

му, для грамотрицательных бактерий. По всей видимости, полные насосы мембраны этих бактерий должны включаться в необходимый период адаптации бактерий на короткое время, что может предотвратить потери энергии в клетках, особенно при низкоэффективных энергетических процессах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гринюс Л. Л., Дагестанчиус Р. Ю., Аликмавичюс Г. А. Биохимия. 45, 1609—1618, 1980.
2. Краткий определитель бактерий Берги. 188—189. М., 1980.
3. Трчунян А. А., Карасулян Э. Л., Ванян Н. А. Биол. журн Армении. 37, 836—843, 1984.
4. Трчунян А. А., Оганджян Е. С., Миронова Г. Д. и др. Биофизика. 36, 102—104, 1994.
5. Dargaryan S. S., Martirosou S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 5, 554—560, 1978.
6. Epstein W. FEMS Microbiol. Lett., 29, 73—78, 1986.
7. Martirosou S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 8, 597—603, 1981.
8. Martirosou S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 11, 29—36, 1983.
9. Martirosou S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 15, 417—426, 1986.
10. Rhoads D. B., Winters F. B., Epstein W. J. Gen. Physiol., 67, 325—341, 1976.
11. Sueller C. H. Science, 138, 789—793, 1970.
12. Trchounian A. A., Ogandjanian E. S. Stud. Biophys., 132, 231—234, 1989.
13. Trchounian A. A., Ogandjanian E. S., Martirosou S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 17, 503—508, 1987.
14. Trchounian A. A., Ter-Nikogossian V. A., Martirosou S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 17, 183—192, 1987.
15. Walderhaug M. O., Doseit D. C., Epstein W. Ion Transport in Procarvates. 85—138, N.—Y.: Acad. Press, 1987.

Поступило 22.IV 1991 г.

Биол. журн. Армении. № 1.(45) 1992

УДК 577.21

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЦ, СОДЕРЖАЩИХ ГЕН ГОРМОНА РОСТА БЫКА, ПОД КОНТРОЛЕМ ДЛИННОГО КОНЦЕВОГО ПОВТОРА ВИРУСА САРКОМЫ РАУСА

Г. К. ШАХБАЗЯН, Н. С. АМБАРЦУМЯН, И. Д. КАЗАРЯН,
А. К. ОГАНЕСЯН, А. К. ШАХБАЗЯН, Ж. И. АКОПЯН

Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван
Бурастанская экспериментальная совхоз-лаборатория, Армения

Проведен анализ F_2 трансгенных мышц на наличие в их геноме интегрированных последовательностей гена гормона роста быка под контролем длинного концевго повтора вируса саркомы Рауса. В двух случаях показана интеграция искомым последовательностей и экспрессия их на уровне транскрипции в мышечных тканях животных.

Կատարված է F_2 տրանսգենային մկների անալիզ ըստ նրանց գենոմում ինտեգրացված ցույց ածի հորմոնի գենի հաջորդականությունների առկայության: Ուսումի սարկոմայի վիրուսի վերջնային երկար կրկնությունն օժանդակությամբ:

Երկու դեպքում ցույց է տրված որոնելի հաջորդականությունների ինտեգրացիան և տրանսկրիպցիայի մակարդակով նրանց էքսպրեսիան կենդանիների մկնային հյուսվածքներում:

The *F_o* of transgenic mice containing integrated sequences of bovine growth hormone gene under the control of Rous sarcoma virus long terminal repeat sequences has been analyzed. Integration in the genomic structure and its transcription in target tissues was shown in two cases.

Трансгенные мыши—ген гормона роста быка

В последние годы интенсивное развитие получили техники микроинъекций генетического материала в зиготы и ранние эмбрионы различных животных [1, 2]. Для микроинъекций используются рекомбинантные конструкции, содержащие индивидуальные гены, которые часто помещены под контроль различных гетерологических промоторов, обеспечивающих тканеспецифичность экспрессии генов в трансгенных животных [3]. Так, первые трансгенные животные были получены в результате инъекции в зиготы мышцей гена гормона роста быка под контролем регулируемого промотора гена металлотионина [4].

Продолжается интенсивный поиск промоторов, имеющих различную силу и тканеспецифичность. Широкое применение нашла сильная промоторы, локализованные в длинных концевых повторах ретровирусов (LTR) [3, 5]. LTR вируса саркомы Рауса (RSV) содержит в своем составе сильный промотор—энхансер, обеспечивающий определенную тканеспецифичность экспрессии генов, находящихся под его контролем. Кроме того, гены, находящиеся под контролем LTR, RSV, активно экспрессируются только у взрослых животных. Это особенно существенно при экспрессии у трансгенных животных генов, кодирующих токсичные для организма белки, способные приостановить развитие организма [3].

