



**ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК С РЕПЛИКАТИВНО  
ИНАКТИВИРОВАННЫМ ГЕНЕТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ ОДНОГО ИЗ  
ПАРТНЕРОВ ПО СЛИЯНИЮ**

*Е.И. Филясова, О.В. Зацепина, О.А. Ларионов, Ю.М. Ходарович*

Институт Биоорганической Химии им. академиков Шемякина М.М. и Овчинникова Ю.А.

РАН, Москва

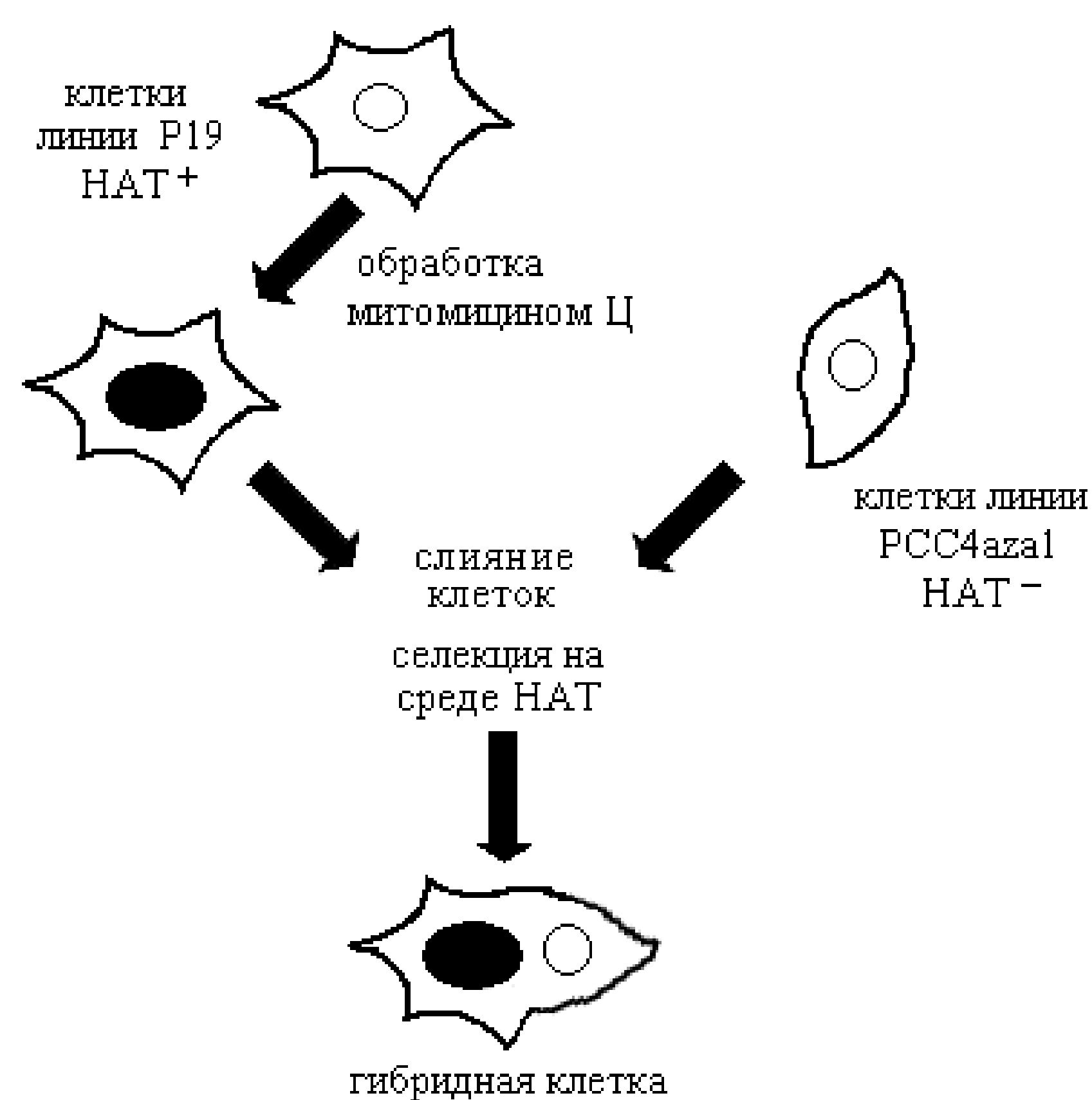


Рис. 1: Схема эксперимента по получению гибридных клеток P19/МЦ×PCC4aza1.

