

Манипуляции с ранними эмбрионами мыши для создания генетически модифицированных животных

А.Н. Кorableв¹✉, И.А. Серова¹, Б.В. Скрыбин²

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Вестфальский университет имени Вильгельма, медицинский факультет, сектор трансгенных животных, Мюнстер, Германия

За последнее время технологии редактирования генома стали более эффективными и доступными. Открытие нуклеаз для направленного редактирования геномов (CRISPR/Cas9, TALEN, ZFNs) значительно ускорило и упростило получение мышей с адресными направленными изменениями в геноме. В настоящее время наиболее популярной системой является CRISPR/Cas9 благодаря своей простоте и высокой эффективности. Технологию CRISPR/Cas9 эффективно используют для «нокаутирования» генов, получения масштабных делеций или направленных инсерций в целевых участках генома на эмбриональных стволовых клетках (ЭСК). Такие генетически модифицированные ЭСК после инъекции их в полость бластоцист способны генерировать развитие и рождение химерных животных, у которых часть гамет имеет идентичный генотип ЭСК. Таким образом, среди потомства химерных животных рождаются мыши с модифицированными геномами. Недавно технология CRISPR/Cas9 была успешно применена на зиготах, что существенно сократило время получения животных с необходимыми генетическими модификациями. Несмотря на то что современные технологии редактирования генома упрощают получение генно-модифицированных животных, данная технология остается сложной в воспроизведении и имеет множество тонкостей из-за методов и техник работы с ранними эмбрионами. Вследствие этого для исследователя, работающего в области получения генно-модифицированных животных, важно использование современных технологий и совершенное владение эмбриологическими техниками. В настоящей статье описаны протоколы микроинъекции в пронуклеус или цитоплазму зигот, подготовка растворов для микроинъекции, а также методы инъекции ЭСК в полость бластоцисты. Помимо этого, приведены протоколы для работы с мышами, а именно: суперовуляция и подготовка гормонов, получение эмбрионов на ранних стадиях (зиготы и бластоцисты), подготовка вазектомированных самцов и суррогатных матерей, трансплантация эмбрионов в яйцевод или матку. Отдельно приводится сборка и необходимые составляющие наркозного аппарата для изофлуранового наркоза и проведение общей анестезии.

Ключевые слова: трансгенез; инъекция в зиготу; эмбриональные стволовые клетки (ЭСК); инъекция ЭСК в бластоцисту; трансплантация эмбрионов.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Кorableв А.Н., Серова И.А., Скрыбин Б.В. Манипуляции с ранними эмбрионами мыши для создания генетически модифицированных животных. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):758-763. DOI 10.18699/VJ17.291

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Korablev A.N., Serova I.A., Skryabin B.V. Manipulations with early mouse embryos for generation of genetically modified animals. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):758-763. DOI 10.18699/VJ17.291 (in Russian)

Received 29.09.2017
Accepted for publication 23.10.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: korablev@bionet.nsc.ru

Manipulations with early mouse embryos for generation of genetically modified animals

A.N. Korablev¹✉, I.A. Serova¹, B.V. Skryabin²

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² University of Muenster, Faculty of Medicine, Transgenic animal and genetic engineering Models (TRAM), Muenster, Germany

Recently, genome-editing technologies have become more efficient and accessible. The discovery of nucleases for directional genome editing (CRISPR/Cas9, TALEN, ZFNs) significantly accelerated and simplified the production of mice with targeted gene editing in the genome. Until last time, the CRISPR/Cas9 system noticeably simplified the preparation of knockout or transgenic mice. CRISPR/Cas9 technology was successfully applied for gene knockout and knock-in, generation of large deletions or directed insertions in targeted genome regions in embryonic stem cells (ESCs). When injected into blastocysts, such modified ESCs are able to generate chimeras producing gametes with an identical genotype with ESC. Thus, it can identify animals with modified genomes. More recently, CRISPR/Cas9 technology was successfully applied to mouse zygotes and the birth of genetic modified mice was observed, i. e., the time required for generating genome-modified animals decreased significantly. The CRISPR/Cas9 system allows making gene knockout, large deletions or directed insertions into the target region of the genome by cytoplasm or pronuclear microinjection into zygotes. In addition, this is faster and simpler than similar work with mouse ESCs. Meanwhile, methods of manipulation with early embryos and their transplantation to surrogate mothers may be somewhat tricky. Therefore, it is important to use modern technologies for directional genome editing and perfect mastery in the embryological technics. In this article, we describe the protocols of microinjection into the pronucleus or cytoplasm of zygotes and injection of embryonic stem cells into the blastocyst cavity. We also describe embryological methods, such as superovulation, preparation of early stage embryos, surgical operation, production of foster mice. In addition, we describe the assembly and necessary components for the isoflurane anesthetic apparatus and isoflurane anesthesia.

