



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования

«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
ГИДРОМЕТЕОРОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра водных биоресурсов, аквакультуры и гидрохимии

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Бакалаврская работа

На тему: Проблемы создания и использования генно-модифицированных  
объектов декоративного рыбоводства на примере рыб семейств карповых  
(*Cyprinidae*) и харациновых (*Characidae*)

Исполнитель: Соловьева Елена Андреевна

Руководитель: доцент, к. т. н. Королькова Светлана Витальевна

«К защите допускаю»

Заведующий кафедрой

(Подпись)

к.т.н., доц. Королькова Светлана Витальевна

«09» 11/01/2022 г.

Санкт – Петербург

2022

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1	6
БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕМЕЙСТВ	6
Карповые ( <i>Cyprinidae</i> )	6
Харациновые ( <i>Characidae</i> )	7
ГЛАВА 2	10
АКВАРИУМИСТИКА И ДЕКОРАТИВНОЕ РЫБОВОДСТВО	10
ИСТОРИЯ ПОЯВЛЕНИЯ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ	
ОБЪЕКТОВ В РЫБОВОДСТВЕ	14
РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ	
ДЕКОРАТИВНЫХ РЫБ	17
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГМО ДЕКОРАТИВНОГО РЫБОВОДСТВА В	
НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ	21
ГЛАВА 3	27
МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ РЫБ	27
Микроинъекции	29
Электропорация	33
Ретровирусные векторы	35
Встраивание ДНК с использованием транспозонов	37
Перенос генов через сперму	38
Система культивирования клеток	38
Ксеногенез	39
ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ В	
АКВАКУЛЬТУРЕ	39
Ген гормона роста (ГР)	41
Антифризный протеин (АФП)	41
ПЕРЕНОС ГЕНОВ В ПОКОЛЕНИЯХ	42
РИСКИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ТРАНСГЕННЫХ РЫБ	43
	1

ЭТИЧЕСКАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГМО	45
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	50
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	52
ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИЙ СЛОВАРЬ	57

## ВВЕДЕНИЕ

Генетика сравнительно молодая наука, которая сегодня ввиду своей сложности слабо распространена. Однако некоторые темы периодически попадают в информационное поле.

Генно-модифицированные объекты сегодня являются популярной темой для обсуждения, это связано с распространением разнообразных данных в научных кругах, средствах массовой информации, обыденной жизни. Внедрение посторонних генов сегодня проводят на разных группах организмов – бактериях, растениях, животных. Для данных манипуляций используются различные современные генно-инженерные технологии. Введение чужеродных генов в растительную или животную клетку или трансгенез – это сложный многоэтапный процесс, основанный на генно-инженерных процессах при участии отдельных ферментов, клеточных систем, бактерий и вирусов.

Распространение использования генетически-модифицированных организмов связано с их потенциальной возможностью решить современные проблемы человечества – продовольственную, медицинскую и т.д. Но сегодняшние работы сталкиваются с рядом трудностей, в том числе несовершенством технического обеспечения, что может привести к ряду рисков в процессе использования генно-модифицированных объектов.

Особое место в развитии данного направления занимают гидробионты, в частности рыбы. Отчасти это связано с современным состоянием рыболовства, которое последние годы остается примерно на одном уровне. Растущий спрос на морские белки, вероятно, будет обеспечиваться аквакультурой. Благодаря работе генной инженерии можно адаптировать виды рыб для экономически эффективного производства в аквакультуре либо отдельно, либо в сочетании с традиционными методами селекции. [22]

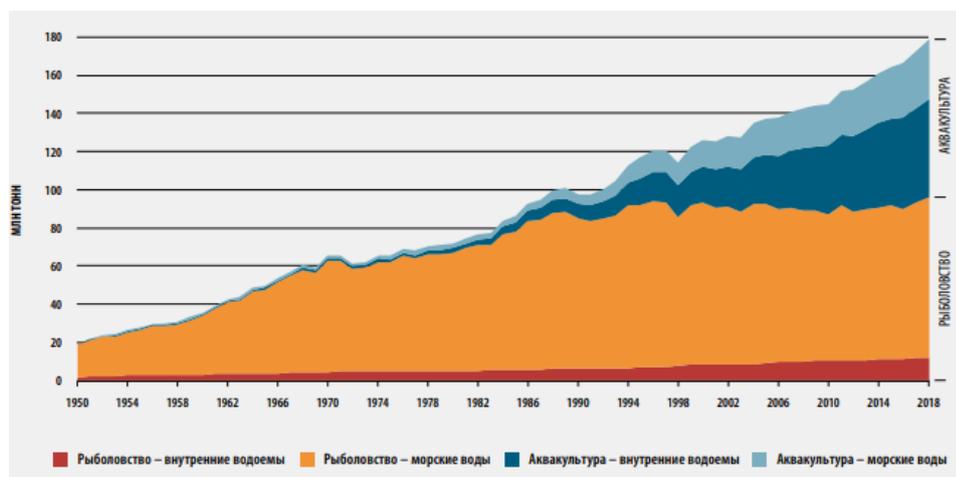


Рис. 1 Продукция мирового промышленного рыболовства и аквакультуры. [15]

Проблема экспериментального использования аквакультурных видов заключается в их длительном росте и более позднем созревании, в свою очередь маленькие аквариумные рыбки становятся половозрелыми уже в 5-6 месяцев, при создании более благоприятных условий это может происходить раньше, что делает их успешными модельными объектами.

Среда обитания рыб делает их также полезными объектами для мониторинга состояния водоемов, состояние которых можно анализировать без применения специального технологического оборудования.

Кроме исследовательской работы генно-модифицированные рыбки стали популярными среди любителей аквариумистов. Сейчас можно встретить большее количество людей, которые готовы приобрести для себя ярких необычных флюоресцирующих рыбок.

Актуальность этой работы обосновывается возрастающим интересом среди покупателей на данные организмы, так они позволяют разнообразить аквариумы, а также повышением уровня их популярности в научной деятельности в качестве модельных объектов.

**Цель работы:** изучить области применения и методы создания генно-модифицированных декоративных рыб семейств карповых и харациновых.

Для достижения поставленной цели необходимо выполнить следующие задачи:

1. Рассмотреть биологическую характеристику представляемых семейств;
2. Изучить историю появления генно-модифицированных рыб;
3. Рассмотреть примеры использования представленных объектах и связанные с ними проблемы;
4. Рассмотреть методики создания генно-модифицированных рыб и связанные с ними проблемы;
5. Изучить аспект рисков, связанных с генно-модифицированными рыбами;
6. Рассмотреть этичность создания ГМО.

Объектом исследования являются генно-модифицированные представители семейств карповых и харациновых.

Предметом исследования являются проблемы создания и использования генно-модифицированных рыб.

Структура дипломной работы: выпускная квалификационная работа представлена на 63 страницах, состоит из введения, 3 глав, заключения, списка литературы в количестве 40 источников, терминологического словаря.

# ГЛАВА 1

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕМЕЙСТВ

### Карповые (*Cyprinidae*)

Семейство Карповые относится к отряду Карпообразных (*Cypriniformes*). Это семейство является самым богатым в отношении видового состава. Его представители обитают в широких географических диапазонах, населяя пресные и солоноватые воды нашей планеты: Африка (за исключением острова Мадагаскар), Азия, Северная Америка, Европа. Наиболее богатая группа представлена в Южной Азии и тропической части Африки. Отсутствуют в Австралии и Южной Америке.

Предположительно центром возникновения карповых считается современная территория Азии, в частности полуостров Индостан.

Представители семейства обитают зачастую в теплых водах, однако могут проживать и холодных реках, протекающих среди тающего снега. Гидрохимические и гидрологические показатели воды также индивидуальны для каждого вида и могут кардинально отличаться. [14]

В части декоративной аквариумистики карповые являются популярными обитателями аквариумов - рыбы рода барбусы (*Barbus*), рода расбора (*Rasbora*), вид золотая рыбка или китайский карась (*Carassius auratus*), рода данио (*Danio*). Вид Данио-рерио (*Danio rerio*) из последнего представленного рода является популярным модельным организмом. Первоначально их применяли для изучения эмбрионального развития и функций генов позвоночных, сегодня спектр использования их как модельных организмов представлен в различных сферах от экологической до медицинской. [21]

#### Характеристика Данио-рерио

Длина рыбки в среднем составляет 3-6 см. Тело веретеновидное, удлиненное, сплющенное с боков. Основная окраска серебристая, по бокам располагаются ярко-синие полосы вдоль тела. Полосы проходят от

жаберных крышек до хвостового плавника. Хвостовой и анальный плавники - полосатые, остальные прозрачные, иногда могут быть окрашены желтоватыми полосками. У молодых рыбок плавники короткие, со временем они отрастают и могут образовывать вуаль.

Рот имеет верхнее строение, на каждой губе имеется по небольшой паре усов, которые плотно прижаты. Глаза расположены в центре головы, на одном уровне с боковой линией.

Половой диморфизм выражен слабо: у самок брюшко толще, они полнее самцов и имеют менее развитые плавники, самцы отличаются более удлиненным телом. Полового созревания достигают в возрасте 6 месяцев.

Ареал обитания - реки и ручьи Пакистана, Индии, Бангладеш, Непала, Мьянмы и Бутана.

Условия необходимые для жизнедеятельности данио-рерио: температура воды 18 - 26°C, кислотность (pH) 6,0 - 7,5, общая жесткость воды (gH) 5 - 20. [34]



Рис. 2. Данио-рерио [36]

#### Харациновые (*Characidae*)

Семейство Харациновые или Хараксовые относится к отряду Харацинообразные (*Characiformes*). Его отличает большое разнообразие форм и видов, включая такие потенциально опасные как пираньи (*Serrasalmus*) (могут выделять в отдельное семейство - *Serrasalmidae*) или

слепые пещерные виды рыб из Мексики и Бразилии (*Stygichthys typhlops*). На данный момент систематическое положение семейства не оформилось окончательно. Сегодня говорят о том, что харациновые представлены 165 родами и около 962 видами.

Встречаются в пресных водоемах юго-запада штата Техас (США), Мексики, Центральной и Южной Америки. [13]

Наиболее ранние остатки харациновых относят к миоцену, раскопки производились в Перу. Предполагается, что центром возникновения является современная территория Центральной Америки.

Морфологически группа разнообразна. Встречаются особи от 1 см до 45 см. Крупные виды являются промысловыми. Особенностью представителей данного семейства является наличие жирового плавника, однако он имеется не у всех рыб. [38]

Преимущественно это небольшие стайные рыбы, благодаря чему они стали популярными среди аквариумистов. На данный момент наиболее известными являются такие обитатели аквариумов, как рыбки тетры, голубые неоны (*Paracheirodon innesi*), пирании Наттерери (*Pugocentrus nattereri*).

#### Характеристика Тернеций

Среди харациновых наибольшей популярностью пользуется тернеция или черная тетра (*Gymnocorymbus ternetzi*). Длина тела составляет 3-5 см. Имеет плоское тело, естественная окраска темно-серебристая, поперек тела располагаются три черные полосы, одна из которых проходит через глаз. От третьей полосы начинается так называемая “юбочка” - переход к темному цвету; спинной, жировой, анальный плавники черного цвета; грудные, хвостовой, брюшные плавники обычно прозрачные. Благодаря работе селекционеров сейчас встречается большое количество разнообразных окрасок. Встречаются особи с вуалевой формой хвостового плавника.

Самцы и самки отличаются размером - самцы меньше, а также имеют более заостренный спинной плавник.

Ареал обитания - реки Бразилии, Парагвая.

В аквариумах этих рыб содержат стайками по 5-6 особей. Они имеют миролюбивый характер, возможно подселить к другим стайным рыбкам. Когда рыба находится в одиночестве, может становиться агрессивной. Так как тернеция может обкусывать плавники другим рыбам, ее не рекомендуют размещать с рыбами с большими плавниками.