LTR, RSV содержат в своем составе также последовательности прокариотического промотора, обеспечивающего транскрипцию прилежащих к нему последовательностей в клетках *E. coli* [6]. Предполагается, что способность LTR RSV направлять транскрипцию в эукариотических и прокариотических клетках можно использовать для предварительной тестировки активности полученных рекомбинантных молекул, подготовленных для микроинъекций, в клетках *E. coli*. С целью проверки этого предположения нами ранее была получена рекомбинантная плазмида, содержащая ген гормона роста быка под контролем LTR RSV (pI2A-GH). Было показано, что последовательности гена гормона роста быка активно транскрибируются в клетках *E. coli* [7].

В настоящей работе представлены результаты экспериментов по получению трансгенных животных, несущих плазмиду pI2A-GH, и проверки возможности транскрипции последовательностей гена гормона роста быка в различных органах и тканях трансгенных животных.

Материал и методика. Клетки *E. coli*, несущие рекомбинантные плазмиды, выращивали на LB-агаре или жидкой L-среде. Использовали плазмиду pI2A-GH [7], рестриктазы—НПО «Фермент».

Плазмидную ДНК выделили по описанному методу [8] с дальнейшей очисткой гель-фильтрацией на колонке с Сефарозой 4В в стерильных условиях. Фрагменты

плазмидной ДНК, содержащие специфические последовательности, выделены электролизом из геля [9].

Микроинъекции плазмидной ДНК проводили без ее предварительной линейризации. Микроинъекции проводили в зиготы мышей, полученные из суперовулированных самок линии ББ по описанному методу [10]. Микроинъекцированные эмбрионы после культивирования пересаживались в эмбрионы псевдобеременных реципиентных самок линии СС57/В1. Выживаемость после этого составляла около 20%.

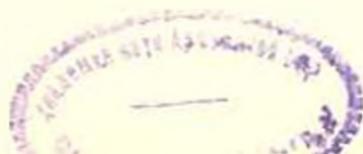
Анализ ДНК родившихся мышей проводили по методу Сазерленда [11]. В качестве радиоактивно меченого зонда использовали либо ДНК плазмиды р1ZA-GH, либо ее фрагменты, содержащие различные участки гена гормона роста быка LTR RSV. Выделение тотальной ДНК и РНК из различных органов мышечной ткани проводили по ранее описанным методам [10]. Гибридизацию ДНК и РНК проводили в жестких условиях, как описано ранее [7].

Результаты и обсуждение. Ранее нами была получена конструкция, содержащая ген гормона роста быка под контролем LTR RSV. После анализа возможности транскрипции последовательностей этого гена в клетках *E. coli* указанная конструкция была микроинъекцирована в зиготы мышей. Выживаемость эмбрионов после этого составляла около 20%. Всего было получено 20 животных F₁. В одном случае был обнаружен эмбрион, погибший в утробе самки реципиента. ДНК, выделенную из печени всех животных, анализировали методом блоттинг-гибридизации на наличие в ней интегрированных последовательностей плазмиды р1ZA-GH.

В двух случаях удалось достоверно выявить наличие интегрированных последовательностей р1ZA-GH в геноме исследуемых животных. Анализ полученных блотов показывает, что интеграция последовательностей р1ZA-GH произошла в различные участки генома мыши. Анализ рестрикционных фрагментов ДНК, гибридизующихся с ДНК плазмиды р1ZA-GH у животного под номером 1, показывает, что точка соединения последовательностей LTR RSV со структурной частью гена гормона роста быка остается интактной при интеграции в геном. Так, нам удается выявить 1,5 т.п.н. PstI фрагмент, гибридизующийся с LTR-специфической пробой ДНК, и 3,9 т.п.н. EcoRI фрагмент, гибридизующийся с тотальной ДНК-пробой. Анализ структуры плазмиды р1ZA-GH позволяет предположить, что подобного размера фрагменты могут образовываться только в случае интеграции плазмиды в геном мыши за счет векторных последовательностей.

Интеграция последовательностей р1ZA-GH в геном наблюдается также при анализе ДНК, выделенной из тотальных тканей внутриутробно погибшего эмбриона. Были получены также указания на интеграцию последовательностей р1ZA-GH в геномы других животных F₁, однако они не были подвергнуты подробному анализу, так как для решения поставленной задачи было достаточно выявления одного животного, содержащего интегрированные последовательности р1ZA-GH в такой ориентации, которая допускает транскрипцию последовательностей гена гормона роста быка в трансгенном животном.

Такая ориентация, допускающая транскрипцию последовательностей гена гормона роста быка в трансгенном животном, была выявлена в случае с животным № 1.



С целью проверки возможности транскрипции последовательностей гена гормона роста быка в этом случае, а также в случае внутриутробно погибшего эмбриона мы провели dot-гибридизационный анализ РНК, выделенной из различных органов животного № 1 на наличие в ней последовательностей, гибридизующихся с геном гормона роста быка. Ген гормона роста быка активно транскрибируется в сердечной мышце, а в тканях почек уровень транскрипции сопоставим с контролем. Анализ РНК, выделенной из печени контрольных и опытного животного, показал наличие фонового уровня за счет гибридизации с эндогенными последовательностями гена гормона роста у контрольных животных и полное отсутствие гибридизации у животного № 1. Не исключено, что наличие последовательностей p1ZA-GH в геноме трансгенных животных изменяет спектр экспрессии эндогенного гена гормона роста в различных тканях.

