

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992228** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.04.15

(51) Int. Cl. *A01K 67/027* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.03.29

(54) **ТРАНСГЕННАЯ РАДУЖНАЯ АКУЛА**

(31) 62/478,923; 62/478,898; 62/615,625;
62/615,634; 62/615,638; 62/615,628

(32) 2017.03.30; 2017.03.30; 2018.01.10;
2018.01.10; 2018.01.10; 2018.01.10

(33) US

(86) PCT/US2018/025224

(87) WO 2018/183728 2018.10.04

(71) Заявитель:
ГЛОУФИШ, ЛЛС (US)

(72) Изобретатель:

Блэйк Алан, Крокетт Ричард,
Насевичиус Айдас (US)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к трансгенной декоративной рыбе, а также к способам получения такой рыбы посредством методик оплодотворения *in vitro*. Также раскрыты способы установления популяции такой трансгенной рыбы и способы ее предоставления индустрии декоративной рыбы для торговли.

201992228
A1

201992228

A1

ТРАНСГЕННАЯ РАДУЖНАЯ АКУЛА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка подается 29 марта 2018 г. как международная патентная заявка РСТ, и в ней испрашивается приоритет заявки на патент США номер 62/478898, поданной 30 марта 2017 г. и озаглавленной «Трансгенная оранжевая радужная акула», заявки на патент США номер 62/615625, поданной 10 января 2018 г. и озаглавленной «Трансгенная оранжевая радужная акула», заявки на патент США номер 62/478923, поданной 30 марта 2017 г. и озаглавленной «Трансгенная пурпурная радужная акула», заявки на патент США номер 62/615628, поданной 10 января 2018 г. и озаглавленной «Трансгенная пурпурная радужная акула», заявки на патент США номер 62/615634, поданной 10 января 2018 г. и озаглавленной «Трансгенная синяя радужная акула», и заявки на патент США номер 62/615638, поданной 10 января 2018 г. и озаглавленной «Трансгенная зеленая радужная акула». Каждая из вышеупомянутых ссылок включается сюда посредством ссылки во всей ее полноте.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится к трансгенной рыбе. В частности, данное изобретение относится к оранжевым трансгенным радужным акулам. В частности, данное изобретение относится к пурпурным трансгенным радужным акулам. В частности, данное изобретение относится к синим трансгенным радужным акулам. В частности, данное изобретение относится к зеленым трансгенным радужным акулам.

ВВЕДЕНИЕ

Трансгенная технология включает перенос чужеродного гена в организм-хозяин, делающий возможным приобретение хозяином нового и наследуемого признака. Трансгенная технология имеет много потенциальных применений. Например, ее можно использовать для введения трансгена в рыбу для того, чтобы создать новые разновидности рыбы. Существует много способов введения чужеродного гена в рыбу, включающих: микроинъекцию (например, Zhu et al., 1985; Du et al., 1992), электропорацию (Powers et al., 1992), опосредованный спермой перенос генов (Khoo et al., 1992; Sin et al., 1993), генная бомбардировка или генная пушка (Zelenin et al., 1991), опосредованный липосомами перенос генов (Szelei et al., 1994) и непосредственная инъекция ДНК в мышечную ткань (Xu et al., 1999). Первое сообщение о трансгенной рыбе было опубликовано Zhu et al. (1985) с использованием химерной генной конструкции, состоящей из промотора мышечного гена металлотионеина и человеческого гена гормона

роста. Большинство ранних исследований по трансгенным рыбам было сосредоточено на переносе гена гормона роста с целью получения быстрорастущей рыбы. В то время как в большинстве ранних попыток использовали гетерологичные гены гормона роста и промоторы и не смогли получить такую рыбу (например, Chourrout et al., 1986; Penman et al., 1990; Brem et al., 1988; Gross et al., 1992), усиленный рост трансгенной рыбы был продемонстрирован у нескольких видов рыбы, включая атлантического лосося, нескольких видов тихоокеанского лосося и гольца (например, Du et al., 1992; Delvin et al., 1994, 1995; Tsai et al., 1995).

Радужная акула (*Epalzeorhynchus frenatum*) представляет собой пресноводную карповую рыбу, которая имеет происхождение из Таиланда. В то время как плавники обладают окраской от красной до оранжево-красной, цвет тела варьирует от черного или темно-серого до более светлого, почти серебристого. У альбиносной формы отсутствуют эти более темные пятна, и тело имеет цвет масла или жемчуга. Однако для индустрии декоративной рыбы серые или жемчужные тела не помогают в эффективной демонстрации разных цветов. Доступность таких радужных акул, имеющих модифицированную пигментацию, для трансгенеза флуоресцентными белками приводила бы к лучшим продуктам для индустрии декоративной рыбы из-за лучшей визуализации разных цветов.

В данной области известны многие флуоресцентные белки, и их использовали для исследования разных клеточных процессов, включая флуоресцентные белки, демонстрирующие разные зеленые, желтые, оранжевые, синие или пурпурные цвета. Несмотря на то, что эксперименты по трансгенезу с участием флуоресцентных белков предоставили новые маркеры и репортеры для трансгенеза, прогресс в области разработки и получения радужных акул, которые экспрессируют такие белки, был ограниченным.

ТРАНСГЕННАЯ РАДУЖНАЯ АКУЛА

В некоторых воплощениях настоящее описание касается получения трансгенной флуоресцентной рыбы и предоставления такой рыбы для индустрии декоративной рыбы.

В некоторых воплощениях предложена трансгенная рыба или способы получения трансгенной рыбы. В некоторых аспектах трансгенная рыба представляет собой фертильную трансгенную флуоресцентную рыбу. В конкретном воплощении рыба для применения с раскрытыми конструкциями и способами представляет собой радужную акулу. Цвет кожи радужной акулы определяется пигментными клетками в коже, которые содержат пигментные гранулы, называемые меланосомами (черный или коричневый цвет), ксантосомами (желтый цвет), эритросомами (оранжевый или красный цвет) или

иридосомами (переливающиеся цвета, включая белый цвет). Число, размер и плотность пигментных гранул на пигментную клетку влияют на цвет кожи рыбы.

