

**МЕТОДЫ**

УДК 57.085.2:636.028

doi: 10.25687/1996-6733.prodanimbio.2018.3.106-110

**ПОЛУЧЕНИЕ БЛАСТОЦИСТ МЫШИ В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕДАХ  
ПОСЛЕ МИКРОИНЪЕКЦИИ В ПРОНУКЛЕУСЫ ЗИГОТ СМЕСИ ПЛАЗМИД  
ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ КОМПОНЕНТОВ CRISPR/Cas9 СИСТЕМЫ**

Максименко С.В., Трубицина Т.П., Белова Н.В., Кутьин И.В., Рябых В.П.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных, Боровск Калужской обл.,  
Российская Федерация*

Цель работы – исследовать способность зигот к развитию до стадии бластоцисты после микроинъекции в их пронуклеусы смеси плазмид для экспрессии компонентов CRISPR/Cas9 системы и культивирования на коммерческих средах. Донорами клеток были самки мышей линии C57BL6/СВА в возрасте 6-9 недель. В качестве манипуляционной среды использовалась коммерческая среда Global with Hepes® с добавлением 10% заменителя сывороточного белка, а в качестве культуральной среды – Global® с добавлением 10% заменителя сывороточного белка. В результате получены данные, которые свидетельствуют о том, что исследованные среды могут быть успешно использованы для получения бластоцист. При культивировании после микроинъекции в течение суток вступили в развитие 84,5% эмбрионов, –стадии компактной морулы достигли 52%, из них стадии бластоцисты – 92%. Заключение, что выход бластоцист от числа микроинъектированных зигот на уровне 44% достаточен для выполнения дальнейших работ по получению геномно-редактированных животных, продуцирующих рекомбинантные белки с молоком.

*Ключевые слова: эмбрионы мыши, генно-инженерные конструкции, микроинъекция, культивирование in vitro*

*Проблемы биологии продуктивных животных, 2018, 3: 106-110*

**Введение**

Открытие технологии рекомбинантной ДНК в 1970-х положило начало новой эры для биологии. Сначала молекулярные биологи получили возможность манипулировать молекулами ДНК (Xiao et al., 2015), что позволило изучать гены и открывать новое в медицине и биотехнологии и впоследствии – непосредственно редактировать и модулировать функции геномных последовательностей ДНК. В 1980 Гордон и коллеги впервые применили метод микроинъекции в пронуклеус зигот для переноса чужеродных генов в эмбрион мыши, после чего данная технология получила распространение и широко используется по сегодняшний день (Gordon et al, 1980).

Наиболее широко применяется метод получения трансгенных мышей, включающий как микроинъекцию трансгена в пронуклеус оплодотворенных ооцитов, так и генетическое таргетирование (получение целевых мутаций) посредством использования эмбриональных стволовых клеток (Miguel et al., 2010).

Одним из основных методов получения генетически модифицированных животных является метод микроинъекции генно-инженерной конструкции в пронуклеусы зигот. Данный метод используется, преимущественно, для получения трансгенных мышей, кроликов и свиней. Это связано с недостаточной эффективностью метода, обусловленной низкой частотой встраивания рекомбинантной ДНК в геном, доступностью зигот на стадии двух пронуклеусов и сложностью проведения операций на крупных сельскохозяйственных животных (Максименко и др., 2013).

Система CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, регулярно расположенные группами короткие палиндромные повторы) – это адаптивная система иммунологической защиты прокариотов, обеспечивающая их иммунитет против генетически изменчивых элементов, таких как вирусная ДНК (Erwei et al., 2017). Система CRISPR-Cas9 состоит из двух ключевых молекул, взаимодействие которых способно внести изменение в ДНК. Это фермент Cas9, способный разрезать геномную ДНК в определенном месте – рядом с PAM-последовательностью, представляющей собой мотив 5'-NGG-3', и гРНК (гайдовая, или направляющая РНК), включающая в себя фрагмент размером 20 нуклеотидов, идентичный таковому рядом с PAM-мотивом, и структурный фрагмент. В случае, когда тщательно подобранная гРНК комплементарно взаимодействует с нитью ДНК, которой она соответствует, эндонуклеаза Cas9, обнаружив рядом с PAM-мотивом структурный фрагмент гРНК, вносит двухцепочечный разрыв в целевой последовательности ДНК. Последующий процесс молекулярной репарации ДНК приводит к появлению вставок, удалению или замещению части последовательности. После появления системы редактирования CRISPR/Cas9, существенно упростилось получение нокаутных и трансгенных животных, в первую очередь, мышей как модельных животных (Немудрый и др., 2014, Yang 2015).