Транскрипция гена гормона роста быка наблюдается также в препарате РНК, выделенном из внутриутробно погибшего эмбриона. Это позволяет предположить, что гибель эмбриона могла произойти за счет интеграции последовательностей p1ZA-GH в жизненно важный участок генома мыши. Подобного рода ситуация не редка и описана в ряде случаев [12].

Полученные данные о преимущественной транскрипции конструкции, несущей LTR RSV, в мышечной ткани (сердце) полностью совпадают с результатами подробного анализа транскрипции, направленной LTR RSV в трансгенных мышах [3]. Из них следует, что LTR RSV обеспечивает активную транскрипцию прилежащих к ним генов в тканях мезэнхимального происхождения.

Таким образом, один и те же рекомбинантные конструкции, несущие структурные гены, под контролем LTR RSV способны транскрибироваться как в клетках *E. coli* [7], так и в клетках млекопитающих. Следовательно, по крайней мере с конструкциями, несущими LTR RSV, может быть предложен вариант предварительной тестировки биологической (транскрипционной) активности рекомбинантных молекул в клетках *E. coli* до введения их в зиготы млекопитающих.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гловер (под ред.) Новое в клонировании ДНК: методы. М., 1989.
2. Маннингс Т., Фрик Э., Сэмбрук Дж. В кн.: Молекулярное клонирование. М., 1984.
3. Шахбазян Г. К., Бабини К. Ш., Амбарцумян Н. С., Аюлян, Ж. И. Биол. ж. Армении, 11, 388—393, 1988.
4. Birnboim U. C., Doly J. Nucl. acids. Res., 7, 1513—1517, 1979.
5. Guntaka R. V., Mitslakis S. A. Gene, 12, 113—121, 1980.
6. Hammer R. E., Palmiter R., Brinster R. L. Nature, 315, 680—683.
7. Jahner D., Haase K., Mulligan R., Jaenisch R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 6927—6931, 1985.
8. Overbeek P. A., Lai S. P., Van Quill R., Westphal H. Science, 2316, 1574—1576, 1986.

9. Palmer R. D., Brinster R. L., *Cell*, 41, 343-435, 1985.
 10. Palmer R. D., Brinster R. L. *Annu. Rev. Genet.* 21, 465-499, 1985.
 11. Ross S. R., Sotter D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 5880-5884, 1985.
 12. Southern E. L. *Mol. Biol.* 9, 593, 1974.

Получено 1.11.1991

Бюллетень журн. Архивна. № 1 (45), 1992

Т. 8, № 386-612-1977

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЕТОИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ХЛОРОПЛАСТОВ

Г. Б. ГУКАСЯН, С. А. ГОНИН, А. Е. ЗАКЛЯН, Г. А. ПАНОСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии

Показаны светоиндуцированные изменения электрокинетического потенциала хлоропластов высших растений. Величина электрокинетического потенциала -40 ± -60 мВ, а при значениях pH 4,3 и выше его значение переходит на положительный. Освещение вызывает значительное увеличение электрокинетического потенциала на 60-90% в отсутствие электронного акцептора электронов и на 80-140%, в присутствии $K_2Fe(CN)_6$. Ингибитор электронного транспорта антрацин подавляет светоиндуцированный рост потенциала.

Ուսումնասիրված բարձրակարգ բույսերի քլորոպլաստների էլեկտրակինետիկական պոտենցիալի լուսաինդուցիվ փոփոխությունները էլեկտրոակտիվական պոտենցիալի մեծությունը -40 ± -60 մՎ է. իսկ pH 4,3-ում և ավելի բարձր ցածրում նրա նշանը փոխվում է դրականի (ուստի որովհետև առաջացնում է էլեկտրակինետիկական պոտենցիալի դրական մեծացում, 60-90 % էլեկտրոնների կիրառման անցնելու արդյունքում և 80-140 % $K_2Fe(CN)_6$ ներկայության դեպքում:

Light-induced alterations of electrokinetic potentials of high-plants' chloroplasts are shown. Illumination causes considerable increase of electrokinetic potential: 60-90% in the absence of electron acceptor of electrons and 80-140% in the presence of $K_2Fe(CN)_6$.

Хлоропласты—электронный транспорт—электрокинетический потенциал

Исследование поверхностных свойств тилакоидных мембран расширяет возможности изучения и контролирования ряда фотосинтетических процессов, которые в определенной мере обуславливают эти свойства. Ряд исследователей показали, что поверхностный заряд тилакоидов обусловлен в основном интегральными белками мембран [4, 7]. Эти данные подтверждались нами на искусственных системах. При изучении процесса слияния фосфолипидных липосом со встроенным пигмент-белковым комплексом фотосистемы I с плоской фосфолипидной мембраной было обнаружено, что этот процесс во многом обусловлен зарядом встроенного и мембрану липосом белка [1].

Целью настоящей работы явилось изучение изменений поверхностного потенциала хлоропластных мембран при смене темновых и све-