



РДК 572.5:576.312

ПЕРЕНОС И ТРАНЗИТОРНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ТИМИДИНКИНАЗЫ HSV-I В СОСТАВЕ РЕКОНСТРУИРОВАННЫХ ВИРУСОПОДОБНЫХ И НУКЛЕОПРОТЕИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ В КЛЕТКАХ ПЕЧЕНИ

Р. А. Захарян

Введение. Ранее [1—4] сообщалось о конструировании искусственных вирусоподобных частиц (ИВЧ) на основе капсид вируса полиомы в качестве переносчика генетического материала в клетки эукариот. Было показано, что ИВЧ в 100—150 раз превосходят метод Са-преципитата в трансформации обработанных *in vitro* клеток и по эффективности действия приближаются к результатам, получаемым при использовании микроинъекций [5]. В настоящей работе описан перенос гена тимидинкиназы (tk) вируса герпеса в составе преформированной капсиды вируса полиомы (ИВЧ) в клетки печени крысы (*in vivo*). В клетках печени животных, инъецированных ИВЧ, изучена активность tk HSV-I. Одновременно осуществлен гибридационный анализ по Саузерну ДНК гепатоцитов и ретикулоэндотелиальных клеток для выявления в них интактного гена tk HSV-I. Аналогичный эксперимент проведен с геном tk HSV-I в составе ДНК *pBR322* в виде Са-преципитата и реконструированного нуклеосомоподобного комплекса.

Материалы и методы. Выделение ДНК плазмиды *pBR322* tk. Рекombинантная ДНК *pBR322* tk содержит ген tk вируса герпеса HSV-I в составе *BamHI*-фрагмента 3500 пар оснований (п. о.), клонированного по *BamHI*-участку *pBR322*. *E. coli* HB101 выращивали в стандартных условиях до плотности $A_{650} = 1,0$ в присутствии хлорамфеникола («Serva», ФРГ, 180 мкг/мл); из клеточной биомассы выделяли ДНК *pBR322* tk по [5]. Полученный препарат ДНК очищали обработкой нуклеазой S1 («Serva», ФРГ) с последующей депротеинизацией и хроматографией на колонке с биогелем А-15. ДНК из элюата осаждали этанолом (—20 °С).

Выделение *PvuII*-фрагмента (около 2000 п. о.) гена tk HSV-I. ДНК *pBR322* tk разрезали эндонуклеазой *PvuII*, полученные фрагменты разделяли электрофорезом в 0,5 %-ном легкоплавком агарозном геле («MSE», Англия). *PvuII*-фрагмент гена tk экстрагировали из геля при 65 °С двойным объемом свежеперегнанного фенола (рН 8,0), насыщенного буферным раствором (0,1 М трис-НСl, рН 8,0, 0,2 %-ный β-меркаптоэтанол, 0,1 %-ный гидроксихинолин, 0,3 М NaCl, 10 мМ ЭДТА).

Выделение клеточной ДНК, проведение гибридизации на фильтрах. Клеточную ДНК выделяли по [6], расщепляли эндонуклеазами *PstI*, *BglIII*, *SmaI*. Полученные фрагменты фракционировали электрофорезом в 1,8 %-ном агарозном геле и переносили на нитроцеллюлозные фильтры по методу Саузерна [7]. Для гибридизации использованы меченные ³²P *PvuII*-фрагменты (ген tk) со специфической активностью 10⁸ имп/мин на 1 мкг ДНК. Гибридизацию проводили в условиях, описанных в работе [8].

Фракционирование клеток печени. Суспензию клеток печени получали после перфузии ткани печени 0,05 %-ным раствором коллагеназы («Serva», ФРГ). Гепатоциты, эндотелиальные и Купферовские клетки (РЭС) разделяли в градиенте концентрации 50—30 % метризамида [9]. Фракционирование градиента проводили со дна пробирки при 580 нм на приборе ИА-5 («ISCO», США).

