

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия репортерных генов под контролем регуляторных элементов гена теплового шока дрозифилы в трансгенных эмбрионах вьюна *Misgurnus fossilis* L.

Л.Е. Андреева¹, Н.В. Хайдарова¹, А.В. Родригес-Бланко¹, Н.Н. Канайкина², А.В. Ревещин², В.З. Тарантул¹, Л.И. Корочкин², Г.В. Павлова²

¹ Институт молекулярной генетики РАН

² Институт биологии гена РАН, лаборатория нейрогенетики и генетики развития

L.E. Andreeva¹, N.V. Khaydarova¹, A.V. Rodrigues-Blanco¹, N.N. Kananaykina², A.V. Revishchin², V.Z. Tarantul¹, L.I. Korochkin², G.V. Pavlova²

¹Molecular Genetics Institute, RAS

²Institute of Gene Biology RAS, laboratory of neurogenetics and genetics of development

Gene expression under control of regulatory elements of thermal shock gene of drozophyla in transgenic larvae germ of loach *Misgurnus fossilis* L.

Исследовали эффективность транзientной экспрессии репортерных генов *lacZ* и *gfp* под контролем двух различных промоторных элементов гена теплового шока *hsp70* дрозифилы в трансгенных эмбрионах вьюна *Misgurnus fossilis* L. F₀-поколения. Экспрессия трансгенов в ранних эмбрионах и предличинках носила мозаичный характер и зависела от количества вводимого генетического материала. В то же время экспрессия трансгена не зависела от повышения температуры окружающей среды, т.е. возникла без теплового шока. У 2–3-суточных зародышей эффективность транзientной экспрессии была максимальной и достигала в отдельных сериях экспериментов 100%. Таким образом, регуляторные элементы гена теплового шока дрозифилы способны обеспечивать конститутивную экспрессию репортерных генов в эмбрионах вьюна.

Ключевые слова: экспрессия генов, белки теплового шока.

Введение

В последние годы появилось множество работ по получению линий трансгенных рыб с экспрессирующимися репортерными генами, находящимися под контролем гетерологических регуляторных элементов. Для быстрого анализа различий в экспрессии генов с регуляторными элементами различной структуры довольно часто используют транзientную экспрессию трансгенов у F₀-поколения рыб [1–4]. Этот метод, несмотря на некоторые недостатки, может быть полезен для получения информации об уровнях и характере экспрессии трансгена в зависимости от индуцибельности и тканеспецифичности промотора.

Удобную модель для тестирования экспрессии чужеродных генов представляет собой вьюн *Misgurnus fossilis* L. Легкость содержания (отсутствие необходимости кормления взрослых особей) и получения половых продуктов, сравнительно большие размеры икринок и прозрачные оболочки, относительно короткая продолжительность эмбриогенеза способствуют использованию его в экспериментах по исследованию функционирования введенных генов [5–7].

The efficiency of transient expression of *lacZ* and *gfp* genes-reporters under control of two different promoter elements of drozophyla *hsp70* thermal shock gene in transgenic larva of F₀ generation loach *Misgurnus fossilis* L. were studied. The expression of genes in early larva and in the prelarval stage was mosaic and depended upon the amount of genetic material introduced.

At the same time gene expression did not depend upon external temperature increase, i.e. it appeared without thermal shock.

In 2–3 day larva the efficiency of transient expression was maximal and reached 100% in separate experimental series. Thus, regulatory elements of drozophyla thermal shock gene are capable to provide constitutional expression of gene-reporter in loach larva.

Key words: gene expression, thermal shock proteins.

Белки теплового шока (ТШ) вовлечены во многие физиологические и патологические процессы организма и играют центральную роль в защите и репарации клеток под воздействием стресса (тепловой, холодовой шок, ультразвук, тяжелые металлы и др.) [8]. Рядом исследователей показано, что гетерологические промоторы генов ТШ могут обеспечивать индуцибельную экспрессию маркерных генов в трансгенных организмах и культуре клеток различных видов животных [9–14].

В данной работе репортерные гены *lacZ* и *gfp*, находящиеся под контролем двух разных промоторов гена ТШ дрозифилы *hsp70*, инъецировали в оплодотворенные яйцеклетки вьюна с целью анализа уровней экспрессии трансгенов в зависимости от структуры промоторов, температуры окружающей среды, концентрации введенного генетического материала и стадии развития зародышей.

