



УДК 577.113

МОДИФІКАЦІЯ ГЕНОМУ ЕУКАРІОТ ШЛЯХОМ ВАС-РЕКОМБІНАЦІЇ

А. О. Цирульник¹, В. В. Снітинський¹, Р. С. Стойка²

¹Львівський національний аграрний університет
вул. В. Великого, 1, Львів-Дубляни 80381, Україна
e-mail: a_tsyruhnyk@yahoo.com

²Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна

Введення модифікованих генів у геном еукаріотичних організмів відкриває нові можливості моделювання та дослідження біологічних процесів. Експресія генів контролюється специфічними регуляторними ділянками різних розмірів і локалізації, більшість із яких вивчені недостатньо. Зазвичай сконструйований ген вводять разом із коротким промоторним фрагментом. Оскільки у цьому випадку втрачаються усі вихідні регуляторні ділянки, рівень експресії гена суттєво відрізняється від фізіологічного. Особливо складно досягнути вибіркової експресії введеного гена у специфічному типі тканини чи клітин. У статті представлено новий, ефективний метод генної інженерії *in vivo* із використанням штучної бактерійної хромосоми (ВАС; bacterial artificial chromosome). У його основі лежить використання рекомбінаційної системи *Rec*-профага (*Rec*/*ET*) або λ -фага (*Red α* /*Red β*), адаптованої та перенесеної у бактеріальну клітину *Escherichia coli* DH10B. ВАС-рекомбінація дає змогу вводити у геном сконструйований ген у складі ВАС разом із усіма необхідними вихідними регуляторними ділянками. Це забезпечує досягнення практично будь-якої бажаної специфічності експресії сконструйованого гена *in vivo*.

Ключові слова: клонування, ВАС-рекомбінація, експресія генів, модифікація геному.

ВСТУП

Проведення досліджень на генетичному рівні, безперечно, вважається одним із найперспективніших напрямів сучасної біології. Ефективні технології модифікації геному відкривають нові можливості для вивчення ролі генів у процесах клітинного поділу, росту і функціонування організму в цілому.

Геном миші за своєю будовою та структурою генів близький до геному людини. Зазвичай саме цих тварин використовують як експериментальну модель для проведення генетичних досліджень. Введення генів без відповідних регуляторних ділянок не забезпечує експресії на високому рівні або вибірково у потрібному типі тканини. Класична генна інженерія є малоефективною для створення плазмід із фрагментами ДНК великого розміру, якими зазвичай є промоторні ділянки. Для вирішення цієї

проблеми був розроблений новий метод інженерії ДНК великих розмірів, що дає змогу вводити у геном сконструйований ген разом із усіма необхідними для експресії регуляторними ділянками.

Штучна бактерійна хромосома (BAC; bacterial artificial chromosome) – це бактерійна плазміда розміром 150–350 тис. п.н., що містить певний фрагмент хромосоми еукаріотичного організму з усіма вихідними генами та регуляторними ділянками цього фрагмента [7]. Rec/ET-рекомбінацію із використанням BAC (BAC рекомбінація) було розроблено у лабораторії Ф. Стюарта (F. Stewart) [10, 11]. У лабораторії Н. Коупеланда (N. Copeland) цей метод було вдосконалено й адаптовано для використання у бактеріальних клітинах *Escherichia coli* DH10B [1].

Першим етапом BAC-рекомбінації є конструювання певного гена (трансгена), який планується ввести у геном. Далі, за рахунок Rec/Red-залежної гомологічної рекомбінації проводиться його інтеграція у певну ділянку BAC, що містить потрібні регуляторні ділянки. Заключним етапом є мікроін'єкція модифікованої BAC у пронуклеус ооцита [13, 18]. Оскільки трансген перебуває під повним контролем вихідної регуляторної ділянки BAC, це забезпечує високоспецифічну для цієї зони експресію. Використання тієї чи іншої BAC дає змогу досягнути практично будь-якої тканинної специфічності та фізіологічного рівня експресії трансгена [14, 15, 21]. Метою роботи є детальний опис методу та наведення ключових експериментальних даних застосування BAC-рекомбінації.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Розробка стратегії BAC-рекомбінації

Перед початком експериментальної роботи необхідно розробити загальну стратегію BAC-рекомбінації в електронній версії, скласти карту нуклеотидних послідовностей усіх елементів трансгенного фрагмента і відповідної BAC. Для цього зручно використовувати професійні комп'ютерні ДНК-програми (NTI-vector, DNAstar, Clone manager). Ключовим є підбір сайтів ендонуклеазного розщеплення, зручних для клонування, та пошук оптимальних гомологічних послідовностей BAC.

