



Молекулярно-генетические аспекты технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами N-ацетилтрансферазы (*NAT1* и *NAT2*) человека

В.Н. Каркищенко¹, В.П. Рябых², Н.Н. Каркищенко¹, М.С. Дуля¹,
В.А. Езерский², Е.М. Колоскова², В.Н. Лазарев¹, С.В. Максименко²,
Н.В. Петрова¹, В.Н. Столярова², Т.П. Трубицина²

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных», Калужская область

Контактная информация: д.м.н. Каркищенко Владислав Николаевич, vlad1672@ya.ru

В ходе работы были созданы ДНК-конструкции, включающие нуклеотидные последовательности генов *NAT1* и *NAT2* человека и промоторно-энхансерную область гена альбумина мыши. Кодировующие части генов *NAT1* и *NAT2* были амплифицированы с матрицы геномной ДНК человека с использованием олигонуклеотидов *NAT1*-Not и *NAT1*-Xho в случае *NAT1* и *NAT2*-Not и *NAT2*-Xho – в случае *NAT2*. Плазмиды pSI-*NAT1* и pSI-*NAT2* расщепляли эндонуклеазами *Bam*HI и *Eco*RV (сайт рестрикции *Eco*RV был введен в олигонуклеотид *enAlb*-F).

Параллельно осуществлялся синтез олигонуклеотидных праймеров и детекция экспрессии генов у людей и создаваемых трансгенных животных с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров.

На следующих этапах осуществлялось выделение ДНК/РНК из пробы плазмы крови, амплификация геномной ДНК, идентификация ПЦР-продуктов методом горизонтального электрофореза. Наличие в геле полосы ДНК соответствующего размера свидетельствовало о наличии в образце искомого гена.

Получены трансгенные мыши (F0) с интегрированными в их геном конструкциями, включающими нуклеотидные последовательности генов *NAT1* и *NAT2* человека под промотором гена альбумина мыши. Общая эффективность трансгеноза составила для гена *NAT1* – 1,1% и для *NAT2* – 0,6%. Анализ интеграции трансгенов в различных органах и тканях у потомков (F1) первичных трансгенных мышей (F0) показал, что встраивание генов *NAT1* и *NAT2* человека произошло во все три зародышевых листка.

Ключевые слова: ДНК-конструкции генов *NAT1* и *NAT2*, промоторно-энхансерная область гена, плазмиды, высокоспецифичные праймеры, детекция экспрессии генов, амплификация, трансгеноз.

Введение

Ацетилирование в живых системах является фундаментальным процессом

генетических и эпигенетических механизмов, который, наряду с процессом метилирования, обеспечивает стабиль-

ность и оптимальное функционирование геномов. Огромное количество лекарственных препаратов и ксенобиотиков участвует в гистоновых модификациях через вовлечение ацетильных групп и ацетилирование, которые, не влияя на исходную последовательность генов, существенно изменяют их экспрессию.

Несмотря на важную роль в метаболизме экологических и синтетических химических веществ, ферменты, метаболизирующие ксенобиотики, первоначально развивались, чтобы катализировать реакции эндогенного метаболизма [15]. Например, фаза I ферментов CYP450, как известно, действуют при широком диапазоне эндогенных субстратов, в т.ч. стероидов, жирных кислот, желчных кислот, простагландинов, лейкотриенов, ретиноидов и биогенных аминов [16, 20]. II фаза сульфотрансфераз и UDP-глюкуроносультрансфераз также играют ключевую роль в эндогенном метаболизме стероидов и билирубина [9, 11].

Дальнейший прогресс в направленном поиске лекарств определяется наличием адекватных биологических моделей в виде трансгенных или гуманизированных животных, несущих гены человека. Эндогенная роль человеческой NAT1 и ее мышинового гомолога NAT2 далее поддерживается повсеместной экспрессией двух изоферментов и тем, что они представлены в зародыше и ранних стадиях преимплантационных эмбрионов на протяжении всего развития. Работы прошлых лет с конгенными и рекомбинантными инбредными линиями подразумевали генетическую связь между фенотипами медленных ацетиляторов и высокой чувствительностью

к тератогенно-индуцированному орофациальному расщеплению [12, 13], в то время как последние исследования показывают взаимодействие человеческой NAT1 с транскрипцией фактора внутри клеточного ядра [6, 10].

В качестве средства, исследующего постулат эндогенной роли NAT, ученые предприняли попытку получения трансгенных мышей, лишенных или сверхэкспрессирующих NAT-изоферменты. Первые сообщения в литературе свидетельствуют о том, что NAT-ограниченные, *NAT2*-нокаутные [8] или *NAT1/NAT2*-нокаутные [19], мыши нормально развиваются и не страдают никакими очевидными фенотипическими дефектами. Корниш и др. [6] подтвердили, что уровни активности гена *NAT2* строго дозозависимые, *p*-ABA N-ацетилирование у мышей *NAT2* (+/+) примерно в два раза выше, чем у гетерозигот *NAT2* (+/-). *p*-ABA-ацетилирования не наблюдалось у гомозиготных «нулевых» мышей *NAT2* (-/-), предполагая, что дефицит не компенсируется другими ферментами метаболизма ксенобиотиков.

Этот эффект «ген-доза» также отражается на уровнях иммунореактивности белка NAT2, обнаруженного в печени мышей *NAT2* (+/+), *NAT2* (+/-) и *NAT2* (-/-) линий. Также стало возможным контролировать тканеспецифичную экспрессию NAT2 при помощи X-Gal-окрашивания нокаутных эмбрионов, т.к. кассета, используемая для прижигания NAT2 ORF, также содержит ген *LacZ* транскрипции, связанный с эндогенным NAT2-промотором через внутренний рибосомный сайт вступления (IRES).