В по меньшей мере одном типичном воплощении предложена трансгенная радужная акула или ее потомство, содержащие события специфичной интеграции трансгена, называемые здесь трансформационными событиями. Данные рыбы представляют особый интерес, так как они, например, воплощают эстетически привлекательную оранжевую окраску. Трансгенная рыба, содержащая данные специфичные трансгенные события, может быть гомозиготной или гетерозиготной (включая, например, гемизиготную) в отношении трансформационного события. Гомозиготная рыба, скрещенная с рыбой, не имеющей трансформационного события, почти во всех случаях будет давать на 100% гетерозиготное потомство. Икринки, сперма и эмбрионы, содержащие данные специфичные трансгенные события, также включены как часть настоящего изобретения.

В одном таком воплощении, относящемся к событию специфичной интеграции трансгена, предложена оранжевая трансгенная радужная акула или ее потомство, содержащая хромосомно интегрированные трансгены, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС (Европейская коллекция клеточных культур). Хромосомно интегрированные трансгены могут присутствовать на одной интегрированной экспрессионной кассете или двух или более чем двух интегрированных экспрессионных кассетах. В некоторых аспектах такая трансгенная радужная акула представляет собой фертильную трансгенную радужную акулу. Такая трансгенная радужная акула может быть гомозиготной или гетерозиготной (включая, например, гемизиготную) в отношении трансгенов или интегрированной(ых) экспрессионной(ых) кассет(ы).

Также раскрыты способы предоставления трансгенной радужной акулы, содержащей трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1, на рынок декоративной рыбы. В некоторых воплощениях указанный способ включает получение трансгенной радужной акулы или ее потомства, содержащих хромосомно интегрированные трансгены, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС, и распространение указанной рыбы на рынке декоративной рыбы. Такую рыбу можно распространять от производителя к коммерческому дистрибьютеру, или такую

рыбу можно распространять от производителя или коммерческого дистрибьютера к ритейлеру, такому как, например, мультипродуктовый ритейлер, имеющий отдел декоративной рыбы.

В некоторых аспектах предложены способы получения трансгенной радужной акулы, включающие: (а) получение радужной акулы, которая демонстрирует флуоресценцию и содержит один или более чем один хромосомно интегрированный трансген или экспрессионную кассету, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС; и (б) скрещивание полученной радужной акулы со второй радужной акулой с получением трансгенной радужной акулы, содержащей трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1. Вторая радужная акула может быть трансгенной или нетрансгенной радужной акулой.

В других воплощениях также предложены способы получения трансгенного организма, включающие применение спермы, содержащей трансформацию оранжевой радужной акулы 1, причем такая сперма депонирована в ЕСАСС, с получением трансгенного потомства. Такое потомство может представлять собой, например, радужную акулу, вид семейства Cypriniformes, вид рода *Epalzeorhynchus*, вид или род рыбы, родственные радужной акуле, или другой вид или род рыб. В некоторых аспектах рыба может быть получена с использованием методик оплодотворения *in vitro*, известных в данной области или описанных здесь.

В по меньшей мере одном типичном воплощении предложена трансгенная радужная акула или ее потомство, содержащие события специфичной интеграции трансгена, называемые здесь трансформационными событиями. Данные рыбы представляют особый интерес, так как, например, они воплощают эстетически привлекательную пурпурную окраску. Трансгенная рыба, содержащая данные специфичные трансгенные события, может быть гомозиготной или гетерозиготной (включая, например, гемизиготную) в отношении трансформационного события. Гомозиготная рыба, скрещенная с рыбой, не имеющей трансформационного события, почти во всех случаях будет давать на 100% гетерозиготное потомство. Икринки, сперма и эмбрионы, содержащие данные специфичные трансгенные события, также включены как часть настоящего изобретения.

В одном таком воплощении, относящемся к событию специфичной интеграции трансгена, предложена пурпурная трансгенная радужная акула или ее потомство,

содержащая хромосомно интегрированные трансгены, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС. Хромосомно интегрированные трансгены могут присутствовать на одной интегрированной экспрессионной кассете или двух или более чем двух интегрированных экспрессионных кассетах. В некоторых аспектах такая трансгенная радужная акула представляет собой фертильную трансгенную радужную акулу. Такая трансгенная радужная акула может быть гомозиготной или гетерозиготной (включая, например, гемизиготную) в отношении трансгенов или интегрированной(ых) экспрессионной(ых) кассет(ы).

Также раскрыты способы предоставления трансгенной радужной акулы, содержащей трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1, на рынок декоративной рыбы. В некоторых воплощениях указанный способ включает получение трансгенной радужной акулы или ее потомства, содержащих хромосомно интегрированные трансгены, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС, и распространение указанной рыбы на рынке декоративной рыбы. Такую рыбу можно распространять от производителя к коммерческому дистрибьютеру, или такую рыбу можно распространять от производителя или коммерческого дистрибьютера к ритейлеру, такому как, например, мультипродуктовый ритейлер, имеющий отдел декоративной рыбы.

В некоторых аспектах предложены способы получения трансгенной радужной акулы, включающие: (а) получение радужной акулы, которая демонстрирует флуоресценцию и содержит один или более чем один хромосомно интегрированный трансген или экспрессионную кассету, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС; и (б) скрещивание полученной радужной акулы со второй радужной акулой с получением трансгенной радужной акулы, содержащей трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1. Вторая радужная акула может быть трансгенной или нетрансгенной радужной акулой.

В других воплощениях также предложены способы получения трансгенного организма, включающие применение спермы, содержащей трансформацию пурпурной

радужной акулы 1, причем такая сперма депонирована в ЕСАСС, с получением трансгенного потомства. Такое потомство может представлять собой, например, радужную акулу, вид семейства Cypriniformes, вид рода *Epalzeorhynchus*, вид или род рыбы, родственные радужной акуле, или другой вид или род рыбы. В некоторых аспектах рыба может быть получена с использованием методик оплодотворения *in vitro*, известных в данной области или описанных здесь.

В по меньшей мере одном типичном воплощении предложена трансгенная радужная акула или ее потомство, содержащие события специфичной интеграции трансгена, называемые здесь трансформационными событиями. Данные рыбы представляют особый интерес, так как они, например, воплощают эстетически привлекательную синюю окраску. Трансгенная рыба, содержащая данные специфичные трансгенные события, может быть гомозиготной или гетерозиготной (включая, например, гемизиготную) в отношении трансформационного события. Гомозиготная рыба, скрещенная с рыбой, не имеющей трансформационного события, почти во всех случаях будет давать на 100% гетерозиготное потомство. Икринки, сперма и эмбрионы, содержащие данные специфичные трансгенные события, также включены как часть данного изобретения.