Клонування трансгенного фрагмента

Трансгенний фрагмент містить декілька ключових елементів: модифікований ген (трансген), репортерні гени, ген-резистентності та послідовності, гомологічні до певних послідовностей штучної бактерійної хромосоми, куди планується ввести даний фрагмент. Ендонуклеазне розщеплення та лігування їх у плазмиду проводять з використанням широкого спектру ензимів і буферних систем (Fermentas, NEB). Для ампліфікації ДНК застосовують високоточну полімеразну систему (high-fidelity PCR kit, Fermentas), що виключає можливість помилок у синтезованій нуклеотидній послідовності. Стандартні умови проведення полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) становлять: +96°C/3 хв, 35 циклів: +94°C/0 40 хв, +45°C...+65°C/0,50 хв, 72°C/1–3 хв. ДНК очищують шляхом електрофоретичного розділення у 2% гелі агарози та колонкової афінної хроматографії (DNA-Plasmid purification Mini / Maxi kit, Roche). Усі етапи клонування перевіряють секвенуванням. Перед рекомбінацією трансгенного фрагмента у BAC необхідно провести тестування функціональної активності всіх його елементів *in vitro*. Використання тих чи інших методів залежить від включених у плазмиду генів.

Рекомбінація у BAC

Для рекомбінації використовують штам *E. coli* DH10B, що містить необхідну BAC і допоміжну плазмиду pR6K.αβγBAD, яка забезпечує експресію рекомбінаційних

ензимів. Трансгенний фрагмент вводять у *E. coli* шляхом електропорації за стандартних умов: 1,35 kV, 25 μF, 200 Ω, використовуючи електропоратор Eppendorf-2510. Для швидкого пошуку модифікованої ВАС застосовують метод ПЛР. Більш детальний аналіз проводять шляхом ДНК-гібридизації з радіоактивними пробами (Southern blot). ВАС лінеаризують за допомогою ендонуклеазного розщеплення із *Not* I, сайти якої вводять у ВАС.

Очищення модифікованої ВАС здійснюють шляхом електрофоретичного розділення у гелі агарози із низькою температурою плавлення (Sea-Plug Low-melting point agarose, Sigma). Оскільки розмір ВАС є достатньо великим (50–250 тис. п.н.), використовують електрофоретичну систему типу пульс-електрофорез (Pulse-Field Gel Electrophoresis: PFGE) (CHEF-DR® III Pulsed Field (BioRad). Параметри електрофорезу становлять: початковий час = 0,5 сек, кінцевий час = 20 сек, $\alpha = 120$ C, $IEI = 6$ V/см, $I = 140$ mA, загальний час = 12–14 год.

Мікроін'єкцію ВАС у пронуклеус ооцита проводять у Tris-HCl буфері: pH = 7,5, 10 mM, EDTA pH = 8,0, 0,1 mM, NaCl 100 mM, спермін 30 mM, спермідин 70 mM.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Метою ВАС-рекомбінації є досягнення специфічної експресії трансгена у геномі еукаріот. Першим кроком є пошук оригінального гена, регуляторні ділянки якого планується використати. Необхідно визначити хромосомну локалізацію цього гена та його структуру. Для прикладу проаналізуємо ген транскрипційного фактора STAT5a миші [16]. Задаючи у пошукову систему електронної ДНК-бібліотеки ENSEMBL (www.ensembl.org) назву гена, ми отримуємо детальне графічне зображення його локалізації у хромосомі та розміщення інших генів у даній ділянці (рис. 1).