Sugamori и др. [18] сделали еще один шаг вперед, нокаутировав гены *NAT1* и *NAT2* у мышей. Полное отсутствие ген-

ных продуктов было подтверждено с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и анализа ферментативной активности. Было показано, что гомозиготные *NAT1/NAT2* (-/-) мыши «подрывают» возможность метаболизировать лекарственные средства в силу отсутствия N-ацетилированных производных п-AS и СМЗ в плазме *NAT1/NAT2*-дефицитных мышей.

Получение *NAT3*-нокаутных линий также было недавно проведено Sugamori и соавт. [16]. Эта линия является фенотипически нормальной и имеет ту же ариламинметаболизирующую способность, как и у дикого типа. Сверхэкспрессия *NAT3* случайно индуцируется у двойного нокаута *NAT1/NAT2*, как результат присутствия сильных элементов промотора в аблации кассеты, не имеющего никакого фенотипического воздействия.

Исследователи также попытались воспроизвести сверхэкспрессию *NAT2*-подобного белка у трансгенных мышей. Sim и др. [17] сообщают о грубых нарушениях, ведущих к смерти химерных эмбрионов мышей с избыточной экспрессией человеческой *NAT1*. Другие исследования обнаружили нормальное развитие мышей, несущих тот же трансген, но сообщают только о скромной (или об отсутствии увеличения) ферментативной активности, даже на сроках, где количество копий гена человеческой *NAT1* является высоким [7]. Различные вариации методик, используемых для генерации трансгенных линий, могут объяснить противоречивые результаты двух исследований.

В целом, исследование трансгенных моделей для NAT позволяет предпо-

ложить, что изоферменты не участвуют в решающей эндогенной функции организма. Это не абсолютно неожиданное открытие, поскольку в литературе есть несколько примеров фенотипически нормальных нокаутных мышей, которые испытывают дефицит ферментов фазы I и II метаболизма ксенобиотиков [3]. Тем не менее, эти мыши по-разному реагируют на применение канцерогенов, и их способности метаболизировать препараты могут быть также нарушены.

Предварительное исследование трансгенных мышей с гиперэкспрессией человеческого *NAT2*-изофермента в простате не выявило какого-либо влияния на локальную скорость биоактивации предканцерогенов, таких как PhIP [14]. Тем не менее, необходимы дальнейшие детальные исследования, чтобы определить, как NAT-дефицит или избыточная экспрессия могут модулировать восприимчивость к химической токсичности и раку. С этой целью NAT-нокаутные и трансгенные линии, доступные для научного сообщества, будут очень полезны.

Молекулярно-генетические аспекты получения трансгенных мышей основываются на генно-инженерных технологиях, к которым относятся:

- получение нуклеотидных последовательностей структурного гена, кодирующего тот или иной признак;
- получение нуклеотидных последовательностей регуляторных участков гена (промоторов, энхансеров и др.);
- создание генно-инженерных конструкций;
- анализ интеграции трансгена у эмбрионов и животных, полученных из зигот, микроинъектированных генно-инженерными конструкциями.

Цель работы – создание генетических конструкций с генами *NAT1* и *NAT2* человека и животных, несущих гены NAT.

Материалы и методы

Создание генетической конструкции с генами *NAT1* и *NAT2* человека

Кодирующие части генов *NAT1* и *NAT2* были амплифицированы с матрицы геномной ДНК человека с использованием олигонуклеотидов NAT1-Not и NAT1-Xho в случае *NAT1* и NAT2-Not и NAT2-Xho – в случае *NAT2*. Плазмиды pSI-NAT1 и pSI-NAT2 расщепляли эндонуклеазами BamHI и EcoRV (сайт рестрикции EcoRV был введен в олигонуклеотид enAlb-F).

ПЦР проводили с использованием ДНК-полимеразы Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученный продукт очищали путем препаративного электрофореза в агарозном геле и выделяли с помощью набора Gene JET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific).

Препаративное выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора Jet Star Plasmid Purification Maxi Kit (Genomed, Германия) согласно инструкции фирмы-производителя.

Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Полосу, соответствующую по подвижности ДНК-фрагменту размером 3,5 кБ, вырезали и выделяли из геля с помощью набора Gene JET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Концентрацию ДНК в конечном растворе определяли по оптической плотности при длине волны 260 нм.

Правильность структуры плазмид проверяли путем секвенирования по Сэнгеру с использованием олигонукле-

отидов pSI-F и pSI-R на капиллярном автоматическом секвенаторе.

ПЦР-анализ интеграции трансгенов в геном животных

Определение интеграции трансгена у потомства мышей, полученного из зигот, микроинъектированных генно-инженерной конструкцией, проводили с использованием ПЦР-амплификации.

Выделение геномной ДНК из тканей проводили по методу Блина и Стаффорда [4] с некоторыми модификациями.

ДНК из лизата выделяли гуанидиновым методом: сорбцией на стекле в высокосолеовом растворе, с последующими несколькими промывками Трис-спиртовым (80%) буфером, испарением спирта и растворением ДНК, сорбированной на стекле, в ТЕ-буфере.

Для определения интеграции генно-инженерной конструкции в геном мыши использовали метод ПЦР с применением следующих пар праймеров:

для обнаружения конструкции Alb-NAT1 брали пару – prAlb-F (прямой) и NAT1-Not (обратный);

для обнаружения конструкции Alb-NAT2 брали пару – prAlb-F (прямой) и NAT2-Not (обратный).

В обоих случаях величина амплификата составляла 1504 пары нуклеотидов (п.н.).

Нуклеотидные последовательности используемых праймеров:

prAlb-F: GAC CCA TGG GGC ATG CTT CCA TGC CAA G - 5'-концевой на промотор (28 п.н.);

NAT1-Not: GAA GCG GCC GCC TAA ATA GTA AAA AAT CTA TCA CCA 3'-концевой на *NAT1* (36 п.н.);

NAT2-Not: GAA GCG GCC GCC TAA ATA GTA AGG GAA CCA TCA C - 3'-концевой на *NAT2* (34 п.н.).

Электрофорез проводили в 0,8% агарозном геле в 0,5хTBE. В каждую лунку вносили по 18-20 мкл ПЦР-смеси (окрашенная водная фаза) для ДНК из образцов тканей мышей или 6-10 мкл положительного контроля.

