

**ФИЗИОЛОГО-ЭМБРИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ
ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ МЕТОДОМ МИКРОИНЪЕКЦИИ
ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ В ПРОНУКЛЕУСЫ ЗИГОТ**

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*

Технология получения генно-модифицированных животных на сегодняшний день имеет множество спорных моментов, требующих уточнения и более подробного исследования. При проведении экспериментов с ранними эмбрионами требуется совершенное владение эмбриологическими методиками и использование современных технологий. Цель данной работы – систематизация этих методик, отработанных авторами в ходе длительных исследований по получению животных – продуцентов рекомбинантных белков с молоком. Описаны условия содержания модельных животных (мышей), методики индукции суперовуляции у мышей-доноров эмбрионов и получения зигот, микроинъекции генно-инженерной конструкции в пронуклеусы, культивирования зигот, подготовки вазэктомированных самцов, псевдобеременных самок и трансплантации эмбрионов. Комплекс отработанных методик использован в исследованиях по получению модельных животных, экспрессирующих в молоко лактоферрин и гранулоцит-колониестимулирующий фактор, а также других трансгенных животных.

Ключевые слова: культивирование эмбрионов, генно-инженерные конструкции, микроинъекция в пронуклеус зигот, трансплантация эмбрионов

Проблемы биологии продуктивных животных, 2018, 3: 111-115

Введение

Трансгенные мыши являются одним из важнейших инструментов для проведения генетического анализа. Для получения трансгенных мышей в основном используют метод микроинъекции в пронуклеус одноклеточных эмбрионов, несмотря на то, что общая эффективность трансгеноза при использовании данного метода составляет менее 10% (Shinnosuke et al., 2015; Lars et al., 2007).

Основными факторами, существенно снижающими выживаемость эмбрионов в выборке, были признаны спонтанный лизис зигот после инъекции ДНК и блок развития на стадии одной клетки (Гловер, 1988; Auerbach, 2003). Поэтому одной из главных задач, связанных с совершенствованием метода микроинъекции в пронуклеус является увеличение выхода трансгенного потомства.

Цель данной работы – систематизация эмбриологических методик, отработанных авторами в ходе длительных исследований по получению животных – продуцентов рекомбинантных белков с молоком.

Содержание мышей

Виварии, в которых содержатся мыши, должны быть построены таким образом, чтобы обеспечивать подходящие условия окружающей среды содержащимся в них животным в соответствии с их физиологическими и поведенческими потребностями.

Следует стремиться к тому, чтобы причинять животным минимальное беспокойство и не нарушать условия их содержания. Если существует риск возникновения агрессии или травм, животных необходимо содержать индивидуально.

Мышей следует содержать в клетках с чистой подстилкой из опилок или стружки лиственных пород деревьев при температуре воздуха от 20 до 24°C и относительной влажности от 45% до 65%. Площадь пола на одно животное должна составлять 60-70 см². Кроме того, необходимо обеспечить животных материалом для создания закрытых гнёзд, что позволяет создать благоприятные условия для размножения.

Система вентиляции в комнатах для содержания должна быть сконструирована таким образом, чтобы обеспечивать достаточный объем свежего воздуха надлежащего качества, удаление избыточного тепла и влажности, снижение концентрации запахов и пыли, а также исключать возникновение вредных для животных сквозняков и шумов, вызывающих беспокойство (Каркищенко и др., 2010).

Освещение в комнатах для содержания выполняется посредством люминесцентных ламп. Следует установить чёткую периодичность светового дня и достаточную интенсивность освещения, не вызывающую у животных дискомфорт или стресс. Как правило, это 12-часовой цикл освещения с автоматическим включением света в 8:00 и выключением в 20:00.

Постоянный интенсивный шум, а также внезапные шумы могут приводить к стрессу, оказывающему отрицательное влияние на физиологическое состояние животных.

При содержании беременных самок и самок с потомством следует избегать слишком частой чистки клеток, так как причиняемое беспокойство может стать причиной поедания потомства самкой или нарушения её материнского поведения.