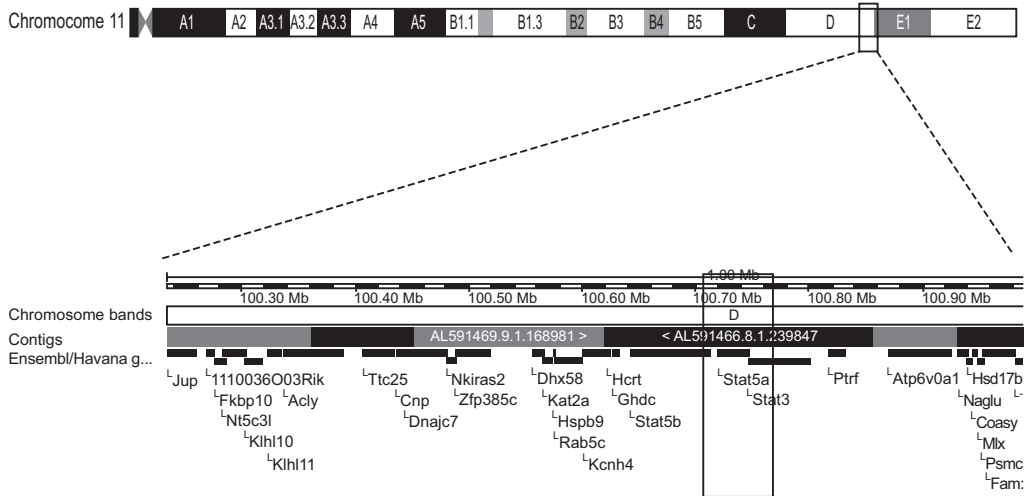


Рис. 1. Визначення хромосомної локалізації та структури гена транскрипційного фактора STAT5a миші шляхом використання комп'ютерної ДНК-бібліотеки ENSEMBL. Ген STAT5a міститься у кінцевій ділянці хромосоми 11 в оточенні генів HCRT, GHDC, STAT5b та STAT3, PTRF із 5'- та 3'-сторін, відповідно

Fig. 1. Identification of chromosomal localization and gene structure of murine transcription factor STAT5a using online DNA library „ENSEMBL”. Gene of STAT5a is located on chromosome 11 and bordering genes HCRT, GHDC, STAT5b and STAT3, PTRF from 5'- and 3'-sides, respectively

Наступним завданням є пошук ВАС, що містить у своєму складі даний фрагмент хромосоми. Для цього зручно використовувати електронну бібліотеку NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Функція „MapViewer” дає змогу одержати детальну інформацію про наявність потрібних ВАС.

Оптимальна ВАС повинна містити потрібний ген у своїй центральній частині, оскільки тоді більшість регуляторних ділянок, особливо промоторна частина, буде також збережена. Наступним етапом є заміщення оригінального гена на новий штучно сконструйований трансгенний фрагмент із усіма необхідними елементами.

Рекомбінація у ВАС відбувається через гомологічні послідовності (ГП), розміщення яких визначає точне місце рекомбінації [9, 22]. Схематично процес ВАС-рекомбінації можна зобразити так (рис. 2).

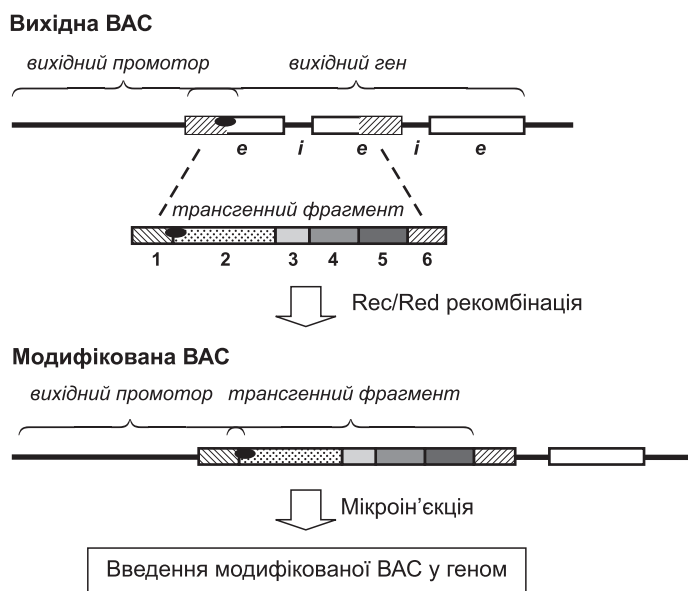


Рис. 2. Загальний принцип рекомбінації у штучну бактеріальну хромосому (ВАС). Трансгенний фрагмент містить кілька елементів: 5'-гомологічну послідовність (1), трансген зі старт-кодоном ATG (2), сайт зв'язування із рибосомою-IRES (3), репортерний ген (4), ген-резистентності (5) та 3'-гомологічну послідовність (6). Гомологічні послідовності забезпечують заміщення трансгенним фрагментом частини вихідного гена при повному збереженні промоторної ділянки. Це дає змогу отримати високу специфічність експресії трансгенного фрагмента відповідно до використаного промотора