Для оценки размера амплификата одна из дорожек агарозного геля выделялась для ДНК-маркера (100-10000 п.н., Fermentas).

Результаты и их обсуждение

Создание генно-инженерных конструкций, включающих нуклеотидные последовательности генов *NAT1* и *NAT2* человека

Плазмиды, содержащие участки ДНК, кодирующие *NAT1* и *NAT2*, под контролем промотора мышинного гена альбумина, были получены в три этапа, на основе плазмиды pSI (Promega). На первом этапе из плазмиды был удален промоторный участок и заменен на промотор мы-

шиного гена альбумина. На втором этапе в плазмиду ввели энхансерный участок мышинного гена альбумина. На последнем этапе в полученный вектор вводили кодирующие участки для белков NAT1 и NAT2. Поэтапное конструирование регуляторной области объясняется тем, что в мышинном геноме промотор и энхансер гена альбумина физически удалены на большое расстояние (около 8 кБ).

Участки ДНК, соответствующие промотору и энхансеру мышинного гена альбумина, были получены с помощью ПЦР. В качестве матрицы использовалась ДНК мыши. Для амплификации энхансерного участка применяли олигонуклеотиды enAlb-F и enAlb-R с введенными сайтами рестрикции BamHI и NcoI соответственно. Для амплификации промоторного участка применяли олигонуклеотиды prAlb-F и prAlb-R с введенными сайтами рестрикции NcoI и HindIII соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Структура олигонуклеотидов

Название	Структура 5'->3'
enAlb-F	TGGATCCGATATCTAGCTTCCTTAGCATGACGTTCT
enAlb-R	ATACCATGGGTCCTCAAGCTGGAGAACGCA
prAlb-F	GACCCATGGGGCATGCTTCCATGCCAAG
prAlb-R	AATCAAGCTTGGGGTTGATAGGAAAGGTGATC
NAT1-Not	GAAGCGGCCGCTAAATAGTAAAAAATCTATCACCA
NAT1-Xho	AGCCTCGAGATGGACATTGAAGCATATCTTG
NAT2-Not	GAAGCGGCCGCTAAATAGTAAGGGAACCATCAC
NAT2-Xho	AGCCTCGAGATGGACATTGAAGCATATTTTG
pSI-F	GTTTCGCCACCTCTGACTTG
pSI-R	TCACTGCATTCTAGTTGTGGT
pSI-int	CCTATTGGTCTTACTGACATC
en-s1	GTGTCTCCTGCTCTGTCAG
en-s2	AGCAGATCTCTGAGTTCAAGA

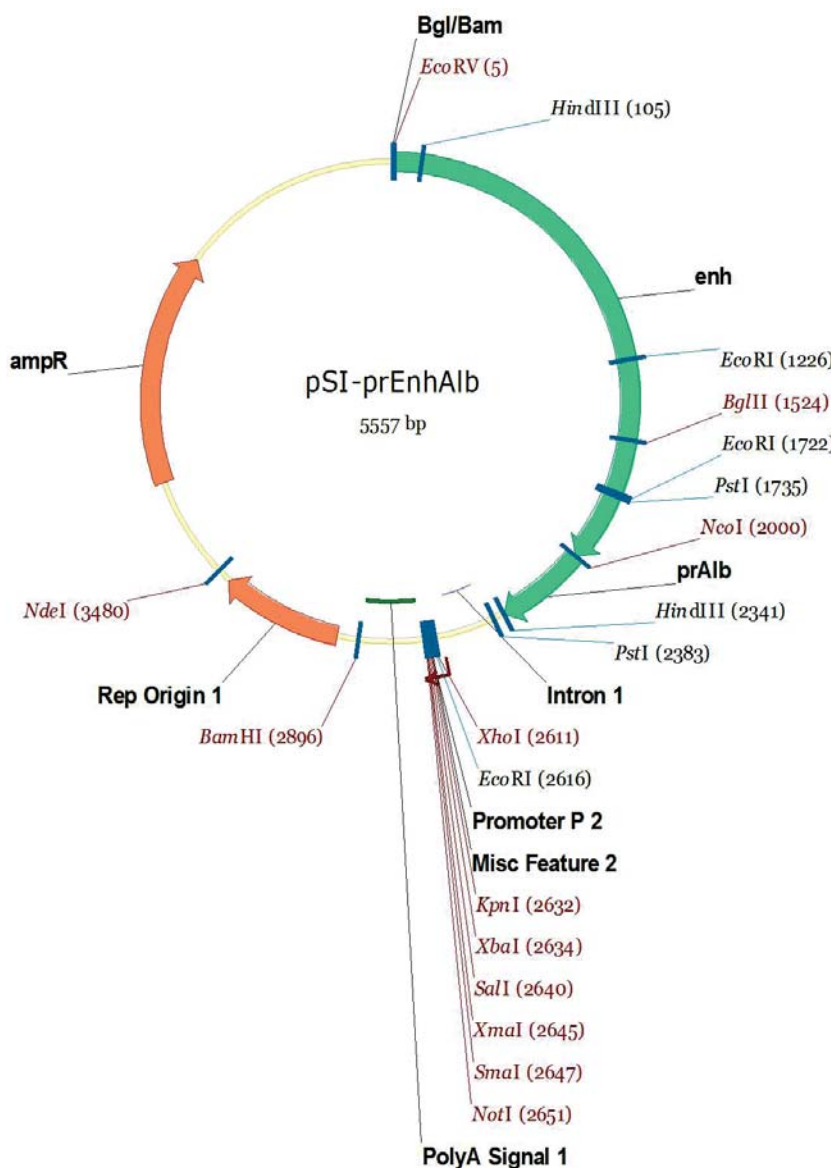


Рис. 1. Карта плазмиды pSI-prEnhAlb.