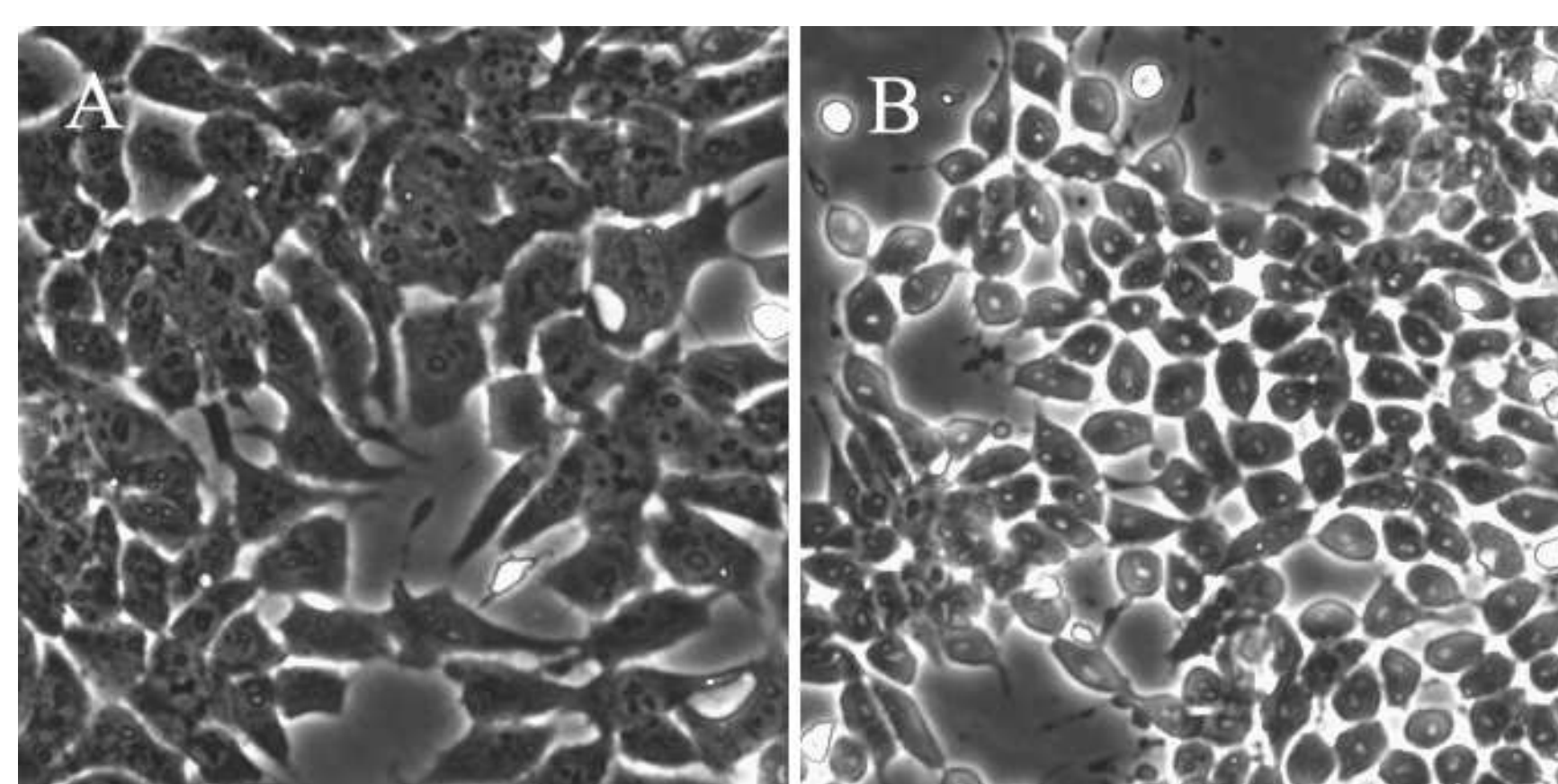


Рис. 2: Морфология клеток линии P19 (А) и линии PCC4aza1 (В).