Материалы и методы

Половозрелых вьюнов *Misgurnus fossilis* L., принадлежащих к семейству вьюнов *Cobitidae*, отряду карпообразных

Cypriniformes, надотряду костистых рыб *Teleostei*, отлавливали в природе (в Рязанской обл.) в декабре месяце. Самцов и самок содержали раздельно в холодильнике при температуре 4–6°C. Зрелую икру получали через 40–42 часа после инъекций самке хорионического гонадотропина в дозе 100 МЕ и осеменяли суспензией спермы [15]. Через 20–80 мин после оплодотворения и вплоть до первого деления дробления под бластодиск через желток со стороны вегетативного полюса икринки инъецировали 10–20 нл водного раствора, содержащего рекомбинантную ДНК в концентрации 20–30 нг/мкл. Инъекцию проводили с помощью микроинъектора фирмы «Эппендорф» стеклянной микроиглой с диаметром кончика 12–14 мкм. Общее количество генетического материала варьировало, от 0,2 нг до 1,5 нг на икринку. Для инъекций использовали 2 различных плазмиды, одна из которых содержала ген β-галактозидазы *E. coli* (*lacZ*), находящийся под промотором гена *hsp70* дрозофилы (pD88), у которого 5′-нетранскрибируемая область содержит 88 пар нуклеотидов, прилегающих непосредственно к точке старта транскрипции [16] (любезно предоставлена профессором В.А. Гвоздевым), вторая – репортерный ген зеленого флуоресцентного белка (*gfp*), находящийся под промотором гена *hsp70* дрозофилы (pHLP), у которого 5′-нетранскрибируемая область содержит 98 пар нуклеотидов. Икринки каждой серии инъекций получены от одной пары родителей. Зародышей инкубировали в отстойной воде при комнатной температуре.

Гистохимическую активность β-галактозидазы определяли с помощью субстрата X-Gal по методу, описанному ранее [17, 18], с добавлением хлороквина для блокирования эндогенной β-галактозидазной активности: зародышей фиксировали 2,5%-м глутаральдегидом, отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и инкубировали 30 мин в растворе следующего состава: 5 мМ $K_3Fe(CN)_6$, 5 мМ $K_4Fe(CN)_6 \cdot 6H_2O$, 2 мМ $MgCl_2$, 0,2% Тритон X-100, 150 мкг/мл хлороквина на PBS (pH=7,4–7,6). После этого добавляли X-Gal до конечной концентрации 0,4 мг/мл и проводили окрашивание в течение суток при 35°C. Эмбрионы отмывали в PBS, переносили в 30% сахарозу на PBS, содержащий азид натрия. Окрашенные эмбрионы подсчитывали и фотографировали.

Количественный анализ β-галактозидазной активности в зародышах вьюна определяли по методу, описанному ранее [19], с некоторыми модификациями. Зародышей, по 5 штук, помещали в пробирки типа «Эппендорф» и промывали буфером C-39 следующего состава: 3,2 мМ $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 4,2 мМ $NaHCO_3$, 21 мМ KCl, 65 мМ NaCl. Буфер C-39 тщательно отбирали, добавляли 200 мкл буфера Z (60 мМ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 40 мМ $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 10 мМ KCl, 1 мМ $MgSO_4 \cdot 0,35\%$ в-меркаптоэтанол) и гомогенизировали, к гомогенату добавляли 100 мкл раствора субстрата о-нитрофенил-β-D-галактопиранозиды в Z-буфере (4 мг/мл) и инкубировали его при 37°C 90 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 0,52 М раствора Na_2CO_3 . Оптическую плотность измеряли при $\lambda=420$ нм и $\lambda=550$ нм. Относительную активность β-галактозидазы в условных единицах определяли по формуле $A_{420} = 1,1 \times A_{550}$.

Активность гена *gfp* определяли с помощью флуоресцентного микроскопа «Axioscop 2 plus» или «Leica DM6000 B» при длине волны 450–490 нм.

Часть зародышей на различных стадиях развития нагревали при 37°C в течение 30 мин, после чего через 2–4 часа подвергали гистохимическому окрашиванию с помощью X-Gal, проводили количественный анализ активности β-галактозидазы или исследовали зародыши под флуоресцентным микроскопом.

Положительным контролем служили зародыши, которым инъецировали рекомбинантную плазмиду, содержащую ген

gfp под химерным регуляторным элементом, имеющим в своем составе немедленно ранний энхансер цитомегаловируса человека и промотор фактора элонгации 1b человека (pCEEGFP) [20] (любезно предоставлена Dr. T. Takada). Экспрессию трансгена (флуоресценция зеленым цветом) анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа «Axioscop 2 plus» или «Leica DM6000 B» при длине волны 450–490 нм. Отрицательным контролем служили интактные зародыши и интактные зародыши, подвергавшиеся нагреванию.