В одном таком воплощении, относящемся к событию специфичной интеграции трансгена, предложена синяя трансгенная радужная акула или ее потомство, содержащие хромосомно интегрированные трансгены, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие синей радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие синей радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС. Хромосомно интегрированные трансгены могут присутствовать на одной интегрированной экспрессионной кассете или двух или более чем двух интегрированных экспрессионных кассетах. В некоторых аспектах такая трансгенная радужная акула представляет собой фертильную трансгенную радужную акулу. Такая трансгенная радужная акула может быть гомозиготной или гетерозиготной (включая, например, гемизиготную) в отношении трансгенов или интегрированной(ых) экспрессионной(ых) кассет(ы).

Также раскрыты способы предоставления трансгенной радужной акулы, содержащей трансформационное событие синей радужной акулы 1, на рынке декоративной рыбы. В некоторых воплощениях указанный способ включает получение трансгенной радужной акулы или ее потомства, содержащих хромосомно интегрированные трансгены, где указанная радужная акула содержит

«трансформационное событие синей радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие синей радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС, и распространение указанной рыбы на рынке декоративной рыбы. Такую рыбу можно распространять от производителя к коммерческому дистрибьютеру, или такую рыбу можно распространять от производителя или коммерческого дистрибьютера к ритейлеру, такому как, например, мультипродуктовый ритейлер, имеющий отдел декоративной рыбы.

В некоторых аспектах предлагаются способы получения трансгенной радужной акулы, включающие: (а) получение радужной акулы, которая демонстрирует флуоресценцию и содержит один или более чем один хромосомно интегрированный трансген или экспрессионную кассету, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие синей радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие синей радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС; и (б) скрещивание полученной радужной акулы со второй радужной акулой с получением трансгенной радужной акулы, содержащей трансформационное событие синей радужной акулы 1. Вторая радужная акула может быть трансгенной или нетрансгенной радужной акулой.

В других воплощениях также предложены способы получения трансгенного организма, включающие применение спермы, содержащей трансформацию синей радужной акулы 1, причем такая сперма депонирована в ЕСАСС, с получением трансгенного потомства. Такое потомство может представлять собой, например, радужную акулу, вид семейства Cypriniformes, вид рода *Epalzeorhynchus*, вид или род рыбы, родственные радужной акуле, или другой вид или род рыбы. В некоторых аспектах рыба может быть получена с использованием методик оплодотворения *in vitro*, известных в данной области или описанных здесь.

В по меньшей мере одном типичном воплощении предложена трансгенная радужная акула или ее потомство, содержащие события специфичной интеграции трансгена, называемые здесь трансформационными событиями. Данные рыбы представляют особый интерес, так как они, например, воплощают эстетически привлекательную синюю окраску. Трансгенная рыба, содержащая данные специфичные трансгенные события, может быть гомозиготной или гетерозиготной (включая, например, гемизиготную) в отношении трансформационного события. Гомозиготная рыба, скрещенная с рыбой, не имеющей трансформационного события, почти во всех случаях будет давать на 100% гетерозиготное потомство. Икринки, сперма и эмбрионы,

содержащие данные специфичные трансгенные события, также включены как часть данного изобретения.

В одном таком воплощении, относящемся к событию специфичной интеграции трансгена, предложена зеленая трансгенная радужная акула или ее потомство, содержащие хромосомно интегрированные трансгены, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие зеленой радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие зеленой радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС. Хромосомно интегрированные трансгены могут присутствовать на одной интегрированной экспрессионной кассете или двух или более чем двух интегрированных экспрессионных кассетах. В некоторых аспектах такая трансгенная радужная акула представляет собой фертильную трансгенную радужную акулу. Такая трансгенная радужная акула может быть гомозиготной или гетерозиготной (включая, например, гемизиготную) в отношении трансгенов или интегрированной(ых) экспрессионной(ых) кассет(ы).

Также раскрыты способы предоставления трансгенной радужной акулы, содержащей трансформационное событие зеленой радужной акулы 1, на рынок декоративной рыбы. В некоторых воплощениях указанный способ включает получение трансгенной радужной акулы или ее потомства, содержащих хромосомно интегрированные трансгены, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие зеленой радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие зеленой радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС, и распространение указанной рыбы на рынке декоративной рыбы. Такую рыбу можно распространять от производителя к коммерческому дистрибьютеру, или такую рыбу можно распространять от производителя или коммерческого дистрибьютера к ритейлеру, такому как, например, мультипродуктовый ритейлер, имеющий отдел декоративной рыбы.

В некоторых аспектах предлагаются способы получения трансгенной радужной акулы, включающие: (а) получение радужной акулы, которая демонстрирует флуоресценцию и содержит один или более чем один хромосомно интегрированный трансген или экспрессионную кассету, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие зеленой радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие зеленой радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС; и (б) скрещивание полученной радужной акулы со второй радужной акулой с получением трансгенной радужной акулы, содержащей трансформационное событие зеленой

радужной акулы 1. Вторая радужная акула может быть трансгенной или нетрансгенной радужной акулкой.

В других воплощениях также предложены способы получения трансгенного организма, включающие применение спермы, содержащей трансформацию зеленой радужной акулы 1, причем такая сперма депонирована в ЕСАСС, с получением трансгенного потомства. Такое потомство может представлять собой, например, радужную акулу, вид семейства Cypriniformes, вид рода Epalzeorhynchos, вид или род рыбы, родственные радужной акуле, или другой вид или род рыбы. В некоторых аспектах рыба может быть получена с использованием методик оплодотворения *in vitro*, известных в данной области или описанных здесь.

Термин в единственном числе в том виде, в котором он используется в данном описании изобретения, может означать один или более чем один. Термины в единственном числе в том виде, в котором они используются здесь в формуле изобретения, при использовании в сочетании со словом «содержащий», могут означать один или более чем один.

Применение термина «или» в формуле изобретения используется для обозначения «и/или», если прямо не указано, что он относится только к альтернативам, или что альтернативы являются взаимоисключающими, хотя данное раскрытие поддерживает определение, которое относится только к альтернативам и «и/или». Термин «другой» в том виде, в котором он здесь используется, может означать по меньшей мере второй или больше, чем второй.