Оптимальная температура для содержания 22-25°C, pH 6-7, жесткость воды 5—10 °dGH. Подходящий объем аквариума от 15-18 литров, лучше около 50, чтобы у рыб была возможность активно проводить время. Желательна установка аэратора. [35]



Рис. 3. Тернеция. [37]

## ГЛАВА 2

### АКВАРИУМИСТИКА И ДЕКОРАТИВНОЕ РЫБОВОДСТВО

Аквариумистика - деятельность, связанная с созданием и представлением части экосистемы естественного водоема, которая демонстрируется в искусственной закрытой системе. Под закрытой системой имеется в виду аквариум, то есть копия водоема, жизнь в котором протекает по тем же биологическим законам. [12]

Благодаря аквариумам можно наблюдать за жизнью и развитием животных и растений водных экосистем. Также аквариум является инструментом хозяйственного значения, так как в нем проводятся исследования заболеваний промысловых видов рыб и предварительное наблюдение по деятельности, связанной с акклиматизационными работами. [11]

История аквариумистика начинается задолго до нашей эры. Первыми аквариумистами считаются египтяне и китайцы. В Древнем Египте, например, было принято вырывать специальные пруды, где разводили тилипию, которая являлась тотемным животным. Китай стал первым регионом, где рыбу содержали не в водоеме, а в специальных сосудах. Древнеримские и древнегреческие ученые, такие как Цицерон, Аристотель, Сенека описывали в своих работах пруды с проточной водой, которые носили название писцины, также ими были описаны несколько разновидностей рыб.

Однако большой вклад в изучение и развитие аквариумистики внесли китайцы: они первые начали заниматься селекцией с точки зрения научного подхода. В буддистских монастырях появились первые золотые рыбки, яркая окраска которых была результатом мутации от серебряного карася.

Повсеместное увлечение аквариумистикой в Европе началось в эпоху Возрождения после завоза с территории Китая золотых рыбок.

Также развитие во многом связано с длительными путешествиями на Восток и в Новый свет, где были исследованы и описаны флора и фауна мест недоступных ранее европейцам. Одними из популяризаторов аквариумистики того времени стали Георг Маркграф и Виллем Пизон, которые опубликовали “Натуралистическую историю Бразилии”, где были описаны 87 видов рыб, обитающих в Амазонке. [10]

Первым руководством по аквариумистике можно считать книгу Иоганна Маттеуса Бехштейна - “Природная история домашних животных” (Johann Matthäus Bechstein - “Naturgeschichte der Stubenthier”), опубликованную в 1797 году. Одной из тем является описание содержания в неволе вьюна и золотой рыбки. [19]

В XIX веке был придуман аквариум в том виде, который мы сейчас знаем. Жанна Вильпрё-Пауэр создала клетку “а-ля Пауэр” в 1834 году. Впоследствии в 1841 году Натаниэль Вард, проводивший в подобных сосудах эксперимент по выращиванию растений, поместил в нем золотых рыб совместно с валлиснерией. Таким образом сформировался современный вид аквариума, как стеклянный сосуд с водой для содержания в нем растений и животных.

Первая экспозиция рыб открылась в Лондонском зоопарке в 1849 году, ее устройством занимался Филипп Генри Госсе (Philip Henry Gosse). Немного позже один за другим открылись павильоны в Нью-Йорке, Бостоне, Вене, Париже, Берлине и Франкфурте-на-Майне.

Спустя 20 лет любительской аквариум стал набирать популярность в России. Впервые аквариумные рыбки появились в Москве во второй половине XVII века; ваза с золотыми рыбками была подарена англичанами царю Алексею Михайловичу. В 1863 году была открыта выставка с аквариумными рыбками в Москве, ее посетило около 20 тысяч человек. [10]

Термин “аквариум” был введен в 1853 году Эмилом Адольфом Росмеслером (Emil Adolf Rossmuessler) и Филиппом Госсе. Первая полноценная книга, посвященная уходу за аквариумом, вышла в 1854 году - “Аквариум” (по др. источникам — “Аквариум, или Открытые чудеса глубин”). Ее автором был профессор Филипп Госсе, который работал в Эдинбургском университете. [10]

В 1867 году в Петербурге вышла первая отечественная книга по аквариумистике. Ее автором был Павел Матвеевич Ольхин, и она называлась “Чудеса вод в комнате. Комнатный аквариум и его обитатели”. [10] Популяризатором аквариумистики и декоративного рыбоводства в России был также Николай Федорович Золотницкий, а его книга “Аквариум любителя”, вышедшая в 1885 году, стала известна в европейских странах.

В XX, несмотря на Мировые войны в начале столетия, аквариумистика набирала свою популярность, а в XXI благодаря модернизации техники она продолжает активно развиваться. Сегодня эта сфера сочетает в себе прикладную науку и популярное хобби. Современная аквариумистика позволяет с помощью прикладного подхода углубить свои знания о природе. [10]

Рассматривая представленную тему необходимо обозначить, что представляет собой декоративное рыбоводство. В первую очередь следует отметить, что оно является частью аквариумного рыбоводства. Аквариумное рыбоводство занимается разработкой, использованием и модернизацией методов содержания и размножения рыб в замкнутых системах. В аквариумном рыбоводстве, кроме декоративного, представляется промышленное направление, целью которого является развитие пищевой индустрии.

На сегодняшний день существует несколько интенсивных методов для разведения экзотических рыб и ценных промысловых. Ниже будут рассмотрены способы, связанные больше с декоративными видами рыб.

- Разведение с помощью гормонов.

Данный метод представляет собой введение инъекций с гормонами для стимуляции нереста у рыб. Такой способ наиболее применим к видам, которые с трудом размножаются в неволе. Регулирующим фактором в этом вопросе во много выступает размер рыбы, например, маленьким тропическим рыбкам инъекции гормонов делать нельзя. Однако, недавние достижения позволяют вводить гормоны орально вместе с кормом или методом погружения в ванны.

- Однополое потомство.

Гормональная терапия получила свое применение не только в части стимуляции рыбы к нересту, но и в изменении пола. В коммерческом аспекте это становится экономически выгодно, например, для получения среди потомства только самцов, так как они имеют более яркую и привлекательную окраску или длинные плавники, что делает их более дорогими. Таким образом разводят, например, гуппи и моллинезий. Для получения в потомстве самцов, мальков кормят пищей, насыщенной мужскими гормонами. У данного метода имеется еще одна экономическая выгода - продажа рыб одного пола приведет к отсутствию конкуренции на рынке и монополизации.

Этичность данного метода является предметом спора, так как любители аквариумисты во многом получают наслаждение от размножения аквариумных рыбок, чего их лишают рыбоводы.

- Бесплодие, вызванное гормонами.

Данный метод также направлен на ликвидацию возможности у любителей аквариумистов разводить приобретенных рыб. У самцов вызывают бесплодие, давая им большие дозы мужских гормонов. Они

выглядят и ведут себя также как нестерилизованные рыбы: совершают ухаживания, у них происходит коагуляция, однако их сперма нежизнеспособна.

Такое применение гормонов многие считают неэтичным, и некоторые аквариумисты настаивают на информировании продавцом о стерильности приобретаемых рыб, чтобы будущий владелец мог осознанно принимать решение о покупке. [4]

К популярным интенсивным методам также относят массовую инкубацию икры в аппаратах.

## ИСТОРИЯ ПОЯВЛЕНИЯ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОБЪЕКТОВ В РЫБОВОДСТВЕ

На сегодняшний день общепринятого определения для генно-модифицированных объектов нет. Европейское экономическое сообщество (European Economic Community - ЕЕС) под термином ГМО определяет: «...организм, в котором генетический материал был изменен таким образом, который не происходит естественным образом в результате спаривания и/или естественной рекомбинации...» (ЕЕС, 1990).

Международный Совет по исследованию моря (International Council for the Exploration of the Sea - ICES) принял определение ГМО, которое отражает современные методы переноса генов и не включает продукты селекции.

Экологическое сообщество Америки (Ecological Society of America) в свою очередь предлагает рассматривать ГМО на основании их биологических свойств, а не в зависимости от методов генной инженерии, которые были использованы для их создания.

Великобритания определяет ГМО как организмы, генетический материал которых был заимствован от иных видов. Таким образом, называя их трансгенными организмами. [17]

Созданием ГМО сегодня занимается “генная инженерия”, “биотехнология”, “генная технология”, или “технология рекомбинантных молекул”. Данная область науки зародилась в 1972 году, когда впервые была получена рекомбинация ДНК *Escherichia coli*. Под руководством П.Берга были совмещены фрагменты фага лямбда, экспрессионным вектором выступал вирус обезьян SV40. [6]

Первой генно-модифицированной рыбой стала радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*) в 1984 году. Исследования проводил Норман Маклин (Norman Maclean). [24] Позднее в марте 1987 года были опубликованы положительные результаты их исследований из других лабораторий. Велась совместная работа с Дэвидом Пенманом (David Penman) и китайскими учеными, в частности с Цзуюан Чжу (Zuoyan Zhu). [25]

Сегодня имеется группа генно-модифицированных рыб, которая включает в себя более 30 представителей. Они являются объектами товарного выращивания, модельными организмами и декоративными рыбками. Ниже представлены некоторые представители:

1. Семга (*Salmo salar*);
2. Кижуч (*Oncorhynchus kisutch*);
3. Чавыча (*O. tshawytscha*);
4. Лосось Кларка (*O. clarkii*);
5. Тиляпии:
  - 5.1. Нильская (*Oreochromis niloticus*);
  - 5.2. Мозамбикская (*O. mossambicus*);
6. Медака японская (*Oryzias latipes*);
7. Карп (*Cyprinus carpio*);
8. Канальный сомик (*Ictalurus punctatus*);
9. Африканский сомик (*Clarias gariepinus*);
10. Мешкожаберный сом (*Heteropneustes fossilis*);

11. Караси:
  - 11.1. Серебряный (*Carassius gibelio*);
  - 11.2. Золотой (*C. carassius*);
12. Светлоперый судак (*Sander vitreus*);
13. Обыкновенная щука (*Esox lucius*);
14. Амурский сом (*Parasilurus asotus*);
15. Вьюны:
  - 15.1. Обыкновенный (*Misgurnus fossilis*);
  - 15.2. Амурский (*M. anguillicaudatus*);
16. Дорада (*Sparus aurata*);
17. Красный пагр (*Pagrus major*);
18. Лещ черный (*Megalobrama terminalis*);
19. Данио-рерио (*Danio rerio*);
20. Тернеция или черная тетра (*Gymnocorymbus ternetzi*). [18]

О распространении такого феномена как генно-модифицированные рыбы свидетельствует график, демонстрирующий общий тренд повышения количества опубликованных статей за период 1986-2019 г.г.



Рис.4 .Количество публикаций в год, опубликованных в Web of Science, связанных с «трансгенными рыбами». [32]

Изучение исследований, посвященных трансгенным рыбам, показывает, что большая часть исследований трансгенных рыб на момент 2013 года проводилась с использованием модельных видов для

медицинских исследований, исследований развития и исследований функциональной геномики. Меньшая составляющая относилась к изучению аквакультурных видов рыб. [20]

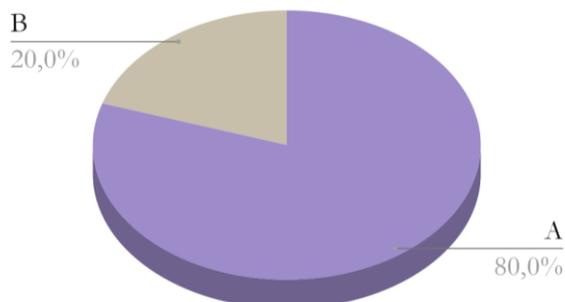


Рис 5. Соотношение исследований трансгенных рыб на 2013 год. А - медицинские исследования, исследования развития, исследования функциональной геномики; В - исследования в области аквакультуры.

### РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДЕКОРАТИВНЫХ РЫБ

В конце 2003 года была зарегистрирована торговая марка GloFish, где покупатели могли приобрести трансгенных данио, которые флюоресцировали зеленым, красным и желтым цветами. Сегодня кроме данио представлены такие виды как тернеции, барбусы, петушки. [39]

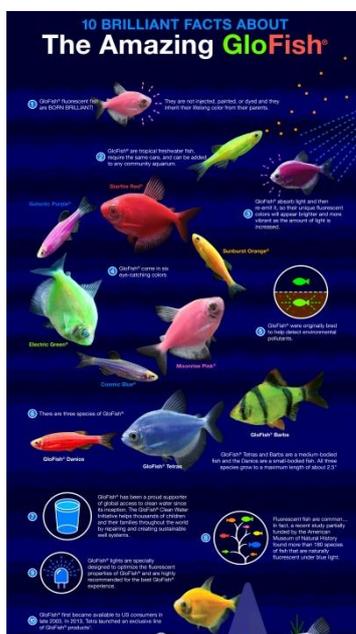


Рис. 6. 10 блестящих фактов о GloFish. [39]

Первым зарегистрированным патентом, который был связан с генно-модифицированными рыбками, стала работа Чжюань Гонг, Цзяньян Хэ, Беншэн Джу, Тун Джин Лам, Янфей Сюй, Галстук Ян из Национального университета Сингапура в Южной Каролине 16 июля 1999 года. [40] Благодаря их проекту “Химерные генные конструкции для получения флуоресцентных трансгенных декоративных рыб” (“Chimeric gene constructs for generation of fluorescent transgenic ornamental fish”) стало возможным создание торговой марки GloFish. Основная цель изобретения состояла в том, чтобы клонировать промоторы генов рыб, которые являются повсеместными или которые обладают тканевой специфичностью, такой, как специфичность кожи или специфичность мышц, или которые индуцируются химическим веществом, и использовать эти промоторы для разработки эффективных генных конструкций.