Результаты

Экспрессия *lacZ*-гена под контролем регуляторных элементов гена теплового шока дрозофилы в эмбрионах вьюна

Было проведено 5 серий микроинъекций плазмиды pD88, содержащей *lacZ*-ген под контролем промотора гена TSH дрозофилы, в оплодотворенные икринки вьюна на стадии бластодиска. 108 зародышей и предличинок 1–5-суточного возраста были обработаны X-Gal. Экспрессия *lacZ*-гена носила мозаичный характер и проявлялась на всех исследованных стадиях развития в виде сине-зеленых штрихов, точек, пятен различных размеров, расположенных по отдельности или в виде небольших групп (рис. 1А и 1В). У предличинок мозаичная экспрессия репортерного гена происходила на голове, в туловищных сомитах, хвосте, плавниках, а также в желточном синцитии и была представлена, в основном, клетками эпидермиса и мышечными волокнами.

В некоторых сериях опытов эффективность экспрессии трансгена наблюдали у 100% зародышей. Как видно из таблицы, в которой представлены суммарные данные по всем 5 сериям опытов, начало экспрессии происходило у 66,7% суточных зародышей на стадии ранней – средней гастролы. Максимальная доля зародышей, экспрессирующих трансген, возрастала к 2–3 суткам, достигая 96,2–78,6% и постепенно снижалась к стадии вылупления из оболочек (57,1–52,9%). Следует отметить, что количество сине-зеленых точек и интенсивность окрашивания, отражающие экспрессию трансгена, были максимальными на стадии 2–3 суток развития. У 5-суточных предличинок экспрессия гена *lacZ* была представлена, в основном, в отдельных эпидермальных и мышечных клетках. Однако повышение концентрации трансгена или объема раствора при микроинъекции в икринки приводило к увеличению количества экспрессирующих зародышей, интенсивности экспрессии вводимого генетического материала и увеличению количества аномальных зародышей (рис. 1С).

Нагревание 2-суточных зародышей в одной из серий опытов в течение 30 мин при 37°C и инкубация их при комнатной температуре в течение 2 часов с последующим гистохимическим окрашиванием не приводила к повышению эффективности и интенсивности экспрессии трансгена (табл.). Ни в одном случае не было отмечено специфического окрашивания на β-галактозидазу у интактных зародышей либо интактных зародышей, подвергавшихся нагреванию.

Полученные данные подтверждаются результатами и другой серии опытов, где 2-суточных зародышей подвергали аналогичной процедуре, после чего их гомогенизировали и отдельные суммарные гомогенаты (5 зародышей после нагревания, 5 зародышей без нагревания и 5 контрольных зародышей) окрашивали по методу, описанному выше, с добавлением субстрата о-нитрофенил-β-D-галактопиранозиды и определяли уровень экспрессии количественным путем на спектрофотометре. Относительная фоновая активность β-галактозидазы у контрольных зародышей составила

0,095 у.е., у зародышей, микроинъекцированных плазмидой pD88, – 0,410 у.е., а зародышей той же серии после нагревания – 0,280 у.е. Представленные данные свидетельствуют о том, что нагревание зародышей при 37°C в течение 30 мин и их обработка спустя 2 часа не приводит к увеличению экспрессии трансгена.

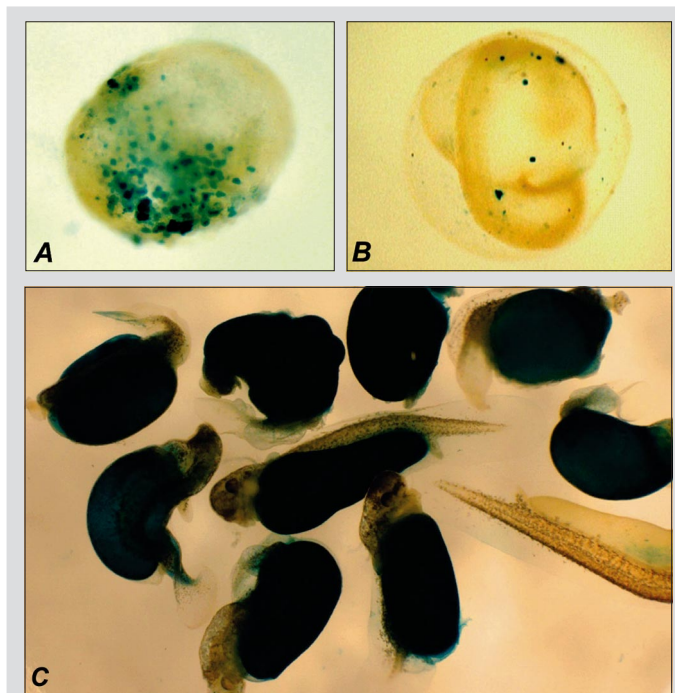


Рис. 1. Трансгенные зародыши вьюна с экспрессией плазмиды pD88 после окрашивания X-Gal: А – 1-суточный зародыш (со снятой оболочкой); В – 2-суточный зародыш; С – группа 5-суточных аномальных зародышей, полученных после инъекции трансгена в количестве 1,5 нг на икринку

