Лекция. Биотехнология в воспроизводстве и селекции животных

План лекции.

1. Трансплантация эмбрионов.
2. Клонирование сельскохозяйственных животных.
3. Получение трансгенных и химерных животных.

1. Трансплантация эмбрионов.

Биотехнология имеет особое значение в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. Крупный рогатый скот относится к одноплодным видам млекопитающих. От одной коровы можно получить в лучшем случае одного теленка в год. Однако в ее яичнике содержатся сотни тысяч незрелых половых клеток (ооцитов). Они представляют огромный генетический резерв. Ускорить воспроизводство скота можно при переходе к нетрадиционным способам увеличения плодовитости. В последнее время приобрела практическое значение трансплантация эмбрионов. Использование этого метода в сочетании с длительным хранением семени в замороженном состоянии позволяет получить десятки тысяч потомков от одного производителя в год и освободить генетически выдающихся самок от необходимости вынашивания плода и вскармливания потомства. Суть метода состоит в том, что самок стимулируют с целью увеличения выхода яйцеклеток, которые затем извлекают на стадии ранних зародышей и пересаживают менее ценным в генетическом отношении реципиентам.

Технология трансплантации эмбрионов включает следующие этапы:

Отбор доноров**.** В качестве коров-доноров отбирают матерей потенциальных племенных быков. На первом этапе племенная ценность донора оценивается по главным признакам молочного скота – по уровню молочной продуктивности и жирности молока. На втором этапе число признаков в зависимости от цели селекции расширяется (форма вымени и сосков, свойства молокоотдачи, резистентность, крепость костяка и копыт, тип и воспроизводительные качества). Предпочтение отдают коровам, которые сохранили в течение трех отелов стабильную воспроизводительную способность. От таких коров можно регулярно получать эмбрионы через каждые два месяца. У коров-доноров при всех отелах должны отсутствовать осложнения (мертворождаемость, задержание последа, послеродовые заболевания половых органов).

Вызывание суперовуляции. В группу доноров переводят только тех коров, которые положительно реагируют на введение гормонов. Для стимуляции множественной овуляции используют: **а)** гонадотропин сыворотки жеребых кобыл (СЖК) в сочетании с простагландинами и другими биологически активными веществами. Вводят однократно. Этот способ позволяет вызывать суперовуляцию примерно у 70 % коров; **б)** фолли кулостимулирующий гормон ФСГ или его комбинация с лютеинизирующим гормоном ЛГ в соотношении 5:1. Вводят многократно.

Оптимальный результат суперовуляции – выход из яичника в воронку яйцепровода 10 - 20 яйцеклеток. Эмбрионы можно получить менее чем от половины первоначально отобранных потенциальных коров-доноров. Хорошими донорами считают коров, которые после многократных суперовуляций имеют хорошую реакцию яичника и производят большое число пригодных для пересадки эмбрионов за одно вымывание.

Кормление доноров должно быть таким, чтобы они находились в хорошем физиологическом состоянии. Рацион коровы-донора должен быть сбалансированным по основным питательным веществам, и особенно по аминокислотам и микроэлементам.

Искусственное осеменение коров-доноров. Для этого используют сперму только выдающихся быков-производителей, достоверно оцененных по качеству потомства. Коров осеменяют дважды: первый раз при начале появления половой охоты и второй – через 12 - 24 часа. Со дня осеменения начинается отсчет развития эмбрионов *in vitro*.

Извлечение эмбрионов. Возможно три способа:

Извлечение эмбриона после убоя коровы-донора – самый простой и надежный способ. Этот способ практиковался только на первых этапах освоения метода трансплантации. В настоящее время он не используется из-за потери генетически ценной коровы-донора.

Хирургический способ – эмбрионы извлекают между 7-8-ми сутками после первого искусственного осеменения (*разрез верхнего свода влагалища, лапаротомия по белой линии живота и лапаротомия в области голодной ямки*). Этот способ трудоемкий, дорогостоящий, им нельзя пользоваться многократно. В настоящее время применяется редко, главным образом в научных целях.