Key words: transgenesis; zygote injection; embryonic stem cells (ESCs); injection of ESCs into blastocyst; embryotransfer.

В последнее время с появлением нуклеаз для редактирования геномов (CRISPR/Cas9, TALEN, ZFNs) значительно упростилось получение мышей с направленными изменениями в геноме (Sung et al., 2013; Yang et al., 2014). Однако мало изменились способы манипуляций с эмбрионами и работы с животными, поэтому такие методы могут быть одними из лимитирующих в получении нокаутных и трансгенных мышей.

Классическим путем получения мышей с целевыми модификациями генома является инъекция эмбриональных стволовых клеткок (ЭСК) в полость бластоцисты и рождение химер. Первым шагом к развитию данной технологии было выделение ЭСК из внутренней клеточной массы бластоцисты (стадии 3.5 дня после коитуса) (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981). Затем в 1984 г. была показана возможность получения химерных мышей путем инъекции ЭСК в полость бластоцист. Химерные животные, в свою очередь, способны продуцировать гаметы генотипа, идентичного ЭСК, и тем самым передавать его потомкам (Bradley et al., 1984). Вскоре была осуществлена гомологичная рекомбинация между экзогенной ДНК и эндогенной ДНК хромосомы в клетках млекопитающих (Lin et al., 1985). Все это позволило получить первую нокаутную мышь из ЭСК с инсерцией рекомбинантной ДНК (несущей селективный ген) в целевой ген путем их инъекции в полость бластоцисты для получения химерных мышей. Потомство, полученное от химерных мышей, имело нокаутную мутацию в целевом гене (Sapich, 1989).

Постепенно данная технология совершенствовалась и, что важно, не потеряла актуальности и сегодня. Так, например, применение пьезодреки при инъекции ЭСК в бластоцисту значительно упростило технику инъекции ЭСК в полость бластоцисты (Kawase et al., 2001). Позже был разработан трудоемкий, но эффективный метод тетраплоидной комплементации (инъекции диплоидных ЭСК в тетраплоидные бластоцисты), который позволяет получать рождение генетически модифицированных животных, развившихся из экспериментальных бластоцист, имеющих генотип диплоидных ЭСК клеток (Wang, Jaenisch, 2004).

В статье (Dupont et al., 2017) опубликован интересный способ повышения уровня химеризма с участием ЭСК посредством обработки морул фактором FGF (fibroblast-growth factor), который смещает дифференцировку бластомеров в сторону фибробласта, и, как следствие, клеток внутренней клеточной массы становится меньше. Инъекцированные в такие бластоцисты ЭСК с большей эффективностью заселяют внутреннюю клеточную массу, тем самым повышаются уровень химеризма и эффективность передачи генотипа ЭСК потомкам.

Другой способ получения мышей с модификациями генома – пронуклеарная инъекция. Самая первая трансгенная мышь получена путем микроинъекции экзогенной ДНК (Gordon et al., 1980). Среди родившихся 78 мышей было получено две трансгенные мыши. Одним из главных недостатков данной технологии является случайная встройка трансгена в геном (Smithies et al., 1985). В 1989 г. выполнена работа, целью которой было получение мыши с направленной модификацией в геноме путем инъекции ДНК в пронуклеус (Brinster et al., 1989). В результате было инъекцировано 10602 зиготы, родилось мышей 1841, среди

них 506 несли случайную встройку трансгена и лишь одна имела нужную целевую модификацию в локусе МНС II, что показывает несостоятельность данного метода без применения современных технологий для редактирования геномов.