Таблица. Эффективность экспрессии плазмиды pD88 у 1–5-суточных зародышей вьюна

Стадия развития (сутки)	Тепловой шок (ТШ)	Общее кол-во зародышей	Зародыши с экспрессией гена lacZ	
			кол-во	%
1	–	36	24	66,7
2	–	26	25	96,2
2	+	8	7	87,5
3	–	14	11	78,6
4	–	7	4	57,1
5	–	17	9	52,9

Экспрессия gfr-гена под контролем регуляторных элементов гена теплового шока дрозофилы в эмбрионах вьюна

Было проведено несколько серий микроинъекций рекомбинантной плазмиды rHLP, содержащей gfr-ген под промотором гена ТШ дрозофилы, в оплодотворенные икринки вьюна на стадии бластодиска. Экспрессия gfr-гена носила мозаичный характер и проявлялась в виде отдельных точек, пятен на поверхности суточных зародышей, в желточном синцитии, а по мере развития зародышей – в мышечных волокнах, в эпителиальных клетках эпидермиса, меланофорах и других типах клеток (рис. 2А, В, С).

В одной из серий опытов в икринки вьюна на стадии бластодиска инъекцировали в качестве контроля плазмиду pCEEGFP, содержащую gfr-ген под химерным промотором, имеющим в своем составе немедленно ранний энхансер цитомегаловируса человека и промотор фактора элонгации 1b человека. Этой плазмидой было проинъекцировано 48 икринок, в такое же количество икринок параллельно инъекцировали плазмиду rHLP. Анализ экспрессии трансгенов у развившихся после микроинъекции суточных зародышей показал, что при инъекции контрольной плазмиды pCEEGFP 25 из 26 зародышей экспрессировали трансген, тогда как при инъекции плазмиды rHLP и эффективность, и интенсивность экспрессии трансгена была значительно ниже – только у 6 зародышей из 26, выживших через сутки после микроинъекции, наблюдалась экспрессия gfr-гена. К 2-м суткам развития несколько из 11 зародышей, выживших после инъекции плазмиды rHLP, экспрессировали трансген (рис. 3А).

Нагревание данной группы зародышей в течение 30 мин при 37°C и последующее инкубирование их при комнатной температуре в течение 2,5 часов не привело к заметному увеличению интенсивности экспрессии трансгена (рис. 3В). Не было отмечено явного усиления экспрессии gfr-гена в данной группе зародышей ни через 4 часа, ни через сутки после нагревания. В то же время, после инъекции плазмиды pCEEGFP трансген интенсивно экспрессировался у 6 из 7 выживших 2-суточных зародышей (рис. 3С). Дальнейшее наблюдение (до 12 суток развития) за зародышами с плазмидой rHLP данной серии экспериментов показало, что на 6-е сутки у 2 предличинок из 6 интенсивная экспрессия трансгена проявлялась в мышечных, эпидермальных клетках и в желточном синцитии (рис. 4А). У одной из двух экспрессирующих предличинок была обнаружена сильная экспрессия gfr-гена в хрусталиках глаз (рис. 4В), которая сохранялась до 12 суток развития. На 7–12-е сутки развития экспрессия gfr-гена у обеих предличинок отмечалась также в отдельных клетках или клонах клеток эпидермиса, мышц, жабр, в меланофорах и других типах клеток (рис. 4С). Не было отмечено флуоресцентного свечения клеток у контрольных интактных зародышей либо контрольных зародышей, подвергавшихся нагреванию.

Обсуждение результатов

В настоящей работе показано, что экспрессия репортерных генов lacZ и gfr под контролем регуляторных элементов гена ТШ hsp70 дрозофилы после микроинъекции в оплодотворенные икринки вьюна происходила во время раннего развития эмбрионов F₀-поколения. Экспрессия трансгенов осуществлялась на достаточно высоком уровне независимо от структуры регуляторных элементов и носила мозаичный характер.