Получение нуклеопротеидных (НП) комплексов гена tk. Очистка пустых капсид вируса полиомы, реконструирование ИВЧ на основе преформированных пустых капсид вируса полиомы и tk-гена описаны ранее [2, 3]. Реконструкция гена tk в НП-комплекс с дискретным набором нуклеосомоподобных структур осуществлена в присутствии набора гистонов и анионных ДНК-связывающих белков крови [10] в условиях, описанных в работе [11]. Реконструированные комплексы использованы для внутривенного введения в виде Са-преципитата, который получали аналогично Са-ДНК-преципитату. ДНК была переведена в Са-форму в растворе 125 мМ СаСl₂. Дексаметазонацетат («Serva», ФРГ) вводили из расчета 50 мкг на 100 г веса внутривенно крысам 20-дневного возраста за 6 ч до введения гена tk в составе комплексов.

Определение активности tk. Гомогенат ткани печени в растворе (0,01 М трис-НСl, рН 7,5, 0,15 М КСl, 1 мМ 2-меркаптоэтанол и 50 мкМ тимидин) обрабатывали ультразвуком, центрифугировали при 30 000 g 30 мин, надосадок использовали для анализа активности tk по [12]. Надосадок (1 мг белка) фракционировали электрофорезом в 5 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ) («Serva», ФРГ), как описано в работе [12]. В инкубационную смесь вносили 1 мкМ [³H]TdR 1990 ГБк/моль (ВО «Изотоп», Моск. отд-ние), сорбцию синтезированного [³H]dTMP на ДЭАЭ-целлюлозе («Sigma», США) и измерение радиоактивности проводили в основном, как описано в работе [13].

Влияние тимидинового аналога 5-этилдезоксинуридина на активность tk. Активность tk (клеточной и HSV-I) определяли по описанной выше методике [12] в присутствии 50 мкМ 5-этилдезоксинуридина. Процент активности вычислен относительно величины, определяемой в отсутствие аналога.

Результаты и обсуждение. ИВЧ, НП-комплекс и Са-преципитат с геном tk из расчета 10⁵ молекул гена tk на клетку печени вводили внутривенно крысам 20-дневного возраста. Через 6, 24 и 72 ч после

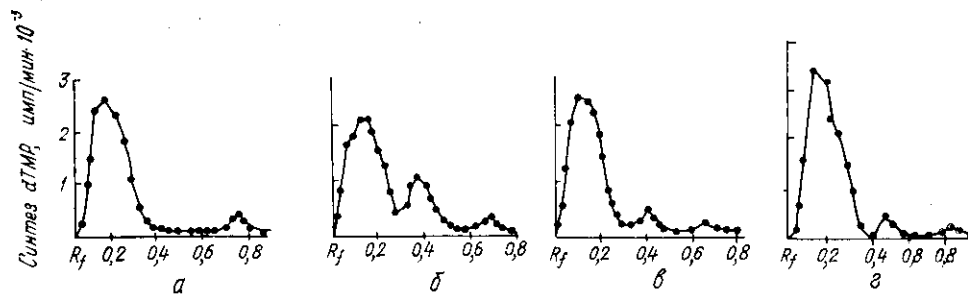


Рис. 1. Электрофоретическое распределение в 5 %-ном ПААГ активности tk HSV-I клеток печени крыс после внутривенного введения ИВЧ и НП-комплекса, содержащих 100 мкг гена tk HSV-I (Poull-фрагмент): а — контроль (интактные крысы); б — 24, в — 72 ч после введения ИВЧ; г — 24 ч после введения НП-комплекса (200 мкг ДНК). Электрофоретическая подвижность (Rf) вычислена относительно подвижности красителя бромфенола синего

Fig. 1. Electroforetic distribution in 5 % PAAG of the thymidine kinase activity from the liver cells of rats after intravenous injection of artificial virus-like (AVL) particles, nucleo-protein complexes containing tk gene of HSV-I: а — control (intact rats); б — 24 h after injection of AVL particles (100 μg of tk gene); в — 72 h after injection of AVL; г — 24 h after injection of nucleo-protein complex (200 μg of tk gene)

инъекций одновременно проведены электрофоретический анализ распределения активности tk и гибридизационное изучение клеточной ДНК, выделенной из целых клеток и очищенных ядер гепатоцитов, эндотелиальных и Купферовских клеток с ДНК гена tk HSV-I.