На следующем этапе плазмиду pSI-prAlb (рис. 1) обрабатывали эндонуклеазами BglII и NcoI. Фрагмент ДНК, соответствующий энхансерной области гена альбумина, расщепляли с помощью эндонуклеаз BamHI и NcoI. Продукты расщепления объединяли и подвергали действию T4-ДНК-лигазы.

Дальнейшие операции по трансформации, отбору целевых клонов и получению плазмидной ДНК проводились по аналогии с вышеописанным. При секвенировании использовали олигонуклеотиды pSI-F, pSI-R, enAlb-R, en-s1 и en-s2. В результате была получена плаزمида pSI-prEnhAlb.

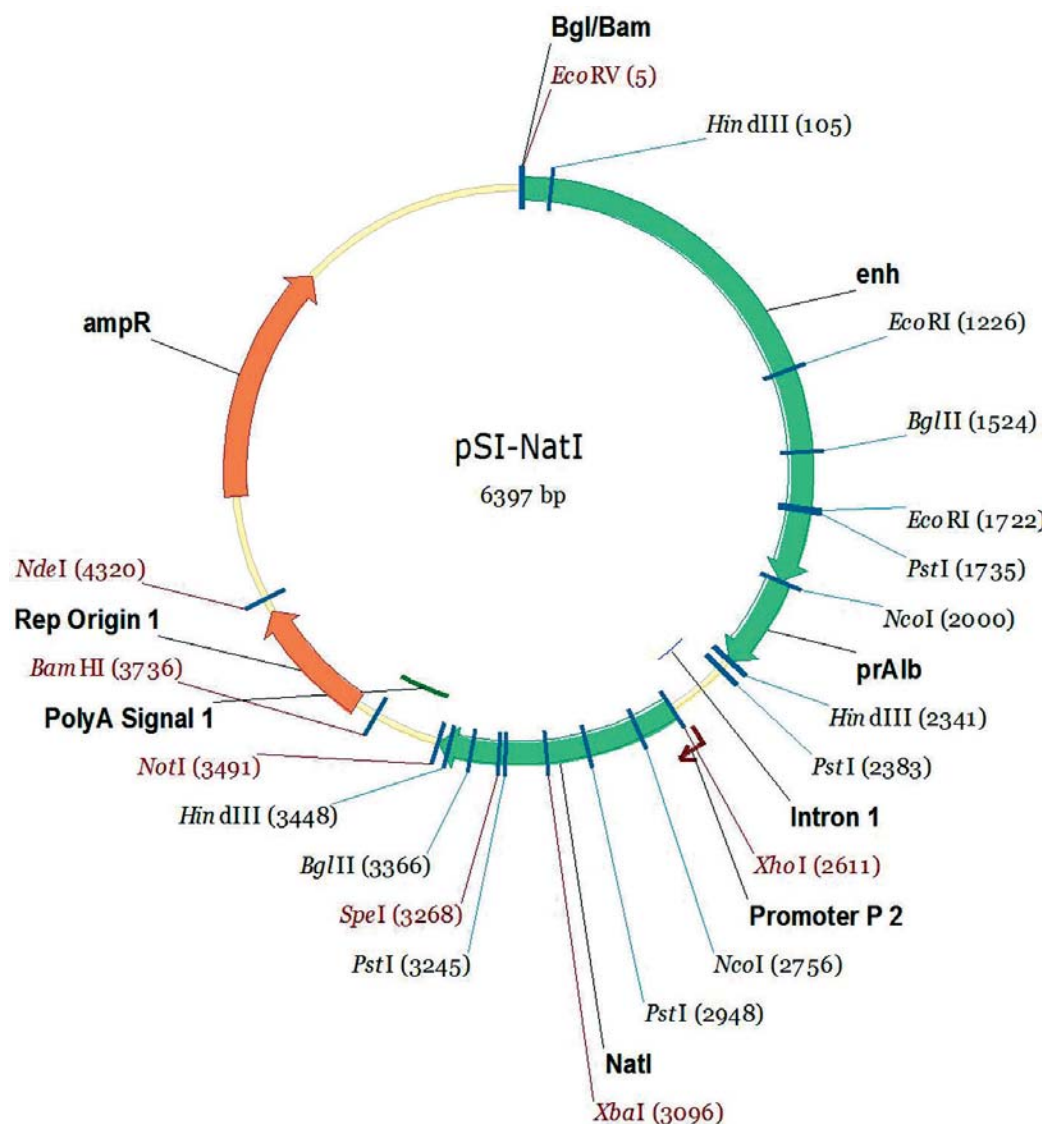


Рис. 2. Карта плазмиды pSI-NAT1.

Кодирующие части генов *NAT1* и *NAT2* были амплифицированы с матрицы геномной ДНК человека с использованием олигонуклеотидов NAT1-Not и NAT1-Xho в случае *NAT1* и NAT2-Not и NAT2-Xho – в случае *NAT2*. Полученные ДНК-фрагменты обрабатывали эндонуклеазами NotI и XhoI и объединяли путем

лигирования с плазмидой pSI-prEnhAlb, расщепленной теми же ферментами. Дальнейшие операции проводили аналогично. Для ПЦР-анализа бактериальных колоний и секвенирования использовали олигонуклеотиды pSI-R и pSI-int. В результате получены плазмиды pSI-NAT1 (рис. 2) и pSI-NAT2 (рис. 3).