Ранее также наблюдалась мозаичная транзистентная экспрессия репортерных генов в эмбрионах различных организмов F₀-поколения при тестировании эффективности работы гетерологичных регуляторных элементов. В частности, промоторы Hox1 мыши и Hox2 человека обеспечивали высокую транзистентную экспрессию гена lacZ у суточных

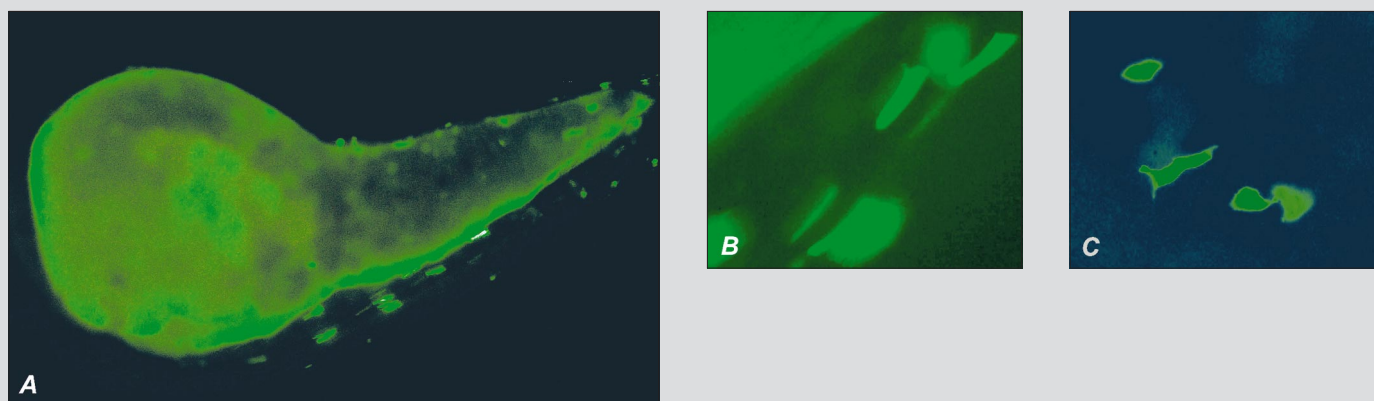


Рис. 2. Трансгенные зародыши мыши с экспрессией плазмиды rHLP:
 А – 4-суточный зародыш с экспрессией *gfr*-гена; В – мышечные волокна; С – меланофоры

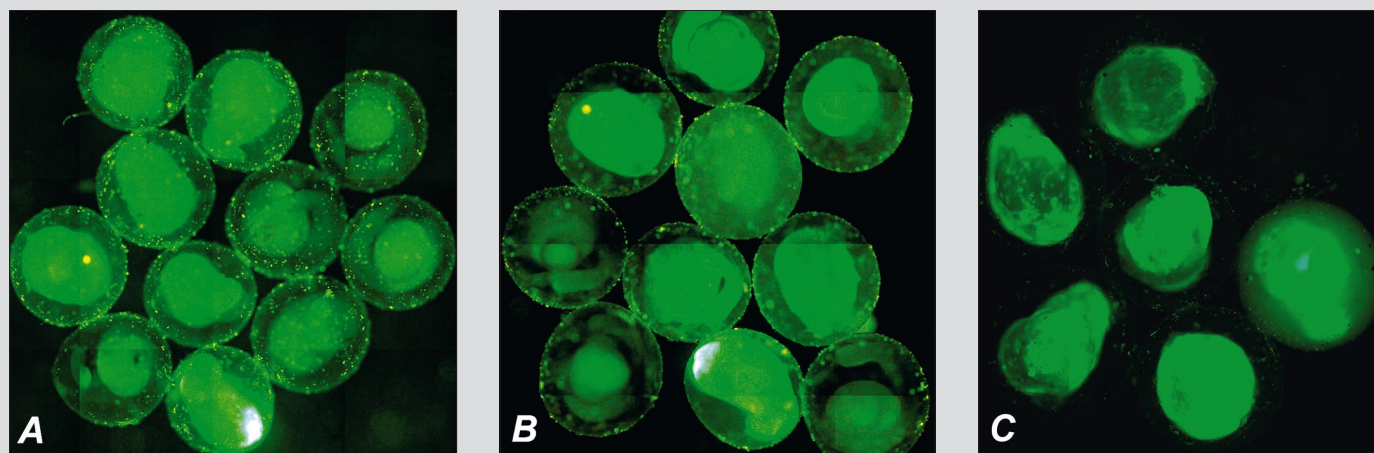


Рис. 3. Трансгенные зародыши мыши:
 А – группа 2-суточных зародышей с экспрессией плазмиды rHLP; В – эта же группа 2-суточных зародышей с экспрессией плазмиды rHLP через 2 часа после нагревания; С – группа 2-суточных зародышей с экспрессией плазмиды rCEEGFP