Электрофоретический анализ (в 5 %-ном ПААГ) активности tk клеток печени интактных животных и получивших внутривенно ген tk HSV-I приведен на рис. 1. В клетках печени интактных крыс выявлены две tk с Rf 0,2 и 0,8—0,9. Последняя соответствует tk-активности митохондрий. В клетках печени крыс, получивших ген tk HSV-I в составе ИВЧ, через 24 ч после инъекции обнаруживается добавочный пик tk-активности, мигрирующей с Rf 0,45—0,5, соответствующий tk-актив-

ности, индуцируемой в мышинных клетках вирусом HSV-I или при трансформации геном tk HSV-I *in vitro* [12, 14]. Индуцируемая добавочная активность составляет 20 % общей и к 72 ч после инъекции ИВЧ снижается до минимума. Добавочная tk-активность с Rf, соответствующей Rf вирусной tk, обнаруживается и при введении 200 мкг гена tk в составе НП-комплекса (через 24 ч после инъекции комплекса) и количественно соответствует tk-активности митохондрий. При введении 200 мкг гена tk в составе Са-ДНК-преципитата, равно как и через 6 ч после введения ИВЧ и НП-комплекса, обнаружить добавочную tk-активность, характеризующуюся Rf 0,45—0,5, не удалось.

Эксперименты по изучению влияния ингибитора HSV-I вирусспецифической tk 5-этилдезоксипуридина на активность тимидинкиназы, фракционированных электрофорезом в 5%-ном ПААГ, показали, что добавочная tk-активность, индуцируемая в печени при внутривенном введении гена tk HSV-I, ингибируется в присутствии 5-этилдезоксипуридина на 80—70 %, в то время как клеточная активность tk не меняется даже в присутствии его при концентрации 100 мМ.

Очевидно, что внутривенное введение гена tk HSV-I в составе ИВЧ или НП-комплекса обеспечивает в клетках печени через 24 ч после инъекции достаточно выраженный транзитный синтез фермента HSV-I tk, активность которой в определенной степени обнаруживается и через 72 ч после инъекции ИВЧ.

Определенный интерес представляло выявление распределения вводимых внутривенно tk-комплексов в клетках печени, гепатоцитах, а также в клетках РЭС и их субклеточных фракциях. ДНК, изолированную из гепатоцитов и клеток РЭС, расщепляли эндонуклеазами *Pst*I, *Bgl*III, *Sma*I, и после разделения полученных фрагментов электрофорезом в агарозном геле в их составе методом гибридизации выявили интактные гены tk HSV-I (*Pvu*III-фрагмент) (рис. 2, а, б). Через 6 ч после инъекции ИВЧ, НП-комплексов и Са-преципитата гены tk HSV-I обнаруживаются как в гепатоцитах, так и в клетках РЭС, по-видимому, в цитоплазме или ассоциированные с плазматической мембраной этих клеток, так как в ядерной фракции tk-ген в данных условиях эксперимента выявить не удастся. Интенсивность полос на радиоавтографе при использовании ИВЧ (в идентичных условиях эксперимента) существенно выше, чем при применении НП-комплекса и Са-преципитата. ДНК, изолированная из клеток печени интактных крыс, в данных условиях эксперимента не дает полос гибридизации с tk-геном HSV-I. Через 24 ч после инъекции tk-гена в составе НП-комплекса или Са-преципитата в ядрах гепатоцитов обнаруживается при использовании для анализа 100 мкг клеточной ДНК слабый сигнал гибридизуемости в обоих случаях.

В случае же ИВЧ через 24 ч после инъекции при рестрикции 20 мкг клеточной ДНК выявляются полосы гибридизации с tk-геном HSV-I как в цитоплазме, так и в ядрах гепатоцитов.

Ранее нами было показано, что глюкокортикоиды стимулируют перенос ДНК в клетки печени, предположительно гепатоциты [15]. В эксперименте с предварительным введением дексаметазона (рис. 2, б) показано, что дексаметазон существенно (по интенсивности полосы гибридизуемости) повышает транспорт tk-гена в гепатоциты как в составе НП-комплексов, так и в составе ИВЧ. При этом полностью блокирован их транспорт в клетки РЭС. Очевидно, что глюкокортикоиды можно использовать для избирательного транспорта экзогенно вводимых генов в гепатоциты печени *in vivo*.

Полученные данные показывают возможность переноса (в составе ИВЧ и НП-комплекса) и транзитной экспрессии экзогенного генетического материала в клетках печени.