Для работы использовался GFP (Green Fluorescent Protein). Дословный перевод названия - Зеленый Флуоресцентный Белок, однако правильнее будет назвать это генной конструкцией, которая позволяет генерировать флуоресцентный белок. Ее выделили из медузы *Aqueous victoria*. GFP дикого типа испускает зеленую флуоресценцию на длине волны 508 нм или при стимуляции ультрафиолетовым светом (395 нм). Первичная структура GFP была выяснена путем клонирования его кДНК и геномной ДНК. Модифицированный GFP, также называемый EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), был создан искусственно и содержит мутации, которые позволяют полученному белку излучать более сильный зеленый свет, а его кодирующая последовательность также была оптимизирована для более высокой экспрессии в клетках млекопитающих на основе предпочтительных кодонов человека. GFP (включая EGFP) стал популярным инструментом в клеточной биологии и трансгенных исследованиях. [40]

Путем слияния GFP-трангена с тестируемым участком ДНК, производящим необходимый белок, GFP можно использовать в качестве индикатора субклеточной локализации тестируемого белка. Путем трансформации клеток функциональным геном GFP можно использовать в качестве маркера для идентификации экспрессирующих клеток. Таким образом, ген GFP становится все более популярным репортерным геном для трансгенных исследований, поскольку GFP можно легко обнаружить с помощью неинвазивного подхода.

Было выведено 4 типа трансгенов, которые могли специфично проявлять себя в коже, соматической или висцеральной мускулатуре, то есть мускулатуре тела и внутренних органов соответственно, и повсеместно. Когда полученные генные конструкции внедряли в данио-рерио, они флуоресцировали зеленым цветом в синем или ультрафиолетовом свете.

Одной из дополнительных целей работ была разработка флуоресцентных трансгенных рыб с использованием этих генных конструкций для использования рыб в декоративных целях. Способность флуоресцировать делает генетически модифицированных рыб уникальными и привлекательными на рынке декоративного рыбоводства. [40]

В 2008 году ученым удалось на основе трансгенной технологии данио-рерио создать генно-модифицированную декоративную тернецию. Выбор данного объекта был обоснован отсутствием пигмента в некоторых частях тела, что делало этих рыбок идеальной моделью для разработки новых флуоресцентных трансгенных рыб. Рыбкам вводили не GFP, а модифицированный RFP (Red Fluorescent Protein), в результате чего они должны были получить способность флуоресцировать красным цветом. После введения нового гена было обнаружено, что ярко-красный цвет

заметно наблюдается у взрослых трансгенных рыб при обычном дневном свете. [27]

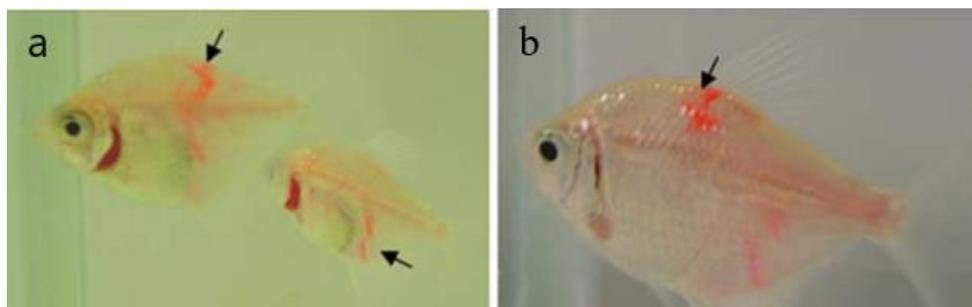


Рис. 7. Живые взрослые трансгенные рыбы с выраженным проявлением RFP в мышцах тела. Снимки сделаны при дневном свете, области сильной экспрессии RFP указаны стрелками. [27]

Во время этого исследования также был описан полный эмбриогенез тернеций.[27]

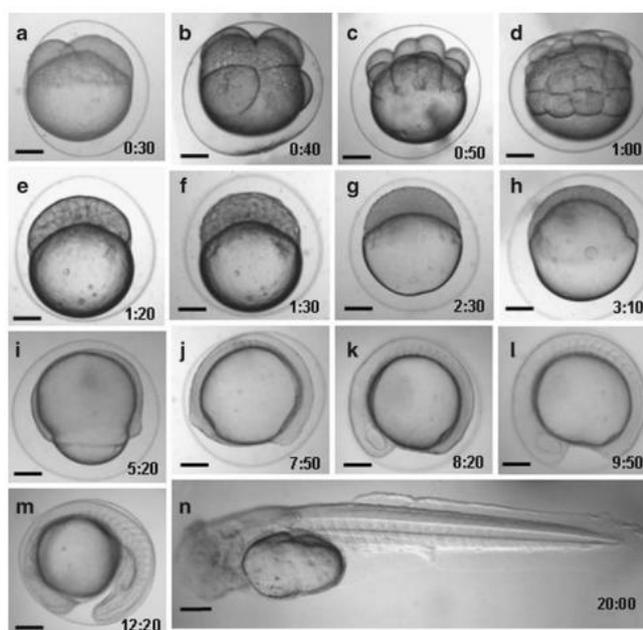


Рис. 8 Эмбриональное развитие тернеций. а) двухклеточный эмбрион, б) 4-клеточный эмбрион, в) 8-клеточный эмбрион, г) 16-клеточный эмбрион, е) ранняя бластула, ф) эмбрион на высокой стадии, г) эмбрион на стадии купола, х) стадия формирования зародышевого кольца, и) достижение 75% эпиболии, ж) начало сомитогенеза, к) стадия 8 сомитов, л) стадия 13 сомитов, м) стадия 20 сомитов н) выход эмбриона из яйцевых

оболочек произошел через 20–24 часа после оплодотворения. В нижнем левом углу указано время с момента оплодотворения. [27]

По сравнению с эмбриональным развитием рыбок данио, развитие тернеций происходит примерно в два раза быстрее до стадии вылупления. Например, при тех же 28,5 °С эмбрионы рыбок данио достигают стадии 16 клеток через 1,5 часа после оплодотворения, высокой стадии через 3,3 часа, стадии купола через 4,3, образования зародышевого кольца через 5,7 часов, 75% эпиболии через 8 часов, сомитогенеза из от 10,3 до 22 часов и вылупление через 48 часов после оплодотворения. [27]

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГМО ДЕКОРАТИВНОГО РЫБОВОДСТВА В НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Использование генно-модифицированных рыб, которые сегодня встречаются в аквариумах любителей, в научной среде является одним из последствий проекта сотрудников Национального университета Сингапура. Данио-рерио, которые стали полноценными модельными объектами для научного сообщества, являются популярными по ряду физиологических и анатомических факторов. Главным достоинством является прозрачность эмбрионов, которая позволяет проводить прямой мониторинг развития. Высокая плодовитость и быстрый период созревания также вывели данных рыбок в часто используемые модельные объекты. Эта особенность позволяет ускорить процесс исследования и минимизировать затраты в виде средств и времени. [9]

Декоративные виды рыб используются как модельные формы для изучения структурно-функциональных изменений генома при встраивании генов других организмов. Полученные данные помогают эффективно внедрять биотехнологические методы для товарного рыбоводства. [2] Исследования подобного рода продолжаются в настоящее время, например, изучение на рыбках данио-рерио подавления действия миостатина. Миостатин представляет собой белок, который выступает в

качестве негативного фактора для развития соматической мускулатуры в период миогенеза. Микроинъекции двухцепочечной РНК на ранней стадии развития привели к гиперплазии или гипертрофии, при чем было отмечено, что интерференция функции гена роста напрямую зависела от количества введенной двухцепочечной РНК. Микроинъекции двухцепочечной РНК соответствовали биологически активному С-концевому домену из аминокислоты 268. [16]

Проблема химического загрязнения воды также является областью, где используются объекты декоративного рыбоводства. Данио и тернеций применяют в качестве тест-объектов при индикации химического загрязнения водной среды. Их использование связано с выявлением определенных агентов в воде. Промоторы чувствительные к определенному химическому воздействию будут вызывать экспрессию целевых генов. Продукт экспрессии можно будет оценить визуально или с помощью специальных методов. Существует множество вариаций “элементов”, способных выявлять разнообразные соединения. Например, элементы реакции на ароматические углеводороды (AhRE) связаны с многочисленными полициклическими углеводородами и галогенированными копланарными молекулами, такими как 2,3,7,8-тетрахлордибензо-*p*-диоксин (диоксин) и полихлорированные бифенилы. Элементы электрофильного отклика (EpRE) дают реакцию на хиноны и множество других сильнодействующих электрофильных окислителей. Катионы тяжелых металлов (ртуть, медь, никель, кадмий, цинк) выявляются благодаря металлочувствительным элементам (MRE). Одним из вариантов репортёрного гена может служить GFP или RFP. [30]

В качестве индикаторов используют наиболее чувствительные элементы - ооциты, эмбрионы, личинки рыб, ювенильные особи в период дифференциации гонад, а также семенники взрослых самцов.

Изучение особенностей заболеваний позвоночных, в том числе человека, также являются областью использования декоративных модельных генно-модифицированных объектов. Рассматриваются закономерности развития позвоночных, работа и формирование систем органов на живых организмах, имеющих врожденный патогенез. Также в связи со схожестью генома данио-рерио с человеческим на 70%, эти организмы используют как модели для изучения и купирования генетических заболеваний. [7]

Примером изучения является ахроматопсия. Было выявлено, что причиной врожденной ахроматопсии являются мутации в трансдуцине колбочек глаза GNAT2. Модельный организм - данио-рерио лишили возможности проявлять оптокинетический ответ  $f$  W21 (nof), и продемонстрировали возможность терапии данного заболевания с помощью направленной экспрессии белка дикого типа. Генетическим материалом для создания мутантного организма служила плазмидная ДНК.

Мутантные формы данио-рерио также используются для моделирования частичного дальтонизма при синдроме Ваарденбурга. Так как данный синдром, помимо дальтонизма, проявляется также гетерохромией, врожденной тугоухостью, отсутствием пигментации отдельных прядей волос, вызванными мутациями в генах PAX3, MITF, WS2B, WS2C, SNAI2, SOX10, EDNRB, EDN3, для демонстрации каждого мутантного гена используются отдельные живые организмы. [7]

Для моделирования болезни Ниманна–Пика типа С1 (NPC1), относящейся к группе лизосомных болезней накопления и характеризующейся аутосомально-рецессивным наследованием, В.Ч. Тсенг совместно с группой ученых, используя CRISPR/Cas9, сгенерировали двух npc1-null-мутантов. Поскольку NPC1 характеризуется патологическим накоплением неэтерифицированного холестерина и

гликолипидов в поздних эндосомах и лизосомах, а общие признаки заболевания выражаются в желтухе новорожденных, гепатоспленомегалии, судорогах, мозжечковой атаксии и снижении когнитивных функций, одна из моделей демонстрировала раннее поражение печени, а вторая представляла собой неврологический фенотип. Посредством CRISPR/Cas9 индуцировались разрывы двуцепочечной ДНК: на одноклеточной фазе развития в эмбрионы рыбок дикого типа (F0) инъецировали прс1-специфическую направляющую РНК (sgРНК) и мРНК, кодирующую Cas9. Полученных таким образом рыбок выращивали до половозрелого состояния и скрещивали с особями дикого типа, получая эмбрионов F1. Посредством ПЦР и фрагментного анализа эмбрионы F1 исследовались на возможность передачи зародышевой линии мутации прс1. В свою очередь, особи F0, несущие потенциальные мутации в зародышевой линии, были скрещены с особями дикого типа. Полученные от этого второго скрещивания рыбки F1 выращивались до взрослого состояния и исследовались на наличие мутаций в гене прс1. В результате были идентифицированы два мутантных аллеля: прс1 у535 и прс1 hg37. Наблюдения показали задержку роста и преждевременную летальность прс1-мутантов, а гистологические исследования подтвердили содержание большого количества неэтерифицированного холестерина в печени молоди рыб. [7]