Во всей данной заявке термин «примерно» используется для указания того, что значение включает варьирование ошибки, присущее устройству, способу для определения данного значения или варьирование, которое существует среди исследуемых субъектов. Любое воплощение любого из настоящих способов, наборов и композиций может состоять или по существу состоит – скорее, чем содержит/включает/имеет – из описанных характеристик и/или стадий.

Таким образом, в любом из пунктов формулы изобретения термин «состоящий из» или «по существу состоящий из» может быть заменен любым из неограничивающих связывающих глаголов, перечисленных выше, для того, чтобы изменить объем данного пункта формулы от того, в котором в противном случае использовался бы неограничивающий связывающий глагол. Другие задачи, признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного описания. Однако следует понимать то, что подробное описание и конкретные примеры, при

указании предпочтительных воплощений изобретения, приводятся лишь в качестве иллюстрации, так как разные изменения и модификации, находящиеся в пределах сущности и объема изобретения, станут очевидными специалистам в данной области из данного подробного описания.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Трансгенная рыба

В некоторых аспектах настоящее описание касается трансгенной рыбы. Способы получения трансгенной рыбы описаны, например, в патентах США № 7135613; 7700825; 7834239, каждый из которых включен посредством ссылки во всей его полноте. Например, трансгенная оранжевая радужная акула может быть получена с использованием экспрессионной кассеты, кодирующей желтый флуоресцентный белок (YFP), такой как TurboYFP – усиленный вариант желтого флуоресцентного белка PhiYFP из медузы вида *Phialidium* (Shagin et al., 2004). В других примерах трансгенная пурпурная радужная акула может быть получена с использованием экспрессионной кассеты, кодирующей пурпурный флуоресцентный белок (PFP). В других примерах трансгенная синяя радужная акула может быть получена с использованием экспрессионной кассеты, кодирующей синий флуоресцентный белок (BFP), такой как TagBFP, или TagBFP в комбинации с нефлуоресцентным синим хромопротеином. В других примерах трансгенная зеленая радужная акула может быть получена с использованием экспрессионной кассеты, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP), такой как zsGreen1.

Предпочтительно использовать рыбу, принадлежащую к видам и разновидностям рыбы, имеющей коммерческую ценность, в частности, коммерческую ценность в индустрии декоративной рыбы. Такая рыба включает следующих: сом, полосатый данио и другие данио, оризия, карп, тилапия, карась серебряный, харациновые, барбусы, акулы (семейство *Surginidae*, как, например, радужная акула), рыба-ангел, голец, кои, стеклянный окунь, дискус, угорь, бычок, гурами, гуппи, *Xiphophorus*, клинобрюшка, моллинезия или пангасиус, но не ограничивается ими. Конкретная рыба для применения в контексте настоящего раскрытия представляет собой радужную акулу – *Epalzeorhynchus frenatum*. Радужная акула представляет собой все более и более популярное декоративное животное, и она имела бы дополнительную коммерческую ценность в разных цветах. Эмбрионы радужной акулы являются легко доступными и почти прозрачными. Цвет кожи радужной акулы определяется пигментными клетками в коже, которые содержат

пигментные гранулы, называемые меланосомами. Число, размер и плотность меланосом на пигментную клетку влияют на цвет кожи рыбы.

Оплодотворение in vitro

В коммерческой аквакультуре радужные акулы, включая оранжевых, пурпурных, синих и зеленых радужных акул, не нерестятся естественным образом, но нерестятся in vitro с использованием того же самого, проверенного временем способа промышленного стандарта, который использовали для репродукции их нефлуоресцентных аналогов в течение последних нескольких десятилетий. В то же время радужные акулы являются идеальными кандидатами для гормонального индуцирования, так как они являются достаточно крупными для того, чтобы быть легкими в обращении и оплодотворении, с самками, продуцирующими существенное количество икринок на нерест. В общем, радужные акулы являются животными с ограниченным периодом спаривания и легче всего могут нереститься приблизительно с мая до октября. Достижение сексуальной зрелости у радужных акул занимает ориентировочно один год. Однолетние самки могут высвободить вплоть до одной тысячи икринок на нерест, тогда как старшие самки могут высвободить вплоть до 10000 икринок на нерест при хорошей подготовке для воспроизводства. Самки могут икриться один или два раза за сезон. Самцы могут нереститься вплоть до двух или трех раз в месяц. Чаще всего используемый гормон для индуцирования овуляции, который был одобрен FDA (Федеральное агентство США по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств) для применения с декоративной рыбой, называется оваприм. Он содержит аналог гонадолиберина лососевых и антагонист дофамина. Оваприм дает согласующиеся результаты, является легким в дозировании, и он является широко доступным в продаже. Информация по воспроизводству промышленного стандарта для данного вида (и для флуоресцентного, и для нефлуоресцентного фенотипа) следует ниже, однако точные подробности могут слегка варьировать у разных производителей.

Маточное стадо акул можно содержать в емкостях в помещении, предпочтительно с объемом по меньшей мере 1136 л, но типично их доводят до кондиции вне помещений в грунтовых прудах. При достижении кондиции для воспроизводства радужных акул перемещают из находящихся вне помещений земляных прудов в большие, находящиеся в помещениях ванны для содержания. Для воспроизводства доведенное до кондиции маточное стадо удаляют из ванны для содержания и помещают в воду, содержащую седативное средство, такое как трикаин, которое одобрено FDA для данного типа применения. Рыба считается адекватно усыпленной, когда она переворачивается. В это

время рассматриваемую рыбу удаляют из воды, содержащей седативное средство, взвешивают и подвергают инъекции оваприма. Самцы также могут получать инъекцию оваприма для индуцирования выработки спермы. Овуляция у самок обычно будет начинаться примерно через семь часов после инъекции; как только начинается овуляция, икринки будут свободно вытекать при легком сдавливании рыбы. Для подготовки для оплодотворения *in vitro* икринки затем следует наносить полосами в сухую чашу. Несколько капель спермы от самцов радужной акулы следует аналогичным образом наносить полосами в ту же самую чашу. Совместное перемешивание икринок и спермы с 0,5 мл (приблизительно 10 капель) воды начнет процесс оплодотворения. Через 20 секунд следует добавить еще 2 мл воды. Данный процесс будет вызывать оплодотворение икринок в пределах приблизительно 30 секунд. Сразу после оплодотворения икринки можно помещать в банки для инкубирования икры типа банок Макдональда. Икринки будут набухать и становиться плавучими в течение первых 30 минут, таким образом, ток в банках для инкубирования должен быть откорректирован, чтобы быть исходно таким слабым, как только возможно, чтобы избегать потери икринок. Ток следует часто проверять и корректировать по мере необходимости. Мальков следует кормить только что выведенными науплиусами *Artemia* на вторые сутки после выведения, и их следует продолжать кормить *Artemia* в течение одной недели. С этого момента можно начинать их перевод на приготовленную диету, перекрывающуюся с живым кормом в течение 5 суток. Через две недели после выведения мальков можно перемещать в ванны и/или пруды для непрерывного роста до зрелости.