Известно, что узким местом в процессе ДНК-опосредованной трансформации является переход ДНК из цитоплазмы в ядро [5] и «разделение» вируса полиомы именно в ядрах инфицированных клеток [16]. Использование ИВЧ для переноса гена существенно облегчает преодо-

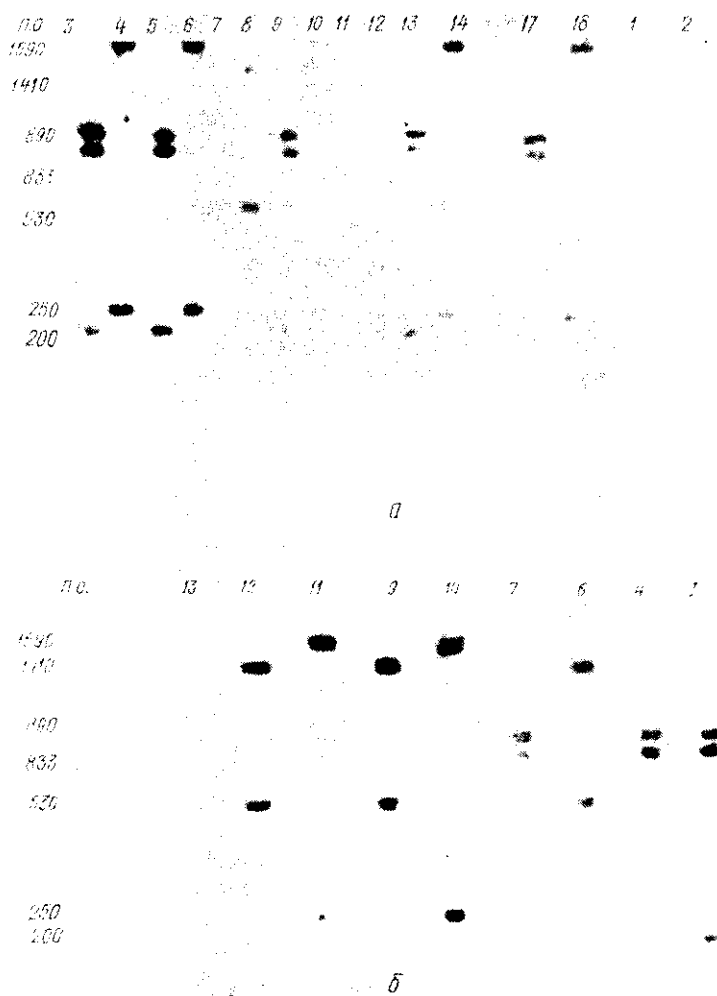


Рис. 2. Обнаружение экзогенной ДНК гена tk HSV-I (*PvuII*-фрагмент) в гепатоцитах и клетках РЭС: а — инъецировано 10 мкг tk-гена в составе ИВЧ, рестриктазы *PstI*, *BglIII* (2 — ДНК ядер клеток РЭС; 3, 4 — ДНК целых клеток РЭС; 5, 6 — ДНК гепатоцитов; 7 — ДНК ядер гепатоцитов), НП-комплекса (8 — ДНК гепатоцитов, *SmaI*; 9 — ДНК клеток РЭС), Са-преципитата (10 — ДНК гепатоцитов); ДНК изолирована через 6 ч после инъекции, рестрицировано по 5 мкг ДНК (1, 11, 12 — контроль); инъецировано 10 мкг tk-гена в составе Са-преципитата (13, 14 — ДНК ядер гепатоцитов) и НП-комплекса (17, 18 — ДНК ядер гепатоцитов); ДНК изолирована через 24 ч после инъекции, рестрицировано по 100 мкг ДНК; б — инъецировано 10 мкг tk-гена в составе ИВЧ (1 — ДНК цитоплазмы гепатоцитов; 4 — ДНК ядер гепатоцитов; ДНК изолирована через 24 ч после инъекции, рестрицировано по 20 мкг ДНК), НП-комплекса через 6 ч после введения дексаметазона (6 — ДНК ядер гепатоцитов, *SmaI*; 7 — ДНК цитоплазмы гепатоцитов, *PstI*; 13 — ДНК клеток РЭС; ДНК изолирована через 24 ч после инъекции, рестрицировано по 20 мкг ДНК) и в составе ИВЧ через 6 ч после введения дексаметазона (10 — ДНК цитоплазмы гепатоцитов; 11 — ДНК ядер гепатоцитов, *BglIII*; 12 — ДНК ядер гепатоцитов, *SmaI*; 9 — 40 пг ДНК *PvuII*-фрагмента (маркер) tk-гена HSV-I, *SmaI*; ДНК изолирована через 24 ч после инъекции, рестрицировано по 10 мкг ДНК). ДНК цитоплазмы — тотальная РНК цитоплазмы (100 мкг), к которой добавляли 20 мкг ДНК печени крысы и после соответствующей обработки РНКазой и очистки использовали в рестрикционном анализе для поиска tk-гена