Достаточно точную модель X-сцепленной аденолейкодистрофии (ALD), взяв за основу данио-рерио, удалось создать Л. Р. Страчан и его сотрудникам. Это заболевание относится к группе пероксисомных болезней с X-сцепленным рецессивным типом наследования и обусловлено мутациями гена *abcd1*, что приводит к поражению миелина периферической и центральной нервных систем, а также надпочечников. Ген *abcd1* кодирует трансмембранный белок ALDP, необходимый для метаболизма очень длинноцепочечных жирных кислот. Показано, что

аминокислотная последовательность гена *abcd1* данио-рерио на 70% идентична последовательности гена *abcd1* человека, и в процессе онтогенеза экспрессируется в гомологичных областях. Для генерации мутантных аллельных линий *abcd1* данио-рерио использовалась технология TALEN, с помощью которой в экзоне 1 генерировались мутации, приводящие к возникновению преждевременных стоп-кодонов. Наблюдения показали у мутантных особей повышение концентрации в организме очень длинноцепочечных жирных кислот, развитие гипомиелинизации, снижение выживаемости, нарушение двигательной моторики и задержки развития межпочечного органа (аналог надпочечников). [7]

С помощью мутантных линий данио-рерио также изучают синдром ломкой X-хромосомы, или синдром Мартина-Белл (распространенная моногенетическая форма аутизма), который возникает в результате потери или нарушения экспрессии гена *FMR1*. В основе исследования были изменения сенсорных сетей в масштабах мозга и его клеток, являющиеся основой сенсорных аспектов этого синдрома и аутизма в целом. Используя кальциевую визуализацию, они исследовали реакции нейронов на зрительные и слуховые стимулы у личинок рыбок Данио. В результате изменений в гене происходило нарушение слуховой обработки. [8]

Областью использования ДНК-технологий также является профилактика и лечение гидробионтов. Сегодня разрабатываются методы ДНК-вакцинации. Особенно это актуально для аквакультурных видов для создания генетической устойчивости к патогенам. Данный метод профилактики заболеваний обладает потенциалом, среди его преимуществ выделяют следующие факторы:

- Относительно недорогие производственные процессы;
- Распространение использования мультивалентных вакцин;

- Плазмидная ДНК обладает большой химической стабильностью, что позволяет увеличить срок хранения препаратов;
- Быстрая модификация последовательностей вакцинной ДНК для противодействия новым мутациям патогена (в последовательности ДНК вакцины появляются прижизненные вариации катионных связей, что способствует повышению устойчивости организма к новым мутантным формам возбудителя);
- Отсутствует риск передачи заболевания (как это происходит с живыми ослабленными вакцинами);
- Правильное конформационное сворачивание антигенного белка патогена (не всегда достигается с рекомбинантными белковыми вакцинами, получаемыми из бактерий);
- Отсутствие потребности в использовании адъювантов и стимуляции иммунных реакций;
- Стимулирование как гуморального, так и клеточного иммунного ответа.

Данная технология сталкивается с определенными проблемами. Ввиду отсутствия четкой формулировки о том, что такое генно-модифицированные организмы, на сегодняшний день также не имеется разграничения между ДНК-вакцинированными и ГМО. Это может привести к проблемам с лицензированием продуктов потребления и общественному отрицанию технологии. [26]

## ГЛАВА 3

### МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ РЫБ

Получение трансгенных рыб начали с адаптации методик по созданию трансгенных мышей. Различия в строении организмов требовали определения степени, насколько легко можно было изменить процесс для успешного применения. Важным отличием является строение зигот: у рыб они большего размера и имеют трудно различимые пронуклеусы, в результате введения новых данных в которые получали трансгенных мышей. [20]

Вследствие этих различий было разработано и используются на данный момент следующие методы: микроинъекции в цитоплазму, электропорация, ретровирусные векторы, встраивание ДНК с помощью транспозонов, перенос с помощью спермы, ядерная трансплантация с использованием эмбриональных клеток и клеточно-опосредованный перенос генов, бомбардировка частицами - биологическая баллистика, перенос ДНК инкапсулированной в липосомы - липосомно-опосредованный перенос. [32]

Производство генетически модифицированной рыбы производится по следующему плану: [32]

#### 1. Отбор производителей и подготовка племенного стада.

Учитывается ряд параметров, которые связаны с успешным разведением вида: фотопериодизм, температура, качество и количество корма, соотношение полов, и т.д. Оптимальное обеспечение данных факторов приводит к получению достаточного количества икры для исследований.

#### 2. Создание генной конструкции

В целом, работа конструированию чужеродной ДНК происходит по одному принципу. Чтобы разработать успешную трансгенную рыбу с предсказуемой картиной экспрессии трансгена, вторым шагом является

создание генной конструкции, подходящей для трансгенных исследований. Генная конструкция обычно включает три части: промотор гена, структурный ген и последовательность нуклеотидов, останавливающих синтез мРНК. Промотор гена будет определять, где, когда и при каких условиях включается структурный ген. Структурный ген содержит части, кодирующие белок, которые определяют синтезируемый белок и, следовательно, биологическую функцию. Структурный ген может также содержать последовательности интронов, которые могут влиять на стабильность мРНК или которые могут содержать элементы, регулирующие транскрипцию.

Сигналы терминации транскрипции состоят из двух частей: сигнал полиаденилирования и сигнал терминации транскрипции после сигнала полиаденилирования. Оба важны для прекращения транскрипции гена. Среди трех частей выбор промотора очень важен для успешного трансгенного исследования, и предпочтительно использовать гомологичный промотор (гомологичный рыбе-хозяину), чтобы обеспечить точную активацию гена в трансгенном хозяине. [27]

### 3. Сбор оплодотворенной или неоплодотворенной икры.

Икру собирают непосредственно с брюшка самки или со дна резервуара. Как правило, может быть собрано больше икринок, чем необходимо для исследований. После вся икра должна быть удалена из аквариума, чтобы предотвратить контакт со старой, которая уже непригодна для инъекций. Обычно период нереста определяют около 3 часов с интервалом 15-20 минут для сортировки.

### 4. Введение чужеродной ДНК.

Может производиться различными методами.

5. Выявление рыб, которые успешно перенесли процедуру и несут дополнительные гены.

Проводится с помощью молекулярно-генетического анализа.

6. Скрещивание особей с дикими представителями своего вида для проверки передачи введенного гена следующим поколениям или скрещивание особей с одинаковым генотипом для получения гомозиготных особей по необходимому признаку. [32]

#### Микроинъекции

Самыми частыми методиками в использовании являются микроинъекции ДНК, однако на сегодняшний момент они не являются самыми эффективными. С помощью специальных игл в цитоплазму вводится генная конструкция.

Введение микроинъекций ДНК в цитоплазму неоплодотворенных яиц или на стадии от 1 до 4 клеток.

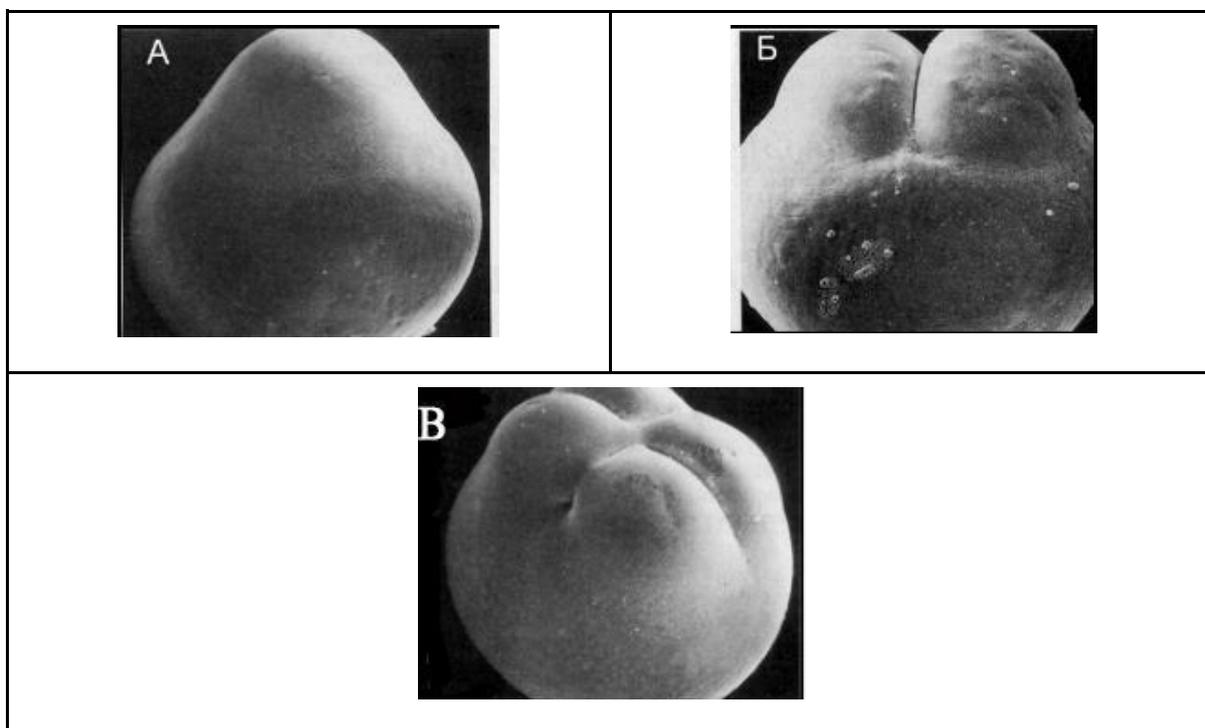


Рис. 9. Дробление яйцеклетки Данио-рерио а) зародыш на одноклеточной стадии, накопление свободной цитоплазмы, б) двухклеточный зародыш, в) четырехклеточный зародыш. [32]

Для введения инъекций в икру используются различные модели микроскопов, микроманипуляторов, пипеткоуловителей, систем микроинъекций и другого оборудования. В лаборатории водной

биотехнологии и окружающей среды Университета Джорджии используется стереомикроскоп для диссекции, который оснащен источником света и регулируемым зеркалом; он имеет от 6 до 100 кратного увеличения. [20]

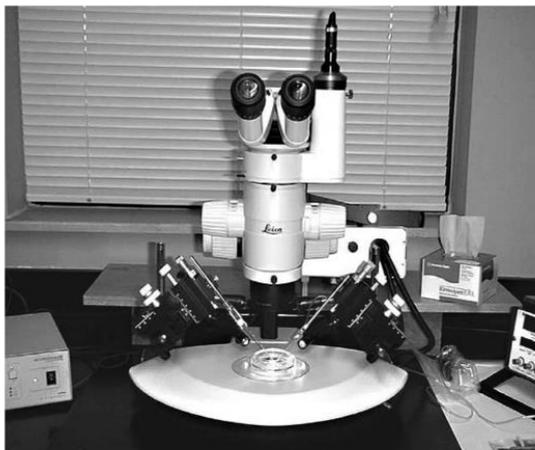


Рис. 10. Диссекционный микроскоп со стереозумом, с проходящим светом и регулируемым зеркалом. Справа микроинжектор с газовым приводом. [20]

Икринки удерживаются на дне предметного стекла или чашки Петри с помощью держателя пипетки, который прикреплен к микроманипулятору. Удерживающая пипетка отрегулирована так, чтобы зафиксировать яйцо, позволяя поворачивать его в правильную ориентацию с помощью пинцета для микроинъекции. После инъекции яйцеклетка удаляется, а на место вставляется другая с минимальными движениями рук и корректировками. [20]

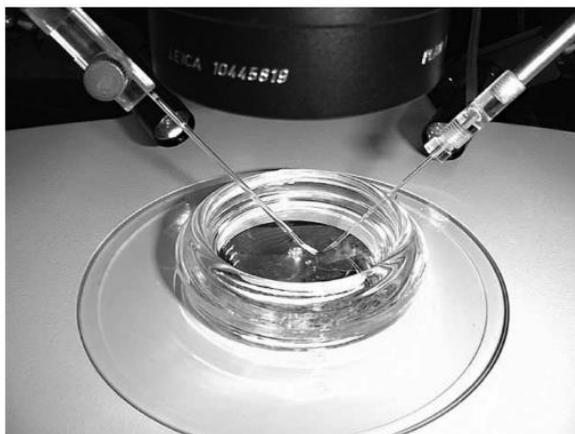


Рис. 11. Введение микроинъекций в икру. Удерживающая пипетка - слева, игла для микроинъекций - справа. [20]

