

УДК 575.11316+576.315.4:599.323.4

## ВЫЖИВАЕМОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ МЫШИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ<sup>1</sup>

© 2008 г. М. В. Глазков, С. Ф. Дрозд, П. К. Головатенко-Абрамов\*,  
М. Ю. Мартынова\*, А. П. Нестерова\*

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН  
119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26*

*\* Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН  
119991 Москва, ул. Губкина, д. 3*

*E-mail: MVGlazkov@yandex.ru*

*Поступила в редакцию 04.07.07 г.  
Окончательный вариант получен 26.09.07 г.*

Изучали выживаемость трансгенных эмбрионов мыши в зависимости от структуры трансгена. Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение в конструкцию трансгена фрагмента хромосомной ДНК, обуславливающего “заякоривание” интерфазных хромосом на ядерной оболочке, приводит к 3-кратному повышению эффективности трансгенеза у мыши за счет повышения их жизнеспособности.

*Ключевые слова:* трансгенез, жизнеспособность эмбрионов, компартиментализация генов в ядре.

Манипуляции с зиготами при введении трансгена в мужской пронуклеус (как и сам факт введения чужеродной ДНК) вызывает сильное снижение жизнеспособности эмбрионов, появление большого количества нежизнеспособных потомков, имеющих различные аномалии развития (Brinster et al., 1985; Андреева, Серова, 1992). Среди обширного списка причин этого явления (Кадулин и др., 2006) мы рассматриваем один – структуру генетической конструкции, вводимой в зиготу.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Плазмида 1446, содержащая ген *LacZ*, находящийся под промотором гена  $\beta$ -глобина человека и регуляторной областью гена *Нoxa2* (энхансер), длиной 800 п.н. любезно предоставлена С. Нончевым (S. Nonchev, Universite Joseph Fourier, Grenoble I, Institute Albert Bonniot).

В работе использованы мыши линий СВА (самки) и С57BL6 (самцы) в возрасте 2–2.5 мес.

*Получение мышей с датированным сроком беременности.* Самок (в возрасте 8–10 нед) индуцировали к овуляции внутрибрюшинными инъекциями сывороточного (Folligon, “Intervet”, Вели-

кобритания) и хорионического (Chorulon, “Intervet”, Великобритания) гонадотропина (5 и 10 МЕ каждого гормона на мышь, с интервалом в 46 ч). Затем самок подсаживали к самцам на ночь. Факт наступления беременности (утром) определяли по наличию вагинальной пробки и считали 1-м днем беременности.

*Выделение ооцитов из яйцеводов.* Оплодотворенные яйцеклетки освобождали от фолликулярных клеток в среде Виттена с БСА (Abramezuk et al., 1977), содержащей 0.1% гиалуронидазы (“Sigma”, США) (Hogan et al., 1986). Затем эмбрионы тщательно отмывали от гиалуронидазы в каплях среды Виттена с БСА, перенося их из капли в каплю с помощью стеклянной пипетки с внутренним диаметром 120 мкм. Все манипуляции с ранними эмбрионами мыши проводили в фосфатном буфере Дульбекко и в среде Виттена.

*Трансформация зигот и культивирование зародышей in vitro.* В мужской пронуклеус вводили 1–2 пкл раствора ТЕ (0.1 мМ ЭДТА; 10 мМ трис-НСl, рН 7.4) (“Fluka”, Германия), содержащего 1500–3000 копий линейного трансгена, используя микроманипулятор “Narichige” (Япония) и микроскоп “Биолам” (Россия). Культивирование доимплантационных эмбрионов до стадии бластоцисты проводили в стеклянных флаконах в течение 96 ч в 500 мкл среды Виттена при темпе-

<sup>1</sup> Работа частично поддержана Программой Президиума РАН “Биоразнообразие и динамика генофондов” (Подпрограмма “Динамика генофондов”) (проект № 06-ПП-2.4.3).

ратуре 37°C в среде трехгазовой смеси (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>).