Fig. 2. Detection (by the Southern blot analysis) of exogenous tk-gene of HSV-I DNA into hepatocytes, endothelial and Kupffer cells. 5 μ g of DNA were digested by *PstI*, *BglIII*, *SmaI*, fractionated on a 1.8% agarose gel, transferred into nitrocellulose filter and hybridized with P^{32} *PvuII* tk DNA: a — DNA was isolated 6 h after injection of AVL, containing 10 μ g of tk gene. 1 — DNA from the liver of intact rats; 2 — DNA from nucleus of endothelial cells; 3, 4 — DNA from whole endothelial cells; 5, 6 — DNA from hepatocytes; 7 — DNA from nucleus of hepatocytes. DNA was isolated 6 h after injection of nucleoprotein complex and Ca-precipitate: 8 — DNA from hepatocytes (*SmaI*), 9 — DNA from endothelial cells, 10 — DNA from hepatocytes; 11, 12 — DNA from the liver of intact rats. DNA isolated 24 h after injection of 10 μ g of tk gene as a Ca-precipitate

ление барьера ядерной мембраны в условиях *in vivo*, что ранее было продемонстрировано и для экспериментов *in vitro* [1, 4], где частота трансформации достигает $(5,6-6,5) \cdot 10^3$ трансформантов на 10^6 клеток на 1 мкг ДНК. В наших экспериментах через 24 ч после инъекции ИВЧ, содержащих 10 мкг гена tk, в 20 мкг ДНК ядер гепатоцитов обнаруживается сигнал гибридизации с геном tk, по интенсивности сопоставимый с гибридизацией с 40 пг гена tk (*PvuII*-фрагмент). После инъекции в составе ИВЧ десятикратно большего количества

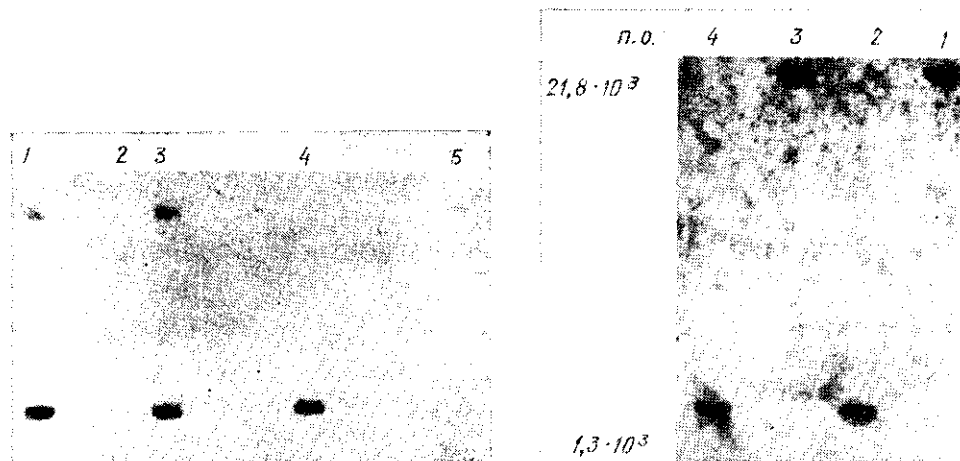


Рис. 3. Гибридизация с геном tk HSV-I ДНК ядер клеток печени крыс, которым вводили ИВЧ (100 мкг гена tk): 1, 3 — смесь 50 мкг ДНК с 40 пг гена tk; 2 — 50 мкг ДНК интактных крыс; 4 — 40 пг tk-гена HSV-I (*PvuII*-фрагмент); 5 — 50 мкг ДНК. ДНК изолирована через 4 дня после инъекции

