

12. Зубко М. К., Зубко Е. И., Капранов Ф. В. Индукция хлорофиллдефектных мутантов табака — маркеров для клеточной инженерии // Биополимеры и клетка. — 1991. — 7, № 4. — С. 72—79.
13. Vlatak J. Effect of different desintegration techniques and media on yield appearance of isolation nuclei // Biol. plant. — 1981. — 23, N 6. — P. 406—413.
14. Манцатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 479 с.
15. Improved hybridization conditions for DNA «fingerprints» probed with M13 / D. F. Westneat, W. A. Noon, H. K. Reeve, C. F. Aquadro // Nucl. Acids Res. — 1988. — 16, N 9. — P. 4161.

Ин-т молекуляр. біології і генетики
АН України, Київ
Ин-т клітин. біології і генет. інженерії
АН України, Київ

Одержано 30.07.91

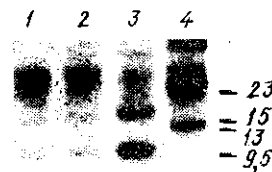
УДК 578.52

О. І. Ніколаєв, Т. Т. Чконія, К. А. Еріставі-Кафіані, В. З. Тарантул

АНАЛІЗ «ВРЯТОВАНОЇ» ПЛАЗМІДИ З ТРАНСГЕННОГО ТУТОВОГО ШОВКОПРЯДУ

За допомогою оригінальної методики мікроін'єкцій ДНК до гени тutowого шовкопряду отримано трансгенні особини. З сумарної ДНК F₂-нащадків цих тварин «врятовано» плазмиду (p_ga), котра відрізнялася за своєю структурою від перенесеної плазмиди p1.5LTR і спадкувалася позахромосомно. У складі плазмиди p_ga виявлено повторювані послідовності ДНК тutowого шовкопряду, які є еволюційно консервативними.

Вступ. При трансгенезі у тварин екзогенна ДНК частіш за все інтегрує з ядерним геном [1, 2], хоча може існувати й у екстрахромосомній формі [3, 4]. На моделі тutowого шовкопряду раніш вперше було показано, що при перенесенні плазмід шляхом мікроін'єкцій до гени вони як у першому поколінні дорослих комах (F₀), так і у наступних (F₁ і F₂) є присутніми головним чином поза хромосомною ДНК [5, 6]. Для дослідження механізму перенесення та екстрахромосомного наслідування трансгену було здійснено його клонування за допомогою метода «врятування» плазмиди [3]. У цьому повідомленні наведено дані про молекулярний аналіз однієї з «врятованих» рекомбінантних плазмід, яку отримано за трансформації клітин *Escherichia coli* ДНК з F₂-покоління трансгенного тutowого шовкопряду.



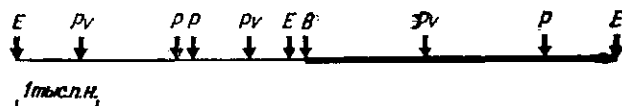
Мал. 1. Блот-гібридизація міченої p1.5LTR з нерестриційованою сумарною ДНК, виділеною з трансгенного тutowого шовкопряду № 4 (F₀-покоління) (4) та його F₂-нащадків № 8a (1), № 16a (2) і № 166 (3)

Матеріали і методи. До гени тutowого шовкопряду за допомогою оригінальної методики мікроін'єкцій [6, 7] переносили рекомбінантну плазмиду p1.5LTR, яка містить BamHI/EcoRI-фрагмент плазмиди pBR322 (3,9 тис. п. н.) та півтора довгих кінцевих повтора (LTR) вірусу саркоми Рауса (RSV) [8]. Схрещування метеликів, виділення ДНК та блот-гібридизацію провадили так, як описано раніше [7].