Цель данной работы – исследовать способность зигот к развитию до стадии бластоцисты после микроинъекции генно-инженерной конструкции (смесь плазмид, экспрессирующих компоненты CRISPR/Cas9 системы) в пронуклеусы зигот и их культивирования на коммерческих средах.

### Материал и методы

В качестве доноров эмбрионов были использованы самки мышей линии C57BL6/CBA в возрасте 6-9 недель, массой 14-16 г. У мышей была вызвана суперовуляция при помощи внутрибрюшинного введения 10 МЕ препарата «Фоллигон» (гонадотропин из сыворотки жеребых кобыл (СЖК), производитель – Московский эндокринный завод, РФ) с последующим (через 47 ч) введением 10 МЕ хорионического гонадотропина человека (ХГч) (производитель – Московский эндокринный завод, РФ). После введения ХГч самки были помещены в клетку с самцами и на следующий день были проверены на наличие копулятивной пробки. Мыши с копулятивной пробкой были умерщвлены путём дислокации шейных позвонков через 70 ч после введения гонадотропина СЖК. Из яйцеводов с использованием коммерческой манипуляционной среды Global with Hepes® (производство LifeGlobal Group, США) с добавлением 10%-ным заменителем сывороточного белка (Quinn's Advantage™ SPS Serum Protein Substitute, производство SAGETM In Vitro Fertilization, Inc., США) были получены ооцит-кумуляусные комплексы, которые были очищены 0,1%-ным раствором гиалуронидазы (Sigma, США). Полученные эмбрионы были последовательно отмыты в трёх каплях манипуляционной среды, посчитаны и визуальным образом оценены по качеству. Для последующих манипуляций были взяты только морфологически нормальные эмбрионы с видимыми пронуклеусами.

Как следует из табл. 1, не все полученные эмбрионы были с видимыми пронуклеусами, однако на одну самку-донора в среднем приходилось 18,8 морфологически нормальных эмбрионов, пригодных для микроинъекции, что является достаточным количеством для работы.

Таблица 1. Результаты индукции суперовуляции у мышей-доноров

Число самок-доноров	Количество извлечённых яйцеклеток				Количество зигот с пронуклеусами	
	Всего	С видимыми пронуклеусами		Без видимых пронуклеусов		На одного донора
		n	%	n	%	
20	437	377	86,3	60	13,7	18,8

Для микроинъекций готовили *рабочий раствор* ДНК (генно-инженерных конструкций) следующего состава: 1. Смесь плазмид рХ330-g3 и рХ330-g7, созданных на основе бицистронной плазмиды рХ330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene plasmid # 42230), как компоненты CRISPR/Cas9 системы (<http://www.addgene.org/42230/>); 2. Плазмида рWAPhLf, созданная в лаборатории клеточной и генной инженерии в качестве матрицы для сайт-специфического гомологичного встраивания в локус гена кислого сывороточного белка (Колоскова и др., 2018).

Все компоненты находились в буфере ТЕ для инъекций (10 мМ Tris-HCl, 0,1 мМ EDTA, рН 7,4). Раствор центрифугировали 10 минут при 12000 об/мин. Супернатант стерилизовали с использованием 0,22 мкм фильтрующей колонки Millipore. Плазмиды рХ330-g3 и рХ330-g7 использовали по 2,5 нг/мкл, рWAPhLf – в концентрации 8 нг/мкл смеси. Общее содержание плазмидной ДНК составляло 13 нг/мкл рабочего раствора.

*Микроинъекции* осуществляли в поле видимости инвертированного микроскопа с интерференционной оптикой Номарского, оснащённом гидравлическими манипуляторами Narishige. Для удержания зигот использовали холдеры, которые подключали к микроинъекционному шприцу. Игла для микроинъекций заполнялась 2-3 мкл рабочего раствора смеси плазмидной ДНК при помощи пипетки с удлиненным носиком, после чего закреплялась в холдере. Присоска закреплялась в холдере аналогично игле и была размещена диаметрально противоположно в камере для манипуляций в поле видимости микроскопа (Мензоров и др., 2016).