Чаще для инъекций используют линейризованную ДНК, однако иногда прибегают к использованию кольцевой ДНК. Считается, что скорость интеграции выше с линейризованной ДНК. Для контроля введенной ДНК используют дополнительные инъекции, содержащие 0,1 моль КСl и 0,125% красителя тетраметилродамина декстрана. Когда в составе раствора имеется краситель, принимаются дополнительные меры предосторожности, для избежания засорения иглы и, чтобы краситель не оказал неблагоприятного воздействия на развивающийся эмбрион. [20]

Эффективность интеграции трансгена зависит от концентрации вводимой ДНК, тогда как жизнеспособность яйцеклетки обратно пропорциональна концентрации ДНК. Следовательно, ищется компромисс между выживанием эмбриона и интеграцией. [20]

Количество ДНК, вводимой в клетку, регулируется путем регулирования концентрации ДНК, а не объема вводимого раствора ДНК. Для достижения попадания в ядро части вводимой ДНК и сохранения жизнеспособности эмбрионов, придерживаются концентрации около 50-200 нг/мл ( $10^4$  -  $10^6$  копий трансгена). Использование более высоких концентраций трансгена приводит к большей вязкости. [20]

Икра переносится на предметное стекло с солевым раствором; он не наносит ущерба выживаемости, а также повышает стерильность. Погружение в солевой раствор позволяет без добавления красителя визуализировать поток ДНК с кончика иглы, ввиду разницы плотностей растворов. Икринку располагают так, чтобы бластомер находился сверху. Перед микроинъекцией кончик иглы “открывают” путем осторожного позиционирования иглы и касания ею боковой части удерживающей пипетки. Прикосновение к игле удерживающей пипетки при одновременном включении инжектора или режима высокого давления облегчает эту процедуру. Раствор ДНК должен свободно вытекать из кончика иглы, когда противодействие (равновесное давление) установлено на уровне около 69 кПа. Эти настройки могут варьироваться в зависимости от характеристик яиц используемых видов. [20]

Важным моментом является введение иглы строго перпендикулярно поверхности икринки. Это обеспечивает сохранность иглы при процедуре и легкое прохождение через хорион. Период впрыскивания раствора зависит от скорости потока из иглы, и может быть скорректирован в процессе. Было предложено несколько альтернативных методов преодолений трудностей, связанных инъекцией через с твердый хорион. Применялись процедуры по механическому удалению хориона, также проводили дехорионизацию только что оплодотворенных икринок рыбок данио, замачивая их на несколько минут в разбавленном растворе проназы (1 мг/мл в растворе Холтфретера). Однако, работая с модельными организмами, зачастую используют инъекции через хорион. К аквакультурным видам, в том числе лососевым, применяют альтернативные методы, например, высверливание небольшого отверстия перед введением иглы. [20]

После инъекций икринки помещают в чашку Петри с чистой водой. Инъекции проводят в течение 20-30 минут после сбора. Инкубация икры

проходит при необходимых для вида температурах, ежедневно икру осматривают, удаляя погибшую, после чего меняют воду во избежание инфекций. Иногда в воду добавляется метиленовый синий, однако его использование может быть нежелательно ввиду его потенциальной токсичности, с другой стороны его использование помогает отличить мертвую икру и снижает рост возбудителей заболеваний, приводящих к летальному исходу эмбрионов. Согласно статистике выживает около 40-90% эмбрионов до момента выхода из икринок. [20]

### Электропорация

Электропорация представляет собой процесс временного изменения клеточной мембраны путем создания в липидном слое пор с помощью электрического поля. Предполагается, что происходит перестройка структуры в мембране, которая приводит к появлению сквозного канала. Через образовавшиеся каналы происходит попадание в клетку ДНК или РНК. Электропорация использовалась в качестве альтернативы методам микроинъекций для переноса генов у рыб. [32]

Рассматривая метод в целом, большинство приходит к выводу, что электропорация является эффективной и успешной процедурой по введению чужеродной ДНК. Исследования проводили на морских и пресноводных видах: канальный сом (*Ictalurus punctatus*), карп (*Cyprinus carpio*), данио рерио и серебряный лещ (*Rhabdosargus sarba*). Сегодня способ является наиболее используемым для массового переноса генов, ему чаще подвергается икра аквакультурных видов, таких как форель и карпы. Проводимые исследования говорят о различной степени успеха в процессе процедуры; используются разнообразные электропораторы и методики, что затрудняет установление общих правил для проведения данного процесса. Каждый новый опубликованный результат требует тестирования для получения более точных и оптимальных данных. По разным данным коэффициент интеграции обычно составляет 25–75%. В

целом, эмбрионы, подвергшиеся электропорации, легче поддерживать в живых, чем эмбрионы, подвергнутые микроинъекции, в течение первых нескольких дней инкубации. Благодаря электропорации можно создать большее количество особей первого поколения, однако это не всегда актуально, ввиду недостатка ресурсов для скрининга, оценки или разведения такого возросшего количества рыб. [20]

Новое ДНК может быть введено в сперму, либо на стадии одного бластомера. Электропорация также может проводится в две стадии: электропорированная сперма используется для оплодотворения яйцеклеток, а затем проводится электропорация оплодотворенной икры. Такой метод повышает вероятность переноса генов. Подготавливаются два отдельных раствора: 2,0 мл (0,9%) физиологического раствора с концентрацией трансгена в сперме 50 мкг/мл и 9,0 мл ТЕ-буфера (5 мМ трис-НСl, 0,5 М ЭДТА, рН 8,0) с концентрацией 50 мкг/мл для спермы и оплодотворенной икры соответственно. [20]

Далее одну или две капли спермы помещают в раствор ДНК (1,0 мл) в физиологическом растворе и перемешивают. Выдерживание проходит около 5 минут, после ее переносят в чашку Петри и заливают пресной водой. В этот момент сперматозоиды активизируются и способны поглотить большее количество ДНК. Далее сперму подвергают электропорации, используются разные параметры при настройке аппарата, например, 6 кВ, 27 импульсов, всплеск 0,8 с, четыре цикла и 160 мкс. Первая электропорация должна быть сделана не более чем в течение 2 минут, иначе половые клетки деактивируются и оплодотворение не произойдет. [20]

Вторая электропорация проводится незадолго до первого деления клеток. Оплодотворенную икру погружают в чашки Петри и заливают раствором ДНК в ТЕ-буфере. Икринки остаются в растворе около 10 минут, после чего их подвергают электропорации. Количество

помещаемой икры в чашки Петри зависит от их размера, например, одновременно в одной емкости можно разместить 300-400 икринок обыкновенного карпа. После процедуры электропорации икру переносят в пробирки с раствором Холтфретера, после чего инкубируют в статическом состоянии. Перемешивание происходит под действием сжатого воздуха, подаваемого через аэраторы. Ежедневно происходит замена раствора Холтфретера, перед этим убираются погибшие икринки. [20]

Имеются и другие методы внедрения посторонней ДНК в геном рыб. Они являются менее популярными, однако важно их упомянуть.

#### Ретровирусные векторы

Внедрение ретровирусных методов позволило улучшить интеграцию генов и эффективность передачи у нескольких видов рыб. Было получено большое количество данио-рерио (>83% инъецированных рыбок), которые были способны передать провирусные вставки своему потомству. [31]

Некоторые зародышевые клетки могут быть инфицированы более чем одним вирусом и продуцировать множественные вставки. Это обеспечивает более высокую скорость трансгеноза, что демонстрирует полезность данного подхода для масштабных исследований инсерционного мутагенеза и быстрого клонирования мутантных генов. [40]

Для данного метода были необходимы не целые вирусы, а в большей степени механизмы интеграции этих вирусов. Соответственно, проводились работы по введению трансгенной ДНК, белка ретровирусной интегразы из вируса лейкемии мышей (MoMLV) в эмбрионы рыбок данио. Было обнаружено, что белок интегразы действительно усиливает экспрессию и интеграцию трансгенов. Однако интеграционная активность белкового препарата была намного ниже у эмбрионов рыбок данио, подвергшихся микроинъекции, чем у инфицированных вирусом клеток,

возможно, из-за необходимости некоторых факторов хозяина, которые не были адекватными в клетках рыбок данио. [31]

Стабильные трансгенные линии медаки получали путем электропорации дефектных по репликации векторов с широким диапазоном хозяев (пантропных) в недавно оплодотворенные эмбрионы медаки. Эти сообщения предполагают, что ретровирусные векторы могут также служить эффективными носителями для переноса чужеродной ДНК в зародышевую линию живородящих рыб. Сармасик и др. [20] продемонстрировали осуществимость этого подхода путем введения пантропного ретровирусного вектора, несущего neoR, в неполовозрелые гонады живородящих рыб *Poeciliopsis lucida*. Они показали, что 83% выживших самцов и 9% самок несут переносчик в своих гонадах. [20]

Однако данная технология не получила широкого применения. Ее использование было периодическим и часто сочеталось с технологиями ретровирусных векторов со спермой или клеточной культурой для получения трансгенных рыб модельных видов.

Главной проблемой данного метода считают вероятность возникновения заболеваний и рисков для здоровья. Это связывают с теоретической возможностью рекомбинации генов, которая приведет к воссозданию активных инфекционных вирусных клеток, приводящих к воспалительным реакциям. Проводились исследования, которые были сосредоточены на устранении экспрессии вирусных белков. FAO/ВОЗ (2003) пришли к выводу, что использование вирусных последовательностей связано с некоторыми потенциальными опасностями для здоровья животных, включая возможность рекомбинации и последующей экспрессии, измененную патогенность и обратную транскрипцию вирусных последовательностей РНК. Но они также пришли к трем выводам: разработка невирусных эписомных векторов позволяет преодолеть многие проблемы, связанные с векторными системами на

основе вирусов, принципы руководств, разработанные для генной терапии человека, следует использовать в исследованиях трансгенных рыб, и дальнейшие исследования нужно. [23]

#### Встраивание ДНК с использованием транспозонов

Ивикс и ряд других ученых предложили альтернативный способ встраивания ДНК в геномы рыб с использованием генов транспозонов, который служит вектором для доставки гена. [31]

Мечение транспозонов — это старый метод, при котором трансгенная ДНК доставляется в клетки, чтобы она интегрировалась в гены, тем самым инактивируя их путем инсерционного мутагенеза. При этом инактивированные гены помечаются мобильным элементом, который затем можно использовать для восстановления мутировавшего аллеля. Связанный метод заключается в использовании элемента маркировки в экранах «ловушка гена или энхансера». Маркерный ген, такой как белок зеленой флуоресценции (GFP), может действовать как репортер для геномных элементов, подобных энхансеру транскрипции, расположенных достаточно близко к встроенному транспозону. Этот метод можно использовать для поиска и идентификации специфических для тканей и развития регуляторных сигналов транскрипции, а также генов. Вставка мобильного элемента может нарушить функцию гена, что может привести к характерному фенотипу. Так часто обнаруживают новые активные транспозоны у различных организмов. [31]

Часто обнаружение мобильных элементов носит случайный характер, некоторые из них присутствуют рядом с необходимыми генами, в таком случае раньше они являлись бы помехой, но сегодня они генетический инструмент. [31]

Несмотря на некоторые остающиеся неопределенности, связанные с эффективностью переноса транспозонов разного размера, этот подход является многообещающим. Транспозоны могут быть использованы у

позвоночных в качестве носителей для внесения новых фенотипов в геномы (мутации с приобретением функции), а также для разрушения эндогенных элементов (потеря функции). [31]

#### Перенос генов через сперму

Спермопосредованный перенос генов (SMGT - Sperm-mediated gene transfer) представляет собой метод, при котором экзогенная ДНК сначала попадает в сперматозоид. В свою очередь сперматозоиды транспортируют ее в ооцит во время оплодотворения. В отличие от перечисленных методов выше данный метод позволяет внедрять чужеродную ДНК до оплодотворения. С помощью данного метода от одного до нескольких десятков гомологичных фрагментов встраиваются в геном хозяина путем последующего опосредованного спермой трансгенеза. Для интеграции нового гена используют электропорацию. [32]

#### Система культивирования клеток

Было представлено несколько систем, где культивированные клетки для размножения эмбрионов были способны продуцировать зародышевые клетки *in vivo*. Предполагается, что подобный подход будет полезен для введения целевых мутаций у рыб. Были установлены основные методы трансплантации ядер у рыб путем пересадки ядер эмбриональных клеток из трансгенных особей, несущих GFP, в неоплодотворенные икринки. Были получены внутривидовые клоны отдельных рыб. В случае рыбок данио фертильные трансгены были получены путем переноса ядер с использованием клеток эмбриональных фибробластов из долгоживущих культур. Донорские ядра модифицировали ретровирусными вставками, экспрессирующими GFP, и трансплантировали в энуклеированные ручную икринки. Недостатком была низкая выживаемость (2%), в результате чего было получено 11 взрослых трансгенных рыбок данио, экспрессирующих GFP. Эти трансгенные рыбы с ядерным трансплантатом P1 дали функционирующее

трансгенное диплоидное потомство F1/F2, экспрессирующее GFP так же, как и рыба-основатель. Эта работа представляет собой важный первый шаг к созданию клонированных рыб из соматических или культивируемых клеток. Однако за последнее десятилетие эта работа не продвинулась далеко вперед. [20]

### Ксеногенез

Ксеногенез теперь является еще одним методом создания генно-модифицированных рыб. Первичные половые клетки (ППК) выделяются из организма донора после его расщепления и интегрируются в эмбрионы-реципиенты на стадии бластулы. [29]

В исследовании Saito T. и др. [29] все полученные химерные организмы фенотипически были самцами, для получения самок личинки, начиная с 20 дня после оплодотворения, обрабатывали гормональными препаратами.