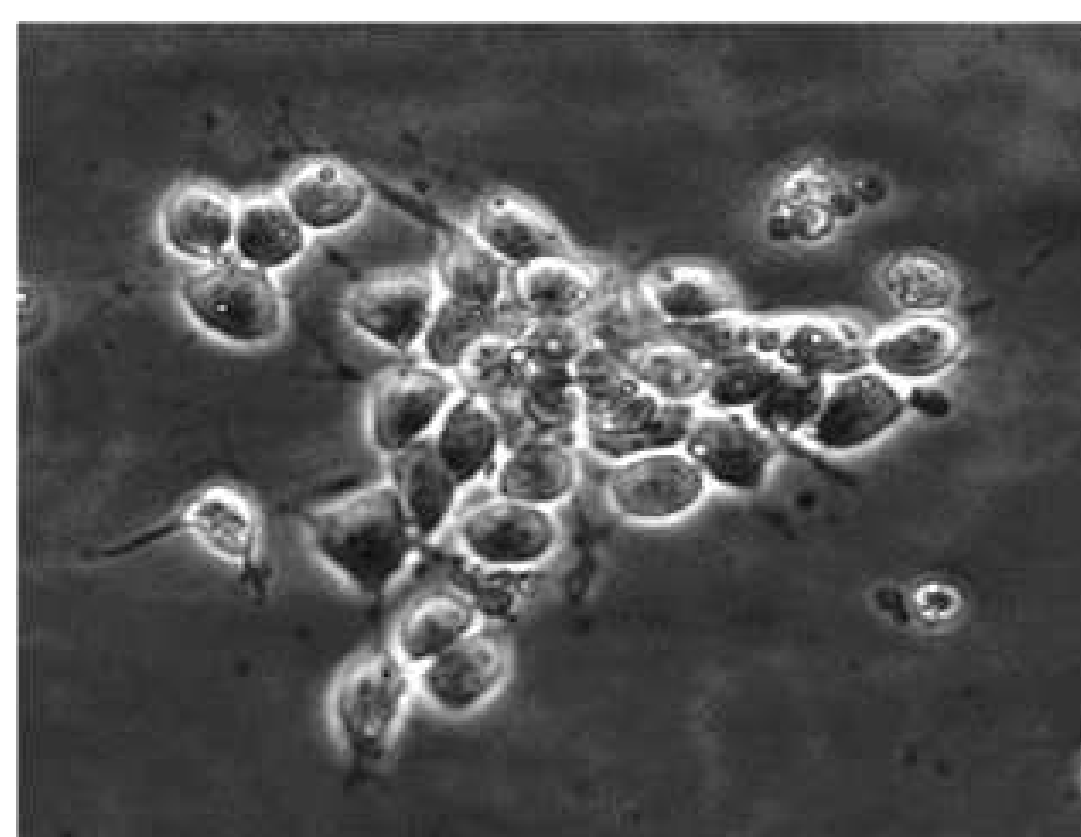


Рис. 3: Гибридный клон P19/МЦ×PCC4aza1.