Вызывание суперовуляции у мышей-доноров эмбрионов

За 48 часов до гормональной обработки самок мышей линии СВА×С57Bl6 (F1) в возрасте 4-7 недель необходимо подсаживать в клетку к самцам через перегородку. Для вызывания суперовуляции используют метод гормональной стимуляции – самкам в первый день в 16:00 внутрибрюшинно вводится по 10 МЕ препарата Фоллигон (гонадотропин из сыворотки жеребых кобыл, производитель – Московский эндокринный завод, РФ) со свойствами фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов, который стимулирует у самок рост и созревание фолликулов, а через 47 ч (в 15:00) внутрибрюшинно – 10 МЕ хорионического гонадотропина человека (производитель – Московский эндокринный завод, РФ). Хорионический гонадотропин оказывает гонадотропное, преимущественно лютеинизирующее действие, вызывает у самок овуляцию, стимулирует синтез эстрогенов и прогестерона.

После введения ХГ самок подсаживают к самцам на ночь из расчета 1:1. Покрытие самки осуществляется в середине цикла отключения освещения. Результативность оплодотворения определяют по наличию копуляционной пробки (Манк, 1990).

Получение зигот от самок-доноров эмбрионов

Самок-доноров умерщвляют путём дислокации шейных позвонков. После наступления смерти надрезают кожи в области крестца с последующим снятием кожи до уровня грудины. Далее стерильными инструментами выполняют разрез брюшины и извлекают яйцеводы и помещают их в каплю манипуляционной среды Global with Hepes® (производство LifeGlobal Group, США) с добавлением 10% заменителя сывороточного белка (Quinn's Advantage™ SPS – Serum Protein Substitute, производство SAGETM In Vitro Fertilization, Inc., США) объёмом 36 мкл. Дальнейшие манипуляции проводят под микроскопом. Извлечение ооцит-кумулясных комплексов выполняют при малом увеличении. Стерильной инъекционной иглой вскрывают ампулярное пространство, извлекают ооцит-кумулясные комплексы и помещают их в отдельную каплю с 0,1% раствором гиалуронидазы (Sigma, США) для удаления

кумулясных масс. После очистки от кумулюсных масс эмбрионы последовательно отмывают в 3-х каплях с манипуляционной средой и помещают в каплю под слоем минерального масла (Sigma, США) в чашке Петри диаметром 40 мм.

Микроинъекция генно-инженерной конструкции в пронуклеусы зигот

Микроинъекцию генно-инженерной конструкции проводят под микроскопом при помощи микроманипулятора в мужской, более крупный пронуклеус оплодотворённой яйцеклетки тонкой иглой (до 1 мкм). Степень наполнения пронуклеуса определяют визуально. После микроинъекции эмбрионы помещают в среду для культивирования Global® (производство LifeGlobal Group, США) с добавлением 10% заменителя сывороточного белка и культивируют в ней в течение 15-18 ч до последующей трансплантации на стадии двух бластомеров (Xiuzhi et al., 2017).

Культивирование мышинных зигот

Культивирование мышинных зигот *in vitro* широко применяется при изучении эмбрионов, проверки сред для культивирования и для введения генетического материала с целью получения трансгенных животных. Процедуру проводят в пластиковых чашках Петри диаметром 40 мм в каплях объемом 36 мкл среды Global® с добавлением 10%-ного заменителя сывороточного белка при температуре 37°C.

Получение псевдобеременных самок-реципиентов

Для получения в качестве реципиентов псевдобеременных самок необходимо использовать вазэктомированных самцов, к которым подсаживают самок-доноров через перегородку за 48 ч до введения самкам препарата Фоллигон в дозе 5 МЕ на одно животное. Через 47 ч после введения Фоллигона самкам вводят 5 МЕ хорионического гонадотропина человека (ХГч) и подсаживают к вазэктомированным самцам. Через 17-19 ч после введения ХГч проверяют у самок наличие копуляционной пробки и, в случае положительного результата, этим самкам проводят трансплантацию эмбрионов на стадии двух бластомеров.

