

Литература

1. Хантер, Р. Х. Ф. Физиология и техника воспроизведения домашних животных / Р. Х. Ф. Хантер; пер. с англ. – М. : Колос, 1984. – 320 с.
2. Антонюк, В. С. Биотехнические способы повышения эффективности оплодотворения сельскохозяйственных животных / В. С. Антонюк. – Мн. : Ураджай, 1988. – 198 с.
3. Hancock, J. L. Insemination before and after the onset of heat of sows / J. L. Hancock, G. J. R. Novell // Anim. Prod. – 1972. – Vol. 4. – P. 91-96.
4. Burger, J. F. Sex physiology of pigs. Onderstepoort I / J. F. Burger // Vet. Res. – 1972. – Vol. 2. – P. 218.
5. Hunter, R. H. F. The effects of delayed insemination on fertilization and early cleavage in the pig / R. H. F. Hunter // J. Reprod. Fert. – 1987. – Vol. 13. – P. 133-147.
6. Boender, J. The development of AI in the Netherlands and the storage of boar semen / J. Boender // World Rev. Anim. Prod. – 1986. – Vol. 2, Special issue. – P. 29-44.
7. Thibault, C. Analyse comparee de la fecondation et de ses anomalies chez la brebis, la vache et la lahine / C. Thibault // Annals Biol. Anim. Biochim. Biophys. – 1987. – Vol. 7. – P. 5-23.

(поступила 5.02.2010 г.)

УДК 636.2.034:612.6.02

А.И. БУДЕВИЧ, В.Г. ЧАРТОРИЙСКИЙ, С.Н. ПАЙТЕРОВ,
И.Н. ШЕВЦОВ, Ю.К. КИРИКОВИЧ, Н.Л. ЗАРЕМБА, С.В. КОЗЛОВ,
И.И. БУДЕВИЧ, И.В. МИХЕДОВА, Е.В. ПЕТРУШКО,
Т.Н. ЛУКАШЕВИЧ, В.Н. КУЗНЕЦОВА

ОПЛОДОТВОРЯЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ СПЕРМЫ И ТРАНСМИССИЯ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК ПОТОМСТВУ ОТ ПЕРВИЧНЫХ ПО ГЕНУ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА КОЗЛОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству»

Введение. Открытия, сделанные в области молекулярной генетики, послужили началом для развития нового направления в биотехнологии – трансгенеза в животноводстве, целью которого является интеграция чужеродного гена в геном индивидуума для получения определенной, необходимой для человека в больших количествах, во многих случаях дефицитной продукции, зачастую несвойственной для данного вида животных.

Существует мнение [1], что направленная изменчивость при трансгенезе предопределяет новые взаимодействия генотипа и фенотипа с выделением других факторов, участвующих в различных биохимических, физиологических и иных процессах, происходящих в организме

и в ряде случаев откладывающих свой отпечаток на морфофункциональные признаки животного.

Так, по данным некоторых исследователей [2], получение трансгенных овец по гену химозина с конструкцией под альфа-S1-промотором привело к созданию стад животных, не имеющих какой-либо хозяйственной ценности вследствие гиполактии, непроходимости молочных альвеол и первичных протоков: под влиянием химозина происходит створаживание молока и переход ряда его составляющих в нерастворимую гелеобразную форму. Установлено [3], что рекомбинантный ген химозина, встроенный в геном овцы, способен передаваться по наследству и экспрессировать в молочной железе с выделением в молоко продукта экспрессии – прохимозина, при этом трансгенность не отражается на воспроизводительной функции животных, на росте и развитии потомства, как самцов, так и самок. По данным Юткина Е.В. [4], трансгенные бараны по гену химозина имели нормальные половые рефлексы, при естественном осеменении ими маток оплодотворяемость составила 71,2-82,4 %, а при искусственном – 43,1 %. Репродуктивная способность трансгенных овец была на уровне 81,5 %, нетрансгенных – 80,2 %. Передача трансгена потомству была установлена в 31,5-32,4 % случаев, при этом наследование чужеродной генной составляющей исследовано в трех поколениях животных.

Мага Е.А. et al. [5] при разведении трансгенных по человеческому лизоциму (конструкция α S1-HLZ) коз использовали естественное спаривание животных, при этом трансгенных коз осеменяли обычными самцами. Трансмиссия чужеродной ДНК у потомства составила 44 %, получено 52 % самок и 48 % самцов.