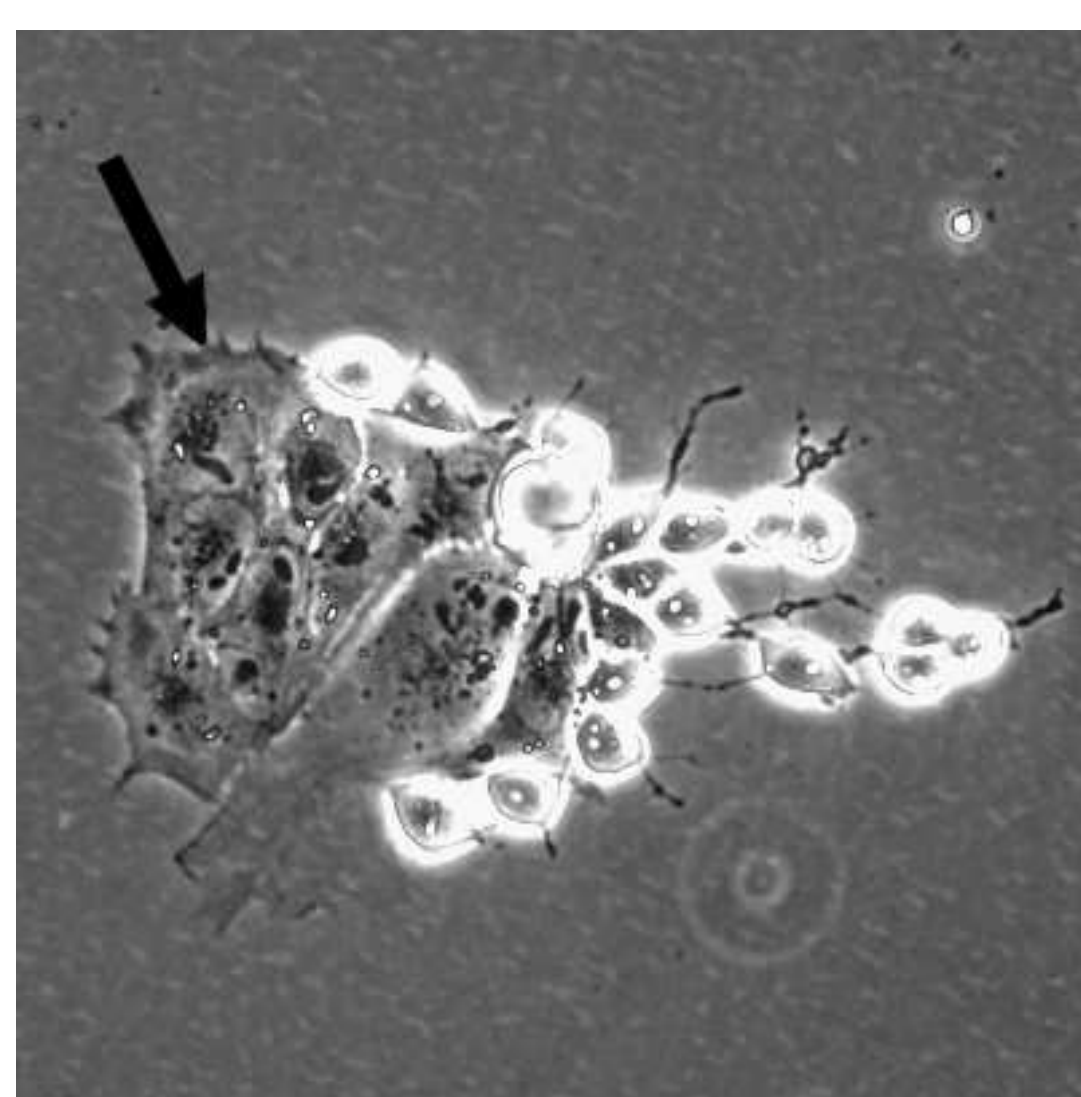


Рис. 4: Морфология клеток полиплоидного гибридного клона P19/P6G x PCC4aza1 (светлые клетки), выросшего рядом с гетерокардионом, полученным в результате слияния между собой нескольких клеток P19/P6G (показан стрелкой)

Гибридные клетки с репликативно инактивированным генетическим материалом одного из партнеров по слиянию могут быть использованы для изучения влияния ядерно-цитоплазматических факторов одной клетки на состояние дифференцировки другой клетки. Также такие гибридные клетки могут найти применение в клеточной терапии, так как позволяют получить клетки с диплоидным набором хромосом, аутологичные клеткам пациента.

