

13. Vlazak J. Effect of different desintegration techniques and media on yield appearance of isolation nuclei // Biol. plant.—1981.—23, N 6.—P. 406—413.
14. Маниатис 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. биологии и генетики АН Украины, Киев
Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН Украины, Киев

Получено 30.07.91

УДК 578.52

А. И. Николаев, Т. Т. Чкония,
К. А. Эристави-Кафиани, В. З. Тарантул

АНАЛИЗ «СПАСЕННОЙ» ПЛАЗМИДЫ ИЗ ТРАНСГЕННОГО ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

С помощью оригинальной методики микроинъекций ДНК в грену тутового шелкопряда получены трансгенные особи. Из суммарной ДНК F_2 -потомков этих животных «спасена» плазмида (p γ a), которая отличалась по своей структуре от переносимой плазмиды p1.5LTR и наследовалась внехромосомно. В составе плазмиды p γ a обнаружены повторяющиеся последовательности ДНК тутового шелкопряда, которые эволюционно консервативны.

Введение. При трансгенезе у животных экзогенная ДНК чаще всего интегрирует с ядерным геномом [1, 2], хотя может существовать и в экстрахромосомной форме [3, 4]. На модели тутового шелкопряда ранее впервые было показано, что при переносе плазмид путем микроинъекций в грену они как в первом поколении взрослых насекомых (F_0), так и в последующих (F_1 и F_2) присутствуют главным образом вне хромосомной ДНК [5, 6]. Для исследования механизма переноса и экстрахромосомного наследования трансгена было осуществлено его клонирование с помощью метода «спасения» плазмиды [3]. В настоящем сообщении приводятся данные по молекулярному анализу одной из «спасенных» рекомбинантных плазмид, полученной при трансформации клеток *Escherichia coli* ДНК из F_2 -поколения трансгенного тутового шелкопряда.

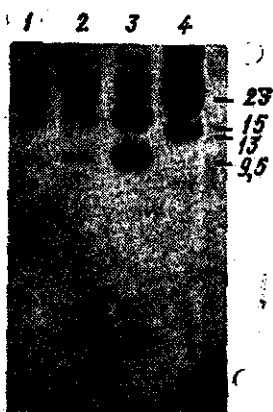
Материалы и методы. В грену тутового шелкопряда с помощью оригинальной методики микроинъекций [6, 7] переносили рекомбинантную плазмиду p1.5LTR, содержащую BamHI/EcoRI-фрагмент плазмиды pBR322 (3,9 тыс. п. н.) и полтора длинных концевых повтора (LTR) вируса саркомы Рауса (RSV) [8]. Скрещивание бабочек, выделение ДНК и блот-гибридизацию проводили, как описано ранее [7].

Результаты и обсуждение. С помощью блот-гибридизации суммарной нерестрицированной ДНК из трансгенного шелкопряда № 4 с меченой плазмидой p1.5LTR установили, что у этого насекомого (самец) содержится несколько различающихся по размерам экстрахромосомных ДНК, имеющих гомологию с p1.5LTR (рис. 1, дорожка 4). С ДНК всех трансгенных F_2 -потомков этого насекомого картина блот-гибридизации была одинаковая (рис. 1, дорожки 1—3), но отличалась от той, которая имела место у родительской особи. Таким образом, трансген присутствует как в F_0 , так и в F_2 -поколениях насекомых в экстрахромосомной форме, структура которой перестраивается в процессе передачи по наследству [6].

Суммарную ДНК, выделенную из бабочек F_2 -поколения (№№ 8а, 16а и 16б), без рестрикции использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* (штамм JM101) [9]. В результате получили

© А. И. НИКОЛАЕВ, Т. Т. ЧКОНИЯ, К. А. ЭРИСТАВИ-КАФИАНИ, В. З. ТАРАНТУЛ, 1992

около двух десятков устойчивых к ампициллину колоний, содержащих плазмидную ДНК. Все спасенные плазмиды оказались идентичными по молекулярной массе и картине рестрикции. Из двух видов молекул экстрахромосомной ДНК, выявленных в нерестрицированной суммарной ДНК трансгенных насекомых (рис. 1, дорожки 1—3), по-видимому, лишь меньшая по размеру несет *Ori* репликации и сайт устойчивости к ампициллину (Amp^r) плазмиды *E. coli*. В дальнейших экспериментах использовали одну из этих плазмид — *pr8a*. Рестрикционный и гибридационный анализы показали, что плазмида *pr8a*, как и все остальные спасенные плазмиды, содержит целиком *BamHI/EcoRI*-фрагмент, который присутствовал в инъектированной плазмиде *p1.5LTR*, но в ней, по этим данным, отсутствуют вирусные последовательности (рис. 2).



