.
38. Naito M., Kuwana T. Production of chimeric chickens. *Methods Mol. Biol.*, 2004, 254: 245-254.
39. Etches R.J. Transgenic chickens. *Proc. 10th European Poultry Conference «The poultry industry towards the 21st century»*. Jerusalem, Israel, 1998, v. 1: 3-6.
40. Fire A. Nucleic acid structure and intracellular immunity: some recent ideas from the world of RNAi. *Q Rev. Biophys.*, 2005, 38(4): 303-309.
41. Mello C.C., Conte D., Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature*, 2004, 431(7006): 338-342.
42. Parrish S., Fleenor J., Xu S., Mello C., Fire A. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol. Cell*, 2000, 6(5): 1077-1087.
43. Shikhov I.Ya. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2009, 4: 3-12.
44. Suraeva N.M., Karapetyan R.V., Baryshnikov A.Yu. *Materialy IV Mezhdunarodnoi konferentsii, posvyashchenoi 100-letiyu so dnya rozhdeniya akademika N.A. Shmanenkova «Aktual'nye problemy biologii v zhivotnovodstve»* [Actual problems of biology in animal husbandry (Proc. IV Int. Conf. dedicated to 100th Anniversary of N.A. Shmanenkov)]. Borovsk, 2006: 276-277.
45. Suraeva N.M., Baryshnikov A.Yu., Fisinin V.I., Prokofev M.I. *Izvestiya RAN*, 2008, 1: 18-23.
46. Leighton P.A., Van de Lavoie M.C., Diamond J.H., Xia C., Etches R.J. Genetic modification of primordial germ cells by gene trapping, gene targeting, and phiC31 integrase. *Mol. Reprod. Dev.*, 2008, 75(7): 1163-1175.
47. Brackett B.G., Baranska W., Sawicki W., Koprowski H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *PNAS USA*, 1971, 68(2): 353-357.
48. Lavitrano M., Camaioni A., Fazio V.M., Dolci S., Farace M.G., Spadafora C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*, 1989, 57(5): 717-723.
49. Gandolfi F. Sperm-mediated transgenesis. *Theriogenology*, 2000, 53(1): 127-137.
50. Nakanishi A., Iritani A. Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods. *Mol. Reprod.*

- Dev., 1993, 36(2): 258-261.
51. Shemesh M., Gurevich M., Harel-Markowitz E., Benvenisti L., Shore L.S., Stram Y. Gene integration into bovine sperm genome and its expression in transgenic offspring. *Mol. Reprod. Dev.*, 2000, 56(2 Suppl.): 306-308.
  52. Karapetyan R.V., Korshunova L.G., Fisinin V.I. *Materialy konferentsii «Orientirovannye fundamental'nye issledovaniya i ikh realizatsiya v APK Rossii»* [Targeted fundamental research and implementation in Russian agro-industrial complex (Proc. Conf.)]. St. Petersburg, 2008: 55-56.
  53. Fisinin V.I., Karapetyan R.V., Korshunova L.G. *Materialy XVI konferentsii Rossiiskogo otdeleniya Vsemirnoi nauchnoi assotsiatsii po ptitsevodstvu «Dostizheniya v sovremennom ptitsevodstve. Issledovaniya i innovatsii»* [Progress in modern poultry. Research and innovations (Proc. XVI Conf. of Russian Branch of World's Poultry Science Association)]. Sergiev Posad, 2009: 67-68.
  54. Beloglazova E.V., Kotova T.O., Volkova N.A., Volkova L.A., Zinov'eva N.A., Ernst L.K. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2011, 6: 60-64.
  55. Mather C. Transgenic chicken by DNA microinjection. *Poultry International*, 1994, 33(6): 16-18.
  56. Perry M.M. A complete culture system for the chick embryo. *Nature*, 1988, 331(6151): 70-72.
  57. Ellendorff F., Gulyas N., Muhlbauer E., Klein S. Potential use of molecular sex recognition in layer birds. *Proc. XX World's Poultry Congress*. India, New Delhi, 1996, v. 4: 3-4.
  58. Ernst L.K., Fisinin V.I., Zhuravlev I.V., Karapetyan R.V., Matveenko N.P., Ziadinova O.F., Kudryavtsev I.V., Kuzin B.A., Enikolopov G.N. *Sposob transplantatsii kurinoy yaitsekletki*. Pat. 1565025 SU № 4396482. Zayavl. 23.03.88. Opubl. 15.01.90. Byul. № 18. [Method for hen ovum transplantation (Patent 1565025 SU № 4396482. Application 23.03.88. Published 15.01.90. Bulletin № 18)].