Для репликативной инактивации ДНК одного из партнеров по слиянию использовали ДНК-сшивающий агент митомицин Ц (МЦ) (рис. 1). Работу проводили на клетках эмбриональной карциномы мыши линий P19 и PCC4aza1 (рис. 2). Было показано, что обработка клеток P19 МЦ не препятствует образованию жизнеспособных гибридов с интактными клетками PCC4aza1 (рис. 3). Процент выросших колоний после проведения слияния был довольно высоким: 1 колония на  $10^4$  подвергающихся слиянию клеток PCC4aza1. Обработка МЦ существенно не влияет на эффективность образования гибридов. Это было продемонстрировано при получении полиплоидных гибридов между клетками PCC4aza1 и клетками P19, обработанными токсическим митохондриальным красителем родамином 6G (P6G) (рис. 4). Полиплоидные гибридные клетки были получены в условиях, сходных с условиями получения гибридных клеток P19/МЦ×PCC4aza1.

**Выводы**

1. При слиянии клеток, обработанных МЦ, с интактными клетками удается получить жизнеспособные гибриды.
2. В гибридных клетках отсутствует геномная и митохондриальная ДНК клеток, обработанных МЦ.
3. Число хромосом в гибридных клетках соответствует числу хромосом клеток PCC4aza1 и свидетельствует об отсутствии в них хромосом клеток P19.

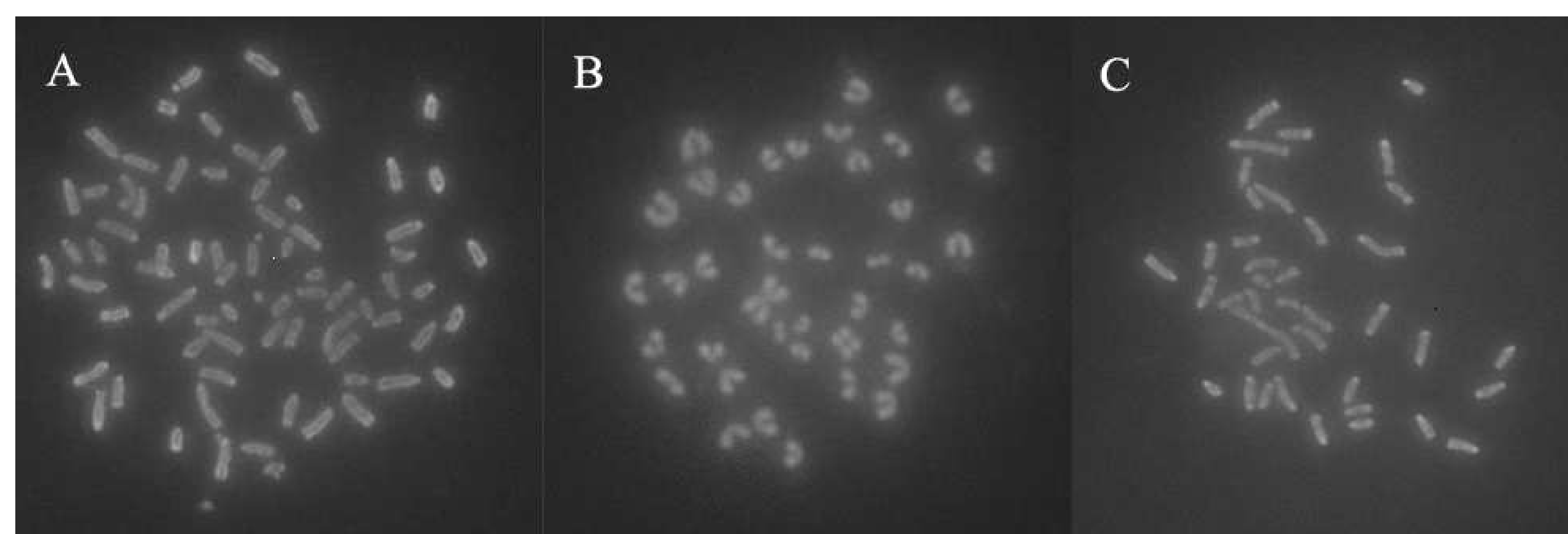


Рис. 5: Хромосомный анализ клеток линии P19 (А), клеток линии PCC4aza1 (В) и гибридных клеток P19/МЦ×PCC4aza1 (С).

