

3. Evans D. G., Silver R. P., Evans D. Y., Chas D. G., Gorbach S. L. Infect. and Immun., 12, 656—667, 1973.
4. Evans D. G., Evans D. Y. Infect. and Immun., 21, 2, 637—647, 1975.
5. Zrskov I., Zrskov P. J. Bacteriol., 91, 1, 69—73, 1966.
6. Zrskov I., Zrskov P. J. Med. Microbiol. and Immunol., 163, 1, 99—100, 1973.

Поступило 26.III 1990 г.

Биолог. журн. Армении, № 12(43), 1990

УДК 577.21

МЕТОД МИКРОИНЪЕКЦИЙ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК В ИКРУ РЫБ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Г. К. ШАХБАЗЯН, Н. Д. КАЗАРЯН

Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван

ДНК экзогенная—икра рыб—трансгены

Для решения как фундаментальных, так и прикладных биотехнологических задач все большее распространение получает трансгенная технология. Трансгены часто экспрессируются и вызывают изменения в системе тканевой специфичности, физиологических реакциях и иногда во всей программе развития организма. Таким образом, открывается путь к изучению функциональной роли и регуляции экспрессии клонированных генов на уровне целого организма.

Разработан целый ряд методик, позволяющих вводить различные последовательности ДНК в клетки зародышевого пути животных. К одному из наиболее распространенных из них относится метод микроинъекций генетического материала в зиготы и ранние эмбрионы различных животных [3, 5].

Для микроинъекций используются рекомбинантные конструкции, содержащие индивидуальные гены, которые помещаются под контроль различных гетерологических промоторов, обеспечивающих тканеспецифичность экспрессии генов.

Целью настоящей работы явилось изучение интеграции и экспрессии экзогенного генетического материала.

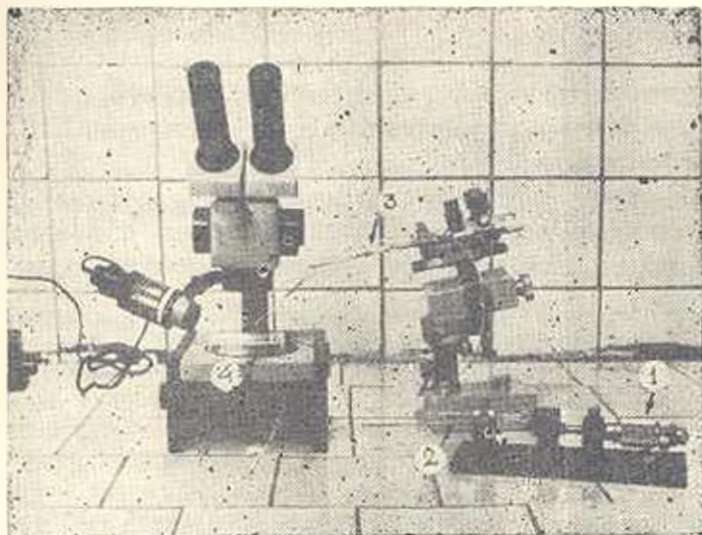
Привлекательными моделями для подобного рода работ, ввиду достаточной изученности эмбриогенеза и сравнительной простоты методических подходов, являются рыбы [2, 4].

Материал и методика. Работу проводили на зрелой икре карпа (*Cyprinidae*), которую получали в ответ на инъекции самкам гормона гонадотропина. Яйцеклетки осеменяли суспензией спермы при 20° и помещали в аппарат на обесклеивание. В оплодотворенное яйцо карпа микроинъектировали рекомбинантную молекулу, которая состояла из слитного гена гомосеринкиназы и треоинисинтетазы под контролем промотора гена металлотонина мышц.

Рекомбинантную ДНК выделяли из *E. coli* С 600 методом щелочного лизиса [1] и очищали 9М LiCl с последующим осаждением ДНК полиэтиленгликолем 6000. Дальнейшую очистку проводили на колонке с сефарозой 4В. Суперскрученную ДНК линейризовали при помощи рестриктазы KpnI и пересаживали этанолом. Препарат растворяли в 10 мМ трис-НСl (рН 7.5) и 0.1 мМ ЭДТА, после чего использовали для микроинъекций.

В цитоплазму формирующегося бластодиска яичи микроинъекцировали 20 мл раствора.

Результаты и обсуждение. Получение трансгенных рыб осуществляли с помощью микроинъекций. Для фиксирования обесклеенную икру помещали в лунку пластинки из оргстекла, а микропипетку, изготовленную из капилляра с оттянутым концом (диаметр кончика микропи-



Установка для микроинъекции в икру рыб: 1—дозатор, 2—микрошприц, 3—держатель микрошприцки, 4—пластинка из оргстекла

петки 15–20 мкм), закрепляли в держателе микроманипулятора КМ-2. Гибким шлангом микропипетку соединяли с микрошприцем (объемом 50 мкл) и заполняли систему дистиллированной водой. Раствор ДНК набирали в микропипетку через носик и вращением ручки микроинжигатора вводили в икру (рис.). Инъектированную икру помещали в аппарат на выживание при 20°.

В результате микроинъекций выживало 10% особей. В нашем эксперименте было получено 23 малька, которые после выклена были перенесены в лабораторные аквариумы.

На данном этапе проводятся исследования по определению наличия интеграции и транскрипции введенной ДНК в различных органах животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Birnboim H. C., Doly J. Nucl. Acids Res., 7, 1513–1517, 1979.
2. Chourrou D. et al. Aquaculture, 51, 2, 1986.
3. Hammer R. E. Nature, 313, 680–683, 1985.
4. Ozato K. et al. Cell Differ., 19, 4, 237–244, 1986.
5. Pulminter R. P., Brinster R. L. Cell, 41, 343–345, 1985.

Поступило 21.XI 1991 г.