Долгое время единственным эффективным способом получения мышей с целевыми модификациями генома были инъекция ЭСК в полость бластоцист и получение химерных мышей. Данная ситуация изменилась после открытия нуклеаз для направленного редактирования геномов. Так, в 2010 г. показана возможность получения нокаутных мышей с высокой эффективностью (20–75 %) путем инъекции матричной РНК (мРНК) нуклеазы на основе цинковых пальцев (ZFNs) в зиготы мыши (Carbery et al., 2010). В 2013 г. получены нокаутные мыши с применением технологии TALEN при помощи инъекции мРНК TALEN в цитоплазму зигот (Sung et al., 2013).

Наибольшим успехом в генной инженерии сегодня является открытие системы CRISPR/Cas9, при помощи которой в 2013 г. осуществлено редактирование генома млекопитающих с высокой эффективностью (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013). В 2014 г. данная технология была применена для получения нокаутных мышей при помощи микроинъекции в зиготу (Yang et al., 2014). С использованием механизмов гомологичной рекомбинации показана высокая эффективность целевых вставок в геном мыши на одноклеточной стадии (Chu et al., 2016; Raveux et al., 2017). В исследовании (Bogovciak et al., 2016), посвященном хромосомной инженерии, при помощи технологии CRISPR/Cas9 путем микроинъекции в зиготу осуществлены крупномасштабные делеции у мышей. В серии экспериментов удалось получить делеции в гене тирозиназы размером 9.5; 65; 155; 545 и 1.150 т. п. о. Показана высокая частота получения животных с делецией, например при создании делеции 1.150 т. п. о. она достигала 30 %.

Эффективность применения данной технологии напрямую через зиготы не исключает получение мышей через технологию химер. Показана возможность получения ЭСК мыши с большими делециями при помощи CRISPR/Cas9. Для этого был разработан (Kraft et al., 2015) 10-недельный протокол для получения животного с делецией, который назван CRISVar (CRISPR/Cas-induced structural variants). Интересным в этой работе является то, что авторы показали возможность получения не только больших делеций (до 1.6 Mb), но и дупликаций/инверсий целевого участка.

Протокол трансгенеза

Материалы

- CO₂-инкубатор Shel Lab, Model NO: 2123-2 или аналогичный.
- Инвертированный микроскоп (Olympus IX71) с интерференционной оптикой Номарского или аналогичный.
- Гидравлические манипуляторы Narishige или аналогичные.
- Микроинъекционный шприц Narishige (масляный) или аналогичный.
- Компрессор Transjector 5246, Eppendorf или аналогичный.

- Стереомикроскоп Olympus SZX10 или аналогичный.
- Стереомикроскоп Olympus SZ или аналогичный.
- Наркозный аппарат на основе испарителя изофлурана ТЕСЗ.
- Пуллер (P-1000, Sutter Instrument Co.) или аналогичный.
- Стекланные капилляры (Harvard Apparatus, GC100-15).
- Пьезодрель PiezoDrill Burleigh или аналогичная.
- Центрифуга Centrifuge 5810 R, Eppendorf или аналогичная.
- Определитель эструса у мышей – Mouse Estrus Detector (MEDpro 100, ELM, Латвия).
- Держатель (холдер) Eppendorf VacuTip (Catalog Number 930001015).
- Игла для инъекции клеток TransferTip (ES) (Catalog Number 930001040).
- Среда для культивирования M2 (Sigma, M7167).
- Среда для культивирования M16 (Sigma, M7292).
- Минеральное масло (Sigma, M8410).
- Гиалуронидаза (H4272, Sigma-Aldrich).
- PMSG (Фоллигон (Folligon), Интервет Интернешнл Б.В., Нидерланды), ветеринарный препарат.
- hCG (Хорулон (Chorulon), Интервет Интернешнл Б.В., Нидерланды), ветеринарный препарат.
- Гибридные мыши первого поколения C57BL/6 × CBA (B6CBAF1) или C57BL/6 × DBA/2 (B6D2F1), самки, возраст два месяца.
- Мыши линии C57BL/6, самцы.
- Мыши линии CD-1, самцы и самки.