Эффективность получения клонов полиплоидных клеток составляла 2.5 колонии на  $10^4$  клеток PCC4aza1. Стоит отметить, что при получении тетраплоидных гибридов между клетками PCC4aza1 и соматическими клетками (спленоцитами) эффективность образования гибридных клонов резко падала и составляла 1 клон на  $5 \times 10^6$  клеток PCC4aza1.

Хромосомный анализ гибридных клеток P19/МЦ×PCC4aza1 показал наличие в них хромосом клеток PCC4aza1 (рис. 5). Микросателлитный ПЦР анализ на маркеры хромосом 5, 6, 8 и 14 показал, что микросателлиты гибридных клонов в точности совпадают с микросателлитами клеток PCC4aza1 (рис. 6). Названия используемых микросателлитных маркеров и последовательности праймеров приведены в таблице 1. Также был проведен анализ состава митохондриальной ДНК полученных гибридных клонов с помощью аллель-специфичной ПЦР. На (рис. 7) приведены результаты ПЦР, указаны последовательности праймеров и условия реакции. Приведенные данные также говорят о том, что в потомках гибридных клеток содержится генетический материал только одного из партнеров по слиянию (PCC4aza1).

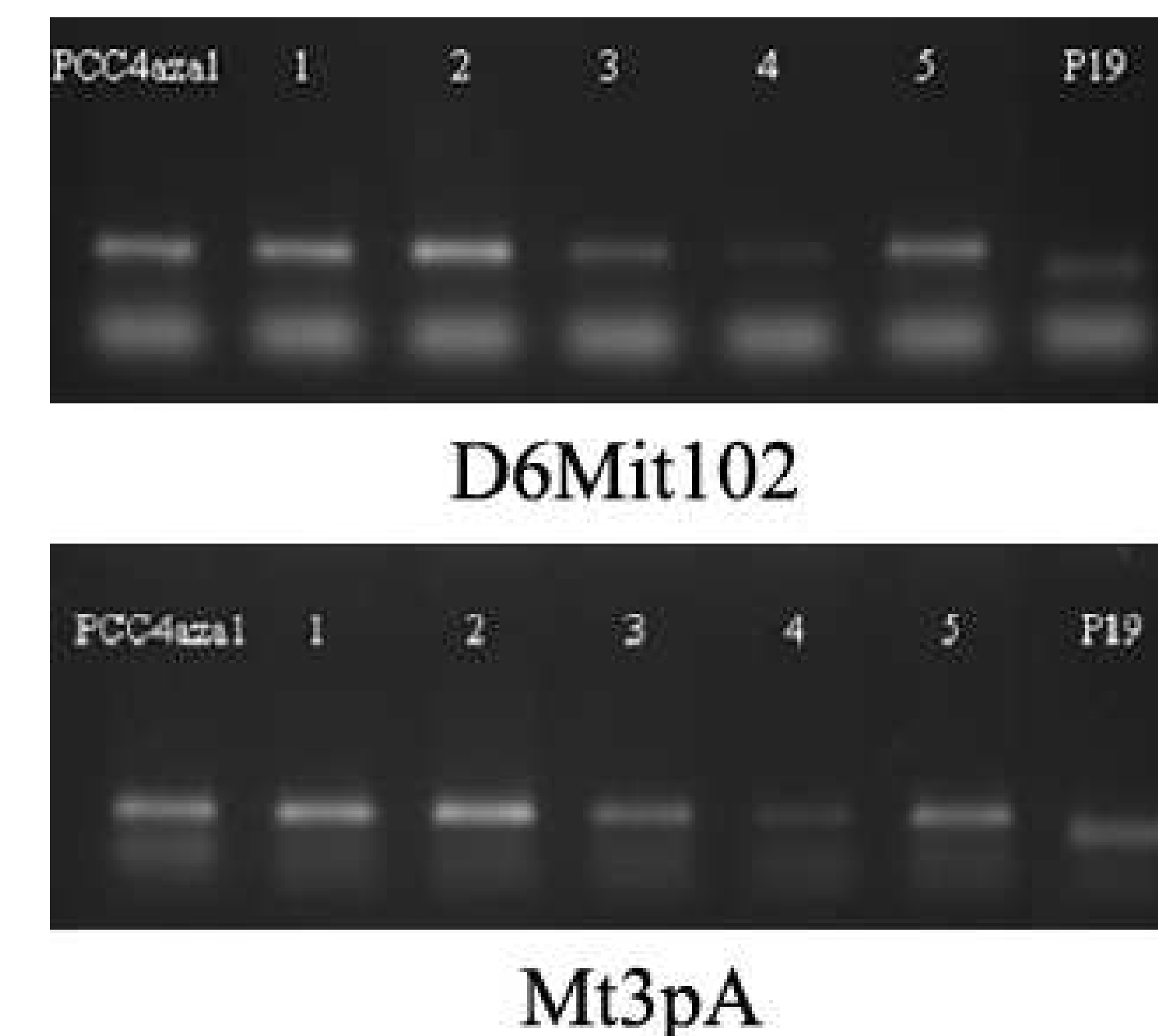


Рис. 6: Микросателлитный ПЦР-анализ с использованием маркеров D6Mit102 и Mt3pA. 1-5 – ДНК гибридных клонов P19/МЦ×PCC4aza1, PCC4aza1 и P19 соответственно ДНК исходных линий PCC4aza1 и P19.

Микросателлитный маркер (хромосома)	Праймеры	Размер ПЦР-фрагмента для линии С3Н/He и линии 129/Ola соответственно, п. о.
D5Mit138 (5)	Пр. 5'-AGACAGTTACCTTCTTCCCAAGG-3' Обр. 5'-TGTTCCTCCCTTCTGCCATC-3'	120 и 142
D6Mit102 (6)	Пр. 5'-CCATGTGGATATCTTCCCTTG-3' Обр. 5'-GTATACCCAGTTGTAATCTTGTGTG-3'	125 и 177
Mt3-pA (8)	Пр. 5'-CCCCTTCTAGCCTTCTTCA-3' Обр. 5'-TTTGGTCCAAACGGGATGCT-3'	123 и 162
D8Mit4 (8)	Пр. 5'-CCAACATCCCAAGGTA-3' Обр. 5'-GTATGTTCAAGGCTGGGCAT-3'	195 и 175
D14Mit92 (14)	Пр. 5'-CTGCTGCAGAAATTAATTGATTT-3' Обр. 5'-GGATATATGGATTTATACAGACACACA-3'	122 и 88

Таблица 1. Структура праймеров, используемых для микросателлитного анализа гибридных клеток P19/МЦ×PCC4aza1 и клеток исходных линий P19 (мышь линии С3Н/He) и PCC4aza1 (мышь линии 129/Ola).