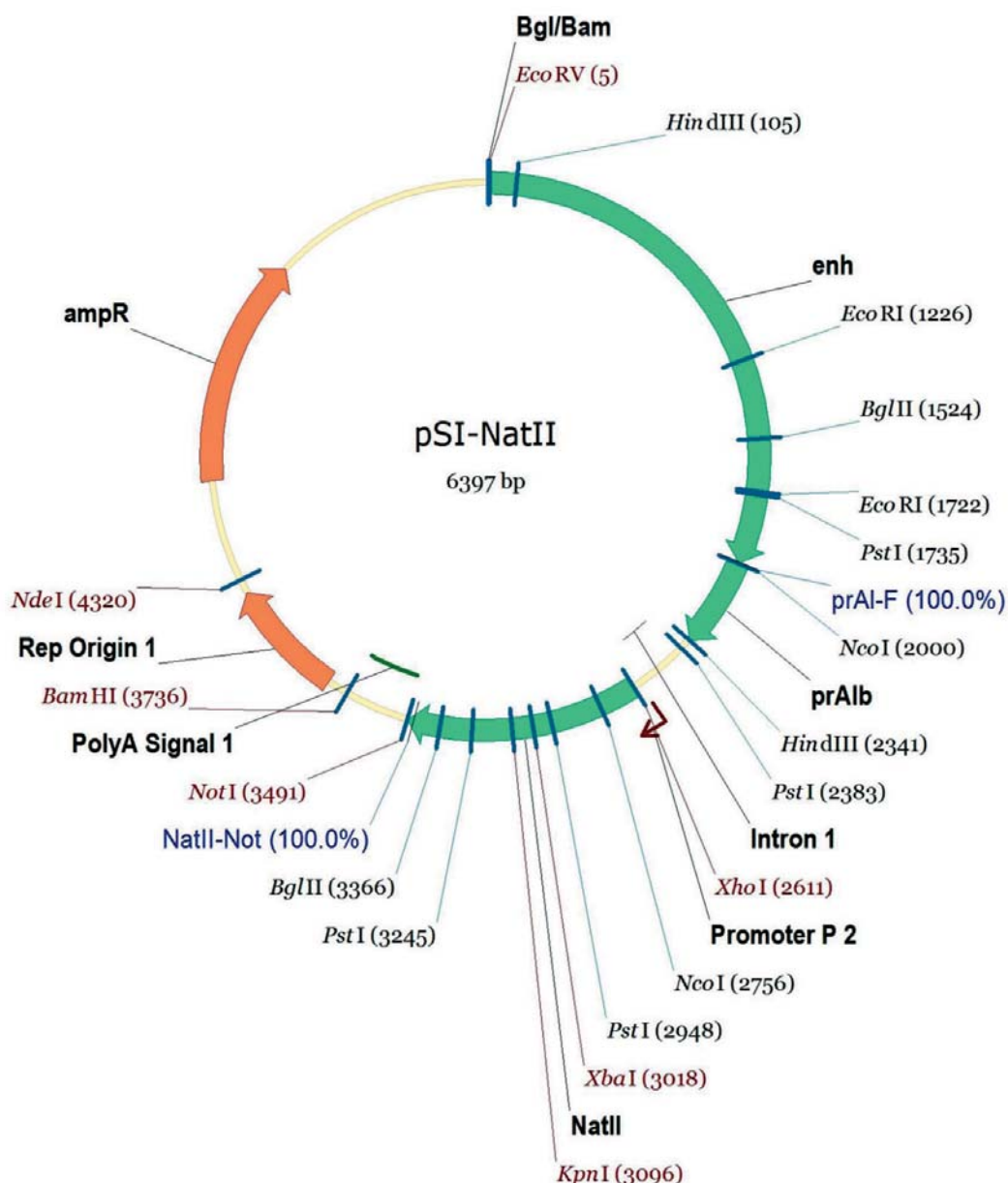


Рис. 3. Схема получения конструкции NAT2 под альбуминовым промотором.

ПЦР-анализ интеграции транс-генов в органах и тканях потомков трансгенных мышей показал, что встраивание трансгенов у потомков первичных трансгенных мышей (F1)

произошло во все исследуемые органы (рис. 4-6), а, следовательно, интеграция трансгенов у первичных животных (F0) произошла во все три зародышевых листка.

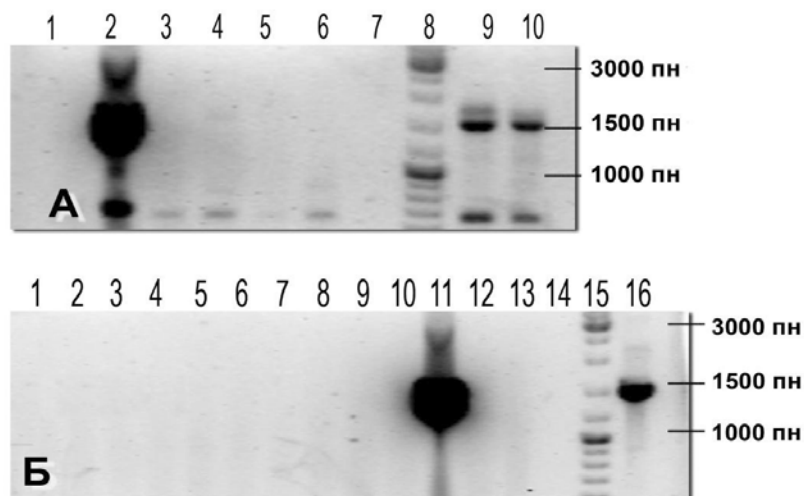


Рис. 4. Электрофореграммы продуктов ПЦР-амплификации ДНК, выделенной из хвостов мышей (F0), полученных в результате микроинъекции конструкций Alb-NAT2 (А) и Alb-NAT1 (Б). Амплификаты размером 1500 п.н. ограничены праймерами prAlb-F-NAT2 и prAlb-F-NAT1. 0,8% агарозный гель с 0,5хТБЕ.

Обозначения: А: 1-6 – образцы №№ 1-6; Б: 1-13 – образцы №№ 7-19; 7 (А), 14 (Б) – вода (отрицательный контроль); 8 (А), 15 (Б) – маркеры размеров ДНК; 9 (А), 16 (Б) – положительный контроль (K+, конструкция Alb-NAT2 (1), 0,001 пг/мкл); 10 (А) – контроль ингибирования (K+, образец ДНК кролика). Мыши №№ 2 и 17 (дорожки 2А и 11Б соответственно) – трансгенные.