Fig. 3. Hybridization analyses with tk gene of HSV-I of genomic DNAs prepared from nuclei of the rat liver cells 4 days after injection of AVL (100 μ g of tk gene). 1, 3 — Mixture of 50 μ g of DNA rat liver cells (after injection of AVL) and 40 pg of tk gene; 2 — 50 μ g of DNA from the liver cells of intact rats; 4 — 40 pg of tk gene HSV-I (*PvuII* fragment); 5 — 50 μ g of DNA from the rat liver cells after injection of AVL

Рис. 4. Гибридизация с геном tk HSV-I ДНК ядер клеток печени крыс, которым вводили ИВЧ (100 мкг гена tk): 1, 3 — 50 мкг ДНК; 2, 4 — 50 мкг ДНК (после действия *EcoRI/SmaI* на ДНК из интегрированного гена tk HSV-I изолирован фрагмент размером около 1300 п. о.)

Fig. 4. Hybridization analysis of genomic DNAs prepared from nuclei of the rat liver cells 4 days after injection of AVL by tk gene of HSV-I (100 μ g of tk gene). 1, 3 — 50 μ g of DNA from the rat liver cells after injection of AVL; 2, 4 — 50 μ g of DNA from the rat liver cells after injection of AVL (DNA digested by *EcoRI/SmaI*)

(100 мкг гена tk) в клетках печени обнаруживается достаточно выраженная транзиторная экспрессия гена tk (рис. 1, б), в определенной степени выявляемая и через 72 ч (рис. 1, в), что доказывает эффективность переноса гена tk в ядра клеток печени и предполагает возможную его интеграцию в геном. ДНК ядер клеток печени крыс, которым



(13, 14) and nucleoprotein-complex (17, 18), 100 μ g of DNA were digested; 13, 14, 17, 18 — DNA from hepatocytes; 6 — DNA was isolated 24 h after injection of AVL; 20 μ g of DNA were digested. 1 — DNA from cytoplasm of hepatocytes, 4 — DNA from nuclei of hepatocytes. Nucleoprotein-complex was injected 6 h after injection of dexamethasone, DNA was isolated 24 h after injection of tk gene, 20 μ g of DNA were digested. 6 — DNA from nuclei of hepatocytes (*SmaI*), 7 — DNA from cytoplasm of hepatocytes, 13 — DNA from whole endothelial cells; AVL were injected 6 h after injection of dexamethasone, DNA was isolated 24 h after injection of tk gene. 10 μ g of DNA were digested. 10 — DNA from cytoplasm of hepatocytes; 11, 12 — DNA from nuclei of hepatocytes, 9 — 40 pg of DNA tk gene (*PvuII* fragment)

после инъекции и изучена методом гибридизации с геном tk HSV-1. В гибридизации использована ДНК с молекулярной массой $(10-12) \times 10^6$, полученная после обработки ультразвуком (рис. 3, 4). Полученный результат свидетельствует в пользу переноса экзогенного генетического материала в составе ИВЧ в клетки печени *in vivo*, сопровождающегося транзиторной экспрессией его, что дает надежду в будущем успешно реализовать этот метод для стабильной трансформации клеток; вопрос заключается в поисках путей по повышению рекомбинационной способности транспортируемого гена. Предварительные данные, полученные нами *in vitro*, показывают что эффективность трансформации с помощью ИВЧ можно существенно повысить за счет лигирования с геном tk транспозоноподобного элемента A1u-повтора.

TRANSFER AND TRANSITORY EXPRESSION
OF HSV-I THYMIDINE KINASE GENE IN THE COMPOSITION
OF RECONSTRUCTED VIRUS-LIKE AND NUCLEOPROTEIN
COMPLEXES IN THE LIVER CELLS

R. A. Zakharyan

Institute of Experimental Biology,
Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

Summary

The thymidine kinase gene (tk) of HSV-I is included into the preformed empty capsid of the polyoma virus and in the composition of the obtained stable artificial polyoma-like particles (PLP) is intravenously injected into rats weighing 30 g. Electrophoretic profile of the induced HSV-I tk activity in the liver cells has been investigated. The Southern hybridization analysis of DNA from the whole cells and purified nuclei of hepatocytes, endothelial and Kupffer cells is carried out to reveal gene tk HSV-I. The results obtained indicate that PLP are more effective than Ca-precipitate and nucleoprotein complexes in tk gene transfer *in vivo* into the liver cells and in the transitory expression of the HSV-I tk-activity. Glucocorticoids stimulate transfer of tk gene into hepatocytes and inhibit its transfer into endothelial and Kupffer cells of the liver.