Результати і обговорення. За допомогою блот-гібридизації сумарної нерестриційованої ДНК з трансгенного шовкопряду № 4 з міченою плазмидою p1.5LTR встановлено, що у цій комасі (самець) міститься декілька екстрахромосомних ДНК, які відрізняються за розмі-

ром і мають гомологію з *p1.5LTR* (мал. 1, доріжка 4). З ДНК усіх трансгенних F_2 -нащадків цієї комах картина блот-гібридизації була однаковою (мал. 1, доріжки 1—3), але відрізнялася від тієї, яка мала місце у батьківської особини. Таким чином, трансген є присутнім як у F_0 - так і у F_2 -поколіннях комах у екстрахромосомній формі, структура якої перебудовується у процесі передавання у спадок [6].

Сумарну ДНК, виділену з метеликів F_2 -покоління (№№ 8а, 16а і 16б), без рестрикції використовували для трансформації компетентних клітин *E. coli* (штам JM101) [9]. Внаслідок отримано біля двох



Мал. 2. Рестрикційна карта врятованої плазмиди *pr8a*. Жирна риска — *pBR322*; тонка риска — клітинна ДНК; P — *PstI*; Pv — *PvuII*; E — *EcoRI*; B — *BamHI*

десятків стійких до ампіциліну колоній, які містили плазмідну ДНК. Усі врятовані плазмиди виявилися ідентичними за молекулярною масою і картиною рестрикції. З двох видів молекул екстрахромосомної ДНК, які виявлено у нерестриційованій сумарній ДНК трансгенних комах (мал. 1, доріжки 1—3), певно, лише менша за розміром несе *Ori* реплікації, а також сайт стійкості до ампіциліну (*Amp^r*) плазмиди *E. coli*. У подальших експериментах використовували одну з цих плазмід — *pr8a*. Рестрикційний та гібридизаційний аналізи виявили, що плазмиди *pr8a*, як і усі інші врятовані плазмиди, містить цілком *BamHI/EcoRI*-фрагмент, котрий був присутнім у ін'єційованій плазмиді *p1.5LTR*, але в ній, за цими даними, відсутні вірусні послідовності (мал. 2).

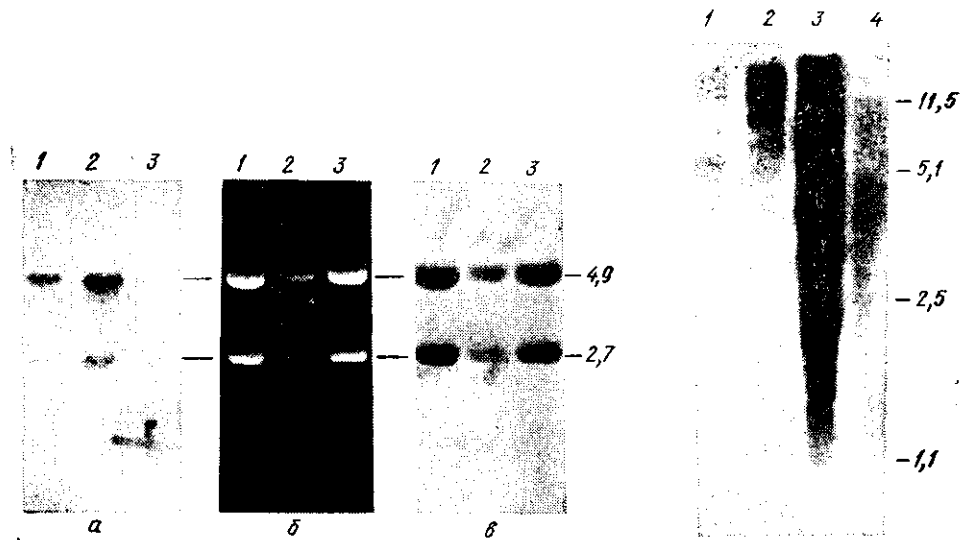
Разом з тим, оскільки сумарний розмір врятованої плазмиди дорівнює 7,6 тис. п. н., очевидно, що в ній, окрім фрагменту *pBR322*, є присутньою якась додаткова послідовність довжиною біля 3,7 тис. п. н. Елімінація усіх вірусних послідовностей і збереження у плазмиді *pr8a* фрагменту *pBR322* дуже нагадують ситуацію, яку виявлено раніш при врятуванні плазмиди *pMARI* з геномної ДНК трансгенної миші [10, 11], хоча на відміну від трансгенних шовпорядів у трансгенної миші мала місце інтеграція екзогенної ДНК з геномном. Таким чином, як за інтеграції з геномом, так і за екстрахромосомної локалізації трансгену у процесі перенесення можлива специфічна елімінація вірусних послідовностей екзогенної ДНК.