Ebert K.M. et al. [6] сообщили о создании двух первичных трансгенных коз (самка и самец) по гену тканевого плазминогенного активатора человека (WAP-LAtPA), который используется в медицине для рассасывания тромбов, особенно в коронарных артериях сердца. В 9-месячном возрасте самка была осеменена нетрансгенным козлом, после чего два родившиеся козленка оказались нетрансгенными, второе покрытие оказалось удачным: из трех козлят один был идентифицирован как носитель генной конструкции WAP-LAtPA. В то же время у первичного трансгенного самца была обнаружена аспермия и впоследствии диагностирована билатеральная киста на головке придатка семенника, что блокировало нормальный сперматогенез. Данный врожденный дефект довольно часто встречается у коз, поэтому неясно, вызвано ли это интеграцией трансгена.

В связи с вышеизложенным, целью исследований явилось изучение оплодотворяющей способности спермы и передачи чужеродной ДНК потомству от первичных по гену лактоферрина человека козлов-производителей.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в период 2008-2009 гг. в лаборатории воспроизводства и генной инженерии с.-х. животных РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» и в Биотехнологическом центре с опытным производством (д. Будагово) Минской области. В опытах использовались первичные трансгенные козлы-производители по гену лактоферрина человека (конструкции hLF3 и hLF5), полученные методом микроинъекции чужеродной ДНК в пронуклеус зиготы: Лак-1 и Лак-2.

Оценка свежеполученных эякулятов трансгенных козлов осуществлялась с применением биологического микроскопа Биолам-70 и микроскопа ZASILACZ-ZH-100 (Польша) по следующим показателям: объём эякулята (мл); подвижность спермиев – по 10-балльной шкале; концентрация спермиев (млрд./мл) при помощи счётной камеры Горяева по Левину К.П. (1984).

Контролем служила спермопродукция обычных производителей в возрасте 12 месяцев.

Для изучения оплодотворяющей способности спермы трансгенных козлов были сформированы 2 группы здоровых, проявляющих нормальную цикличность маток (опытная (n=109) и контрольная (n=72)). Контрольная группа животных осеменялась нетрансгенными производителями. Анализировались следующие общие показатели: оплодотворяемость маток (%), количество абортос (%), рождение приплода (%).

При изучении трансмиссии трансгена потомству от Лака-1 и Лака-2 учитывались показатели: оплодотворяемость коз (%), продолжительность беременности (дн.), наличие трудных козлений (%), многоплодие (%), выход козлят, в том числе самцов и самок (%) и выход трансгенного потомства, в том числе самцов и самок (%).

Выявление в охоте животных осуществлялась с помощью вазоэктомированных козлов, осеменение коз в спонтанной охоте контрольной и опытных групп проводилось с использованием естественной случки, а также методом искусственного осеменения свежеполученной и заморожено-оттаянной спермы катетерами «IMV» (Франция).

Кормление и содержание животных осуществлялось согласно нормам кормления ВАСХНИЛ (1985).

Полученные данные были обработаны биометрически с помощью программы Excel.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Своевременное проявление половых рефлексов у первичных трансгенных производителей позволило изучить показатели их спермопродукции (таблица 1) и идентифицировать наличие встроенной генной конструкции по лактоферрину человека в их сперме.

Таблица 1 – Основные показатели спермопродукции первичных трансгенных козлов-производителей

Козлы-производители, возраст	Количество исследованных эякулятов, n	Объем эякулята, мл	Подвижность, балл	Концентрация спермиев, млрд./мл
Трансгенные (n=2), 12 мес.	12	0,98±0,03	6,08±0,08	2,61±0,05
Нетрансгенные (n=2), 12 мес.	11	0,93±0,10	6,11±0,14	2,55±0,04

Из данных таблицы видно, что по объему эякулята трансгенные и обычные производители в 12-месячном возрасте практически не отличались друг от друга (0,98 и 0,93 мл, соответственно). Не установлено также существенных различий по подвижности сперматозоидов и их концентрации в зависимости от возраста производителей и их принадлежности. Таким образом, конструкция по гену лактоферрина человека не оказывает отрицательного влияния на сперматогенез в репродуктивной системе козлов.