Fig. 2. General principle of bacterial artificial chromosome (BAC) recombination. Transgenic construct contains several elements: 5'-homology arms (1), transgene with START-codon ATG (2), internal ribosome entry site – IRES (3), marker-gene (4), gene of resistance (5) and 3'-homology arms. Homology arms mediate replacement of the original gene by transgenic construct but leave the promoters region. Promoter provides a high specificity of transgene expression

При клонуванні трансгена, перед його СТАРТ-кодомом (ATG) вводять 5'-UTR послідовність β -глобінового гена (GACTCACAACCCAGAAACA) та оптимальну послідовність KOZAK (CCACC). Це сприяє ефективній транскрипції, зв'язуванню мРНК із рибосомою і трансляції трансгена [4].

Для визначення рівня та локалізації експресії введеного трансгена у тканинах чи клітинах можна використати репортерні гени. Широковживаними тут є гени флуоресцентних протеїнів (GFP/YFP – green/yellow fluorescent proteins, dsRED – red

fluorescent protein із *Discosoma* sp.) та гени поверхневих маркерів клітин (CD2, CD4, CD5 та інші). Оскільки ген-маркер вводять у 3'-кінець трансгена, що містить СТОП-кодон, включення IRES (internal ribosome entry site) послідовності є важливим для ініціації трансляції цього елемента [3].

До складу трансгенного фрагмента також повинен входити ген резистентності до певного антибіотика (канаміцину, хлорамфеніколу, тетрацикліну, ампіциліну), що необхідно для селекції модифікованої ВАС у бактерійних і ембріональних клітинах.

Важливими проблемами є дизайн і клонування гомологічних послідовностей. Оптимальним розміром ГП прийнято вважати 200–400 п.н. 5'-ГП розміщується безпосередньо перед СТАРТ-кодоном оригінального гена. Вона містить у своєму складі частину промотора. 3'-ГП може бути вибрана на віддалі 100–1500 п.н. від 5'-ГП. У більшості випадків це забезпечує сплайсингове видалення усього першого екзону вихідного гена.

Зазвичай експресія трансгенного фрагмента є бажаною лише на постнатальному етапі розвитку організму. Цього можна досягнути, використавши рекомбінаційну систему *CRE/loxP* [5, 20]. *CRE* (Cyclization REcombination) є білком бактеріофага P1, що має рекомбінаційну активність і здатний каталізувати рекомбінацію фрагмента ДНК між двома сайтами *LoxP* (locus of X-over of P1). Сайти *LoxP* – послідовності ДНК довжиною 34 п.н. що містять два інвертованих повтори (13 п.н.), які обмежують центральний район (8 п.н.). Залежно від орієнтації та розміщення *LoxP* сайтів, рекомбіназа *CRE* може каталізувати інверсію, ексцизію або транслокацію ДНК [16].

Клонування трансгенного фрагмента у протилежному напрямку до напрямку транскрипції певного промотора та введення у його 5'-/3'-кінці конвергентно розташованих *loxP* сайтів дає змогу отримати плазмиду із *CRE*-залежною експресією фрагмента (рис. 3).

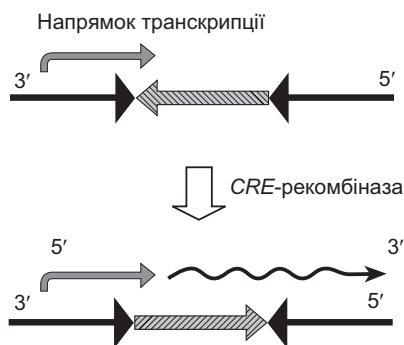


Рис. 3. Плазміда із *CRE*-залежною експресією трансгенного фрагмента. Трансгенний фрагмент, який містить *loxP* сайти на своїх 5'/3'-кінцях, вводять у зворотному напрямку до напрямку промотора. *CRE*-рекомбіназа каталізує інверсію фрагмента між двома *loxP* сайтами, що забезпечує його експресію

Fig. 3. Plasmid with *CRE*-inducible expression of transgenic construct. Transgenic construct introduced in inverted orientation to the promoter and contains *loxP* sites on 5'/3'-ends. *CRE*-recombinase mediates inversion of the construct between two *loxP* sites which leads to activation of transgenic construct expression