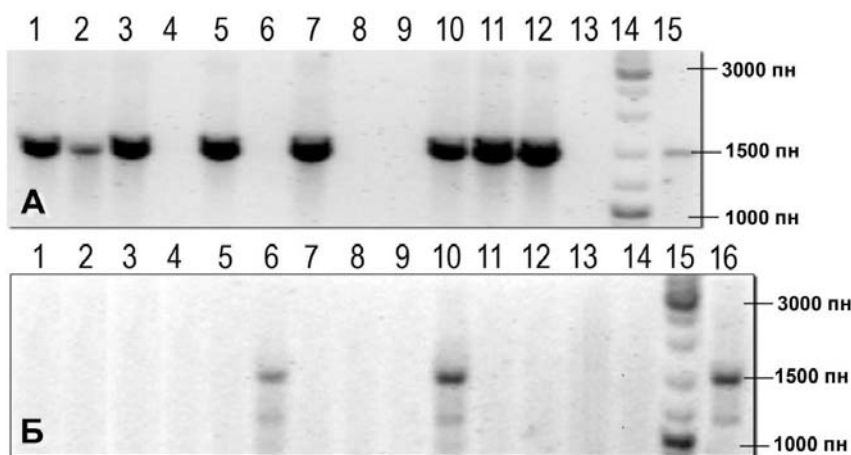


Рис. 5. Электрофореграммы продуктов ПЦР-амплификации ДНК, выделенной из хвостов мышей, потомков (F1) трансгенных основателей линий с генами человека: NAT1 (А) и NAT2 (Б). Амплификаты размером 1500 п.н. ограничены праймерами prAlb-F-NAT1 и prAlb-F-NAT3. 0,8% агарозный гель с 0,5хТБЕ.

Обозначения: А: 1-12 – образцы №№ 1-12; Б: 1-14 – образцы №№ 13-25; 13 (А) – вода (отрицательный контроль); 14 (А), 15 (Б) – маркеры размеров ДНК; 15 (А), 16 (Б) – положительный контроль (K+, мышь № 17 (А), мышь № 49 (Б) - F0). Мыши №№ 2 и 17 (дорожки 2А и 11Б) – трансгенные.

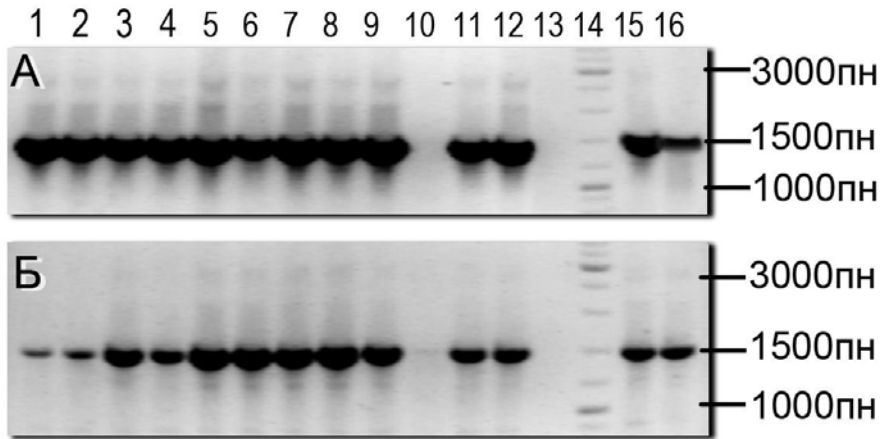


Рис. 6. Электрофореграммы продуктов ПЦР-амплификации ДНК, выделенной из органов и тканей мышей, трансгенных по N-ацетилтрансферазе-1 (*NAT1*) и N-ацетилтрансферазе-2 (*NAT2*) человека (снимки А и Б соответственно). Амплификаты ограничены праймерами Alb-NAT1 (2) (содержат фрагменты последовательности промотора гена альбумина мыши и гена N-ацетилтрансферазы человека), общий размер амплификата – 1500 п.н. 0,8% агарозный гель с 0,5хТБЕ.

Обозначения: 1, 2 – левый и правый яичники; 3 – матка; 4 – мышцы; 5 – кишечник; 6 – почка; 7 – печень; 8 – селезенка; 9 – желудок; 10 – отрицательный контроль (нетрансгенная мышь, хвост); 11 – сердце; 12 – тимус; 13 – вода; 14 – маркер размеров ДНК; 15 – положительный контроль (хвост трансгенной по *NAT1* (2) мыши, ранее тестированной как содержащей трансген); 16 – контроль ингибирования (K⁺, один из образцов 1-9).

Эффективность получения гуманизированных трансгенных мышей с интегрированными конструкциями *NAT1hom* и *NAT2hom* человека

Анализ методом ПЦР интеграции трансгена в геном рождённого потомства (табл. 2) показал, что из 66-ти мышат, полученных из зигот, микроинъецированных конструкцией *NAT1hom*, у пяти была обнаружена интеграция трансгена, что составило 7,6% от чи-

сла рождённых животных. Тогда как из зигот, микроинъецированных конструкцией *NAT2hom*, из 118-ти рождённых мышат интеграция трансгена была обнаружена только у трех потомков, что составило 2,5% от числа рождённых животных. Причина сравнительно низкого выхода трансгенных мышей с интегрированной конструкцией *NAT2hom* требует дальнейшего выяснения.

Таблица 2

№ групп	Конструкция	Число трансплан-тир. эмбрионов	Родилось потомков			Общая эф-фективность трансгеноза (%)
			всего	из них трансген-ных		
				N	N	
I	NAT1hom	434	66	5	7,6	1,1
II	NAT2hom	488	118	3	2,5	0,6

Эффективность получения гуманизированных трансгенных мышей с интегрированными конструкциями *NAT1hom* и *NAT2hom* человека

Общая эффективность технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами *NAT1hom* и *NAT2hom*, т.е. отношение количества полученных трансгенных животных к числу трансплантированных эмбрионов, микроинъектированных генной конструкцией, составила 1,1 и 0,6%, что соответствует среднему стандартному международному уровню (табл. 2).