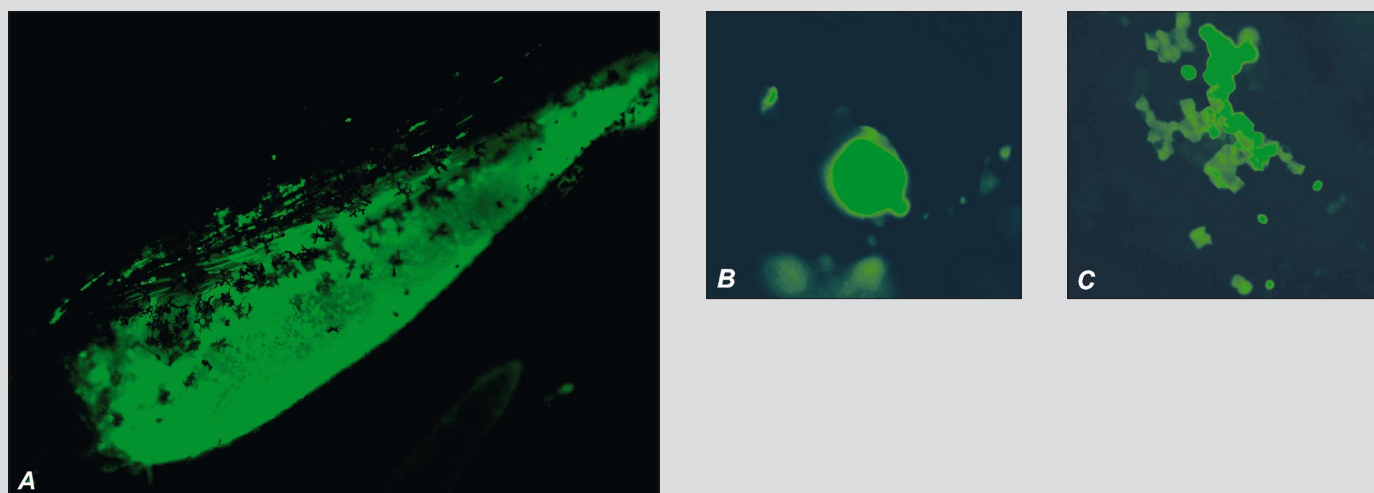


Рис. 4. Трансгенные зародыши мыши с экспрессией плазмиды rHLP:
 А – 6-суточная предличинка (флуоресценция мышечных, эпителиальных клеток и желточного синцития);
 В – глаз 7-суточной предличинки; С – клон эпителиальных клеток, расположенных на хвостовой части туловища

эмбрионов зебрафиш [1]; два различных промотора зебрафиш, специфических для мышечных и эпителиальных клеток (*mylz2* и *krt8*), строго направляли мозаичную тканеспецифическую экспрессию *gfr* и *rfr* генов в ранних трансгенных эмбрионах медаки [4]; ген *gfr* под контролем нейронального гена (*GATA2*) зебрафиш мозаично экспрессировался в эмбрионах *Xenopus L.* [21].

В ряде работ исследовали уровень активности репортерных генов под индуцибельными регуляторными элементами генов ТШ. Показано, в частности, что ген люциферазы (*luc*) под промотором гена *hsp70* дрозофилы после применения ТШ приводил к 55-кратному увеличению уровня экспрессии трансгена в ранних эмбрионах устриц [10]; полностью изолированные регуляторные элементы гена *hsp70* тилипии обеспечивали индуцибельную экспрессию *lacZ*-гена без предпочтения в какой-либо ткани у эмбрионов зебрафиш и в культуре клеток карпа [3]; ген *lacZ* под контролем промоторов генов *hsp70* мыши и *Xenopus L.* в трансгенных эмбрионах зебрафиш экспрессировался в ответ на действие ТШ [12]; высокий уровень люциферазной активности после локального воздействия ультразвуком проявлялся в тканях мышей и крыс после внутривенной инъекции вектора с *luc*-геном под промотором гена *hsp70* дрозофилы [13]; индуцибельная экспрессия гена, кодирующего синий белок BFP, под промотором гена *hsp70* дрозофилы, наблюдалась в трансфицированных эмбриональных стволовых клетках мыши [14].