Подготовка вазэктомированных самцов

Для вазэктомии отбирают половозрелых активных самцов с хорошими репродуктивными способностями в возрасте 4-6 недель. Животных наркотизируют препаратом Золетил-100 (производство Virbac Sante Animale, Франция) в дозе 10-18 мг на 100 г веса, фиксируют в положении на спине и удаляют шерстный покров путём выбривания или выщипывания. Операционное поле протирают тампоном, смоченным 70%-ным раствором этилового спирта, производят поперечный разрез кожи и брюшной стенки в нижней части живота, стараясь при этом не задеть препуциальные железы. Аккуратно вытягивают из разреза наружу сальник и вместе с ним семенник и семявыносящий проток, расположенный под семенником, и освобождают его от поддерживающих связок, избегая повреждения кровеносных сосудов. Далее необходимо перевязать семявыносящий проток в двух местах и удалить фрагмент, находящийся между узлами.

Также можно использовать метод прижигания, поскольку он более удобен и менее травматичен для животного. Для прижигания семявыносящего протока используют бранши пинцета, раскалённые на спиртовке. После процедуры прижигания семенник вместе с сальником помещают обратно в брюшную полость и выполняют вазэктомию на другом семеннике аналогичным образом. Брюшную стенку зашивают, накладывая не менее двух швов, кетгутом или другим рассасывающимся материалом и обрабатывают антисептиком, кожу – капроном или шёлковой нитью. Полученных таким образом вазэктомированных самцов рассаживают по индивидуальным клеткам с чистой подстилкой и подсаживают по одной-две самки для тестирования (Кораблев и др., 2017).

Трансплантация эмбрионов

Полученные эмбрионы трансплантируют псевдобеременным самкам, которые предварительно были спарены с вазэктомированным самцом после гормональной обработки. В качестве реципиентов выбирают самок с наличием копуляционной пробки. Операцию проводят в стерильных условиях под общим наркозом путем рассечения кожи, подкожной клетчатки и брюшины в области яичника. При этом необходимо избегать повреждения крупных кровеносных сосудов. Яичники и яйцеводы осторожно извлекают наружу подтягиванием сальника и закреплением его при помощи небольшого зажима.

Трансплантацию эмбрионов проводят под микроскопом при малом увеличении. Микропипетку с эмбрионами вводят через воронку яйцевода на максимально возможную глубину, что позволяет исключить выход эмбрионов из яйцевода в брюшную полость. После введения проводят визуальный контроль пипетки, чтобы убедиться в отсутствии в ней эмбрионов, после чего яичник с яйцеводом помещают обратно в брюшную полость. Брюшину зашивают кетгутом, либо другим рассасывающимся материалом, а кожу – шелковой нитью. Послеоперационный разрез обрабатывают антисептиком и, если необходимо, проводят маркировку животного.

Следует выбирать надежный и причиняющий минимальную боль и дискомфорт метод идентификации животных, – как при самом процессе маркировки, так и впоследствии, поскольку болевые ощущения и стресс негативно сказываются на протекании беременности и могут стать причиной прохолоста. Прооперированных самок помещают в чистую клетку с наличием корма и воды и создают условия, исключающие влияние стресса на состояние животных.