Вместе с тем, поскольку суммарный размер спасенной плазмиды равен 7,6 тыс. п. н., очевидно, что в ней, кроме фрагмента *pBR322*, присутствует какая-то дополнительная последовательность длиной около 3,7 тыс. п. н. Элиминация всех вирусных последовательностей и сохранение в плазмиде *pr8a* фрагмента *pBR322* очень напо-

Рис. 1. Блот-гибридизация меченой *p1.5LTR* с нерестрицированной суммарной ДНК, выделенной из трансгенного тутового шелкопряда № 4 (F_0 -поколение) (4) и его F_2 -потомков № 8a (1), № 16a (2) и № 166 (3)

минают ситуацию, обнаруженную ранее при спасении плазмиды *pMARI* из геномной ДНК трансгенной мыши [10, 11], хотя в отличие от трансгенных шелкопрядов у трансгенной мыши имела место интеграция экзогенной ДНК с геномной. Таким образом, как при интеграции с ге-

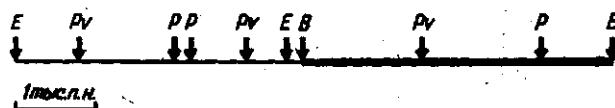


Рис. 2. Рестриктивная карта спасенной плазмиды *pr8a*. Жирная линия — *pBR322*; тонкая линия — клеточная ДНК; P — PstI; Pv — PvuII; E — EcoRI; B — BamHI

номом, так и при экстрахромосомной локализации трансгена в процессе переноса возможна специфическая элиминация вирусных последовательностей экзогенной ДНК.

Дополнительная последовательность, появляющаяся в плазмиде *pr8a*, может быть (подобно дополнительной последовательности плазмиды *pMARI*) элементом генома или же являться частью кольцевых экстрахромосомных ДНК (кэДНК), присутствующих в клетках насекомых [12] и млекопитающих [13]. Второе предположение кажется нам более вероятным, поскольку кэДНК заведомо должна содержать последовательности, обеспечивающие автономную репликацию этих молекул, и, следовательно, при соединении с экзогенной ДНК с большой долей вероятности передавать ей это свойство. Как правило, в кэДНК присутствуют также последовательности, гомологичные повторяющимся элементам генома [12, 13].

Для выяснения вопроса о природе «дополнительной» ДНК в плазмиде *pr8a* были проведены два типа блот-гибридизации: 1) плазмидные ДНК гибридизовали с меченой суммарной клеточной ДНК тутового шелкопряда (рис. 3, в) и 2) геномные ДНК разных трансгенных животных гибридизовали с меченым фрагментом спасенной плазмиды (рис. 3, а). Результаты этих экспериментов свидетельствуют о наличии в ДНК трансгенных бабочек таких же по размеру рестрикционных фрагментов, как и у плазмиды *pr8a*, и имеющих гомологию с послед-

ней, что подтверждает происхождение спасенной плазмиды из ДНК трансгенных бабочек тутового шелкопряда F₂-поколения. Кроме того, они указывают на присутствие в *pr8a* последовательности(ей), гомологичной(ых) повторам, представленным в ДНК тутового шелкопряда, поскольку при гибридизации с суммарной меченой ДНК могут быть выявлены только повторяющиеся последовательности генома.

При гибридизации в мягких условиях меченой спасенной плазмиды с ДНК, выделенными из различных видов организмов, видно (рис. 4).

