



УДК 577.218

## ТРАНСГЕННЫЕ МЫШИ. ПОЛУЧЕННЫЕ НА ОСНОВЕ ПЛАЗМИД pATV-8 И pBR322

А. П. Соломко, А. В. Рындич, Т. Г. Титок, Л. М. Морозова,  
И. Н. Вагина, Л. И. Чащина, С. В. Евсиков,  
И. В. Кириченко, Н. А. Сарапина

Исследованиями последних десяти лет показано, что существенную роль в изменчивости генома эукариот играет интеграция провирусной ДНК ретровирусов, в результате чего изменяется регуляция активности различных хозяйских генов. При этом обращает на себя внимание сходство структуры ретровирусов с перемещающимися генетическими элементами эукариот: лабильность их структуры при интеграции, наличие сильного промотора (*LTR*), способного усиливать во много раз транскрипцию прилежащих генов клеток хозяина, стадийспецифичность функциональной активности, зависимой от характера дифференцировки тех или иных клеток [1].

Данная работа посвящена созданию экспериментальной модели, которая позволила бы детально исследовать механизмы взаимодействия ретровирусного генома и генома хозяина на основе трансгенных мышей с интегрированными последовательностями провируса саркомы Рауса кур.

Для проведения микроинъекций в качестве донорной была взята ДНК плазмиды *pATV-8*, созданная на основе плазмиды *pBR322* и провирусной ДНК вируса саркомы Рауса кур [2]. Донорами яйцеклеток для проведения инъекций служили мыши линии *ICR*, гормонально стимулированные для получения синхронизированных яйцеклеток. Микроинъекции проводили в мужской пропуклеус зигот на стадии двух пропуклеусов с помощью микроманипулятора КМ-2. Вводили 200—400 копий плазмиды на яйцеклетку, после чего зиготы пересаживали псевдобеременным самкам той же линии. В параллельных экспериментах в яйцеклетки вводили столько же копий плазмиды *pBR322*.

Нами было установлено, что инъекция плазмиды, имеющей в своем составе последовательности генома вируса Рауса кур, достоверно снижает число самок-реципиентов, выносивших детенышей, по отношению к контрольной группе, где проводились пересадки зародышей, прошедших все манипулирования, кроме инъекций. Такая же закономерность наблюдалась и для самок-реципиентов при трансплантации им зародышей, микроинъекцированных плазмидой *pBR322*.

### Результаты пересадок зародышей, микроинъекцированных плазмидными ДНК *Results of transplantation of microinjected zygotes*

Инъекцированная ДНК	Количество			
	реципиентов	инъекцированных зародышей	родивших самок (%)	родившихся мышат (%)
<i>pATV-8</i>	80	821	31 (38,75±0,05)*	84 (10,23±0,01)
<i>pBR322</i>	25	294	14 (56,00±0,10)	60 (20,41±0,02)*
Контроль	39	496	27 (69,23±0,07)	83 (16,73±0,02)

\* Достоверно при  $P > 0,99$ .

Анализ результатов экспериментов по пересадке микроинъецированных зигот показал, что выживаемость зародышей в случае инъекции плазмиды *pATV-8* была достоверно меньше, чем при введении плазмиды *pBR322* (таблица). Можно предположить, что особенности структуры плазмиды *pATV-8* и ее достаточно большой размер (14 т. п. н.) являются основными причинами повышенной частоты летальных повреждений зародышей по сравнению с плазмидой *pBR322*.

По данным дот-блот-гибридизации меченой  $^{32}\text{P}$  ДНК плазмид *pATV-8* и *pBR322* (удельная активность  $(2-3) \cdot 10^8$  имп·мин $^{-1}$ ·мкг $^{-1}$ ) с тотальной высокополимерной ДНК из хвостов экспериментальных мышей, количество трансгенных животных в серии с микроинъецированием плазмиды *pATV-8* было достоверно большим (24 из 52 исследованных мышат, что составляет  $46,15 \pm 0,007\%$ ), чем в серии с введением плазмиды *pBR322* (8 из 40 исследованных,  $20 \pm 0,06\%$ ).

Полученные трансгенные мыши были скрещены с нормальными животными той же линии. Предварительный анализ результатов скрещиваний свидетельствует о нарушении репродуктивных способностей у ряда трансгенных самок, несущих вставку *pATV-8*. Из 13 исследованных трансгенных самок четыре дали всего 1—2 небольших помета, от одной самки не удалось получить потомства при различных скрещиваниях. У трансгенных самок *B-7* и *B-17* после первых родов развились опухоли, и они были забиты для анализа. У самок двух линий после скрещивания их с самцом *П-6* (вставка *pBR322*) также отмечено достоверное снижение плодовитости за счет увеличения постимплантационной смертности эмбрионов.