Эти данные свидетельствуют о том, что промоторная активность, в целом, и механизмы тканеспецифической и индуцибельной экспрессии генов, в частности, высококонсервативны у различных видов животных. В отдельных работах детально проанализированы регуляторные элементы гена *hsp70* дрозофилы и других организмов, при этом показано, что экспрессия трансгенов под этими элементами строго индуцибельна. В одном из исследований наблюдалась низкая фоновая экспрессия гена *lacZ* под контролем регуляторных последовательностей генов *hsp70* мыши и *Xenopus L.* в трансгенных эмбрионах зебрафиш без теплового воздействия (несколько окрашенных клеток на эмбрион), однако после повышения температуры авторы отмечали значительное увеличение количества экспрессирующих клеток [12]. В наших экспериментах повышение температуры окружающей среды не приводило к явному усилению и без того довольно интенсивной экспрессии трансгенов под обоими вариантами регуляторных элементов гена *hsp70* дрозофилы. Возможно, что это связано не столько со структурой этих элементов, сколько с особенностями развития вьюна: в развивающихся икринках вьюна находится большое количество транскрипционных факторов, которые являются достаточно консервативными и способны к взаимодействию с гетерологичными промоторами, в результате чего для активации экспрессии трансгенов не требуется никаких дополнительных воздействий, достаточно только готовности транскрипционного аппарата собственного генома транскрибировать чужеродную ДНК [7]. Видимо, гомологи транскрипционных факторов HSF у различных видов рыб способны высокоэффективно связываться с промоторами генов *hsp70* других видов животных, что подтверждает консервативную природу регуляторных районов гена *hsp70* [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Westerfield M., Wegner J., Jegalian B.G. et al. Specific activation of mammalian Hox promoters in mosaic transgenic zebrafish. *Genes Dev.* 1992; 6: 591–8.
2. Андреева Л.Е., Григоренко А.П., Гордеева О.Ф., Дворянчиков Г.А. Экспрессия *CMV-lacZ* и *RSV-lacZ*-генов в трансгенных эмбрионах рыб и мышей. *Генетика* 1996; 3: 1661–8.
3. Molina A., Biemar F., Muller F. et al. Cloning and expression analysis of an

Дополнительным доводом в пользу наличия большого количества транскрипционных факторов широкого спектра действия в зародышах вьюна является тот факт, что *lacZ*-ген под контролем высокоспецифичного промотора гена $\alpha S1$ -казеина быка [22], инъецированный в оплодотворенные икринки вьюна, также высокоэффективно экспрессировался в различных тканях 1–5-суточных зародышей (собственные неопубликованные данные).

По нашим данным, увеличение концентрации трансгенов при введении в яйцеклетки вьюна приводило к увеличению экспрессии трансгена как в отношении количества экспрессирующих предличинок, так и интенсивности экспрессии в индивидуальных особях. Это сопровождалось повышением количества аномальных зародышей, что согласуется с данными других авторов [12].

Начало экспрессии трансгенов у суточных зародышей вьюна (в период ранней-средней гастрюлы) согласуется с данными наших предыдущих исследований [17] и совпадает с началом экспрессии чужеродной ДНК в период гастрюляции у зебрафиш [23]. Максимальное количество экспрессирующих особей вьюна (до 100% – в отдельных сериях экспериментов) без теплового воздействия мы наблюдали у 2–3-суточных зародышей (в период перед вылуплением при формировании органов осевого комплекса и сразу же после вылупления из оболочек), что полностью совпадает с нашими предыдущими данными при инъекции *lacZ*-гена под контролем промоторов RSV и CMV в икринки вьюна [17, 2]. Наивысший пик транзиторной экспрессии трансгенов отмечался и в соответствующий период развития (гастрюла – начало сегментации) у 12–24-часовых эмбрионов зебрафиш F_0 -поколения после инъекции репортерных генов под регуляторными элементами вирусов SV-40 и RSV [23], Hox-генов (82,7% экспрессирующих особей) [1], генов *hsp70* мыши и *Xenopus L.* [12], нейронального гена *GATA2* [21].

Гены ТШ у зебрафиш в нестрессовых условиях экспрессируются уникальным образом. В частности, ген *hsp90alpha* экспрессируется во время нормальной дифференцировки в мышечных волокнах, ген *hsp70-4* – во время развития хрусталика глаза [24, 8]. Однако под воздействием стресса экспрессия трансгенов с гетерологичными *hsp70*-промоторами у эмбрионов зебрафиш не имеет специфического характера и сходна с таковой, например, при использовании SV40-промотора, который является конститутивным [3]. В наших экспериментах экспрессия трансгенов не носила предпочтительного характера по отношению к каким-либо органам и тканям и наблюдалась в эпителиальных и пигментных клетках эпидермиса, мышечных волокнах, желточном синцитии, хрусталике глаз. Аналогичный характер экспрессии мы наблюдали также после введения *lacZ*-гена с промоторами RSV и CMV [2].