Процедура ксеногенеза позволяет с помощью выделения ППК и перенесения их в стерильных рыб-реципиентов ускорить изучение химерных организмов и изучить процессы критических этапов развития первичных половых клеток у человека. [29]

## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ В АКВАКУЛЬТУРЕ

Не все исследования можно смоделировать, и иногда необходимо проводить трансгенные исследования на разводимых в аквакультуре видах, а не на модельных видах. Некоторые трансгены будут реагировать по-разному в разных генетических фонах или геномах. Профиль экспрессии генов, биология, репродукция и история жизни могут сильно отличаться от одного вида к другому, что ограничивает информативность экспериментов по моделированию. Кроме того, некоторые связанные с культурой или экономические характеристики видов аквакультуры не могут быть измерены в модельных видах. [20]

Основным недостатком изучения изменения генов у крупных аквакультурных видов является интервал между поколениями. Из основных видов аквакультуры тилапия может быть наиболее похожей на небольшие модельные виды, поскольку у них могут быть интервалы между поколениями 6 месяцев или меньше, если их содержать в теплой воде. [20]

Другими недостатками являются размер основных видов аквакультуры и сезонность их нереста. Требуются более крупные помещения с дорогостоящим оборудованием. Некоторые виды, такие как канальный сом, имеют очень короткий сезон нереста, который может составлять всего 2 месяца, что ограничивает время года, когда можно начинать эксперименты по трансгенезу. Однако другие основные виды аквакультуры, такие как карп и радужная форель, могут нереститься большую часть года. Кроме того, при наличии достаточных условий период и срок нереста можно регулировать с помощью манипуляций со светом, температурой или с помощью использования гормональных инъекций. [20]

Одним из преимуществ этих более крупных видов является их высокая плодовитость по сравнению с модельными видами, что позволяет производить большое количество эмбрионов за короткий период времени. Обычной процедурой для большинства видов является стимуляция нереста, ручная выбраковка икры и искусственное оплодотворение. У некоторых видов нерест происходит порционно в течение нескольких часов, что позволяет периодически оплодотворять икру и проводить с ней манипуляции. [20]

Икра многих крупных аквакультурных видов поддается процедуре микроинъекции и другим методам переноса генов. Процесс микроинъекций может быть облегчен благодаря клейкости икры

некоторых видов, например, канального сома. Это позволяет устранить необходимость в удержании икринок на месте, что также ускорит процесс.

Работа с икрой этих видов также может проводиться в относительно нестерильной среде, однако содержание икры в растворе Холтфретера позволяет увеличить выживаемость эмбрионов до их выхода из яичевой оболочки.

Основными направлениями работы с аквакультурными видами являются увеличение скорости роста, способность выживать в холодных условиях и создание генетического иммунитета, о чем было сказано выше.

### Ген гормона роста (ГР)

Экспрессия экзогенного ГР под подходящим промотором может стимулировать быстрый рост генетически модифицированных рыб, таких как кижуч, атлантический лосось, радужная форель, канальный сом, сазан, обыкновенная щука и нильская тилapia. Сообщается, что трансгенный по признаку ускоренного роста атлантический лосось демонстрирует увеличение массы тела в 2,6-2,8 раза по сравнению с нетрансгенным лососем. [32]

Однако некоторые исследования на трансгенных данио-рерио указывают, что развитие половой системы было медленнее, чем у нетрансгенных форм, в то время как соматический рост происходил быстрее. [28]

### Антифризный протеин (АФП)

Белки-антифризы относятся к классу белков, которые позволяют рыбам экспрессирующим их выдерживать отрицательные температуры. Белки-антифризы могут снижать температуру замерзания крови и тканей. АФП содержат четыре различных типа структуры и состава (типы I, II, III и IV), и экспрессия их мРНК значительно меняется в зависимости от времени года. Морозоустойчивый трансгенный атлантический лосось был получен с использованием АФП типа I зимней камбалы

(*Pseudopleuronectes americanus*) и золотых рыбок путем введения и экспрессии гена АФП типа III из морской камбалы (*Zoarces americanus*), кодирующий зрелый белок. В целом, увеличение числа копий или использование других конструкций АФП с высокой антифризной активностью может быть необходимо для существенного улучшения антифризной способности генетически модифицированных рыб, что будет способствовать успешному повышению устойчивости к замораживанию выращиваемой рыбы и расширению аквакультуры в северных районах. [32]

### ПЕРЕНОС ГЕНОВ В ПОКОЛЕНИЯХ

В зародышевый период введенная генная конструкция чаще проявляется в мозаичном эффекте. Но при интеграции на этапе бластомера новая ДНК-конструкция находится практически в каждой клетке. Этот результат позволяет полноценно оценить производимый биологический эффект от встроенного гена. Большая часть встроенных генов проявляются, однако есть данные, когда происходило изменение действия гена после встраивания. Проблемы могут возрастать на этапе интеграции или экспрессии трансгена, это может происходить в случае слабо развитой репродуктивной системы животного-донора или при его обладании нежелательными фенотипическими качествами. Поэтому уместно использовать разные клеточные поколения. Одной из проблем является передача гена следующему поколению, или его передача в недостаточном количестве. На сегодняшний день существует проблема, связанная с экспрессией генов в трансгенных поколениях, в большей степени это представлено в форме ослабления экспрессии или в непредсказуемости результата. Барминцев В.А. в устном формате заявлял, что без специальной селекции с трансгенными особями, отобранными по одному признаку, трансген исчезает в потомстве только третьего поколения

генетически модифицированных рыб. Описанная выше система культивирования клеток позволяет решить эту проблему. [6]

## РИСКИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ТРАНСГЕННЫХ РЫБ

Отсутствие данных о потенциальном, экологическом и социально-экономическом воздействии трансгенной рыбы способствовало нарастанию в обществе дискуссий о коммерческом использовании генетически модифицированной рыбы. Так как нет общего мнения касательно использования ГМ-рыб, некоторые ученые высказывают опасения, связанные с распространением данных организмов в естественной среде. Некоторые считают, что попадание генетически модифицированных рыб в водоемы может привести к изменению их экологического состояния.

Приводится в пример тилапия, которая изменена по признаку выживаемости при более низких температурах, чем она проживала изначально, так называемый антифризный признак. При попадании в естественные водоемы из искусственных действительно можно говорить о ее пагубном влиянии на окружающую среду. Однако, если говорить о тилапии, которая была модифицирована по белку роста, то она не представляет опасности для водоема, так как зачастую не может в нем выжить по причине слишком низких температур. [22]

Существует необходимость в организации сдерживающих мер как в исследовательских лабораториях, так и на аквакультурных фермах, не только для улучшения социального восприятия, но и для облегчения процесса патентования, который может потребовать сдерживания для учредителей.

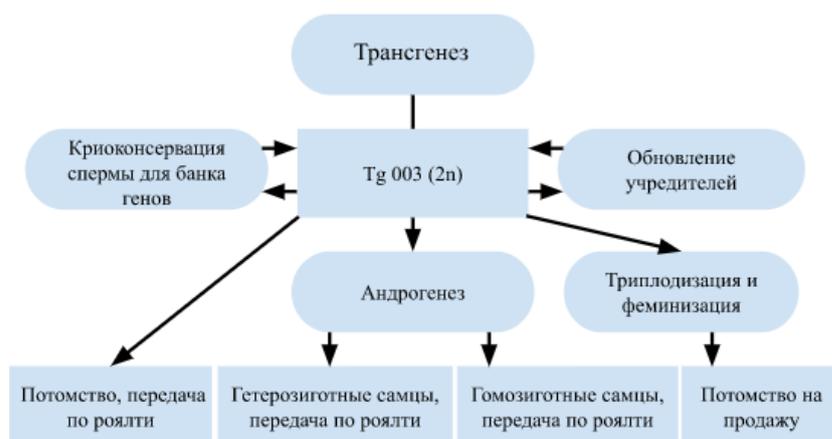


Рис. 12. Процесс патентования трансгенной рыбы. Предлагаемые варианты «сдерживания» расплода-основателя потомства и андрогенов будут продаваться на роялти и триплоидном феминизированном потомстве в свободной продаже. [28]

Сегодня ученые сходятся во мнении, что необходимо регулировать создание и использование ГМО, чтобы также исключить утраты генетического разнообразия в естественном водоеме. Для этого предлагаются к разработке два уровня защиты: физический и биологический. [6]

Физический уровень защиты представляет собой первый этап, который заключается в исключении вероятности попадания трансгенных рыб или их половых продуктов в естественные водоемы. Локализация наземных сооружений может легко сопровождаться фильтрацией впадающих и вытекающих водных путей для предотвращения прямого выхода трансгенных организмов и их гамет из прудов и резервуаров.

Биологический уровень защиты во многом заключается в предотвращении возможности появления потомства у генно-модифицированных рыб. Сегодня применяется несколько методов по стерилизации:

1. Хирургическое удаление гонад. Данный метод является сложным в применении и не подходит для небольших видов рыб. Также

для некоторых видов рыб, например, цихлид он не подходит, так как они обладают способностью регенерации половой системы.

2. Гормонально индуцированная стерильность. Данный метод заключается в погружении эмбрионов в раствор 17 альфа-метил тестостерона. Применение гормонального способа успешно применяется для лососевых и карповых видов рыб.

3. Создание триплоидного или однополого потомства. С помощью этого направления создается стерильность у самок и частичная стерильность у самцов. Стоит учитывать, что выживаемость подобных организмов может быть на низком уровне (около 2%), что связано с двумя проходящими процессами - термическим шоком (для инициации триплоидности) и микроинъекцией (для ввода генномодифицированных конструкций).

4. Стерильность, связанная с гибридизацией. Как было сказано выше на данный момент нет четкого определения о генномодифицированных организмах. В одном из обозначений говорится об изменении генетического материала, который не может происходить естественным образом в результате спаривания и/или естественной рекомбинации. То есть продукты селекции не рассматриваются как ГМО, однако данный метод стерилизации также важно уточнить, так как некоторые предлагают рассматривать организмы на основании их биологических свойств. Гибридная стерильность применяется в селекции для инбридинга лососевых и карповых. Полученное потомство является стерильным. [28]

#### ЭТИЧЕСКАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГМО

Развитие биотехнологий, в том числе, генной инженерии происходит благодаря необходимости человека решить некоторые проблемы. Нехватка энергии, ресурсов, продовольствия, желание улучшить состояние здравоохранения и качество окружающей среды

подталкивает подъему популярности этой отрасли. На сегодняшний день генная инженерия больше используется для развития сельского хозяйства - создаются новые сорта растений, виды животных, штаммы микроорганизмов. Все это внедряется в большей степени для того, чтобы накормить все население Земли, особенно развитие данное направление получило в развитых странах, таких как США, Китай, Германия, Польша, Италия. Ведутся большие дискуссии об успешных технологиях изменения генома организмов, и благодаря этим дискуссиям можно увидеть все плюсы и минусы развития генной инженерии, а также провести дебаты относительно морально-этических аспектов применения биотехнологий, что позволит создать на государственном уровне правовую базу, которая бы регулировала данную сферу.

Этическую составляющую используемых генетических модификаций, а также другие направления естественных и технических наук, регулирует биоэтика. Она отвечает за недоступность нанесения вреда человеку, его потомству и окружающей среде. Это определенная система представлений о пределах и границах проникновения человека в экосистему. Биоэтика затрагивает социальные вопросы, например, ограничение или допущение исследований, в том числе экспериментальных, на человеке, которые способны изменить состояние его психики в худшую сторону.