Сконструйовану плазмиду з інвертованим фрагментом можна протестувати, вводючи її у штам *E. coli*, що експресує *CRE*-рекомбіназу. Оскільки у бактеріальній клітині міститься багато копій плазмиди, а *CRE*-рекомбіназа експресується конститутивно, створюється суміш плазмід із прямонаправленими й інвертованими трансгенними фрагментами у співвідношенні 1:1. Виділення плазмідної ДНК і трансформація цією ДНК звичайного штаму *E. coli* забезпечує виникнення окремих бактеріальних колоній, кожна з яких містить плазмиду із трансгенним фрагментом лише того чи іншого напрямку (рис. 4).

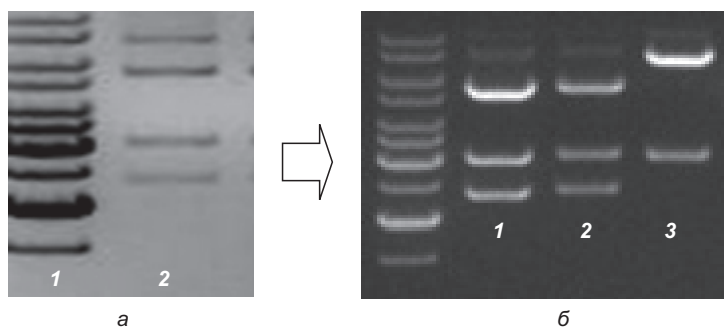


Рис. 4. Аналіз *CRE/loxP* інверсії трансгенного фрагмента. Введений у *E. coli* ген *CRE*-рекомбінази конститутивно експресується, що забезпечує інверсію трансгенного фрагмента, створюючи у бактеріальній клітині суміш плазмід із трансгенними фрагментами у різній орієнтації щодо промотора (а). Виділення і трансформація цієї ДНК звичайних бактеріальних клітин дає змогу отримати окремі колонії, що містять плазмиди лише із трансгенним фрагментом того чи іншого напрямку (б). Визначення напрямку трансгенного фрагмента у плазміді проводиться за розмірами фрагментів ДНК, що утворюються при розщепленні з певною ендонуклеазою (у використаній моделі розміри фрагментів ДНК при прямонаправленому (1, 2) та інвертованому (3) напрямках трансгенного фрагмента становлять: 5250, 3100, 2300 та 7300, 3100, 250 п.н., відповідно)

Fig. 4. Analysis of *CRE/loxP* mediated inversion of the transgenic construct. Gene of *CRE*-recombinase is introduced into *E. coli* and constitutively expressed, which mediates inversion of the transgenic construct and forms in bacterial cells a mix of the plasmids with forward and reverse orientation of the construct. Extraction and transformation of this bacterial DNA into *CRE*-negative bacterial cells allows to obtain colonies which have plasmids with only one type of transgenic construct orientation. Detection of construct orientation in the plasmids is performed by control digest with appropriate endonuclease (In presented transgenic model, the size of DNA fragments which correspond to the forward (1, 2) and reverse (3) oriented construct are: 5,250, 3,100, 2,300 and 7,300, 3,100, 250 b.p., respectively)

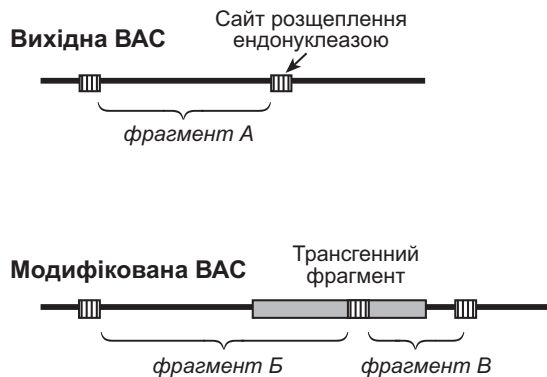
Створений трансгенний фрагмент вирізають ендонуклеазами з плазмиди, очищують і використовують для рекомбінації у ВАС.

Рекомбінація у ВАС

Рекомбінація каталізується парами ензимів *RecE/RecT* λ -профага або *Red α /Red β* λ -фага. Ці пари є функціонально еквівалентними. *RecE* і *Red α* є 5'→3' екзонуклеазами, тоді як *RecT* і *Red β* є білками, що забезпечують рекомбінацію. Взаємодія та функціонування *RecE* і *RecT* чи *Red α* і *Red β* забезпечує рекомбінацію гомологічних послідовностей ДНК. Тому бактеріальна клітина повинна містити, крім ВАС, також *pR6K. $\alpha\beta\gamma$ BAD* – плазмиду, що експресує одну із цих пар ензимів [8,12].