Оплодотворение от замороженной спермы

Способы замораживания рыбьей спермы хорошо известны в данной области; см., например, источники Walker and Streisinger (1983) и Draper and Moens (2007), оба из которых включены сюда посредством ссылки во всей их полноте. Для получения раскрытой здесь трансгенной рыбы, для оплодотворения икры можно использовать замороженную сперму радужной акулы.

В по меньшей мере одном способе доведенных до кондиции самок удаляют из ванны для содержания и помещают в воду, содержащую седативное средство, такое как трикаин, которое одобрено FDA для данного типа применения. Рыба считается адекватно усыпленной, когда она переверачивается. Сразу после усыпления рассматриваемую рыбу удаляют из воды, содержащей седативное средство, взвешивают и подвергают инъекции оваприма. Овуляция у самок, подвергнутых инъекции, обычно будет начинаться примерно через семь часов после инъекции; как только начинается овуляция, икринки

будут свободно вытекать при легком сдавливании рыбы. Для подготовки для оплодотворения *in vitro* икринки затем следует наносить полосами в сухую чашу. Можно объединять икринки от нескольких самок; данные икринки можно сохранять неоплодотворенными в течение нескольких минут. Замороженную сперму оттаивают при 33°C в водной бане в течение 18-20 секунд. Сразу после оттаивания спермы в сосуд добавляют 70 мкл раствора Хэнкса комнатной температуры и производят перемешивание. Затем сперму немедленно добавляют к икринкам и производят легкое перемешивание. Совместное перемешивание икринок и спермы с 0,5 мл (приблизительно 10 капель) воды начнет процесс оплодотворения. Через 20 секунд следует добавить еще 2 мл воды. Данный процесс будет вызывать оплодотворение икринок в пределах приблизительно 30 секунд. Сразу после оплодотворения икринки можно помещать в банки для инкубирования икры типа банок Макдональда. Икринки будут набухать и становиться плавучими в течение первых 30 минут, таким образом, ток в банках для инкубирования должен быть откорректирован, чтобы быть исходно таким слабым, как только возможно, чтобы избежать потери икринок. Ток следует часто проверять и корректировать по мере необходимости. Мальков следует кормить только что выведенными науплиусами *Artemia* на вторые сутки после выведения, и их следует продолжать кормить *Artemia* в течение одной недели. Через одну неделю после выведения можно начинать перевод мальков на приготовленную диету, перекрывающуюся с живым кормом в течение 5 суток. Через две недели после выведения мальков можно перемещать в ванны и/или пруды для непрерывного роста до зрелости. В Parichy and Johnson, 2001, которая включена посредством ссылки во всей ее полноте, предложены дополнительные примеры относительно оплодотворения *in vitro*.

Настоящее раскрытие дополнительно охватывает потомство трансгенной рыбы, содержащей трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1, а также такую трансгенную рыбу, полученную из икры трансгенной рыбы, клетки спермы, эмбриона или другой клетки, содержащей интегрированную в геном трансгенную конструкцию. «Потомство», в том виде, в котором здесь используется данный термин, может возникать в результате скрещивания двух трансгенных рыб по изобретению или в результате скрещивания первой трансгенной рыбы по изобретению со второй рыбой, которая не является трансгенной рыбой по изобретению. В последнем случае вторая рыба может, например, представлять собой рыбу дикого типа, специализированную линию рыбы, мутантную рыбу или другую трансгенную рыбу. Вторая рыба может принадлежать к тому же виду или может быть другого вида или рода. Гибридное потомство от этих спариваний

имеет преимущества трансгена в отношении флуоресценции в сочетании с преимуществами, полученными от данных других линий.

Самым простым способом идентификации рыбы, содержащей трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1, является визуальная проверка, так как рассматриваемая рыба была бы оранжевого цвета и была бы немедленно отличимой от нетрансгенной рыбы.

Настоящее раскрытие дополнительно охватывает потомство трансгенной рыбы, содержащей трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1, а также такую трансгенную рыбу, полученную из икры трансгенной рыбы, клетки спермы, эмбриона или другой клетки, содержащей интегрированную в геном трансгенную конструкцию. «Потомство», в том виде, в котором здесь используется данный термин, может возникать в результате скрещивания двух трансгенных рыб по изобретению или в результате скрещивания первой трансгенной рыбы по изобретению со второй рыбой, которая не является трансгенной рыбой по изобретению. В последнем случае вторая рыба может, например, представлять собой рыбу дикого типа, специализированную линию рыбы, мутантную рыбу или другую трансгенную рыбу. Вторая рыба может принадлежать к тому же виду или может быть другого вида или рода. Гибридное потомство от этих спариваний имеет преимущества трансгена в отношении флуоресценции в сочетании с преимуществами, полученными от данных других линий.

Самым простым способом идентификации рыбы, содержащей трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1, является визуальная проверка, так как рассматриваемая рыба была бы пурпурного цвета и была бы немедленно отличимой от нетрансгенной рыбы.

Настоящее раскрытие дополнительно охватывает потомство трансгенной рыбы, содержащей трансформационное событие синей радужной акулы 1, а также такую трансгенную рыбу, полученную из трансгенной икры рыбы, клетки спермы, эмбриона или другой клетки, содержащей интегрированную в геном трансгенную конструкцию. «Потомство», в том виде, в котором здесь используется данный термин, может возникать в результате скрещивания двух трансгенных рыб по изобретению или в результате скрещивания первой трансгенной рыбы по изобретению со второй рыбой, которая не является трансгенной рыбой по изобретению. В последнем случае вторая рыба может, например, представлять собой рыбу дикого типа, специализированную линию рыбы, мутантную рыбу или другую трансгенную рыбу. Вторая рыба может принадлежать к тому же виду или может быть другого вида или рода. Гибридное потомство от этих спариваний

имеет преимущества трансгена в отношении флуоресценции в сочетании с преимуществами, полученными от данных других линий.