Додаткова послідовність, яка з'являється у плазмиді *pr8a*, може бути (подібно до додаткової послідовності плазмиди *pMARI*) елементом геному або ж частиною кільцевих екстрахромосомних ДНК (кеДНК), які присутні у клітинах комах [12] та ссавців [13]. Друге припущення здається нам більш вірогідним, оскільки кеДНК явно повинна містити послідовності, які забезпечують автономну реплікацію цих молекул, і внаслідок поєднання з екзогенною ДНК з великою долею імовірності передавати їй цю властивість. Як правило, у кеДНК присутні також послідовності, гомологічні повторюваним елементам геному [12, 13].

Для з'ясування питання про природу «додаткової» ДНК у плазмиді *pr8a* було проведено два типи блот-гібридизації; 1) плазмідні ДНК гібридизували з міченою сумарною клітинною ДНК тутового шовкопряду (мал. 3, в) та 2) геномні ДНК різних трансгенних тварин гібридизували з міченим фрагментом врятованої плазмиди (мал. 3, а). Результати цих досліджень свідчать про наявність у ДНК трансгенних метеликів таких же за розміром рестрикційних фрагментів, як і в плазмиді *pr8a*, що мають гомологію з останньою. Це підтверджує походження врятованої плазмиди з ДНК трансгенних метеликів тутового шовкопряду F_2 -покоління. Крім того, вони свідчать про присутність у *pr8a* послідовності (ей), гомологічної (их) повторенням,

які представлені у ДНК тутового шовкопряду, оскільки при гібридизації з сумарною міченою ДНК можуть бути виявлені тільки повторювані послідовності геному.

При гібридизації за м'яких умов міченої врятованої плазмиди з ДНК, виділеними з різних видів організмів, видно (мал. 4), що у плазмиді *pr8a* є присутніми послідовності, які мають гомологію з диспергованими повтореннями як комах (шовкопряд, дрозофіла), так і ссавців (миша, бик). Цікаво, що у плазмиді *pMARI*, «врятованій» з клітин миші, також містився фрагмент, гомологічний консервативним



Мал. 3. Блот-гібридизація міченої *p15LTR* з рестриційованою *PstI* ДНК трансгенних шовкопрядів № 8а (1), № 16а (2) і № 16б (3) за жорстких умов (а) та міченої сумарної ДНК контрольного шовкопряду з рестриційованими *PstI* врятованими плазмидами *pr8a* (1), *pr16a* (2) і *pr16b* (3) (а); б — електрофореграма рестриційованих *PstI* плазмід, які використовували для гібридизації у в

Мал. 4. Блот-гібридизація за м'яких умов (гібридизація у $5\times SSC$ при $55^\circ C$, відмивання у $55\times SSC$ при $55^\circ C$) сумарних клітинних ДНК шовкопряду (1), дрозофіли (2), миші (3) і бика (4), рестриційованих *EcoRI*, з міченим *BamHI/PstI*-фрагментом плазмиди *pr8a*, розташованим зліва від послідовності *pBR322*.

в еволюції повторюваним послідовностям геномної ДНК [10]. Більш того, мабуть, у більшості випадків поряд з інтегрованим трансгеном розташовані повторювані елементи [14, 15]. Всі ці факти свідчать про переважну рекомбінацію екзогенної ДНК у процесі перенесення з повторюваними послідовностями, котрі нерідко є консервативними.