Після електропорації трансгенного фрагмента у *VAC/pR6K. $\alpha\beta\gamma$ BAD⁺ E.coli* та його рекомбінації у ВАС одержані колонії необхідно протестувати. Виявити модифіковану ВАС можна за допомогою методу ПЛР. Для ампліфікації використовують праймери, один із яких є специфічним до включеного фрагмента, а інший – до ВАС, або праймери, специфічні до ВАС ділянок, які межують із рекомбінованим фрагментом із обох боків. У цьому випадку продукт визначеного розміру ампліфікується, лише якщо використана ВАС містить трансгенний фрагмент.

Більш детальну оцінку модифікованої ВАС проводять за допомогою методу ДНК-гібридизації з радіоактивними пробами (Southern blot). Рекомбінований трансгенний фрагмент вносить у ВАС додаткові сайти ендонуклеазного розщеплення. Тому при розщепленні модифікованої ВАС певною ендонуклеазою будуть утворюватися нові ВАС фрагменти, неспецифічні для оригінальної ДНК (рис. 5).



Проінкубувавши модифіковану ВАС із ендонуклеазою, проводять електрофоретичне розділення розщепленої ДНК у гелі агарози. Фрагменти ВАС переносять на нітроцелюлозну мембрану та гібридизують зі специфічними радіоактивними пробами. Як правило, використовують два типи проб: специфічну до трансгенного фрагмента і специфічну до ВАС (рис. 6).

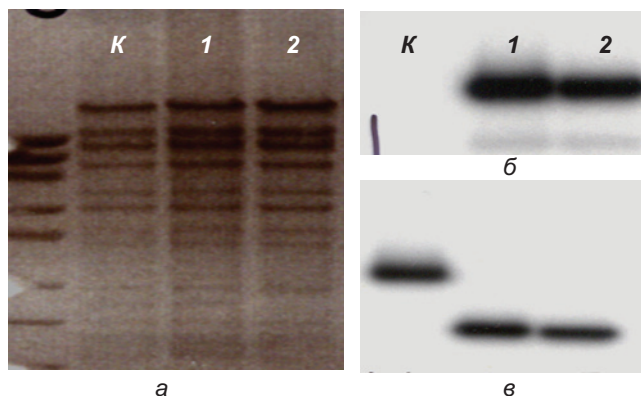


Рис. 6. Ідентифікація штучної бактеріальної хромосоми (ВАС), що містить рекомбінований трансгенний фрагмент шляхом ДНК-гібридизації (Southern blot). Першим етапом є ендонуклеазне розщеплення вихідної (контрольної) ВАС (К) і модифікованих ВАС (1, 2). Далі ДНК фрагменти розділяють шляхом електрофорезу у гелі агарози (а) та переносять на нітроцелюлозну мембрану. Заключним етапом є гібридизація зі специфічними пробами. Зазвичай використовують два типи проб: інтервальну – специфічну до рекомбінованого фрагмента (б) та екстермальну – специфічну до ВАС у зоні, близькій до трансгенного фрагмента (в)

Fig. 6. Identification of transgene-containing bacterial artificial chromosome using DNA-hybridization (Southern blot). The first step is restriction digest of original (control) BAC (K) and modified BACs (1, 2). DNA fragments are separated by electrophoresis in agarose gel (a) and transferred on nitrocellulose membrane. In final step, DNA fragments are hybridized with specific probes. Usually, two types of probes are used: internal – specific to transgenic construct (b) and external – specific to BAC region closed to the transgenic construct (c)

Рис. 5. Зміни розміру штучної бактеріальної хромосоми (ВАС) і фрагментів її ендонуклеазного розщеплення після рекомбінації трансгенного фрагмента. Рекомбінований трансгенний фрагмент вносить у ВАС нові сайти ендонуклеазного розщеплення та змінює розмір ВАС. Різниця у розмірах фрагментів ДНК розщепленої оригінальної та модифікованої ВАС (фрагменти А, Б, В) дає змогу виявити ВАС, що містить рекомбінований трансгенний фрагмент

Fig. 5. Changes of the bacterial artificial chromosome (BAC) size and restriction fragment pattern after recombination of the transgenic construct. The recombined transgenic construct in the BAC brings new restriction sites into the BAC and changes the size of the BAC. The size difference between digested original and modified BACs (fragments A, B, C) can be used for detection of transgenic construct in the BAC

Модифіковану ВАС лінеаризують, використовуючи ендонуклеазу *Not I*, сайт розщеплення якої штучно вводять у ВАС. ВАС очищають шляхом електрофорезу в системі PFGE (Puls Field Gel Electrophoresis) (рис. 7) і використовують для мікроін'єкції у пронуклеус ооцита [2, 19].