Закключение

Нами созданы ДНК-конструкции *NAT1* и *NAT2*, включавшие выделение плазмидной ДНК, удаление из клеток *E. coli* промоторного участка с его заменой на промотор мышинового гена альбумина. Плазмиду pSI-prAlb обрабатывали эндонуклеазами до получения плазмиды pSI-prEnhAlb. Кодировующие части генов *NAT1* и *NAT2* были амплифицированы с матрицы геномной ДНК человека с использованием олигонуклеотидов NAT1-Not и NAT1-Xho в случае *NAT1* и NAT2-Not и NAT2-Xho – в случае *NAT2*. Плазмиды pSI-NAT1 и pSI-NAT2 расщепляли эндонуклеазами BamHI и EcoRV (сайт рестрикции EcoRV был введен в олигонуклеотид enAlb-F). Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Полосу, соответствующую по подвижности ДНК-фрагменту размером 3,5 кБ, вырезали и выделяли из геля с помощью набора Gene JET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Концентрацию ДНК в конечном растворе определяли по оптической плотности при длине волны 260 нм.

Микроинъекции генно-инженерных конструкций вводили в пронуклеусы зигот гибридных мышей. С целью проведения трансплантации ДНК-конструкций *NAT1* и *NAT2* были усовершенствованы или созданы новые методики ксенотрансплантации.

Учитывая результаты наших исследований об отрицательном влиянии слишком ранней экспрессии генно-инженерных конструкций под *cmv*-промотором на жизнеспособность предимплантационных эмбрионов млекопитающих [1, 2], нами при создании конструкций с нуклеотидными последовательностями генов *NAT1* и *NAT2* человека в качестве промоторно-энхансорной области была выбрана регуляторная область гена альбумина мыши (рис. 2). Этот выбор обусловлен тем, что ген альбумина в предимплантационных эмбрионах ещё не активен, и, по всей вероятности, альбуминовый промотор не должен запускать экспрессию чужеродных генов *NAT1* и *NAT2* человека и оказывать отрицательное влияние на их жизнеспособность.

В качестве доноров эмбрионов использовали самок гибридных мышей F1 CBA/Jac * C57BL/6 массой 16-18 г. На следующих этапах осуществлялось выделение ДНК/РНК из пробы плазмы крови, амплификация геномной ДНК, идентификация ПЦР-продуктов методом горизонтального электрофореза. Наличие в геле полосы ДНК соответствующего размера свидетельствовало о присутствии в образце искомого гена.

Параллельно осуществлялся синтез специфических олигонуклеотидных праймеров и детекция экспрессии генов у людей и создаваемых трансгенных животных. Гены *NAT1* и *NAT2* амплифицировались по стандартным методикам.

На основе выполненных работ были получены ДНК-конструкции *NAT1* и *NAT2* с соответствующими генами человека. С помощью генно-инженерных методов получены животные, несущие гены *NAT1* и *NAT2* человека, а также первая генерация соответствующих трансгенных животных. Ранее был проведен биоинформационный анализ последовательностей генов *NAT1* и *NAT2* мышей, крыс, кроликов для отбора наиболее перспективных нуклеотидных последовательностей мишеней, с целью использования в синтезе видоспецифичных праймеров для полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [3].

Результаты наших исследований приживаемости 2-клеточных мышинных эмбрионов, инъецированных генно-инженерными конструкциями *NAT1* и *NAT2* человека, в организме самок-реципиентов, свидетельствующих о достаточно высоком проценте приживаемости этих эмбрионов (как в пересчёте на всех реципиентов, так и на беременных), подтверждают это предположение.

Анализ интеграции трансгенов в органах и тканях потомков мышей, трансгенных как по гену *NAT1*, так и по *NAT2* человека, показал, что встраивание трансгенов у первичных трансгенных мышей (F0) произошло во все три зародышевых листка – эктодерму, энтодерму и мезодерму. Особенно важно, что встраивание трансгенов у самок произошло в оба яичника. Это должно позволить быстро размножить и создать линии трансгенных животных.

В нашей работе (так же, как и у исследователей из Аризонского университета [7]) было получено 5 первичных (F0) трансгенных мышей с интегри-

рованной конструкцией *hNAT1* и 3 – с *hNAT2* человека. Причина относительно более низкого выхода трансгенных мышей с интегрированной конструкцией *NAT2^{hom}* требует своего дальнейшего выяснения.

Проведено исследование вариантов ацетилирования гена *NAT2* у различных линий мышей методом ПДРФ-анализа с применением эндонуклеаз рестрикции: KpnI, TagI, BamHI. Проведены молекулярно-генетические исследования экспрессии генов *NAT2* и *NAT1* человека и мыши на уровне мРНК у трансгенных животных методом ОТ-ПЦР с применением видоспецифичных праймеров.

Проведено сравнение видоспецифичных праймеров для ОТ-ПЦР у людей и лабораторных животных для последующей оптимизации экстраполяции биомodelей ацетиляционного полиморфизма по *NAT1* и *NAT2*, а также для изучения механизмов сегрегации индивидуумов в медленные, быстрые или промежуточные ацетиляторные фенотипы, что будет представлено в последующих публикациях.

По результатам выполнения работы с помощью видоспецифичных праймеров подтверждено наличие генов *NAT1* и *NAT2* человека у создаваемых линий трансгенных мышей.