С целью начала создания стада трансгенных животных трансгенные производители Лак-1 и Лак-2 использованы для осеменения обычных коз, при этом учитывались показатели оплодотворяемости животных и выхода приплода (таблица 2). Для сравнения контрольная группа животных была покрыта нетрансгенными козлами.

Таблица 2 – Оплодотворяемость коз, осемененных спермой трансгенных козлов-производителей, и выход приплода

Группы животных	Осеменено коз, n	Из них:		Окозилось маток, n-%	Кол-во аборт-ов, n-%	Получено приплода всего, n	Из них	
		Оплодотворилось, n-%	Не оплодотворилось, n-%				живые, n-%	мертворожденные, n-%
Опыт	109	78-71,6	31-28,4	76-97,4	2-2,6	142	138-97,2	4-2,8
Контроль	72	61-84,7	11-15,3	58-95,1	3-4,9	117	114-97,4	3-2,6

* - от числа оплодотворенных коз

Осеменение спермой трансгенных производителей обычных самок (n=109) привело к получению 71,6 % фертильности коз (n=78) (после первого осеменения стали беременными 61,5 % животных (n=67), после второго – 10,1 % (n=11) – данные в таблице не приводятся), 28,4 % (n=31) самок не оплодотворилось. Более высокая оплодотворяемость

(на 13,1 %) животных контрольной группы объясняется использованием естественной случки, в то время как в опытной группе животных применялись методы искусственного и естественного осеменения нативной и заморожено-оттаянной спермой. Не отмечено различий между группами по количеству околотившихся маток и количеству рожденного живого приплода. Данный факт свидетельствует о высокой оплодотворяющей способности спермы трансгенных козлов, нормально развивающейся и протекающей беременности у животных, что приводит к получению здоровых козлят без выявленных каких-либо аномалий в развитии.

Таблица 3 демонстрирует результаты трансмиссии трансгена приплоду в зависимости от первичного производителя.

Из данных таблицы видно, что показатель оплодотворяемости коз был на 17,2 % выше при осеменении первичным производителем Лак-1. Трансмиссия рекомбинантной ДНК по гену лактоферрина потомству составила 30,6 и 22,7 % при использовании Лака-1 и Лака-2, соответственно, средний показатель передачи трансгена – 26,8 %. Следует отметить, что если от Лака-1 количество родившихся самок и самцов оказалось практически равным (45,5 и 54,5 %), то от Лака-2 данный показатель был диспропорционален (20,0 и 80,0 %, соответственно). В итоге общее число полученного приплода, разделенного по половому признаку, составило 35,1 и 64,9 %, соответственно.

Таблица 3 – Трансмиссия трансгена приплоду F₁ от производителей Лака-1 и Лака-2

Трансгенные производители	Осеменено коз, п- %	*Оплодотворилось коз, п- %	Получено живых козлят, п- %	**Получено трансгенных козлят всего, п- %	***Из них:	
					Самки, п- %	Самцы, п- %
Лак-1	44-40,4	36-81,8	72-52,2	22-30,6	10-45,5	12-54,5
Лак-2	65-59,6	42-64,6	66-47,8	15-22,7	3-20,0	12-80,0
Итого	109-100,0	78-71,6	138-100,0	37-26,8	13-35,1	24-64,9

* - от числа осемененных животных, ** - от числа полученных живых козлят, *** - от числа полученных трансгенных козлят

В таблице 4 приведены данные по некоторым показателям воспроизводства, характеризующим в сравнительном аспекте коз, осемененных спермой трансгенных (опытная группа животных) и обычных производителей.

Данные таблицы свидетельствуют об отсутствии различий между группами животных по количеству дней беременности. Так, в опыте данный показатель составил 148,51 дня, в контроле – 149,34 дня. Не установлено также существенных различий по количеству трудных козлений и многоплодию коз. Таким образом, не отмечено влияния

трансгена на продолжительность беременности у животных, ее течение, наличие родовых и послеродовых осложнений у коз, а также на многоплодное рождение у маток, покрытых трансгенными производителями.