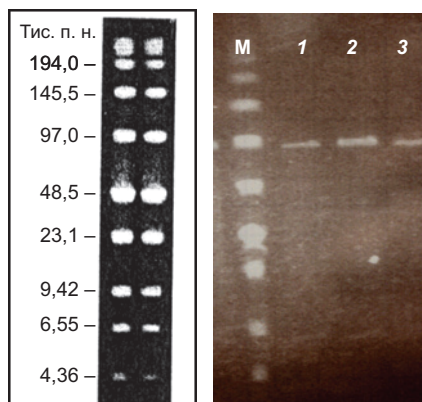


Рис. 7. Очищення лінеаризованої штучної бактеріальної хромосоми (ВАС) шляхом електрофорезу PFGE (puls field gel electrophoresis). Оскільки розмір лінеаризованої ВАС (1, 2, 3) є значним, її очищення проводять шляхом пульс-електрофорезу та використовують для мікроін'єкції у пронуклеус ооцита

Fig. 7. Purification of linearized bacterial artificial chromosome (BAC) using pulse field gel electrophoresis (PFGE). Since linearized BAC is a big size DNA (1, 2, 3), it can be purified by PFGE electrophoresis in agarose gel and used for pronuclear microinjection in oocyte

Мікроін'єкцію ВАС у пронуклеус ооцита проводять у Tris-HCl буфері із використанням мікроголки, що забезпечує ефективність введення та інтеграції ВАС у геном ооцита.

ВИСНОВКИ

Створення генетично змінених організмів на основі технології ВАС дає змогу досягнути високого рівня експресії введених генів. Використання тканинно-специфічних регуляторних ділянок ВАС забезпечує вибірккову експресію трансгена у потрібному типі тканини. Це створює нові можливості модифікації геному еукаріот і проведення досліджень різних біологічних процесів.

1. Copeland N., Jenkins N., Court D. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. **Nature Reviews**, 2001; 2(10): 769–779.
2. Chrast R., Scott H., Antonarakis S. Linearization and purification of BAC DNA for the development of transgenic mice. **Transgenic Research**, 1999; 8(2):147–150.
3. Filbin M., Kieft J. Toward a structural understanding of IRES RNA function. **Current Opinion in Structural Biology**, 2009; 19(3): 267–276.
4. Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. **Gene**, 2005; 21(361): 13–37.
5. Kühn R., Torres R. Cre/loxP recombination system and gene targeting. **Methods in Molecular Biology**, 2002; 180: 175–204.
6. Lalioti M., Heath J. A new method for generating point mutation in bacterial artificial chromosomes by homologous recombination in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, 2001; 29(3): 14–22.
7. Magdaleno S., Curran T. Gene dosage in mice-BAC to the future. **Nature Genetics**, 1999; 22(4): 319–320.
8. Murphy K. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. **The Journal of Bacteriology**, 1998; 180(8): 2063–2071.