Сборка наркозного аппарата на основе испарителя изофлурана ТЕСЗ

Испаритель ТЕСЗ имеет камеру, в которой происходит испарение изофлурана, и в зависимости от потока воздуха, который проходит через аппарат, можно регулировать концентрацию анестетика в выходящем воздухе.

Для сборки наркозного аппарата, помимо самого испарителя, необходимы воздушный компрессор, ротаметр (с возможностью регулировать воздушный поток от 0 до 1000 мл/мин), силиконовые трубки, прозрачная пластиковая индукционная камера и маска для наркоза. В качестве компрессора можно использовать аквариумный компрессор с равномерной подачей воздуха и производительностью 400 л/мин или более (например, компрессор Tetra APS 400). Вместо компрессора можно использовать баллон со сжатым воздухом. Для индукционной камеры хорошо подходит пластиковый пищевой контейнер, а для маски – одноразовый шприц объемом 20–25 мл.

Последовательность подключения. К выходному отверстию воздушного компрессора присоединить входной разъем ротаметра через силиконовый шланг, далее к выходному отверстию ротаметра подключить входное отверстие испарителя через силиконовый шланг. К выходному отверстию испарителя присоединить силиконовый шланг, через который будет поступать смесь воздуха с изофлураном к животному.

Для изготовления индукционной камеры в пищевом контейнере просверлить отверстие для подключения шланга. Для изготовления наркозной маски из шприца удалить поршень и использовать только цилиндр корпуса. Шприц имеет удобный наконечник, подходящий для

присоединения шланга; для удобства операции шприц можно прикрепить на тонкую пластиковую пластинку для изменения положения мыши во время операции.

ВАЖНО! Для соблюдения правил безопасности персонала наркозный аппарат устанавливать в помещении с хорошей активной вентиляцией или в вытяжном шкафу.

Наркоз

Операция проводится с использованием ингаляционного изофлуранового наркоза. Мышь помещается в индукционную камеру (параметры наркоза: поток воздуха от 200 до 1000 мл/мин, концентрация изофлурана 5 об., %). После того как мышь заснула, переключить шланг к наркозной маске и выставить новые параметры наркоза (200 мл поток воздуха и концентрация изофлурана 1.5–2.5 об., %). Во время операции важно следить за дыханием мыши и регулировать концентрацию изофлурана. Как только мышь заснет, проверить при помощи пинцета наличие/отсутствие болевых рефлексов на задних конечностях. При их отсутствии начать операцию. Преимущества данного наркоза – хороший вход и выход животного из состояния наркоза, легкое управление его глубиной, безопасность препарата и низкое влияние на витальные функции.

Подготовка вазектомированных самцов

За две недели до начала эксперимента необходимо подготовить 20 вазектомированных самцов линии CD-1 (можно использовать самцов других линий).

Вазектомия. Наркотизировать мышь. Положение мыши: на спине. Обработать операционное поле 70 % раствором этилового спирта. Выполнить поперечный разрез кожи в нижней части живота, выше препуциальных желез. Салфеткой, смоченной спиртом, удалить волосы из операционного поля, оставшиеся после разреза.

ВАЖНО! Не повредить препуциальные железы во время операции.

Далее выполнить поперечный разрез мышечной стенки. Переместить семенники в брюшную полость надавливанием на мошонку. В операционном разрезе должны появиться жировые капсулы семенников. Вытащить один из семенников за жировую капсулу из операционной раны, закрепить небольшим зажимом, найти и выделить семявыводящий проток. Пережечь или перевязать проток в двух местах (выше и ниже выхода протока). При перевязывании необходимо удалить участок между узлов. Лучше использовать метод пережигания, так как он быстрее и удобнее, чем перевязывание, а также менее травматичен. Для пережигания семенного канатика можно использовать раскаленные на спиртовке бранши пинцета или паяльник с небольшим жалом.