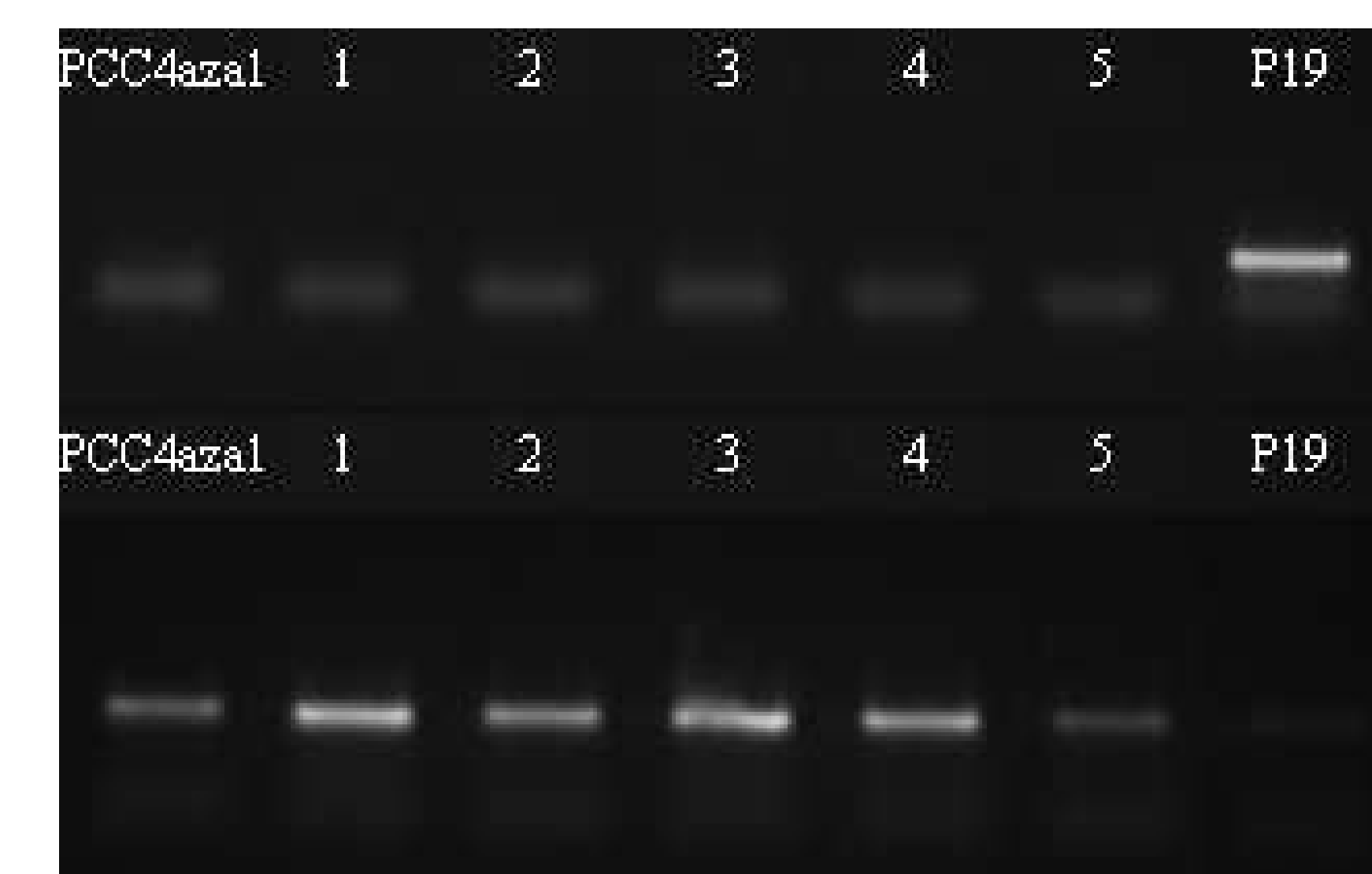


Рис. 7: Анализ наследования митохондрий в гибридных клонках P19/МЦ×PCC4aza1. Вверху – ПЦР, специфичная для линии С3Н/He (праймеры MitF1-MitR1), внизу – ПЦР, специфичная для линии 129/Ola (праймеры MitF2-MitR1). 1-5 – ДНК гибридных клонов P19/МЦ×PCC4aza1, PCC4aza1 и P19 соответствуют ДНК исходных линий PCC4aza1 и P19.

Последовательности праймеров:  
 MitF1 5'-ATACTGACATTTTGTAGACGTA-3'  $T_{отж} = 61^{\circ}C$   
 MitF2 5'-ATACTGACATTTTGTAGACGTA-3'  $T_{отж} = 58^{\circ}C$   
 MitR1 5'-GTAGAAGAGCAATTTCTAGGTC-3'