9. *Muyrers J., Zhang Y., Stewart A.* ET-cloning: think recombination first. **Genetic Engineering**, 2000; 22: 77–98.
10. *Muyrers J., Zhang Y., Testa G., Stewart A.* Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. **Nucleic Acids Research**, 1999; 27(6): 1555–1557.
11. *Muyrers J., Zhang Y., Benes V. et al.* Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination. **EMBO Reports**, 2000; 1(3): 239–243.
12. *Muyrers J., Zhang Y., Buchholz F., Stewart A.F.* RecE/RecT and Redalpha/Redbeta initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. **Genes and Development**, 2000; 14(15): 1971–1982.
13. *Muyrers J., Zhang Y., Stewart A.* Techniques: recombinogenic engineering – new options for cloning and manipulating DNA. **Trends in Biochemical Sciences**, 2001; 26(5): 325–331.
14. *Narayanan K., Williamson R., Zhang Y. et al.* Efficient and precise engineering of a 200 kb beta-globin human/bacterial artificial chromosome in *E. coli* DH10B using an inducible homologous recombination system. **Gene Therapy**, 1999; 6(3): 442–447.
15. *Sharan S., Thomason L., Kuznetsov S., Court D.* Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. **Nature Protocols**, 2009; 4(2): 206–223.
16. *Sternberg N.* Cloning high molecular weight DNA fragments by the bacteriophage P1 system. **Trends in Genetics**, 1992; 8(1): 11–16.
17. *Takeda K., Akira S.* STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. **Cytokine Growth Factor Reviews**, 2000; 11(3): 199–207.
18. *Tsyurulnyk A., Moriggl R.* A detailed protocol for bacterial artificial chromosome recombineering to study essential genes in stem cells. **Methods in Molecular Biology**, 2008; (430): 269–293.
19. *Vintersten K., Testa G., Naumann R. et al.* Bacterial artificial chromosome transgenesis through pronuclear injection of fertilized mouse oocytes. **Methods in Molecular Biology**, 2008; 415: 83–100.
20. *Wilson T., Kola I.* The LoxP/CRE system and genome modification. **Methods in Molecular Biology**, 2001; 158: 83–94.
21. *Yang X., Model P., Heintz N.* Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. **Nature Biotechnology**, 1997; 15(9): 859–865.
22. *Zhang Y., Muyrers J., Testa G., Stewart A.* DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, 2000; 18(12): 1314–1317.

GENOMIC MODIFICATION OF EUKARYOTES USING BAC RECOMBINEERING

A. O. Tsyurulnyk¹, V. V. Snitynsky¹, R. S. Stoika²

¹Lviv National Agricultural University, 1, V. Velykyi St., 1, Lviv-Dubljany 80381, Ukraine

²Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine

Introduction of modified genes into eukaryotic genome gives new opportunities for investigations of biological processes. Gene expression is controlled by specific regulator regions of different size and localization in genome. Most of them are poorly studied. Thus, a transgene construct is usually introduced together with a short ubiquity promoter region. Since all original regulator regions are lost, it makes difficulties to get a high level of expression and particularly a tissue-specific expression of transgene. This article describes a new method of genome modification using bacterial artificial chromosome (BAC). Method is based on recombination system of Rac-prophage (Rec/ET) or λ -phage (Red α /Red β) transferred into *Escherichia coli* DH10B cells. In case of BAC

recombination, all known regulatory regions essential for desired transgene expression can be included. This method is used for generation of transgenic animals that allows more physiological or tissue-specific expression of transgene *in vivo*.

Key words: cloning, BAC recombineering, gene expression, genomic modification.

МОДИФИКАЦІЯ ГЕНОМА ЕУКАРИОТ МЕТОДОМ ВАС-РЕКОМБІНАЦІЇ

А. О. Цирульник¹, В. В. Снітинський¹, Р. С. Стойка²

¹Львівський Національний Аграрний Університет
ул. В. Великого, 1, Львів-Дубляни 80381, Україна

²Інститут біології клітки НАН України, ул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна

Введення модифікованих генів в геном еукаріотических організмів відкриває нові можливості моделювання і дослідження біологічних процесів. Експресія генів контролюється специфічними регуляторними зонами. Більшість цих зон досліджено недостатньо. Тому звичайно сконструйований ген вводять разом з коротким промоторним фрагментом. В цьому випадку рівень експресії достатньо відрізняється від фізіологічного. Особливо складно отримати специфічну експресію введеного гену в певному типі тканин або клітин. В статті розглянуті теоретичні принципи нового методу генної модифікації з використанням штучної бактеріальної хромосоми (ВАС; bacterial artificial chromosome). В основі методу лежить використання рекомбінаційної системи *Rec*-профага (*Rec/ET*) або λ -фага (*Red α /Red β*), адаптованої і перенесеної в бактеріальну клітку *Escherichia coli* DH10B. ВАС-рекомбінація забезпечує введення в геном сконструйованого гену в складі ВАС разом з усіма необхідними оригінальними регуляторними зонами. Це сприяє досягненню практично будь-якої бажаної специфічності експресії сконструйованого гену *in vivo*.

Ключевые слова: клонирование, ВАС-рекомбинация, экспрессия генов, модификация генома.

Одержано: 11.09.2009