Выделяются следующие проблемы в биоэтике: медицинская, профессиональная, нормативная. В их решении участвуют философы, юристы, социологи, биологи, теоретики медицины. Регулятором отрасли является также духовенство.

Производство генно-модифицированных организмов привело к разделению научного сообщества, где одни выступают за распространение использование ГМО и не видят с этим проблемы, а другие говорят о

неэкологичности и неэтичности получения подобных организмов. основными дискуссионными темами являются:

- Использование технологии, которая может негативно повлиять на здоровье модифицированного организма, так как не полностью изучены существующие отклонения.
- Использование технологии, которая потенциально может навредить окружающей среде.
- Использование ГМО, так как существует вероятность возникновения негативных последствий у человека после потребления, в том числе аллергические реакции. [1]

Многие противники использования ГМО винят в распространении данной продукции представителей капитализма и сводят дискуссию к желанию некоторых людей обогатиться за счет сельского хозяйства. Данный аргумент распространен не только в конспирологическом сообществе, но и выводится в качестве научного, не подкрепленный исследованиями.

Этическую составляющую проблемы использования ГМО можно условно разделить на два уровня. Первый - этичность научных исследований в областях, результат которых будет непредсказуем ввиду их сложности. Второй - этическая проблема самой генной инженерии и ее ответвлений.

Говоря о первом уровне противник использования ГМО часто сводятся на развитие ядерных технологий, которые могут привести к ядерной зиме. Данный аргумент приводят как запрещающий фактор использования ГМО в целом.

На втором уровне обсуждается проблема попадания генетически модифицированных организмов в окружающую среду. К отрицательным последствиям относят:

- Отсутствие естественных врагов, что может привести к бесконтрольному размножению.

- Вред для других организмов.

- Прямое разрушение экосистем. [5]

Каждый из перечисленных пунктов можно рассматривать и без участия биотехнологий, например, вселение в водоемы организмов, где они раньше не обитали и не имеют естественных врагов, может происходить и с не генетически модифицированными организмами, и гораздо больше ущерба было нанесено случайной интродукцией.

Сторонники использования и распространения ГМО приводят ряд положительных моментов, связанных с развитием биотехнологий:

- Селекционные работы проводятся быстрее, чем раньше. Во многом это связано с развитием методов производства.

- Относительная дешевизна производства. Этот аспект рассматривается в большей степени в сельском хозяйстве, так как медицинские, научные исследования требуют больших финансовых вложений. С другой стороны, благодаря популяризации в качестве модельного объекта рыб данио-рерио и других декоративных видов позволило сократить расходы.

- Создание новых лекарств, методов лечения, профилактики заболеваний у человека и животных. [1]

Отношение к ГМО во многом зависят от позиции стран, в которых проходят дискуссии. Оно складывается из отношения правительства к биотехнологическим исследованиям; уровню риска в будущем; способностью устранить возможный риск или свести его к минимуму и законодательные меры, применяемые для этих целей; извлекаемой выгоды от использования достижений биотехнологий; интересов определенных групп людей; социальных аспектов и морально-этических норм.

Разработка ГМО некоторыми учеными рассматривается как естественное развитие работ по селекции животных и растений, лишь упростившее процесс. Другие же, наоборот, считают генную инженерию полным отходом от классической селекции. При этом ни один новый ген еще человеком не создан, генная инженерия оперирует лишь с генами, имеющимися в природе. [3]

В общем можно сказать, что распространение ГМО в мире это естественный процесс развития технологий и общества, так как происходит движения науки, благодаря которой упрощается и улучшается жизнь человека, вперед. Прогресс, связанный с возможностью получения человеком необходимых организмов для исследовательских, продовольственных нужд, сегодня неотъемлемо связан с биотехнологиями. Вопрос этичности создания и использования ГМО во многом помогает регулировать данную сферу для исключения возможности причинения вреда естественным экосистемам и здоровью человека.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В результате проведенной работы были сделаны следующие **ВЫВОДЫ**:

1. Проведенный анализ исследуемых материалов по проблеме генной инженерии показал, что область исследований трансгенных рыб развивается, о чем свидетельствует растущее количество производимых генетически-модифицированных рыб - на сегодняшний день известно более 30 видов генетически измененных рыб. В области аквакультуры изменение генома рыбы чаще всего связывают с ускоренным ростом, устойчивостью к низким температурам и болезням. Вполне вероятно, что трансгенные рыбы и рыбы с отредактированными генами будут широко использоваться в будущем. По моему мнению, это перспективное направление, которое необходимо развивать.

2. Популярными объектами декоративного рыбоводства, которые используются в качестве модельных объектов, являются рыбки семейства карповые, в частности вид данио-рерио, и харациновые, в частности вид тернеция. Их распространенность в исследованиях обоснована особенностями физиологии и анатомии, которые позволяют проводить мониторинг их состояния и развития в режиме реального времени, а также возможностью их использования для содержания в меньшем пространстве. Строение генома данио-рерио позволяет проводить на нем исследования генетических заболеваний человека.

3. Представленные виды чаще используются в качестве модельных организмов для следующих целей:

- изучения закономерностей развития позвоночных организмов и их патологий, в частности патологий костно-мышечной и нервной систем:

- с помощью генно-модифицированных рыб создаются новые методы профилактики различных заболеваний, такие, как ДНК-вакцинация;

- изучение состояния окружающей среды.

4. Согласно проведенному анализу материалов было показано, что наиболее распространенным и результативным методом по введению генных конструкций был метод микроинъекций, при этом метод электропорации позволяет модифицировать больше организмов за одну процедуру.

5. Благодаря использованию метода ретровирусных векторов удалось добиться улучшения интеграции генов и повысить уровень передачи вставок следующему поколению, но в случае применения вирусов высказываются опасения, что может произойти развитие активных инфекционных вирусных клеток, вызывающих воспалительные процессы.

6. В настоящее время генно-модифицированных рыб используют не только в научных целях, но их приобретают любители в качестве домашних аквариумных питомцев – например, GloFish.

7. По результатам проведенной работы были даны следующие рекомендации:

- необходимо развивать методы для более успешного проведения процедуры генной модификации, в частности, решить проблему наследования экзогенных генов;

- необходимо решение проблемы, связанной с неопределенностью сообщества о статусе ГМО. Отсутствие статуса тормозит работу над созданием новых форм организмов, их регистрацией и патентованием.

- необходимо проводить регулирование использования ГМО с позиций биоэтики.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулаева З.Э. Философия и общество этические проблемы использования ГМО / З.Э. Абдулаева, Чарандаева М.С. Шахриева Ф.М. // Гуманитарий Юга России - 2019. - Том 8. № 6. - С. 83-88.
2. Аквакультура и трансгенные технологии: области применения и проблемы безопасности / Ганжа Е.В., Банникова М.А., Федорова Л.М., Микодина Е.В. // Сельскохозяйственная биология. – 2011. - №4.
3. Баишева, А.С. Проблемы использования генно-модифицированной продукции / А. С. Баишева, И. С. Бейшова. // Молодой ученый. - 2018. - № 10 (196). - С. 37-40.
4. Бейли М. Золотая книга аквариумиста. Полный справочник по уходу за пресноводными тропическими рыбами / М. Бейли, П. Бергресс – перевод – Тип. Кузнецова И.И., 2004.
5. Воронцов С.А. Морально-этические проблемы развития биотехнологии / С.А. Воронцов, Л.Ю. Николаева - Вестник молодежной науки. - 2017. - №5 (12).
6. Ганжа Е.В. Генетически модифицированные организмы (ГМО): новый глобальный вызов для аквакультуры / Е.В. Ганжа, М.А. Банникова // Труды ВНИРО. - 2010. - Т. 148.
7. Генетические технологии / Ю.В. Михайлова, А.М. Нагорных, В.В. Петров, А.Е. Судьина [и др.]; под общей редакцией академика РАН В.Г. Акимкина. — М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, - 2020. - С. 162-164.
8. Данилова М. С. Данио рерио как модельный объект в исследованиях активности мозга / М. С. Данилова, О. В. Ломтатидзе. - Текст : непосредственный // Актуальные проблемы развития естественных наук : сборник статей участников XXIII Областного конкурса научно-исследовательских работ «Научный Олимп» по направлению

«Естественные науки». — Екатеринбург : Уральский федеральный университет, 2020. - С. 32-37.

9. Danio rerio (zebrafish) как универсальный модельный объект в доклинических исследованиях Качанов Д.А. / Лакеенков Н.М. Левикин К.Е., Блаженко А.А. [и др.] // FORCIPE. – 2018. - Т. 1(1) - С. 49-53.

10. Дудникова С.С. Аквариум. Самая полная энциклопедия / Дудникова С.С., Ярошевич А.В., Мелихова Г.И. – М. : Эксмо, 2014.

11. Ильин М.Н. Аквариумное рыбоводство / М.Н. Ильин – М. : Издательство Московского университета, 1968.

12. Медведев Л.И. Аквариум / Л.И. Медведев – В. : Центрально-Черноземное книжное издательство, 1989.

13. Нельсон Д.С. Рыбы мировой фауны / Д.С. Нельсон – перевод 4-го изд. – М. : Тип. Богущкая Н.Г., 2009 – 876 с.

14. Никольский Г. В. Частная ихтиология / Г. В. Никольский – М. : Советская наука, 1950 - 436 с.

15. ФАО Состояние мирового рыболовства и аквакультуры. Меры по повышению устойчивости – Рим, 2020 - 223 с.

16. Acosta J. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. // J. Acosta , Y. Carpio, I. Borroto, O. González, M. P. Estrada - Journal of Biotechnology. - 2005. - №119. - P. 324–331.

17. Bartley D. M. Precautionary approach to the introduction and transfer of aquatic species / D. M. Bartley - R.: FAO Fisheries Department, 2003. - 60 p.

18. Beardmore J. A. Genetically modified organisms and aquaculture / J. A. Beardmore, J. S. Porter - R.: FAO Fisheries Circular, 2003 - 35 p.

19. Bechstein J.M. Naturgeschichte der Stubenthiere / J.M. Bechstein – G. : Ettinger, 1797.

20. Dunham R. A. Winn Production of Transgenic Fish / R. A. Dunham, N. Richard // Production of Transgenic Fish. - 2014. - P. 305–334.

21. Engeszer R.E. Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field / Engeszer R.E. Patterson L.B., Rao A.A., Parichy D.M. // *Zebrafish*. - 2007 – 4(1) – C. 21-40.
22. Hindar K. Genetically engineered fish and their possible environmental impact. / K. Hindar - T.: NINA Oppdragsmelding, 2010. - 48 p.
23. Jao L.-E. Production of Pseudotyped Retrovirus and the Generation of Proviral Transgenic Zebrafish / S. M. Burgess, L.-E. Jao // *Zebrafish*. - 2009. - P. 13–30.
24. Maclean N. Injection of cloned genes into rainbow trout eggs / N. Maclean, S. Talwar // *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. – 1984. – T. 82. – №. 5. – P. 187-200.
25. Maclean N. Introduction of Novel Genes into Fish / Maclean N., D. Penman, Z. Zhu - *Nature Biotechnology* - 1987 - 5(3) - P. 257-261.
26. Nerland A. DNA vaccination in fish culture /A. Nerland, T. Traavik, L. Colombo // *Genetic impact of aquaculture activities on native populations*. - 2007. - P. 117-122.
27. Pan X. Ornamental Expression of Red Fluorescent Protein in Transgenic Founders of White Skirt Tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*) / X. Pan, Zhan H., Gong Z. // *Marine Biotechnology* - 2008. - P. 498-501.
28. Pandian T. J. Guidelines for research and utilization of genetically modified fish / T. J. Pandian - *Current Science* - № 81 - 2001. - P. 1172-1178.
29. Saito T. Xenogenesis in Teleost Fish Through Generation of Germ-Line Chimeras by Single Primordial Germ Cell Transplantation / T. Saito, R. Goto-Kazeto, K. Arai, E. Yamaha // *Biology of reproduction*. - 2007. - 78. - P. 159–166.
30. Transgenic Zebrafish as Sentinels for Aquatic Pollution / M. J. Carvan III, T. P. Dalton, G. W. Stuart, D. W. Nebert // *Toxicology for the next millennium* - 2000. - P. 133-147.

31. Zoltan I. Genetic Applications of Transposons and Other Repetitive Elements in Zebrafish / I. Zoltan, I.Zsuzsanna, P. B. Hacketti // The Zebrafish: Genetics and Genomics. - 1998. - № 60 - P. 99–131.