Погрузить семенник с жировой капсулой обратно в брюшную полость, выполнить вазектомию на втором семеннике. Послойно ушить рану, сначала мышечную стенку – кетгутон один-два шва, затем кожу – капроном один-два шва. **ВАЖНО!** При ушивании брюшной стенки не повредить препуциальные железы. Извлечь мышь из наркозной маски и перенести в клетку.

Рассадить вазектомированных самцов по индивидуальным клеткам, подсадить по одной-две самки для тестирования.

Суперовуляция

Препараты для суперовуляции

- «Фоллигон» 1000 МЕ/5мл, соответствует PMSG.
- «Хорулон» 1500 МЕ/5мл, соответствует hCG.

Разведение препаратов

- Развести «Фоллигон»: один флакон в 5 мл стандартного растворителя. Полученные 5 мл раствора довести до 20 мл физиологическим раствором. Конечная концентрация препарата 0.05 МЕ/мл.
- Развести «Хорулон»: один флакон в 5 мл растворителя. Полученные 5 мл раствора довести до 30 мл физиологическим раствором. Конечная концентрация препарата 0.05 МЕ/мл.
- Препараты расфасовать, хранить при температуре от -70 до -80 °С. Непосредственно перед применением препараты разморозить и держать на льду до инъекции. Повторно замораживать нельзя.

Схема суперовуляции

- В первый день в 16:00 – 7.5 МЕ (150 мкл) PMS на мышь.
- На третий день в 13:00 – 7.5 МЕ (150 мкл) hCG на мышь.
- Вечером, с 17:00 до 18:00, самок подсадить к фертильным самцам.

ВАЖНО! Подсаживать самок по одной в клетки к самцам, а не наоборот. Не рекомендуется менять подстилку у самца в день или за день до подсадки самки.

- Утром, с 9:00 до 10:00, проверить самок на наличие вагинальных пробок. Отмечать активных самцов, выбраковывая неактивных, создавая тем самым группу самцов с высоким репродуктивным потенциалом.

Подготовка суррогатных матерей

За день до дня трансплантации эмбрионов необходимо подсадить по две-три самки линии CD-1 в клетки к вазектомизированным самцам. Утром, с 9:00 до 10:00, проверить всех самок на наличие вагинальных пробок, особей с пробками отсадить в отдельную клетку. Для увеличения эффективности эмбриотрансфера рекомендуется определять у самок CD-1 эструс прибором Mouse Estrus Detector (Латвия).

Инъекция зигот в цитоплазму или пронуклеус

Получение зигот. 6–10 суперовулированных самок (B6CBAF1 или B6D2F1) подсадить по одной в клетки к самцам линии C57BL/6 на ночь (см. описание суперовуляции). Отобрать особей с вагинальной пробкой. Забить мышью дислокацией шейных позвонков. Извлечь яйцеводы и поместить в каплю 100–200 мкл среды M2. Под стереомикроскопом в капле, придерживая яйцевод ювелирным пинцетом, разорвать ампулу при помощи инсулиновой иглы. Из разрыва в каплю со средой должны выпасть зиготы, окруженные кумулюсными клетками. После того как зиготы извлечены в каплю, добавить гиалуронидазу (из расчета конечной концентрации гиалуронидазы в капле 300 мкг/мл). Контролировать лизирование кумулюсных клеток под микроскопом. Затем зиготы отмыть последовательно через две-три капли со свежей средой M2. После промывки перенести зиготы в капли с M16 под маслом и поместить в CO₂-инкубатор до момента инъекции.

Подготовка игл для микроинъекции. Для изготовления игл используются стеклянные капилляры (Harvard

Apparatus, GC100-15), которые оттягиваются на пуллере (P-1000, Sutter Instrument) при следующих параметрах: Heat 530, Pull 180, Vel. 60, Time 155, Pressure 200, Ramp 508. Полученные иглы загибать до нужного угла (35°) на Micro Forge. Готовые иглы можно хранить в герметичной коробочке из пластика не более одной недели.