  59. Fisinin V.I., Ernst L.K., Karapetyan R.V., Matveenko N.P., Ziadinova O.F., Zazykina T.V. *Sposob polucheniya transgennoi ptitsy* [Method for transgenesis in poultry Pat. 1550652 RU № 4475436. Zayavl. 17.08.88. Opubl. 23.07.93. Byul. № 10 (Patent 1550652 RU № 4475436. Application 17.08.88. Published 23.07.93. Bulletin № 10)].
  60. Fisinin V.I., Ernst L.K., Karapetyan R.V., Matveenko N.P., Ziadinova O.F., Enikolopov G.N., Kuzin B.A., Zazykina T.V. *Sposob transformatsii genoma ptitsy*. Pat. 2022014 RU № 4452202. Zayavl. 12.05.88. Opubl. 30.10.94. Byul. № 20 [Method for genome transformation in poultry (Patent 2022014 RU № 4452202. Application 12.05.88. Published 30.10.94. Bulletin № 20)].
  61. Novik I.E. *Biologiya razmnozheniya i iskusstvennoe osemnenie sel'skokhozyaistvennoi ptitsy* [Reproductive biology and artificial insemination in poultry]. Moscow, 1964.
  62. Karapetyan R.V. *Doklady RASKHN*, 1995, 4: 27-29.
  63. Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E., Jr., Wall R.J., Bolt D.J., Ebert K.M., Palmiter R.D., Brinster R.L. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 1985, 315(6021): 680-683.
  64. Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E., Trumbauer M.E., Rosenfeld M.G., Birnberg N.C., Evans R.M. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 1982, 300(5893): 611-615.
  65. Karapetyan R.V. *Doklady RASKHN*, 1996, 2: 19-20.
  66. Karapetyan R.V. *Materialy Mezhdunarodnogo simpoziuma «Molekulyarnaya genetika i biotekhnologiya v otsenke i izmenenii genomov sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh»* [Molecular genetics and biotechnology in livestock genome study and change (Proc. Int. Symp.)]. St. Petersburg—Pushkin, 1994: 17-18.
  67. Karapetyan R.V. *Sbornik nauchnykh trudov VNITIP (Sergiev Posad)*, 2000, tom 75: 84-95.
  68. Karapetyan R.V., Korshunova L.G., Andreeva L.E., Prokof'ev M.I., Fisinin V.I. *Tezisy doklady konferentsii «Aktual'nye problemy biotekhnologii v rastenievodstve, zhivotnovodstve i veterinarii»* [Actual problems of biotechnology in plant industry, animal husbandry and veterinary medicine (Proc. Conf.)]. Moscow, 1996: 35-35.
  69. Korshunova L.G., Karapetyan R.V. *Sbornik nauchnykh trudov VNITIP (Sergiev Posad)*, 2000, tom 75: 101-104.
  70. Fisinin V.I., Ernst L.K., Karapetyan R.V., Matveenko N.P., Zazykina T.V., Ziadinova O.F., Zhadanov A.B. *Sposob povysheniya yaichnoi produktivnosti ptitsy*. Pat. 2061366 RU № 93019970/15. Zayavl. 19.04.93. Opubl. 10.06.96. Byul. № 16 [Method to improve egg production in poultry (Patent 2061366 RU № 93019970/15. Application 19.04.93. Published 10.06.96. Bulletin № 16)].
  71. Korshunova L.G. *Ptitsa i ptitseprodukty*, 2009, 3: 50-51.
  72. Korshunova L.G. *Ptitsevodstvo*, 2009, 4: 35-36.
  73. Korshunova L.G. *Vestnik RASKHN*, 2009, 3: 72-73.
  74. Korshunova L.G. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2011, 2: 46-50.

75. Korshunova L.G., Karapetyan R.V. *Veterinariya*, 2009, 5: 15-16.
76. Korshunova L.G., Karapetyan R.V., Serikova V.A., Ziadinova O.F. *Sbornik nauchnykh trudov VNITIP (Sergiev Posad)*, 2000, t. 75: 96-100.
77. Suraeva N.M., SamoiloV A.V. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMN*, 2009, 20(4): 19-25.
78. Lillico S.G., Sherman A., McGrew M.J., Robertson C.D., Smith J., Haslam C., Barnard P., Radcliffe P.A., Mitrophanous K.A., Elliot E.A., Sang H.M. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *PNAS USA*, 2007, 104(6): 1771-1776.