Нехирургический способ. Преимущество – простота манипуляций. Для этого не требуется специального операционного помещения. Эмбрионы можно извлекать непосредственно в производственных условиях. При правильном

применении этого способа воспроизводительная способность доноров не нарушается. Это позволяет многократно использовать генетически ценных коров-доноров для получения от них большого числа потомков. Эмбрионы извлекают под местной анестезией путем вымывания (5 - 8 раз). Длительность манипуляции – 20 - 50 минут. После вымывания эмбрионов в матку вводят раствор антибиотика. В среднем из вымытых яйцеклеток до 25 % оказываются неоплодотворенными или дезинтегрированными.

Кратковременное культивирование и хранение эмбрионов. Манипуляции с ран- ними эмбрионами, находящимися на предимплантационных стадиях развития, т.е. от момента их получения до введения в рога матки реципиента, занимают от 1 до 5 часов. В этот период нужно создать оптимальные условия, обеспечивающие сохранение их биологических качеств. Кратковременное хранение эмбрионов дает также возможность транспортировать их в другие хозяйства.

Эмбрионы КРС можно сохранить путем пересадки их в яйцепровод самок других видов млекопитающих, например, крольчих. Недостаток метода – трудоемкость и возможные потери зигот при их переносе.

В настоящее время распространен метод краткосрочного хранения эмбрионов *in vitro.* При этом жизнеспособные эмбрионы переносят в питательные среды с темпера- турой 37 ºС. В состав сред включены растворы солей, аминокислоты с бикарбонатным ионом как буферным агентом. Он обеспечивает pH в пределах 7,2 - 7,6. При этом биологические качества эмбрионов сохраняются до 95 часов.

Оценка эмбрионов. Производится несколькими методами: **а)** Морфологический метод – при этом основное внимание обращают на форму зиготы, равномерность дробления и т.д. **б)** Оценка по адсорбционным свойствам оболочек и цитоплазмы к различным красителям (например, синьке Эванса). **в)** Гистохимические методы – основаны на специфических реакциях структурных элементов и веществ клеток к различным красителям.

При оценке качества эмбрионов в нашей стране принята 5-балльная шкала с учетом следующих показателей: соответствие стадии развития эмбриона его возрасту; правильность формы прозрачной оболочки и ее целостность; состояние цитоплазмы и др.

Идеальный эмбрион должен быть компактным, сферической формы, с однородной окраской, с клетками одинаковой величины и т.д. Эмбрионы с замедленным развитием выбраковываются. Наиболее пригодными для трансплантации являются эмбрионы, которые извлечены из матки коровы-донора

на 7 - 8 сутки после первого осеменения.

Пересадка эмбрионов реципиентам. В качестве реципиента отбирают гинекологи- чески здоровых коров после двух-трех нормальных половых циклов; продуктивные, племенные и породные качества роли не играют. Основное условие хорошего приживления эмбрионов – синхронность проявления половой охоты у доноров и реципиентов.

В настоящее время пересадка эмбрионов реципиентам производится следующими способами:

Хирургический способ – эго эффективность 60 - 70 %, а число телят – 3 - 4 на донора. Этот способ использовали в основном до середины 70-х годов. Однако он требует больших затрат, его трудно применять в производственных условиях. Из-за возможных травм его нельзя многократного использовать.

Нехирургический способ – прост, экономичен, возможно многократное использо- вание реципиента. Разработано несколько способов нехирургической пересадки эмбрионов. Метод основан на введении эмбриона в рог матки через шейку. Аппликацию зародышей – 50 - 60 %.

Эффективность трансплантации повышается при пересадке двух эмбрионов, по одному в каждый рог матки. Это позволяет получить двойные отелы. При пересадке двух эмбрионов в каждый рог матки частота двоен составляет 55 - 60 %, а при естественном многоплодии коров – всего 2 %. Также можно пересаживать эмбрион и оплодотворен- ной корове. При этом приживляемость эмбриона составляет 50 %.