32. Wang Y. A comprehensive review on genetically modified fish: key techniques, applications and future prospects / Y. Wang, N. Hamid, P.-P. Jia, Pei D.-S. // Reviews in Aquaculture - 2021 - P. 1–26.

33. Ефремов В. Сравнительная эмбриология позвоночных животных [Электронный ресурс] : презентация / В. Ефремов – 2018 - 63 слайда.

34. Aqa.ru Прозрачный мир - [Электронный ресурс] - Режим доступа:

[https://www.aqa.ru/wiki/%D0%94%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%BE\\_%D1%80%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BE](https://www.aqa.ru/wiki/%D0%94%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%BE_%D1%80%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BE) (Дата обращения 20.04.2022).

35. Aqa.ru Прозрачный мир - [Электронный ресурс] - Режим доступа:

<https://www.aqa.ru/wiki/%D0%A2%D0%B5%D1%80%D0%BD%D0%B5%D1%86%D0%B8%D1%8F> (Дата обращения 20.04.2022).

36. Aqvium - [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://www.aqvium.ru/ryby/karpovye/danio-rerio> (Дата обращения 20.04.2022).

37. Aqvium - [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://www.aqvium.ru/ryby/kharatsinovye/chyornaya-tetra#:~:text=%D0%A2%D0%B5%D1%80%D0%BD%D0%B5%D1%86%D0%B8%D1%8F%2C%20%D0%A7%D1%91%D1%80%D0%BD%D0%B0%D1%8F%20%D0%A2%D0%B5%D1%82%D1%80%D0%B0%20%D0%B8%D0%BB%D0%B8%20%D0%A7%D1%91%D1%80%D0%BD%D0%B0%D1%8F,%D0%B8%20%D0%B2%D0%BF%D0%BE%D0%BB%D0%BD%D0%B5%20%D0%B8%D0%BD%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B5%D1%81%D0%BD%D1%8B%D0%BC%20%D0%B2%D0%BD%D0%B5%D1%88%D0%BD>

[%D0%B8%D0%BC%20%D0%B2%D0%B8%D0%B4%D0%BE%D0%BC](#)

(Дата обращения 20.04.2022).

38. FishBase. World Wide Web electronic publication - [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://www.fishbase.de/Summary/FamilySummary.php?id=102> (Дата обращения 20.04.2022).

39. GloFish - [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://www.glofish.com/learning-center/get-educated/10-brilliant-facts-about-glofish.aspx> (Дата обращения 20.04.2022).

40. United States Patent and Trademark Office: United States Patent Gong, et al. «Chimeric gene constructs for generation of fluorescent transgenic ornamental fish» - [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnetacgi/nph-bool.html&r=1&f=G&l=50&co1=AND&d=PTXT&s1=7,135,613&OS=7,135,613&RS=7,135,613> (Дата обращения 19.06.2022).

## ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИЙ СЛОВАРЬ

**Адьювант** - соединение или комплекс веществ, используемое для усиления иммунного ответа при введении одновременно с иммуногеном.

**Амплификация**, в молекулярной биологии - процесс образования дополнительных копий участков хромосомной ДНК, как правило, содержащих определённые гены либо сегменты структурного гетерохроматина.

**Антиген** - вещество, которое организм рассматривает как чужеродное и даёт на него иммунный ответ, имеющий целью удалить это вещество.

**Буфер TE (TE-буфер)** - широко используемый буферный раствор в биохимии и молекулярной биологии, применяемый для выделения и манипуляций с ДНК, кДНК и РНК. Название буфера является аббревиатурой от его компонентов буферного вещества Трис и ЭДТА, хелатирующего катионы металлов, например,  $Mg^{2+}$ . Буфер TE используют для растворения ДНК или РНК и предотвращения деградации нуклеиновой кислоты.

**Вектор** - молекула нуклеиновой кислоты, чаще всего ДНК, используемая в генетической инженерии для передачи генетического материала внутрь клетки, в том числе в клетку живого многоклеточного организма *in vivo*.

**Векторы эписомные** - крупные вирусные векторы, не интегрирующиеся в геном реципиента.

**Вирус аттенуированный** - лишенный патогенности для основного хозяина в результате специальных пассажей или обработки мутагенами, но сохранившие антигенные свойства.

**Гипертрофия** - увеличение объема и массы органа, ткани, клеток.

**Гиперплазия** - увеличение количества структурных элементов органа, тканей и клеток в результате их размножения.

**Гоноцит** (первичная половая клетка) - эмбриональная клетка, из которой впоследствии могут образоваться сперматозоиды или яйцеклетки. Также гоноцитом могут называться любые клетки, участвующие в процессе гаметогенеза, и сами гаметы.

**Диссекция** - трупосечение, вскрытие, анатомическое исследование трупов животных. В современном использовании употребляется хирургами как обобщенный синоним действия по рассечению биологических тканей инструментом с тупыми частями.

**ДНК-вакцина** (также генная вакцина, вакцина на основе нуклеиновых кислот) - генно-инженерная конструкция, которая после введения в клетку обеспечивает продуцирование белков патогенов или опухолевых антигенов и вызывает иммунную реакцию. Введение ДНК-вакцин в организм называют генетической иммунизацией. ДНК-вакцинация имеет ряд преимуществ по сравнению с обычными вакцинами. В частности, показано, что такие вакцины обеспечивают не только выработку антител (гуморальный иммунитет), но и специфический цитотоксичный ответ (клеточный иммунитет), что ранее было достижимо только с помощью живых вакцин.

**Зелёный флуоресцентный белок (ЗФБ)** (англ. green fluorescent protein, GFP) - белок, выделенный из медузы *Aequorea victoria*, который флуоресцирует в зелёном диапазоне при освещении его светом от синего до ультрафиолетового диапазона.

**Инактивация** - потеря или уменьшение активности чего-либо.

**Ингибирование** - снижение.

**Инсерционный мутагенез** - мутационное изменение генома вследствие вставок последовательностей нуклеотидов мобильных генетических элементов, вирусов, а также в результате трансфекции или микроинъекции ДНК.

**Интеграза** - фермент, катализирующий включение ДНК вируса в хромосому клетки-хозяина.

**Компланарность** - свойство трёх (или большего числа) векторов, которые, будучи приведёнными к общему началу, лежат в одной плоскости.

**Комплементарная ДНК (кДНК)** - это ДНК, синтезированная на матрице зрелой мРНК в реакции, катализируемой обратной транскриптазой.

**Паскаль** (русское обозначение: Па, международное: Pa) - единица измерения давления (механического напряжения) в Международной системе единиц (СИ).

**Лизосомные болезни** - общее название группы весьма редких наследственных заболеваний, вызванных нарушением функции внутриклеточных органелл лизосом.

**Линеаризация** (от лат. linearis - линейный) - один из методов приближённого представления замкнутых нелинейных систем, при котором исследование нелинейной системы заменяется анализом линейной системы, в некотором смысле эквивалентной исходной.

**Миогенез** - это формирование мышечной ткани, особенно во время эмбрионального развития.

**Мозаицизм** (генетический мозаицизм, хромосомный мозаицизм — mosaicism; мозаичность; могут употребляться синонимы «мозаичная форма», «мозаичный кариотип») - наличие в тканях (растения, животного, человека) генетически различающихся клеток.

**Моль** - единица измерения количества вещества в Международной системе единиц, одна из семи основных единиц СИ.

**Неэтерифицированные жирные кислоты** (свободные жирные кислоты (далее -НЭЖК)) –маркеры обмена липидов (жиров) в организме человека.

**Оптокинетический ответ** – комбинация медленная фаза и быстрая фаза движения глаз.

**Первичные зародышевые клетки (ПЗК)** - единственные клетки в развивающихся эмбрионах, способные передавать генетическую информацию следующему поколению.

**Пероксисомные болезни** - это группа наследственных нарушений обмена веществ, которые возникают в случаях, когда в организме отсутствуют или не функционируют должным образом пероксисомы.

**Плазмиды** (англ. plasmids) - небольшие молекулы ДНК, физически обособленные от хромосом и способные к автономной репликации. Главным образом плазмиды встречаются у бактерий, а также у некоторых архей и эукариот (грибов и высших растений). Чаще всего плазмиды представляют собой двухцепочечные кольцевые молекулы. Несмотря на способность к размножению, плазмиды, как и вирусы, не рассматриваются в качестве живых организмов.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** — метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в биологическом материале (пробе).

**Пролиферация** (от лат. proles - «отпрыск», «потомство» и fero - «несу») - разрастание ткани организма путём размножения клеток делением.

**Промотор** (англ. promoter) - последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой как стартовая площадка для начала транскрипции.

В частности, химический агент - действующее вещество, выполняющее чётко выделенную роль в химическом взаимодействии веществ или их смесей.

**Пронуклеусы** (лат. pronucleus от др.-греч. про «перед» и лат. nucleus «ядро», то есть «предшественник ядра») - гаплоидные ядра гамет в составе зиготы (гаплоидные ядра зиготы).

**Раствор Холтфретера** (среда Холтфретера) представляет собой сбалансированный солевой раствор, разработанный биологом-эволюционистом Йоханнесом Хольтфретером для изучения эмбрионов амфибий и снижения бактериальных инфекций. Концентрации веществ в моль: NaCl 0,059 М, KCl 0,00067 М, CaCl<sub>2</sub> 0,00076 М, NaHCO<sub>3</sub> 0,0024 М.

**Регуляторный ген** (в широком смысле) - это любой ген, регулирующий активность других генов. В узком смысле — ген, кодирующий аллостерический белок, который регулирует транскрипцию структурных генов в опероне путем связывания с оператором.

**Репортёрный ген** (гены-репортёры) в молекулярной биологии – ген, который присоединяют к регуляторным последовательностям других генов для исследования проявлений генов в культурах клеток. Некоторые репортёрные гены используются исследователями, так как их экспрессия придаёт организму чётко выраженные легко измеряемые характеристики, некоторые, - так как они являются селективными маркерами. Репортёрные гены используют для того, чтобы определить уровень экспрессии гена в клетке или в популяции.

**Стволовые клетки** - это незрелые клетки предшественницы для всех тканей организма.

**Терминация** - остановка синтеза полипептидной цепи при достижении терминирующего кодона в мРНК.

**Трансген** - фрагмент ДНК, переносимый при помощи генно-инженерных манипуляций либо природой в геном определённого организма с целью модификации его свойств. Трансген может быть выделен из биологического объекта или синтезирован искусственно.

**Трансдуцин** – белок, экспрессируемый в палочках и колбочках сетчатки позвоночных.

**Транспозоны** - участки ДНК организмов, способные к передвижению и размножению в пределах генома.

**Фибробласты** (от лат. fibra - волокно и греч. βλάστη - росток) — клетки соединительной ткани организма, синтезирующие внеклеточный матрикс и коллаген.

**Физиологический раствор** (0,9% раствор NaCl) - 0,9% раствор хлорида натрия в очищенной воде, простерилизованный через фильтры с размером пор 0,22 мкм. Данный продукт предназначен для исследовательских целей. Препарат - прозрачная жидкость, без опалесценции и осадка.

**Хорион** (лат. Chorion < др.-греч. χόριον ‘оболочка’, ‘перепонка’) - термин, используемый применительно к некоторым эмбриональным структурам. «Хорионом» разные авторы называют:

серозу - внешнюю из трёх зародышевых оболочек (сероза, аллантоис, амнион), имеющих у амниот;

хориоаллантоисную оболочку (англ. chorioallantoic membrane; данный термин используют авторы, именующие «хорионом» серозу) - результат срастания участков серозы и наружной стенки аллантоиса, обычно у амниот (у яйцекладущих видов располагается под скорлупой яйца, а у живородящих видов служит зародышевой частью плаценты);

кутикулярную оболочку, окружающую яйцо у большинства многоклеточных животных - как позвоночных, так и беспозвоночных.

**Эндогенные вирусные элементы** - последовательности ДНК вирусного происхождения в геноме невирусных организмов, которые присутствуют в клетках зародышевой линии и передаются по наследству.

**Экспрессия генов** - это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК)

преобразуется в функциональный продукт - РНК или белок. Некоторые этапы экспрессии генов могут регулироваться: это транскрипция, трансляция, сплайсинг РНК и стадия посттрансляционных модификаций белков.

**Энхансер** - небольшой участок ДНК, который после связывания с ним факторов транскрипции стимулирует транскрипцию с основных промоторов гена или группы генов.

**CRISPR/Cas9** - технология редактирования геномов высших организмов, базирующаяся на иммунной системе бактерий.