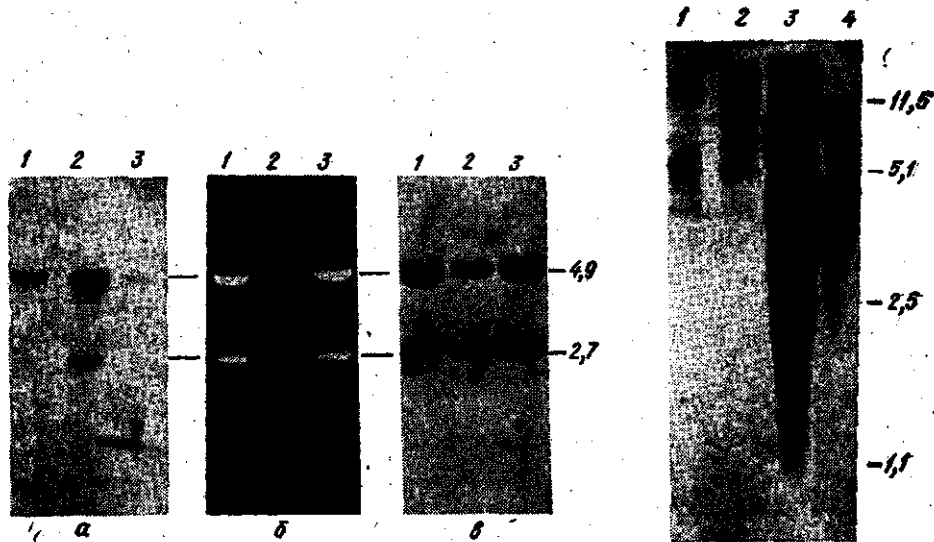


Рис. 3. Блот-гибридизация меченой *p1.5LTR* с рестрицированной *PstI* ДНК трансгенных шелкопрядов № 8а (1), № 16а (2) и № 16б (3) в жестких условиях (а) и меченой суммарной ДНК контрольного шелкопряда с рестрицированными *PstI* спасенными плазмидами *pr8a* (1), *pr16a* (2) и *pr16б* (3) (а); б — электрофореграмма рестрицированных *PstI* плазмид, использованных для гибридизации в в

Рис. 4. Блот-гибридизация в мягких условиях (гибридизация в 5×SSC при 55 °С, отмывка в 55×SSC при 55 °С) суммарных клеточных ДНК шелкопряда (1), дрозофилы (2), мыши (3) и быка (4), рестрицированных *EcoRI*, с меченым *BamHI/PstI*-фрагментом плазмиды *pr8a*, расположенным слева от последовательности *pBR322*

что в плазмиде *pr8a* присутствует последовательность, имеющая гомологию с диспергированными повторами как насекомых (шелкопряд, дрозофила), так и млекопитающих (мышь, бык). Интересно, что в плазмиде *pMARI*, «спасенной» из клеток мыши, также содержался фрагмент, гомологичный консервативным в эволюции повторяющимся последовательностям геномной ДНК [10]. Более того, по-видимому, в большинстве случаев рядом с интегрированным трансгеном расположены повторяющиеся элементы [14, 15]. Все эти факты свидетельствуют о преимущественной рекомбинации экзогенной ДНК в процессе переноса с повторяющимися последовательностями, которые нередко являются консервативными.

Как уже указывалось, в процессе передачи по наследству происходят перестройки трансгена, которые, по-видимому, стабилизируют его структуру. Подтверждением этого могут служить наши неопубликованные данные по повторному переносу спасенной плазмиды *pr8a* в ранние эмбрионы тутового шелкопряда. У двух вновь полученных трансгенных насекомых экзогенная ДНК существовала в экстрахромосомной форме и не отличалась по картине рестрикции от введенной плазмиды. Таким образом, имеются веские основания считать, что описанные в настоящей работе «спасенные» плазмиды за счет рекомбинаций в клетках трех поколений тутового шелкопряда «адаптировались» к этим клеткам.

Summary. With the aid of microinjection of plasmid *pPrC-LTR1.5*, harboring 1.5 DNA copies of Rous sarcoma virus (RSV) long terminal repeats (LTRs) in vector *pBR322*, transgenic silkworms (*Bombyx mori* L.) were obtained. The transgene was transmitted in three, obtained up to now, generation. Most of the exogenous DNA is not integrated into the genome and persist as an extrachromosomal element which was subject to rearrangements. Plasmids have been rescued that carry the part of injected DNA and also fragments of the silkworm cellular DNA. In one of the rescued plasmids a sequence was found that is a member of a family of evolutionally conserved repeated sequences.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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. Соломко, 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, микроинъекционной в грегу 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, N 1.— 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. Э., 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 167 cells / F. Degroote G. Pont, D. Micard, G. Picard // Chromosome.— 1989.— 98, N 2.— P. 201—206.
13. Rash 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. Э., 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. биологии АН СССР, Москва
Тбилис. гос. ун-т
Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 26.11.91