Консервация эмбрионов. Самый эффективный метод – глубокое замораживание (криоконсервация) в жидком азоте при температуре -196 ºС. Долговременное хранение глубокозамороженных эмбрионов имеет преимущества: **а)** пересадки могут быть проведены в любое время независимо от сроков взятия эмбрионов, поэтому нет необходимости в содержании больших групп реципиентов. В результате повышается рентабельность трансплантации; **б)** возможно создание эмбриобанков от генетически ценных животных. Это важно для сохранения генофонда редких и исчезающих пород, при транспортировке эмбрионов.

Выживаемость эмбрионов составляет 90 %, а стельность коров-реципиентов после нехирургической пересадки находится 50 - 55 %.

Эмбрионы замораживают в пробирках 50×6 мм или в ампулах вместимостью 1 мл. В них вносят 1 - 4 эмбриона от одного донора и 0,4 мл раствора криопротектора (например, 10 % раствор глицерина). Затем ампулы запаивают на пламени газовой горелки.

Возможно два режима охлаждения: **1)** Ампулы или пробирки охлаждают с 20 до -6 ºС со скоростью 1 ºС в минуту, проводят кристаллизацию, охлаждение со скоростью 0,3ºС в минуту и погружают в жидкий азот. **2)** Охлаждение от -7 до -35 ºС со скоростью 0,3 ºС в минуту; от -35 до -38 ºС со скоростью 0,1 ºС в минуту и погружение в жидкий азот. Оттаивание эмбрионов производится на водяной бане с температурой 25 или 37 ºС в течение 10 - 12 секунд.

2. Клонирование животных.

Ядро соматической клетки обладает полной генетической информацией о данном организме. Если создать условия для реализации этой информации, то можно получить неограниченное число генетических копий (клонов) определенной особи.

Получение однояйцовых близнецов – имеет большое значение для животноводства. При этом увеличивается выход телят от одного донора, появляются генетически идентичные двойни. Для этого эмбрионы млекопитающих на ранних стадиях развития разделяют микрохирургическим путем на две или более частей. Они в последующем развиваются в отдельный организм. Разделенные эмбрионы коров могут храниться в замороженном состоянии.

Клонирование эмбрионов путем пересадки ядер эмбриональных клеток в энуклеированные (лишенные ядра) яйцеклетки. Включает следующие этапы: выделение интактного ядра донора; энуклеация ооцита; пересадка ядра в энуклеированную яйцеклетку; активация ооцита и слияние мембран яйца и ооцита под действием электрического импульса.

Данная технология позволяет получить из отдельной эмбриональной клетки множественные копии генетически одинаковых животных (до 64). Повторное клонирование полученных этим методом эмбрионов повышает потенциальные возможности технологии в производстве большого числа клонов.

Клонирование животных путем пересадки ядер соматических клеток в энуклеированные яйцеклетки – метод позволяет получить не только одинаковых между собой животных, но и идентичных по генотипу с животными-донорами соматических клеток. Эта технология может быть использована для сохранения исчезающих пород животных.

3. Методы получения трансгенных и химерных животных

Трансгенными называют животных с измененной наследственностью, которая вызвана включением в их геном чужеродных генов с помощью следующих генноинженерных методов:

Микроинъекции гена. Предварительно у животных гормональной обработкой вызывают суперовуляцию и проводят оплодотворение. Затем извлекают эмбрионы на ста дии пронуклеуса хирургическим путем или после убоя доноров.

Для микроинъекции эмбрионов необходим стабильный рабочий стол, на который устанавливают микроскоп, два микроманипулятора для управления удерживающей и инъекционной пипетками и прибор для регулирования инъекционного давления. На столике микроскопа устанавливают инъекционную камеру со средой, покрытой парафиновым маслом. В среду помещают эмбрионы. Для инъекции эмбрионы по мере надобности посредством пониженного давления фиксируют на удерживающей пипетке так, чтобы инъецируемый пронуклеус был хорошо виден. Кончик инъекционной пипетки (внутренний диаметр около 1 мкм) наполняют раствором ДНК. О точности операции судят по набуханию пронуклеуса. После инъекции эмбрионы освобождаются от удерживающей пипетки и культивируют до момента пересадки реципиентам.