Комплекс описанных методик использован в исследованиях по получению модельных животных, экспрессирующих в молоко Г-КСФ, лактоферрин, а также других трансгенных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гловер Д. Новое в клонировании ДНК. Методы. – М.: Мир, 1988. – 538 с.
2. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В. (Ред.) Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. – М.: Профиль, 2010. – 358 с.
3. Кораблев А.Н., Серова И.А., Скрябин Б.В. Манипуляции с ранними эмбрионами мыши для создания генетически модифицированных животных // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – 21. – No. 7. – С. 758- 763.
4. Манк М. Биология развития млекопитающих. Методы. – М.: Мир, 1990. – 406 с.
5. Auerbach A., Norinsky R., Ho W., Losos K., Guo Q., Chatterjee S., Joyner A. Strain-dependent differences in the efficiency of transgenic mouse production // *Transgenic Research*. – 2003. – Vol. 12. – No.1. – P. 59-69.
6. Lars M., Jürgen G. Pronuclear injection for the production of transgenic mice // *Nature Protocols*. – 2007. – Vol. 2. – P. 1206-1215.
7. Shinnosuke S., Tomoyuki T., Takehito K., Hiroshi I., and Naojiro M. A hyperactive piggyBac transposon system is an easy-to-implement method for introducing foreign genes into mouse preimplantation embryos // *J. Reprod. Dev.* – 2015. – Vol. 61. – No. 3. – P. 241-244.
8. Xiuzhi T., Feng W., Lu Z., Pengyun J., Jing W., Dongying L., Guangdong L., Menglong C., Zhengxing L., Guoshi L. Melatonin promotes the in vitro development of microinjected pronuclear mouse embryos via its anti-oxidative and anti-apoptotic effects // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18. – No. 5. – P. 988.

REFERENCES

1. Auerbach A., Norinsky R., Ho W., Losos K., Guo Q., Chatterjee S., Joyner A. Strain-dependent differences in the efficiency of transgenic mouse production. *Transgenic Research*. 2003, 12(1): 59-69.
2. Glover D. *Novoe v klonirovanii DNK. Metody* (New in DNA cloning. Methods). Moscow: Mir publ., 1988, 538 p.

3. Karkishchenko N.N., Grachev S.V. (Eds). *Rukovodstvo po laboratornym zivotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh tekhnologiyakh* (Guide to laboratory animals and alternative models in biomedical technology). Moscow: Profil Publ., 2010, 358 p.
4. Korablev A.N., Serova I.A., Skryabin B.V. [Manipulations with early mouse embryos to create genetically modified animals]. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii - Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017, 21(7): 758- 763.
5. Lars M., Jürgen G. Pronuclear injection for the production of transgenic mice. *Nature Protocols*. 2007, 2: 1206-1215.
6. Mank M. *Biologiya razvitiya mlekopitayushchikh. Metody* (Biology of development of mammals: methods). Moscow: Mir Publ., 1990, 406 p.
7. Shinnosuke S., Tomoyuki T., Takehito K., Hiroshi I., Naojiro M. A hyperactive piggyBac transposon system is an easy-to-implement method for introducing foreign genes into mouse preimplantation embryos. *J. Reprod. Dev.* 2015, 61(3): 241-244.
8. Xiuzhi T., Feng W., Lu Z., Pengyun J., Jing W., Dongying L., Guangdong L., Menglong C., Zhengxing L., Guoshi L. Melatonin promotes the in vitro development of microinjected pronuclear mouse embryos via its anti-oxidative and anti-apoptotic effects. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18(5): 988.

Physiological and embryological aspects of biotechnology for the production of transgenic mouse by microinjecting genetically engineered constructs into zygotic pronuclei

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

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

ABSTRACT. The technology of production the genetically modified animals has today a lot of controversial points, which require specification and more detailed research. When carrying out experiments with early embryos, a perfect mastery of embryological techniques and the use of modern technologies are required. The aim of this work was to systematize the embryological methods worked out by the authors in the course of long studies with the aim to obtain animals expressing recombinant proteins with milk. Conditions of keeping model animals, techniques for inducing superovulation in mice – embryo donors and obtaining zygotes, microinjection of genetically engineered constructions into pronuclei, cultivation of zygotes, preparation of vasectomized males, pseudobremenal females and embryo transplantation are described. A set of used techniques was used in studies for the production of model animals expressing in milk G-CSF, lactoferrin, as well as other transgenic animals.

Keywords: embryo culture, genetically engineered constructs, microinjection into pronucleus, embryo transplantation

Problemy biologii produktivnykh zivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2018, 3: 111-115

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
Кутуйн 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