Подготовка инъекционного раствора. Перед началом инъекции инъекционный раствор отфильтровать (микрофильтр 0.22 Мкм), отцентрифугировать и расфасовать по 10–20 мкл (пробирки для растворов промывать водой для удаления микропылинок пластика). Непосредственно перед заполнением инъекционной иглы пробирку с раствором центрифугировать при 2 °С и максимальных оборотах в течение 10–15 мин. Затем раствор хранить на льду.

Инъекция. Инъекцию начинать в 13:00, оптимальное время для развития пронуклеусов зиготы. В специальную камеру с дном из предметного стекла поместить каплю 100 мкл среды M2. Покрывать сверху минеральным маслом, тестированным для работы с эмбрионами (Sigma, M8410). Заполнить капилляр для инъекций через тонкий носик (Microloader, Eppendorf) 2–3 мкл инъекционного раствора.

Расположить камеру под микроскоп, установить холдер и инъекционную иглу в фокус, в масле отломить кончик иглы и выпустить пузырьки воздуха до появления раствора при помощи максимального давления компрессора (Transjector 5246, Eppendorf). Переместить холдер и иглу в каплю со средой.

Поместить эмбрионы в нижний полюс капли, холдером присосать зиготу, переместиться в центр. Оптимальное инъекционное давление в иголке 30–50 Па.

Для инъекции в пронуклеус повернуть зиготу так, чтобы пронуклеусы были удобны для прокола. Иголлка и пронуклеус (мужской пронуклеус лучше подходит для инъекции из-за большего размера) должны находиться в одной плоскости. Признаком попадания в пронуклеус служит небольшое его увеличение. Если мембрана пронуклеуса не проткнута, то иголлка окружена мембраной и наблюдаются сферообразные перемещения от конца иголлки к ее началу. В таком случае можно проткнуть пронуклеус насквозь и вернуть иголлку обратно в его полость. После увеличения пронуклеуса вытащить иголлку, переместить инъецированную зиготу в верхний полюс и повторить процедуру с новой зиготой. Непригодные эмбрионы (неоплодотворенные, фрагментированные или зиготы с тремя пронуклеусами) переместить в отдельную группу.

При инъекции в цитоплазму соблюдать те же принципы, что и при инъекции в пронуклеус. Характерным признаком успешной инъекции является локальное разряжение цитоплазмы в области конца иголлки. При неудачной инъекции иголлка окружена мембраной и происходят сферообразные перемещения от конца иголлки. В такой ситуации необходимо проткнуть зиготу до противоположной стенки и вернуть иголлку обратно в цитоплазму.

После того как все зиготы инъецированы, переместить их в капли со средой M16 в CO₂-инкубатор и оставить культивироваться примерно на один час. После культивирования сортировать выжившие зиготы от поврежденных.

Трансплантация эмбрионов в воронку яйцевода

Трансплантация. Наркотизировать мышь. Положение мыши: на животе. Обработать операционное поле 70 % раствором этилового спирта, удалить излишки спирта салфеткой. Выполнить поперечный разрез кожи в проекции левого яичника. Салфеткой, смоченной спиртом, удалить волосы, оставшиеся после разреза. Рассечь мышечную стенку, разрез выполнить над жировой капсулой яичника (жировая капсула и яичник хорошо видны через тонкий слой мышц). Пинцетом извлечь за жировик яичник, яйцевод и начальную часть рога матки. Небольшим зажимом за жировую капсулу зафиксировать органокомплекс в направлении позвоночника перпендикулярно. Под капсулой яйцевода (капсула переходит с яичника на яйцевод) найти воронку и ампулу. Капсула яйцевода пронизана кровеносными сосудами.

ВАЖНО! Найти ампулу яйцевода, убедиться в наличии в ней собственных эмбрионов. Ампула является достоверным анатомическим критерием овуляции. Идентифицировать воронку при помощи двух ювелирных пинцетов, аккуратно надорвать капсулу над воронкой между кровеносными сосудами. Придерживая воронку пинцетом, ввести кончик стеклянного капилляра в воронку. Медленно выдуть эмбрионы в яйцевод до первого пузырька.