Як було наведено вище, у процесі наслідування відбуваються конформаційні зміни трансгена, які, мабуть, стабілізують його структуру. Підтвердженням цього можуть бути наші неопубліковані дані з повторного переносу врятованої плазмиди *pr8a* до ранніх ембріонів тутового шовкопряду. У двох одержаних трансгенних комах екзогенна ДНК існувала у екстрахромосомній формі і не відрізнялася за картиною рестрикції від введеної плазмиди. Таким чином, маємо вагомні аргументи на користь того, що описані в даній роботі «врятовані» плазмиди за рахунок рекомбінацій в клітинах трьох поколінь тутового шовкопряду «адаптувалися» до цих клітин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Palmiter R. D., Brinster R. L. Germ-line transformation of mice // Ann. Rev. Genet.— 1986.— 20.— P. 465—488.
2. Gordon K., Ruddle F. H. Gene transfer into mouse embryos // Develop. Biol. Manipul. of Mammalian Develop. / Ed. R. B. L. Gwatkin.— 1986.— 4.— P. 1—36.
3. Трансгенные мыши, полученные на основе плазмид *pATV-8* и *pBR322* / А. П. Со-

- ломко, А. В. Рындич, Т. Г. Титок и др. // Биополимеры и клетка.— 1988.— 4, № 5.— С. 261—269.
4. *Germ line transmission of autonomus genetic elements in transgenic mouse strain* / M. Rassoulzadegan, P. Leopold, J. Vailly, F. Cuzin // *Cell*.— 1986.— 46, N 3.— P. 513—519.
 5. Николаев А. И., Чкония Т. Т., Кафиани К. А. Введение гетерологичной ДНК в ранние эмбрионы тутового шелкопряда // *Онтогенез*.— 1989.— 20, № 2.— С. 364—371.
 6. Николаев А. И., Чкония Т. Т., Кафиани-Эристави К. А. Внехромосомная локализация и передача по наследству рекомбинантной плазмиды, микроинъекцированной в грену тутового шелкопряда // *Молекуляр. биология*.— 1991.— 25, № 4.— С. 1136—1145.
 7. А. с. 1336570 СССР. Способ микроинъекций ДНК в яйца насекомых / А. И. Николаев, К. А. Кафиани.
 8. *Unstable visible mutation induced in Drosophila melanogaster by injection of oncogenic virus DNA into the polar plasm of early embryos* / K. G. Gazaryan, S. D. Nabirochkin, E. N. Shibanova et al. // *Mol. and Gen. Genet.*— 1987.— 207.— P. 130—141.
 9. Харди К. Плазмиды. Методы.— М.: Мир, 1990.— 268 с.
 10. *Rearrangements of microinjected recombinant DNA in the genome of transgenic mice* / V. Z. Tarantul, V. V. Kucheriavy, I. V. Makarova et al. // *Mol. and Gen. Genet.*— 1986.— 203, N 2.— P. 305—311.
 11. Макарова И. В., Тарантул В. З., Газарян К. Г. Структурные особенности сайта интеграции чужеродной ДНК в геноме трансгенной мыши // *Молекуляр. биология*.— 1988.— 22, № 6.— С. 1553—1561.
 12. *Extrachromosomal circular DNAs in Drosophila melanogaster: comparison between embryos and Kc% cells* / F. Degroote, G. Pont, D. Micard, G. Picard // *Chromosome*.— 1989.— 98, N 2.— P. 201—206.
 13. Rush M. G., Misra R. Extrachromosomal DNA in eukaryotes // *Plasmid*.— 1985.— 14, N 3.— P. 177—191.
 14. *Covarrubias L., Nishida Y., Mintz B. Early postimplantation embryo lethality due to DNA rearrangements in a transgenic mouse strain* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1986.— 83, N 16.— P. 6020—6024.
 15. Тарантул В. З., Кузнецова Е. Д., Газарян К. Г. Характеристика участков генома трансгенных животных, прилежащих к интегрированным последовательностям чужеродных ДНК // *Молекуляр. биология*.— 1989.— 23, № 4.— С. 1036—1040.

Ин-т молекуляр. биології АН Росії, Москва
Тбіліс. держ. ун-т
Ин-т молекуляр. генетики АН Росії, Москва

Одержано 26.11.91