Самым простым способом идентификации рыбы, содержащей трансформационное событие синей радужной акулы 1, является визуальная проверка, так как рассматриваемая рыба была бы синего цвета и была бы немедленно отличимой от нетрансгенной рыбы.

Настоящее раскрытие дополнительно охватывает потомство трансгенной рыбы, содержащей трансформационное событие зеленой радужной акулы 1, а также такую трансгенную рыбу, полученную из трансгенной икры рыбы, клетки спермы, эмбриона или другой клетки, содержащей интегрированную в геном трансгенную конструкцию. «Потомство», в том виде, в котором здесь используется данный термин, может возникать в результате скрещивания двух трансгенных рыб по изобретению или в результате скрещивания первой трансгенной рыбы по изобретению со второй рыбой, которая не является трансгенной рыбой по изобретению. В последнем случае вторая рыба может, например, представлять собой рыбу дикого типа, специализированную линию рыбы, мутантную рыбу или другую трансгенную рыбу. Вторая рыба может принадлежать к тому же виду или может быть другого вида или рода. Гибридное потомство от этих спариваний имеет преимущества трансгена в отношении флуоресценции в сочетании с преимуществами, полученными от данных других линий.

Самым простым способом идентификации рыбы, содержащей трансформационное событие зеленой радужной акулы 1, является визуальная проверка, так как рассматриваемая рыба была бы зеленого цвета и была бы немедленно отличимой от нетрансгенной рыбы.

ПРИМЕРЫ

Некоторые воплощения данного изобретения дополнительно описаны со ссылкой на следующие примеры. Данные примеры предназначены для того, чтобы просто иллюстрировать изобретение и не предназначены для ограничения или сужения объема настоящего изобретения каким-либо образом, и не должны истолковываться как предлагающие условия, параметры, реактивы или исходные вещества, которые должны использоваться исключительно для того, чтобы воплощать на практике настоящее изобретение.

Пример 1 – оранжевая трансгенная радужная акула

Предложена трансгенная рыба, демонстрирующая оранжевую окраску. Специфические трансгенные события, воплощенные в данных рыбах, обозначены как «трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1». Сперму от данных рыб

можно использовать для оплодотворения икринок радужной акулы и, посредством этого, воспроизводить трансгенную радужную акулу, которая содержит данные события специфичной интеграции трансгена. Сперма от данной линии была депонирована в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC), Public Health England, CRYOSTORES, Bld. 17, Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, Великобритания, в соответствии с Будапештским соглашением как «Оранжевая радужная акула 1».

Пример 2 – пурпурная трансгенная радужная акула

Предложена трансгенная рыба, демонстрирующая пурпурную окраску. Специфические трансгенные события, воплощенные в данных рыбах, обозначены как «трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1». Сперму от данных рыб можно использовать для оплодотворения икринок радужной акулы и, посредством этого, воспроизводить трансгенную радужную акулу, которая содержит данные события специфичной интеграции трансгена. Сперма от данной линии была депонирована в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC), Public Health England, CRYOSTORES, Bld. 17, Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, Великобритания, в соответствии с Будапештским соглашением как «Пурпурная радужная акула 1».

Пример 3 – синяя трансгенная радужная акула

Предложена трансгенная рыба, демонстрирующая синюю окраску. Специфические трансгенные события, воплощенные в данных рыбах, обозначены как «трансформационное событие синей радужной акулы 1». Сперму от данных рыб можно использовать для оплодотворения икринок радужной акулы и, посредством этого, воспроизводить трансгенную радужную акулу, которая содержит данные события специфичной интеграции трансгена. Сперма от данной линии была депонирована в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC), Public Health England, CRYOSTORES, Bld. 17, Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, Великобритания, в соответствии с Будапештским соглашением как «Синяя радужная акула 1».

Пример 4 – зеленая трансгенная радужная акула

Предложена трансгенная рыба, демонстрирующая зеленую окраску. Специфические трансгенные события, воплощенные в данных рыбах, обозначены как «трансформационное событие зеленой радужной акулы 1». Сперму от данных рыб можно использовать для оплодотворения икринок радужной акулы и, посредством этого, воспроизводить трансгенную радужную акулу, которая содержит данные события специфичной интеграции трансгена. Сперма от данной линии была депонирована в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC), Public Health England,

CRYOSTORES, Bld. 17, Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, Великобритания, в соответствии с Будапештским соглашением как «Зеленая радужная акула 1».

Флуоресцентная трансгенная рыба имеет применение на рынке как декоративная рыба. Стабильно экспрессирующие трансгенные линии могут быть разработаны посредством скрещивания трансгенного индивида с рыбой дикого типа, мутантной рыбой или другой трансгенной рыбой. Желательная трансгенная рыба может быть отличена от нетрансгенной рыбы путем наблюдения рыбы в белом свете, солнечном свете, ультрафиолетовом свете, синем свете или любых других полезных условиях освещения, которые обеспечивают визуализацию оранжевой, пурпурной, зеленой или синей окраски трансгенной рыбы.

Флуоресцентная трансгенная рыба также должна быть ценной на рынке в качестве научных исследовательских средств, так как их можно использовать для эмбриональных исследований, таких как отслеживание клеточной линии и миграции клеток. Кроме того, данных рыб можно использовать для маркирования клеток в генетических мозаичных экспериментах и в рыбных моделях рака.

Все композиции и/или способы, раскрытые и заявленные здесь, можно получать и осуществлять без чрезмерного экспериментирования в свете настоящего описания. В то время как композиции и способы по данному изобретению были описаны в терминах предпочтительных воплощений, для специалистов в данной области будет очевидно то, что могут применяться изменения в отношении композиций и/или способов, и в стадиях или в последовательности стадий описанных здесь способов без отступления от идеи, сущности и объема данного изобретения. Более конкретно, будет очевидным то, что некоторыми агентами, которые являются и химически, и физиологически родственными, могут быть заменены описанные здесь агенты при достижении таких же или аналогичных результатов. Все такие аналогичные заместители и модификации, очевидные специалистам в данной области, считаются находящимися в пределах сущности, объема и идеи изобретения, как определено приложенной формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Трансгенная радужная акула, содержащая хромосомно интегрированную экспрессионную кассету, кодирующую флуоресцентный белок, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС (Европейская коллекция клеточных культур).