Так, в оплодотворенных яйцеклетках мыши или кролика пронуклеусы хорошо видны, их легко инъецировать. У эмбрионов сельскохозяйственных животных в цитоплазме имеются темные липидсодержащие гранулы. Они затрудняют визуализацию пронуклеусов. Поэтому предварительно проводят центрифугирование. При этом гранулы смещаются к одному полюсу яйцеклетки и пронуклеусы становятся видимыми и доступными для микроинъекций. Затем эмбрионы культивирования in vitro (до нескольких часов) и хирургически трансплантируют в яйцевод синхронизированных реципиентов.

Для образования трансгенных линий животных значение имеет получение таких трансгенных животных, у которых часть половых клеток содержат трансген. Возможно появление мозаик – животных, состоящих из двух или нескольких клеточных линий, происходящих от одной зиготы, но имеющих различные генотипы. Часть мозаиков не может дать начало трансгенным линиям, так как у них отсутствует передача трансгена по наследству.

Чтобы получить одно трансгенное животное, трансген которого был бы включен в геном животного, и оно было способно дать трансгенное потомство, необходимо не менее 100 беременностей после пересадки микроинъецированных эмбрионов. Эффективность микроинъекций у крупных домашних животных очень низкая.

Пересадка трансфицированных ядер. При этом используются ядра клеток, отобранные на основе трансгенной интеграции, то есть пересаживаются только трансгенные эмбрионы. Поэтому любой новорожденный организм будет трансгенным. Последующая селекция трансгенных эмбрионов не требуется.

Использование сперматозоидов в качестве векторов экзогенного ДНК. При этом сперматозоиды могут быть взяты от одного самца и пересажены в семенники самца то- го же или другого вида. Там они становятся функционирующими.

Межвидовые пересадки эмбрионов и получение химерных животных. Пересадка эмбрионов, например, овец козам и наоборот сопровождается их приживляемостью, но не завершается рождением потомства. Во всех случаях межвидовых беременностей непосредственной причиной абортов является нарушение функции плаценты за счет иммунологической реакции материнского организма на инородные антигены плода.

Эта несовместимость может быть преодолена получением химерных эмбрионов с помощью микрохирургии.

Химера — организм, состоящий из генетически разнородных клеток. У животных химерами называют организмы, клетки которых происходят от двух и более зигот. Слово «химера» или генетический мозаик. Используется для описания организмов, которые получены из генетически различных клеточных популяций. С генетической точки зрения **химеры** - это продукт объединения двух и более ранних эмбрионов, которые обладают сложным комбинированным генотипом. Химерных животных получают путём слияния четырёх половинок двух разных 5-дневных эмбрионов. Так был получен химерный бычёк в 1984 году (♀ швицкая + ♂ бурая немецкая и ♀ голштинская + ♂ голштинская). Масть у этого телёнка была как у швицкой и голштинской пород, это уже доказывает наличие химеризма. Химеры широко используются для изучения процесса реализации генома в фенотипе животных. В 1983 году впервые были получены межвидовые химеры овцы и козы, хотя они не относятся к близким видам и между собой не скрещиваются.

Контрольные вопросы

1) Значение трансплантации эмбрионов для животноводства.
2) Перечислите основные этапы технологии трансплантации эмбрионов.
3) Требования, предъявляемые к коровам-донорам и коровам-реципиентам.
4) Техника вызывания суперовуляции и искусственное осеменение коров-доноров.
5) Способы извлечения эмбрионов.
6) Оценка эмбрионов.

7) Способы пересадки эмбрионов реципиентам.
8) Консервация эмбрионов.
9) Технология оплодотворения яйцеклеток млекопитающих *in vitro.*
10) Межвидовые пересадки эмбрионов.
11) Методы клонирования животных.
12) Каких животных называют трансгенными?
13) Методы получения трансгенных животных.
14) Что такое химерные животные?