Аккуратно вернуть яичник в брюшную полость. Рану послойно ушить, мышечную стенку ушить одним-двумя швами кетгута, кожу – одним-двумя швами капрона. Мышей поместить в клетки и следить за пробуждением.

Особенности анатомии яйцевода. Иногда воронка яйцевода закреплена глубоко и не определяется через капсулу. В таком случае нужно изменить ход операции и переместить органокомплекс в сторону левой нижней конечности. В данной ситуации подсадку эмбрионов выполнить не через воронку яйцевода, а через разрез его стенки.

Разрез выполняется следующим образом. Определить положение ампулы яйцевода, выше ампулы (между воронкой и ампулой) на изгибе яйцевода при помощи глазных ножниц рассечь стенки, не допуская полного ее пересечения. Разрез должен быть минимальным и соответствовать диаметру капилляра. Вставить кончик капилляра в разрез таким образом, чтобы эмбрионы перемещались из капилляра в сторону ампулы. Выдуть эмбрионы в яйцевод до первого пузырька. Далее операцию производить, как описано выше.

Инъекция эмбриональных стволовых клеток в полость бластоцисты

Подготовка ЭСК мыши. Клетки необходимо вырастить заранее, из расчета клетки из одной лунки шестилунчного планшета на день инъекции. Клетки снять трипсином, центрифугировать, ресуспендировать в 1 мл среды и поставить на лед, используя стандартные методы и принципы культуральной работы.

ВАЖНО! В данном протоколе описывается инъекция в бластоцисты мышей, имеющих черный окрас шерсти. Поэтом для оценки химеризма и передачи генотипа ЭСК потомству ЭСК должны быть получены от мышей отличной окраски (например, от линии мышей 129S1).

Получение бластоцист. Выполнить суперовуляцию 6–10 самкам (B6D2F1), подсадить самок по одной к фер-

тильным самцам линии C57Bl/6 (см. описание суперовуляции). Бластоцисты получают на 3.5 день после коитуса. Мышей забить дислокацией шейных позвонков, извлечь матку и начальный отдел вагинальной трубки, удалить яйцеводы. Вымыть эмбрионы при помощи шприца со сточенной инсулиновой иглой раствором среды M2 под стереомикроскопом из рогов матки. Собрать эмбрионы (бластоцисты и морулы), перенести в капли среды M16 и культивировать в CO₂-инкубаторе до момента инъекции. Морулы оставить в отдельной капле, за время культивирования часть из них созреет до бластоцист.

Инъекция клеток. Инъекция ЭСК производится в специальной камере, дно которой выполнено из стандартного предметного стекла. Камеру заполнить стандартной средой для эмбриональных стволовых клеток (mES growth medium). Установить холдер и иглу для инъекций. Разбавить ЭСК до удобной плотности и при помощи автоматической пипетки поместить их в ванночку (в ее правую или левую сторону).

Для набора клеток в инъекционную иглу использовать масляный шприц Narishige или аналогичный, иглу полностью заполнить маслом. Аккуратно набрать клетки в иголку, заполнив ее до максимально возможного количества (до потери контроля клеток в иголке). Затем перенести несколько бластоцист в камеру. Удобнее выполнять инъекцию при помощи пьезодрели. Использование пьезодрели позволяет избавляться от налипших на иглу клеток, а также легко прокалывать блестящую оболочку и проникать в полость бластоцисты. Вне зависимости от того, используется или не используется пьезодрель, важно попасть в полость бластоцисты и ввести 10–12 клеток.

Ошибкой является введение клеток под блестящую оболочку. Данную процедуру повторить с другими бластоцистами, пока не закончатся клетки в иголке. Инъекцированные бластоцисты поместить в CO₂-инкубатор.