2. Трансгенная радужная акула по п. 1, дополнительно определенная как фертильная трансгенная радужная акула.

3. Трансгенная радужная акула по п. 1, где указанная рыба является гомозиготной в отношении интегрированной экспрессионной кассеты.

4. Трансгенная радужная акула по п. 1, где указанная рыба является гетерозиготной в отношении интегрированной экспрессионной кассеты.

5. Способ предоставления трансгенной радужной акулы на рынок декоративной рыбы, включающий получение трансгенной радужной акулы по п. 1 и распространение указанной рыбы на рынке декоративной рыбы.

6. Способ по п. 5, где рыбу распространяют от производителя к коммерческому дистрибьютеру.

7. Способ по п. 5, где рыбу распространяют от производителя или коммерческого дистрибьютера к ритейлеру.

8. Способ по п. 7, где ритейлер представляет собой мультипродуктового ритейлера, имеющего отдел декоративной рыбы.

9. Способ получения трансгенной радужной акулы, включающий:

(а) получение радужной акулы, которая содержит хромосомно интегрированную экспрессионную кассету, кодирующую флуоресцентный белок, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС; и

(б) скрещивание полученной радужной акулы со второй радужной акулой с получением трансгенной радужной акулы, содержащей трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1.

10. Способ по п. 9, где вторая радужная акула представляет собой нетрансгенную радужную акулу.

11. Потомство трансгенной радужной акулы по п. 1, которое содержит хромосомно интегрированную экспрессионную кассету, кодирующую флуоресцентный белок, где

указанная радужная акула и потомство демонстрируют флуоресценцию и содержат «трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС.

12. Потомство рыбы по п. 11, дополнительно определенное как фертильная трансгенная радужная акула.

13. Потомство рыбы по п. 11, где указанная рыба является гомозиготной в отношении интегрированной экспрессионной кассеты.

14. Потомство рыбы по п. 11, где указанная рыба является гетерозиготной в отношении интегрированной экспрессионной кассеты.

15. Способ предоставления трансгенной рыбы на рынок декоративной рыбы, включающий получение потомства рыбы по п. 11 и распространение указанной рыбы на рынке декоративной рыбы.

16. Способ по п. 15, где рыбу распространяют от производителя к коммерческому дистрибьютеру.

17. Способ по п. 16, где рыбу распространяют от производителя или коммерческого дистрибьютера к ритейлеру.

18. Способ по п. 17, где ритейлер представляет собой мультипродуктового ритейлера, имеющего отдел декоративной рыбы.

19. Способ получения трансгенной рыбы, включающий:

(а) получение трансгенной рыбы по п. 11; и

(б) скрещивание полученной рыбы со второй рыбой с получением трансгенной рыбы, содержащей трансформационное событие оранжевой радужной акулы 1.

20. Способ по п. 19, где вторая рыба представляет собой нетрансгенную рыбу.

21. Трансгенная радужная акула, содержащая хромосомно интегрированную экспрессионную кассету, кодирующую флуоресцентный белок, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС.

22. Трансгенная радужная акула по п. 21, дополнительно определенная как фертильная трансгенная радужная акула.

23. Трансгенная радужная акула по п. 21, где указанная рыба является гомозиготной в отношении интегрированной экспрессионной кассеты.

24. Трансгенная радужная акула по п. 21, где указанная рыба является

гетерозиготной в отношении интегрированной экспрессионной кассеты.

25. Способ предоставления трансгенной радужной акулы на рынок декоративной рыбы, включающий получение трансгенной радужной акулы по п. 21 и распространение указанной рыбы на рынке декоративной рыбы.

26. Способ по п. 25, где рыбу распространяют от производителя к коммерческому дистрибьютеру.

27. Способ по п. 25, где рыбу распространяют от производителя или коммерческого дистрибьютера к ритейлеру.

28. Способ по п. 27, где ритейлер представляет собой мультипродуктового ритейлера, имеющего отдел декоративной рыбы.

29. Способ получения трансгенной радужной акулы, включающий:

(а) получение радужной акулы, которая содержит хромосомно интегрированную экспрессионную кассету, кодирующую флуоресцентный белок, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС; и

(б) скрещивание полученной радужной акулы со второй радужной акулой с получением трансгенной радужной акулы, содержащей трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1.

30. Способ по п. 29, где вторая радужная акула представляет собой нетрансгенную радужную акулу.

31. Потомство трансгенной радужной акулы по п. 21, которое содержит хромосомно интегрированную экспрессионную кассету, кодирующую флуоресцентный белок, где указанная радужная акула и потомство демонстрируют флуоресценцию и содержат «трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС.

32. Потомство рыбы по п. 31, дополнительно определенное как фертильная трансгенная радужная акула.

33. Потомство рыбы по п. 31, где указанная рыба является гомозиготной в отношении интегрированной экспрессионной кассеты.

34. Потомство рыбы по п. 31, где указанная рыба является гетерозиготной в отношении интегрированной экспрессионной кассеты.

35. Способ предоставления трансгенной рыбы на рынок декоративной рыбы,

включающий получение потомства рыбы согласно п. 34 и распространение указанной рыбы на рынке декоративной рыбы.

36. Способ по п. 35, где рыбу распространяют от производителя к коммерческому дистрибьютеру.

37. Способ по п. 35, где рыбу распространяют от производителя или коммерческого дистрибьютера к ритейлеру.

38. Способ по п. 37, где ритейлер представляет собой мультипродуктового ритейлера, имеющего отдел декоративной рыбы.

39. Способ получения трансгенной рыбы, включающий:

(а) получение трансгенной рыбы по п. 31; и

(б) скрещивание полученной рыбы со второй рыбой с получением трансгенной рыбы, содержащей трансформационное событие пурпурной радужной акулы 1.

40. Способ по п. 39, где вторая рыба представляет собой нетрансгенную рыбу.

41. Трансгенная радужная акула, содержащая хромосомно интегрированную экспрессионную кассету, кодирующую флуоресцентный белок, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие синей радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие синей радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС.