Для удобства манипулирования целесообразно проводить микроинъекцию несколькими партиями по 20-30 зигот в каждой. Подготовленные к микроинъекции эмбрионы с видимыми пронуклеусами размещают в камере для микроинъекций в капле манипуляционной среды Global with Hepes® с 10% заменителем сывороточного белка под минеральным маслом и настраивают оптические системы микроскопа таким образом, чтобы отчетливо видеть пронуклеусы зигот. Затем в камеру помещают микроинструменты, перемещая их вверх и вниз до полной фокусировки кончика иглы и присоски, не меняя при этом настройку оптической системы микроскопа. После этого в присоске фиксируют эмбрион таким образом, чтобы пронуклеус находился в фокусе, и перемещением иглы осуществляют прокол блестящей оболочки, цитоплазматической мембраны и пронуклеуса.

Игла должна прокалывать блестящую оболочку и плазматическую мембрану достаточно легко. При микроинъекции в пронуклеус важно не повредить проядрышки и контролировать введение определенного объема экзогенной ДНК, чтобы не вызвать разрыв пронуклеуса и, как следствие, – гибель эмбриона. Признаком успешной микроинъекции является увеличение объема пронуклеуса и сохранение его целостности после извлечения иглы. Микроинъекцированные эмбрионы размещают в камере отдельно от эмбрионов, не прошедших микроинъекцию и при необходимости извлекают их из камеры в каплю с манипуляционной средой под слоем минерального масла. Количество микроинъекцированных зигот, поставленных на культивирование, приведено в табл. 2.

**Таблица 2. Влияние микроинъекции генно-инженерной конструкции на жизнеспособность мышинных эмбрионов**

Количество: Микроинъекциро- ванных зигот	Развилось до стадии 2-х бластомеров		Взято для трансплан- тации		Взято для дальнейшего культивирования		Развилось до стадии морулы		Бласто- цисты	
	п	%	п	%	п	%	п	%	п	%
187	158	84,5	49	31	109	68,9	57	52,2	48	92*
контроль (без микроинъекции)										
187	37	100	-	-	-	-	-	-	34	92**

Примечания: \*от числа развившихся до стадии морулы; \*\* от числа вступивших в дробление

Микроинъецированные эмбрионы культивируют на среде Global® при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> до стадии двух бластомеров, предварительно отмыв в трёх каплях с данной средой.

Как видно из табл. 2, число эмбрионов, развившихся до стадии двух бластомеров, составило 84,5% от количества микроинъецированных зигот. Далее эмбрионы были культивированы до стадии компактной морулы и бластоцисты.

Культивирование на коммерческой среде Global® эмбрионов мыши, микроинъецированных в пронуклеус эмбрионов и развившихся до стадии компактной морулы составило 52% от количества эмбрионов, вступивших в дробление и из них достигших стадии бластоцисты – 92%. В целом, выход бластоцист от числа микроинъецированных зигот составил 44%, что достаточно для выполнения дальнейших работ по получению геномно-редактированных животных, продуцирующих рекомбинантные белки с молоком.

### Заключение

В ходе проведенных исследований выяснено, что использование коммерческих сред Global with Hesper® и Global® для культивирования зигот, не оказало значительного отрицательного воздействия на эмбрионы микроинъецированных генно-инженерной конструкцией (смесь плазмид для экспрессии компонентов CRISPR/Cas9 системы) мышей линии C57BL6/СВА, в ходе их развития от стадии морулы до бластоцисты. В целом, полученный выход бластоцист от числа микроинъецированных зигот на уровне 44% достаточен для выполнения дальнейших работ по получению геномно-редактированных животных, продуцирующих рекомбинантные белки с молоком.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Максименко О.Г., Дейкин А.В., Ходарович Ю.М., Георгиев П.Г. Использование трансгенных животных в биотехнологии: перспективы и проблемы // *Acta naturae*. – 2013. – Т. 5. – № 1. – С. 33-48.
2. Мензоров А.Г., Лукьянчикова В.А., Кораблев А.Н., Серова И.А., Фишман В.С. Практическое руководство по редактированию геномов системой CRISPR/Cas9 // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2016. – Т. 20. – № 6. – С. 930-944.
3. Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas – инструменты открытий // *Acta Naturae*. – 2014. – Т. 6. – № 3. – С. 20-42.
4. Erwei Z., Yi-Jun C., Kui L. et al. One-step generation of complete gene knockout mice and monkeys by CRISPR/Cas9-mediated gene editing with multiple sgRNAs // *Cell Research*. – 2017. – Vol. 27. – P. 933-945.
5. Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., Ruddle F.H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1980. – Vol. 77. – P. 7380-7384.
6. Miguel A., Gama S., Rita G., Gregory A. Animal transgenesis: an overview // *Brain Struct. Funct.* – 2010. – Vol. 214. – P. 91-109.
7. Yang X. Applications of CRISPR-Cas9 mediated genome engineering // *Military Medical Research*. – 2015. – Vol. 2. – P. 11. eCollection <<http://www.addgene.org/42230/>>