Таблица 4 – Продолжительность беременности, наличие трудных козлений и многоплодие у самок, осемененных трансгенной спермой

Группы животных	Окозилось маток, п	Кол-во дней беременности, п	*Кол-во трудных козлений, п- %	*Многоплодие маток		
				Одн-цы, п- %	Двой-ни, п- %	Трой-ни, п- %
Опыт	76	148,51±0,27	4-5,3	21-27,6	43-56,6	12-15,8
Контроль	58	149,34±0,72	2-3,4	15-25,9	31-53,4	12-20,6

* - от числа окозлившихся маток

Заключение. 1. Установлено, что первичные трансгенные козлы обладают выраженными половыми рефлексам, отчетливо проявляющимися в случной период года, а устойчиво функционирующая репродуктивная система с нормально протекающим сперматогенезом позволяет планомерно использовать производителей для создания стад трансгенных животных. По объему эякулята трансгенные и обычные козлы в 12-месячном возрасте практически не отличались друг от друга (0,98 и 0,93 мл, соответственно). Не установлено также существенных различий по показателям подвижности сперматозоидов и их концентрации в свежеполученных эякулятах (6,08 балла и 2,61 млрд./мл, 6,11 баллов и 2,55 млрд./мл, соответственно).

2. Выявлено, что сперма первичных трансгенных производителей обладает высокой оплодотворяющей способностью (71,6 %). Не отмечено различий между опытной и контрольной группами коз по числу нормально окозлившихся маток (97,4 против 95,1 %), количественному показателю живого приплода (97,2 против 97,4 %) и числу аборт (2,6 против 4,9 %). Продолжительность беременности у животных, осемененных спермой трансгенных козлов, составила 148,51 дня, а в контроле – 149,34 дня. Не установлено также существенных различий между группами по количеству трудных козлений и многоплодию коз. Нормально развивающаяся и протекающая беременность у животных, осемененных спермой трансгенов, приводит к получению здоровых козлят без каких-либо видимых аномалий в их развитии.

3. Установлено, что средний показатель передачи гена по лактоферрину человека потомству был на уровне 26,8 %, при этом от Лака-1 трансмиссия рекомбинантной ДНК приплоду составила 30,6 %, а от Лака-2 – 22,7 %. Следует отметить диспропорциональность в рождении самок и самцов от Лака-2 – 20,0 и 80,0 %, соответственно, при этом от Лака-1 количество родившегося приплода, разделенного по половому признаку, оказалось практически равным (45,5 и 54,5 %, соответственно).

Литература

1. Эрнст, Л. Использование биотехнологии в практике животноводства / Л. Эрнст // Главный зоотехник. – 2008. – № 2. – С. 19-21.
2. Шихов, И. Я. Структурные изменения в молочной железе трансгенных по химозину овец / И. Я. Шихов // ДНК-технологии в клеточной инженерии и маркировании признаков сельскохозяйственных животных : сб. тр. Междунар. конф. (ВИЖ, 12 нояб. 2001 г.). – Дубровицы, 2001. – С. 98-100.
3. Калмыков, С. П. Биологические и продуктивные особенности овец, трансгенных по гену химозина : автореф. дисс. ... канд. биол. наук : 03. 00. 023 / Калмыков С.П. – Горки Ленинские, 2008. – 22 с.
4. Юткин, Е. В. Получение трансгенных коз и изучение фенотипических показателей у трансгенных овец с геном α_1 -казеин- химозина : автореф. дисс. ... канд. биол. наук : 03.00.023 / Юткин Е.В. – Горки Ленинские, 1999. – 29 с.
5. Production and processing of milk from transgenic goat expressing human lysozyme in the mammary gland / E. A. Maga [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2006. – Vol. 89. – P. 518-524.
6. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goat and analysis of expression / K. M. Ebert [et al.] // Biotechnol. – 1991. – Vol. 9. – P. 835-838.

(поступила 16.03.2010 г.)

УДК 636.2.034.612.602

А.И. ГАНДЖА¹, Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ¹, В.П. СИМОНЕНКО¹,
Е.С. ЛОБАНОК², В.П. НИКОЛЬСКАЯ²

СОХРАННОСТЬ И МЕТАБОЛИЗМ ДЕКОНСЕРВИРОВАННЫХ ООЦИТОВ И РАННИХ ЗАРОДЫШЕЙ КОРОВ

¹РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству»

²ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной
академии наук Беларуси»

Введение. Крיוконсервация гамет и эмбрионов при низких температурах (-196°C) является основным методом сохранения генетическо-