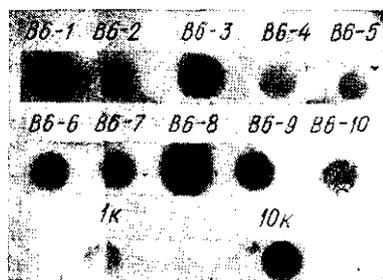


Рис. 1. Фенотип потомков второго поколения трансгенных мышей: *a, б, в* — мутантные мышата; *г* — мышата дикого типа

Fig. 1. The phenotype of  $F_2$  transgenic mice progeny: *a, б, в* — mutant mice; *г* — wild-type mice

Рис. 2. Дот-гибридизационный анализ ДНК хвостов потомков первого поколения трансгенных мышей

Fig. 2. Dot hybridization analysis of tail DNA from  $F_1$  transgenic mice progeny

Анализ потомков трансгенных мышей первого поколения показал отсутствие менделевского наследования введенной плазмиды *pATV-8* в некоторых сублиниях. Практически все потомки сублинии *B-6* наследовали данную последовательность (рис. 1). Эти результаты свидетельствуют либо о том, что встраивание плазмидной последовательности произошло как минимум в две негомологичные хромосомы, либо об автономном существовании плазмиды наряду с интеграцией. Данные о возможности передачи свободно существующей плазмиды у трансгенных мышей появились в печати в последнее время [3, 4]. Вероятность такой передачи в случае нашей модели сейчас проверяется.

В той же сублинии (*B-6*) трансгенных мышей, несущих вставку *pATV-8*, среди потомков второго поколения выявлены мертворожденные мышата с недоразвитием хвостов (рис. 2). Аномалии в развитии скелета у потомков трансгенных мышей были отмечены авторами работы [5, 6]. Обнаруженные нами нарушения репродуктивных функций у ряда исходных трансгенных мышей и аномалии развития их потомков, как правило, проявляющиеся у потомков второго поколения гомозиготных по встройке чужеродной ДНК, отмечали и другие авторы [7—9].

Транспозоноподобная структура генома вируса саркомы Рауса — наличие фланкирующих *LTR*, гена *sarc*, находящегося под сильным промотором, обуславливают перспективность использования плазмиды *pATV-8* в исследованиях стадии- и тканеспецифичности экспрессии генов, стабильности структуры трансгеномов, взаимодействия трансгеномов и генома клеток организма, несущего трансгеном.

#### THE TRANSGENIC MICE CONTAINING *pATV-8* AND *pBR322* PLASMIDS

A. P. Solomko, A. V. Ryndich, T. G. Titok, L. M. Morozova, I. N. Vagina,  
L. I. Chashchina, S. V. Evsykov, I. V. Kirichenko, N. A. Sarapina

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

The transgenic mice containing recombinant *pATV-8* plasmid, produced by insertion of the provirus DNA of RSV into *pBR322* were obtained. The type of the transgene DNA inheritance cannot be explained by the insertion of its copies into one chromosomal site. In certain transgenic mice lines the phenotypic disorders were observed.

1. Хесин Р. Б. Непостоянство генома.— М.: Наука, 1984.—472 с.
2. Restriction endonuclease and nucleotide sequence analysis of molecularly cloned unintegrated avian tumor virus DNA: structure of large terminal repeats in circle junctions / R. A. Katz, C. A. Omer, G. H. Weis et al. // J. Gen. Virol.—1982.—42, N 1.—P. 346—351.
3. Rescue of a *tk*-plasmid from transgenic mice reveals its episomal transmission / U. Klessling, K. Becker, M. Strause et al. // Mol. and Gen. Genet.—1986.—204, N 2.—P. 328—333.
4. Germ line transmission of autonomous genetic elements in transgenic mouse strains / M. Rassoulzadegan, P. Leopold, J. Vailly, F. Cuzin // Cell.—1986.—46, N 4.—P. 513—519.
5. Gordon J. W. A foreign dihydrofolate reductase gene in transgenic mice acts as a dominant mutation // Mol. and Cell. Biol.—1986.—6, N 6.—P. 2158—2167.
6. An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in transgenic mouse / R. P. Woychik, T. A. Stewart, L. Y. Davis et al. // Nature.—1985.—318, N 6041.—P. 36—40.
7. Prenatal lethality in mice homozygous for human growth hormone sequences integrated in the germ line / E. F. Wagner, L. Covarrubias, T. A. Stewart, B. Mintz // Cell.—1983.—35, N 3.—P. 647—655.
8. Insertion of retrovirus into first intron of I/I-collagen gene leads to embryonic lethal mutation in mice / K. Harbers, M. Kuehn, H. Delius, R. Jaenisch // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1984.—81, N 5.—P. 1504—1508.
9. Covarrubias L., Nishido Y., Mintz B. Early postimplantation embryo lethality due to DNA rearrangements in a transgenic mouse strain // Ibid.—1986.—83, N 16.—P. 6020—6024.

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

Получено 17.06.87

УДК 577.152:577.151

#### ИНДУЦИРУЕМАЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫМ СУБСТРАТОМ ДИМЕРИЗАЦИЯ ЭНДОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЫ MvaI

Л. Г. Овечкина, С. Р. Попова, В. В. Зиновьев, Д. П. Вайтквявичюс,  
А. А. Янулайтис, Ю. А. Горбунов, Э. Г. Малыгин

Эндонуклеазы типа II, как правило, узнают симметричную нуклеотидную последовательность и имеют димерную структуру типа  $\alpha_2$  [1]. Имеются, однако, исключения — например, для эндодезоксирибонуклеаз *BglI* и *BspI* показано, что они являются мономерными белками [1].

Исследование таких эндонуклеаз представляет специальный интерес, так как структура фермента, взаимодействующего с симметричным субстратом, должна иметь элементы симметрии. Один из возможных способов образования симметричной струк-