Список литературы

1. Езерский В.А., Тевкин С.И., Трубицина Т.П., Колоскова Е.М., Шишиморova М.С., Безбородова О.А., Якубовская Р.И., Рябых В.П. Интеграция и тканеспецифическая экспрессия гена лактоферрина человека в молочной железе трансгенных кроликов // Проблемы биологии продуктивных животных. 2013. № 4. С. 33-52.
2. Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М. Создание гумани-

- зированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы) // Биомедицина. 2014. № 3. С. 4-22.
3. **Каркищенко Н.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В.** Высокоспецифичные видовые праймеры к генам *NAT1* и *NAT2* для сравнительных исследований у человека и лабораторных животных // Биомедицина. 2014. № 2. С. 4- 17.
 4. **Blin N., Stafford D.W.** A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes // *Nucleic acids res.* 1976. No. 3(9). Pp. 2303-8.
 5. **Boukouvla S., Fakis G.** Arylamine N-acetyltransferases: what we learn from genes and genomes // *Drug metabolism reviews.* 2005. No. 37. Pp. 511-564.
 6. **Butcher N.J., Arulpragasam A., Goh H.L., Davey T., Minchin R.F.** Human arylamine N-acetyltransferase-1 interacts with EHZF, a multi-functional transcription co-factor // In: *Third International Workshop on Arylamine N-acetyltransferases.* - Vancouver, Canada. 2004.
 7. **Cao W., Chau B., Hunter R., Strnatka D., McQueen C.A., Erickson R.P.** Only low levels of exogenous N-acetyltransferase can be achieved in transgenic mice // *Pharmacogenetics J.* 2005. No. 5. Pp. 255-261.
 8. **Cornish V.A., Pinter K., Boukouvla S., Johnson N., Labrousse C., Payton M., Priddle H., Smith A.J., Sim E.** Generation and analysis of mice with a targeted disruption of the arylamine N-acetyltransferase type 2 gene // *Pharmacogenomics J.* 2003. No. 3. Pp. 169-177.
 9. **Coughtrie M.W.H., Sharp S., Maxwell K., Innes N.P.** Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases // *Chem.-biol. interact.* 2003. No. 109. Pp. 3-27.
 10. **Erickson R., Morgan C., McQueen C.A.** 2nd International NAT Workshop. - Eynsham, Oxford. 2000. Abstract. No. 1.
 11. **Green M.D., Tephly T.R.** Glucuronidation of amine substrates by purified and expressed UDP-glucuronosyltransferase proteins // *Drug metab. dispos.* 1998. No. 26. Pp. 860-867.
 12. **Karolyi J., Erickson R.P., Liu S.** Genetics of susceptibility to 6-aminonicotinamide-induced cleft palate in the mouse: studies in congenic and recombinant inbred strains // *Teratology.* 1988. No. 37. Pp. 283-287.
 13. **Karolyi J., Erickson R.P., Liu S., Killewald L.** Major effects on teratogen-induced facial clefting in mice determined by a single genetic region // *Genetics.* 1990. No. 126. Pp. 201-205.
 14. **Leff M.A., Epstein P.N., Doll M.A., Fretland A.J., Devanaboyina U.S., Rustan T.D., Hein D.W.** Prostate-specific human N-acetyltransferase 2 (*NAT2*) expression in the mouse // *J. Pharmacol. exp. ther.* 1999. No. 290(1). Pp. 182-187.
 15. **Nebert D.W.** Polymorphisms in drug metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? // *Am. J. hum. genet.* 1997. No. 60. Pp. 265-271.
 16. **Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W.** P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature // *Pharmacogenetics.* 1996. No. 6. Pp. 1-42.
 17. **Sim E., Pinter K., Mushtaq A., Upton A., Sandy J., Bhakta S., Noble M.** Arylamine N-acetyltransferases: a pharmacogenomic approach to drug metabolism and endogenous function // *Biochem. soc. trans.* 2003. No. 31. Pp. 615-619.
 18. **Sugamori K.S., Wong S., Brenneman D., Lu X., Grant D.M.** *NAT3* knockout or over expression in mice has no influence on N-acetylation activity // *Drug metab. rev.* 2004. No. 36. 164 p.
 19. **Sugamori K.S., Wong S., Gaedigk A., Yu V., Abramovici H., Rozmahel R., Grant D.M.** Generation and functional characterization of arylamine N-acetyltransferase *Nat1/Nat2* double-knockout mice // *Mol. pharmacol.* 2003. No. 64. Pp. 170-179.
 20. **Wong L.-L.** Cytochrome P450 monooxygenases // *Curr. opin. chem. biol.* 1998. No. 2. Pp. 263-268.

Molecular and genetic aspects of technology of generation transgene mice with the integrated human of N-acetyltransferase genes (*NAT1* and *NAT2*)

V.N. Karkischenko, V.P. Ryabykh, N.N. Karkischenko, M.S. Dulya,
V.A. Ezerskiy, E.M. Koloskova, V.N. Lazarev, S.V. Maksimenko,
N.V. Petrova, V.N. Stolyarova, T.P. Trubitsina

The DNA constructions with nucleotide sequences of human genes of *NAT1* and *NAT2* and promoter-enhanced region of a mice albumin gene were created. The coding parts of *NAT1* and *NAT2* genes were amplified from a matrix of genomic human DNA with use of *NAT1*-Not and *NAT1*-Xho oligonucleotides in case of *NAT1* and *NAT2*-Not and *NAT2*-Xho in case of *NAT2*. Plasmids of pSI-*NAT1* and pSI-*NAT2* split by BamHI and EcoRV endonuclease (the site of a restriction of EcoRV was entered in enAlb-F oligonucleotide).

Synthesis of the oligonucleotide primers and detection of human genes expression and the created transgene animals with the use of specific oligonucleotide primers was carried out in parallel.

At the following stages allocation of DNA/RNA from blood plasma test, amplification of genomic DNA, identification of PCR products was carried out by method of a horizontal electrophoresis. Existence in gel of DNA strip corresponding size testified to existence in a sample of a required gene.

Transgene mice (F0) with the designs integrated into their genome including nucleotide sequences of genes of human *NAT1* and *NAT2* under the albumin gene mice promoter were generated. Total effectiveness of a transgenesis for *NAT1* gene is 1,1% and for *NAT2* – 0,6%. The analysis of integration of transgenes in various descendants (F1) organs and tissues of primary transgene mice (F0) showed that human genes *NAT1* and *NAT2* was found in the cells of all three germinal leaves.

Key words: DNA constructions *NAT1* and *NAT2* genes, promoter-enhanced region of gene, plasmids, high-specific primers, detection of a genes expression, amplification, transgenesis.