Трансплантация эмбрионов в полость матки

За два-три дня до трансплантации эмбрионов необходимо подсадить по две-три самки линии CD-1 в клетки к вазектомированным самцам. Утром следующего дня, в 9:00, проверить всех самок на наличие вагинальных пробок, самок с пробками отсадить в отдельную клетку. На второй день (на 2.5 день после покрытия) самок можно использовать для трансплантации.

Первые этапы операции аналогичны трансплантации эмбрионов в воронку яйцевода. После извлечения органокомплекса при помощи иглы инсулинового шприца проколоть стенку матки. Затем ввести капилляр в полость матки и переместить эмбрионы. Аккуратно погрузить органокомплекс в брюшную полость и ушить рану.

Acknowledgments

This study was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0002. Work in the Shared Access Center was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Boroviak K., Doe B., Banerjee R., Yang F., Bradley A. Chromosome engineering in zygotes with CRISPR/Cas9. *Genesis*. 2016;54(2):78-85. DOI 10.1002/dvg.22915.
- Bradley A., Evans M., Kaufman M.H., Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*. 1984;309(5965):255-256.
- Brinster R.L., Braun R.E., Lo D., Avarbock M.R., Oram F., Palmiter R.D. Targeted correction of a major histocompatibility class II E alpha gene by DNA microinjected into mouse eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989;86(18):7087-7091.
- Capecchi M. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 1989;244(4910):1288-1292.
- Carbery I.D., Ji D., Harrington A., Brown V., Weinstein E.J., Liaw L., Cui X. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2010;186(2):451-459. DOI 10.1534/genetics.110.117002.
- Chu V.T., Weber T., Graf R., Sommermann T., Petsch K., Sack U., Volchkov P., Rajewsky K., Kühn R. Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes. *BMC Biotechnology*. 2016;16(1):4. DOI 10.1186/s12896-016-0234-4.
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-823. DOI 10.1126/science.1231143.
- Dupont C., Loos F., Kong-A-San J., Gribnau J. FGF treatment of host embryos injected with ES cells increases rates of chimaerism. *Transgenic Res*. 2017;26(2):237-246. DOI 10.1007/s11248-016-9997-6.
- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-156. DOI 10.1038/292154a0.
- 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(12):7380-7384.
- Kawase Y., Iwata T., Watanabe M., Kamada N., Ueda O., Suzuki H. Application of the piezo-micromanipulator for injection of embryonic stem cells into mouse blastocysts. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci*. 2001;40(2):31-34.
- Kraft K., Geuer S., Will A.J., Chan W.L., Paliou C., Borschiwer M., Harabula I., Wittler L., Franke M., Ibrahim D.M., Kragesteen B.K., Spielmann M., Mundlos S., Lupiáñez D.G., Andrey G. Deletions, inversions, duplications: engineering of structural variants using CRISPR/Cas in mice. *Cell Rep*. 2015;10(5):833-839. DOI 10.1016/j.celrep.2015.01.016.
- Lin F.L., Sperle K., Sternberg N. Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985;82(5):1391-1395.
- Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339(6121):823-826. DOI 10.1126/science.1232034.
- Martin G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981;78(12):7634-7638.
- Raveux A., Vandormael-Pourmin S., Cohen-Tannoudji M. Optimization of the production of knock-in alleles by CRISPR/Cas9 microinjection into the mouse zygote. *Sci. Rep*. 2017;7:42661. DOI 10.1038/srep42661.
- Smithies O., Gregg R.G., Boggs S.S., Koralewski M.A., Kucherlapati R.S. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*. 1985;317(6034):230-234.
- Sung Y.H., Baek I.J., Kim D.H., Jeon J., Lee J., Lee K., Jeong D., Kim J.S., Lee H.W. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat. Biotechnol*. 2013;31(1):23-24. DOI 10.1038/nbt.2477.
- Wang Z., Jaenisch R. At most three ES cells contribute to the somatic lineages of chimeric mice and of mice produced by ES-tetraploid complementation. *Dev. Biol*. 2004;275(1):192-201. DOI 10.1016/j.ydbio.2004.06.026.
- Yang H., Wang H., Jaenisch R. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nat. Protoc*. 2014;9(8):1956-1968. DOI 10.1038/nprot.2014.134.