1. Slilaty S. N., Aposhian H. V. Gene-transfer by polyoma-like particles assembled in cell free system // Science.— 1983.— 220, N 4598.— P. 725—727.
2. Barr S. M., Keck K., Aposhian H. V. Cell-free assembly of a polyoma-like particle from empty capsids and DNA // Virology.— 1979.— 96, N 2.— P. 656—660.
3. Aposhian H. V., Zakharian R. A. Assembly of a polyoma-like particle from empty capsids and DNA in a cell-free system // Adv. Enzyme Regul.— 1980.— 18, N 1.— P. 275—287.
4. Захарян Р. А., Гаспарян Э. Г., Апошян В. Г. Транспорт гена β -лактамазы в составе искусственных вирусоподобных частиц в клетки человека и его экспрессия // Биол. журн. Армении.— 1982.— 35, № 9.— С. 730—734.
5. Caprecchi M. R. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells // Cell.— 1980.— 22, N 2.— P. 479—488.
6. Kirby R. S. A new method for the isolation of DNA // Biochem. J.— 1958.— 66, N 2.— P. 495—501.
7. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // J. Mol. Biol.— 1975.— 98, N 3.— P. 503—517.
8. Pellicer A., Wigler M., Axel R. The transfer and stable integration of the HSV thymidine kinase gene into mouse cells // Cell.— 1978.— 14, N 1.— P. 133—141.
9. Munthe-Caas A. S., Seglen P. O. The use of metrizimide as a gradient medium for isopicnic of rat liver cells // FEBS Lett.— 1974.— 43, N 3.— P. 252—256.
10. Brehm S. P., Hoch S. O., Hoch J. A. DNA-binding proteins in human serum // Biochem. and Biophys. Commun.— 1975.— 63, N 1.— P. 24—31.
11. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which bind histones and transfer them to DNA / R. A. Iaskey, B. M. Honda, A. D. Mills, J. M. Finch // Nature.— 1978.— 275, N 5679.— P. 416—420.
12. Cheng Y.-C., Ostrander M. Deoxythymidine kinase induced in HeLa TK⁻ cells by herpes simplex virus type I and type II // J. Biol. Chem.— 1976.— 251, N 9.— P. 2605—2610.

(Окончание см. на с. 223).

7. Патон Е. Б., Вудмаска М. И., Свердлов Е. Д. Присутствие собственного промотора *groB*-гена снижает стабильность рекомбинантных однонитевых фагов, содержащих этот ген // Биополимеры и клетка.— 1985.— 1, № 3.— С. 160—162.
8. Zinder N. D., Boeke J. D. The filamentous phage (F1) as vectors for recombinant DNA — a review // Gene.— 1982.— 19, N 1.— P. 1—10.
9. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning — a laboratory manual.— New York: Cold Spring Harbor, 1982. — 545 p.
10. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res.— 1979.— 7, N 6.— P. 1513—1523.
11. Collins J. Deletions, insertions and rearrangements affecting *groB* gene expression // Mol. and Gen. Genet.— 1979.— 173, N 1. — P. 217—220.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР,
Киев

Получено 29.01.87

Окончание. Начало см. на с. 215—220.

-
13. Olashaw N. E., Kress E. D., Cristofalo V. J. Thymidine triphosphate synthesis in senescent W 138 cells // Exp. Cell Res.— 1983.— 149, N 2.— P. 347—354.
 14. Transfer of purified HSV thymidine kinase gene to cultured mouse cells / M. Wigler, S. Silverstein, L. S. Lee et al. // Cell.— 1977.— 11, N 1.— P. 223—232.
 15. Захарян Р. А. Ген-транспорт *in vivo* и его регуляция глюкокортикоидами // Структура и транскрипция генома: Тез. докл. IV симпоз. СССР—ФРГ.— Ереван, 1981.— С. 19.
 16. Qasba P. K., Aposhian H. V. DNA and gene therapy: transfer of mouse DNA to human and mouse embryonic cells by polyoma pseudovirions // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1971.— 68, N 10.— P. 2345—2349.

Ин-т эксперим. биологии АН АрмССР, Ереван

Получено 15.09.85