Таким образом, в ранних эмбрионах вьюна показана достаточно высокая транзиторная мозаичная активность репортерных генов *lacZ* и *gfr* под контролем двух отличающихся регуляторных элементов гена *hsp70* дрозофилы без применения теплового шока. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данную модель удобно использовать для быстрого тестирования промоторной активности генов, принадлежащих к различным таксономическим группам.

inducible HSP70 gene from tilapia fish. *FEBS Lett* 2000; 474: 5–10.

4. Zeng Z., Liu X., Seebah S., Gong Z. Faithful expression of living color reporter genes in transgenic medaka under two tissue-specific zebrafish promoters. *Dev. Dyn.* 2005; 234: 387–92.

5. Козлов А.П., Решетников В.Л., Корж В.П., Нейфах А.А. Чужеродная ДНК в развивающихся зародышах вьюна *Misgurnus fossilis L.* *Мол. биология* 1988; 22: 1614–22.

6. Колесников В.А., Алимов А.А., Барминцев В.А. и др. Высокая скорость механической инъекции чужеродной ДНК в яйцеклетки рыбы. *Генетика* 1990; 26: 2122–6.
7. Андреева Л.Е., Дворянчиков Г.А. Анализ экспрессии RSV-lacZ-гена в трансгенных эмбрионах вьюна *Misgurnus fossilis* L. при различных вариантах инъекций. *Генетика* 1995; 31: 759–66.
8. Krone P.H., Evans T.G., Blechinger S.R. Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2003; 14: 267–74.
9. Krone P.H., Heikkila J.J. Expression of microinjected hsp 70/CAT and hsp 30/CAT chimeric genes in developing *Xenopus laevis* embryos. *Dev.* 1989; 106: 271–81.
10. Cadoret J.P., Boulo V., Gendreau S., Mialhe E. Promoters from *Drosophila* heat shock protein and cytomegalovirus drive transient expression of luciferase introduced by particle bombardment into embryos of the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Biotechnol.* 1997; 56: 183–9.
11. Saraiva E., Fampa P., Cedeno V. et al. Expression of heterologous promoters in *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) cell lines. *J. Med. Entomol.* 2000; 37: 802–6.
12. Adam A., Bartfai R., Lele Z. et al. Heat-inducible expression of a reporter gene detected by transient assay in zebrafish. *Exp. Cell Res.* 2000; 256: 282–90.
13. Smith R.C., Machluf M., Bromley P. et al. Spatial and temporal control of transgene expression through ultrasound-mediated induction of the heat shock protein 70B promoter in vivo. *Hum. Gene Ther.* 2002; 13: 697–706.
14. Павлова Г.В., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л. и др. Экспрессия белка ВФР в трансфицированных эмбриональных стволовых клетках. *Клеточные технологии в биологии и медицине* 2005; 2: 99–102.
15. Нейфах А.А. Использование метода радиационной инактивации ядер для исследования их функций в раннем развитии рыб. *Журн. Общ. Биологии* 1959; 20: 202–13.
16. Amin J., Mestriil R., Schiller P. et al. Organization of the *Drosophila melanogaster* hsp70 heat shock regulation unit. *Mol. Cell Biol.* 1987; 7: 1055–62.
17. Андреева Л.Е., Жаданов А.Б., Кузнецов Ю.М. Экспрессия гена β-галактозидазы в трансгенных эмбрионах вьюна *Misgurnus fossilis* L. *Генетика* 1993; 29: 740–7.
18. Thorey I.S., Meneses J.J., Neznanov N. et al. Embryonic expression of human keratin 18 and K18-beta-galactosidase fusion genes in transgenic mice. *Dev. Biol.* 1993; 160: 519–34.
19. Amin J., Mestriil R., Lawson R. et al. The heat shock consensus sequence is not sufficient for hsp70 gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* 1985; 5: 197–203.
20. Takada T., Iida K., Awaji T. et al. Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. *Nat. Biotechnol.* 1997; 15: 458–61.
21. Conway G., Torrejon M., Lin S., Reinsch S. Fluorescent tagged analysis of neural gene function using mosaics in zebrafish and *Xenopus laevis*. *Brain Res.* 2006; 1070: 150–9.
22. Дворянчиков Г.А., Серова И.А., Андреева Л.Е. и др. Секрция биологически активного гранулоцит колоние-стимулирующего фактора (Г-КСФ) человека в молоке трансгенных мышей. *Генетика* 2005; 41: 1330–7.
23. Stuart G.W., Vielkind J.R., McMurray J.V., Westerfield M. Stable lines of transgenic zebrafish exhibit reproducible patterns of transgene expression. *Dev.* 1990; 109: 577–84.
24. Halloran M.C., Sato-Maeda M., Warren J.T. et al. Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. *Dev.* 2000; 127: 1953–60.