### REFERENCES

1. Maksimenko O.G., Deikin A.V., Khodarovich Yu.M., Georgiev P.G. [The use of transgenic animals in biotechnology: perspectives and problems]. *Acta naturae*. 2013, 5(1): 33-48.
2. Menzorov A.G., Luk'yanchikova V.A., Korablev A.N., Serova I.A., Fishman V.S. [A practical guide to editing genomes by the CRISPR/Cas9 system]. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii - Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016, 20(6): 930-944.
3. Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakiyan S.M. [Genome editing systems TALEN and CRISPR/Cas - discovery tools]. *Acta Naturae*. 2014, 6(3): 20-42.

4. Erwei Z., Yi-Jun C., Kui L. et al. One-step generation of complete gene knockout mice and monkeys by CRISPR/Cas9-mediated gene editing with multiple sgRNAs. *Cell Research*. 2017, 27: 933-945.
5. Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., Ruddle F.H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980, 77: 7380-7384.
6. Miguel A., Gama S., Rita G., Gregory A. Animal transgenesis: an overview. *Brain Struct. Funct.* 2010, 214: 91-109.
7. Yang X. Applications of CRISPR-Cas9 mediated genome engineering. *Military Medical Research*. 2015, 2: 11. eCollection <<http://www.addgene.org/42230/>>

**Production of mouse blastocysts in culture media  
after microinjection into zygotic pronuclei of plasmid mixture  
for expressing components of CRISPR/Cas9 system**

Maksimenko S.V., Trubitsina T.P., Belova N.V., Kutyn I.V., Ryabykh V.P.

*Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition,  
Borovsk, Kaluga oblast, Russian Federation*

**ABSTRACT.** The aim of the study is to investigate the ability of the zygotes to develop to the blastocyst stage after microinjection into their pronuclei of a mixture of plasmids for expressing the components of CRISPR/Cas9 system and cultivation on commercial media. Cell donors were female C57BL6/CBA mice aged 6-9 weeks. As a manipulation medium, the Global with Hepes® commercial medium was used with the addition of 10% whey protein substitute, and as a culture medium – Global® with the addition of 10% whey protein substitute. As a result, data have been obtained that indicate that the media studied can be successfully used to produce blastocysts. During cultivation after microinjection, 84.5% of embryos entered the development within a day, reaching 52% before the stage of compact morula, of which up to the stage of blastocyst – 92%. It was concluded that the yield of blastocysts from the number of micro-injected zygotes at the level of 44% is sufficient to carry out further work on obtaining genomic-edited animals that produce recombinant proteins with milk.

*Key words: mouse embryos, genetically engineered constructions, microinjections in pronuclei, in vitro culture*

**Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2018, 3: 106-110**

*Поступило в редакцию: 20.08.2018*

*Получено после доработки: 05.09.2018.*

**Максименко Сергей Васильевич**, к.б.н., с.н.с., тел. 8(906)645-02-52; vx136@rambler.ru  
**Трубицина Татьяна Петровна**, к.б.н., с.н.с., тел. 8(906)641-15-72; trubitsina.tp@yandex.ru  
**Белова Надежда Викторовна**, м.н.с., тел. 9534682694 navikbel@mail.ru  
**Кутын Иван Владимирович**, м.н.с., тел. (953)332-8647; kurookami@mail.ru  
**Рябых Владимир Павлович**, д.б.н., зав. лаб., тел. 8(960)515-79-60;  
vladimirryabykh@rambler.ru