42. Трансгенная радужная акула по п. 41, дополнительно определенная как фертильная трансгенная радужная акула.

43. Трансгенная радужная акула по п. 41, где указанная рыба является гомозиготной в отношении интегрированной экспрессионной кассеты.

44. Трансгенная радужная акула по п. 41, где указанная рыба является гетерозиготной в отношении интегрированной экспрессионной кассеты.

45. Способ предоставления трансгенной радужной акулы на рынок декоративной рыбы, включающий получение трансгенной радужной акулы по п. 41 и распространение указанной рыбы на рынке декоративной рыбы.

46. Способ по п. 45, где рыбу распространяют от производителя к коммерческому дистрибьютеру.

47. Способ по п. 45, где рыбу распространяют от производителя или коммерческого дистрибьютера к ритейлеру.

48. Способ по п. 47, где ритейлер представляет собой мультипродуктового ритейлера, имеющего отдел декоративной рыбы.

49. Способ получения трансгенной радужной акулы, включающий:

(а) получение радужной акулы, которая содержит хромосомно интегрированную экспрессионную кассету, кодирующую флуоресцентный белок, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие синей радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие синей радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС; и

(б) скрещивание полученной радужной акулы со второй радужной акулой с получением трансгенной радужной акулы, содержащей трансформационное событие синей радужной акулы 1.

50. Способ по п. 49, где вторая радужная акула представляет собой нетрансгенную радужную акулу.

51. Потомство трансгенной радужной акулы по п. 41, которое содержит хромосомно интегрированную экспрессионную кассету, кодирующую флуоресцентный белок, где указанная радужная акула и потомство демонстрируют флуоресценцию и содержат «трансформационное событие синей радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие синей радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС.

52. Потомство рыбы по п. 51, дополнительно определенное как фертильная трансгенная радужная акула.

53. Потомство рыбы по п. 51, где указанная рыба является гомозиготной в отношении интегрированной экспрессионной кассеты.

54. Потомство рыбы по п. 51, где указанная рыба является гетерозиготной в отношении интегрированной экспрессионной кассеты.

55. Способ предоставления трансгенной рыбы на рынок декоративной рыбы, включающий получение потомства рыбы согласно п. 51 и распространение указанной рыбы на рынке декоративной рыбы.

56. Способ по п. 55, где рыбу распространяют от производителя к коммерческому дистрибьютеру.

57. Способ по п. 56, где рыбу распространяют от производителя или коммерческого дистрибьютера к ритейлеру.

58. Способ по п. 57, где ритейлер представляет собой мультипродуктового ритейлера, имеющего отдел декоративной рыбы.

59. Способ получения трансгенной рыбы, включающий:

(а) получение трансгенной рыбы по п. 51; и

(б) скрещивание полученной рыбы со второй рыбой с получением трансгенной

рыбы, содержащей трансформационное событие синей радужной акулы 1.

60. Способ по п. 59, где вторая рыба представляет собой нетрансгенную рыбу.

61. Трансгенная радужная акула, содержащая хромосомно интегрированную экспрессионную кассету, кодирующую флуоресцентный белок, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие зеленой радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие зеленой радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС.

62. Трансгенная радужная акула по п. 61, дополнительно определенная как фертильная трансгенная радужная акула.

63. Трансгенная радужная акула по п. 61, где указанная рыба является гомозиготной в отношении интегрированной экспрессионной кассеты.

64. Трансгенная радужная акула по п. 61, где указанная рыба является гетерозиготной в отношении интегрированной экспрессионной кассеты.

65. Способ предоставления трансгенной радужной акулы на рынок декоративной рыбы, включающий получение трансгенной радужной акулы по п. 61 и распространение указанной рыбы на рынке декоративной рыбы.

66. Способ по п. 65, где рыбу распространяют от производителя к коммерческому дистрибьютеру.

67. Способ по п. 65, где рыбу распространяют от производителя или коммерческого дистрибьютера к ритейлеру.

68. Способ по п. 67, где ритейлер представляет собой мультипродуктового ритейлера, имеющего отдел декоративной рыбы.

69. Способ получения трансгенной радужной акулы, включающий:

(а) получение радужной акулы, которая содержит хромосомно интегрированную экспрессионную кассету, кодирующую флуоресцентный белок, где указанная радужная акула содержит «трансформационное событие зеленой радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие зеленой радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС; и

(б) скрещивание полученной радужной акулы со второй радужной акулой с получением трансгенной радужной акулы, содержащей трансформационное событие зеленой радужной акулы 1.

70. Способ по п. 69, где вторая радужная акула представляет собой нетрансгенную радужную акулу.

71. Потомство трансгенной радужной акулы по п. 61, которое содержит

хромосомно интегрированную экспрессионную кассету, кодирующую флуоресцентный белок, где указанная радужная акула и потомство демонстрируют флуоресценцию и содержат «трансформационное событие зеленой радужной акулы 1», причем сперма, содержащая трансформационное событие зеленой радужной акулы 1, депонирована в ЕСАСС.

72. Потомство рыбы по п. 71, дополнительно определенное как фертильная трансгенная радужная акула.

73. Потомство рыбы по п. 71, где указанная рыба является гомозиготной в отношении интегрированной экспрессионной кассеты.

74. Потомство рыбы по п. 71, где указанная рыба является гетерозиготной в отношении интегрированной экспрессионной кассеты.

75. Способ предоставления трансгенной рыбы на рынок декоративной рыбы, включающий получение потомства рыбы согласно п. 71 и распространение указанной рыбы на рынке декоративной рыбы.

76. Способ по п. 75, где рыбу распространяют от производителя к коммерческому дистрибьютеру.

77. Способ по п. 76, где рыбу распространяют от производителя или коммерческого дистрибьютера к ритейлеру.

78. Способ по п. 77, где ритейлер представляет собой мультипродуктового ритейлера, имеющего отдел декоративной рыбы.

79. Способ получения трансгенной рыбы, включающий:

(а) получение трансгенной рыбы по п. 71; и

(б) скрещивание полученной рыбы со второй рыбой с получением трансгенной рыбы, содержащей трансформационное событие зеленой радужной акулы 1.

80. Способ по п. 79, где вторая рыба представляет собой нетрансгенную рыбу.