*Оценка выживаемости доимплантационных эмбрионов мыши.* Непосредственно перед помещением оплодотворенных яйцеклеток во флакон для культивирования и в конце культивирования (4-е сут) визуально определяли число жизнеспособных эмбрионов. Кроме этого, на 4-е сут культивирования оценивали число нормальных и аномальных эмбрионов, не достигших стадии поздней морулы или бластоцисты, а также число аномальных морул, бластоцист и мертвых эмбрионов.

*Получение 9.5–11.5-суточных эмбрионов.* Инъецированные зиготы трансплантировали в воронку яйцевода реципиентам – ложнобеременным самкам (СВА × С57BL/6)F<sub>1</sub>, полученным в результате спаривания накануне эксперимента с вазэктомизированными самцами.

Через 9.5–11.5 сут после трансплантации беременных самок забивали путем дислокации шейных позвонков и извлекали эмбрионы. Вырезанный участок рога матки переносили в чашку Петри с буфером Дульбекко, где выделяли эмбрионы с внезародышевыми оболочками, которые затем помещали в разные пробирки с буфером Дульбекко и подвергали дальнейшему анализу.

*Выявление трансгенных зародышей.* Выявление трансгенов в бластоцистах (4-е сут развития) и эмбрионах (9.5–11.5-е сут развития) осуществляли методом ПЦР в двух независимых повторностях.

Бластоцисты лизировали в среде, mM (50 трис-НСl, рН 8.3, 75 КСl, 3 MgCl<sub>2</sub>, 10 NP-40) в течение 5 мин при 65°C, затем 5 мин при 37°C. Лизат центрифугировали при 8000g в течение 5 мин, а супернатант, содержащий ДНК, замораживали.

Эмбрионы лизировали в буфере: 10 mM трис-НСl, рН 8.0, 75 mM NaCl, 25 mM ЭДТА, 1% SDS, 100 мкг/мл протеиназы К в течение ночи при 37°C. ДНК экстрагировали несколько раз смесью фенол-хлороформ-изоаминол (50 : 49 : 1) и в последний раз – хлороформом. ДНК переосаждали этанолом, промывали 70%-ным этанолом и растворяли в деионизированной воде. Образцы хранили при –20°C.

Праймеры на ген *LacZ* подбирали с помощью программы Vector NTI 9.0 (прямой:

5'-ACAGGAAGGCCAGACGCGAA-3',

обратный:

5'-GGCAACATGGAAATCGCTGA-3',

синтезированные в ЗАО “Евроген Ру”, Россия). Длина амплифицированного фрагмента – 283 п.н.

Аmplификацию проводили на термоциклере Терцик-2 (ИПФ “ДНК-Технология”, Россия) при



Схемы использованных конструкций трансгенов 1446, 4.1 т.п.н. (а) и L1R1, 4.7 т.п.н. (б).

следующем режиме: 95°C – 5 мин, 30 циклов (95°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 30 с, 72°C – 5 мин). Реакцию проводили в 20 мкл среды следующего состава: 1 × буфер для Taq-ДНК-полимеразы (“Sintol”, Россия), по 0.2 mM каждого из четырех dNTP (“Fermentas”, Литва), по 0.2 мкМ прямого и обратного праймеров, 2 ед. Taq-ДНК-полимеразы Thermostar (“Sintol”, Россия) и 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Анализ продуктов ПЦР-реакции проводили в 1.5–2.0%-ном агарозном геле, после чего гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом излучении.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Трансген L1R1.* Согласно современным представлениям, гены в хромосомах организованы в генные домены, включающие в свой состав кодирующие белки участки ДНК и регуляторные элементы. Предполагается, что между соседними генными доменами располагаются “границы”, обеспечивающие независимую от окружения, правильную экспрессию гена (генов). Природа и состав “границ” до сих пор остаются неясными (Глазков, 1998; Capelson, Corces, 2004). Мы (Глазков, 1999; Шабарина и др., 2006) предполагаем, что одним из элементов таких “границ” могут быть участки прикрепления хромосомной ДНК к ядерной оболочке (яоДНК). Фрагменты яоДНК являются эволюционно-консервативными, в их состав входит много регуляторных элементов, они обладают способностью в двухнитевом состоянии специфично и прочно связываться с ядерной оболочкой (Глазков и др., 1998, 1999; Шабарина и др., 2006). Всеми перечисленными выше свойствами обладает фрагмент яоДНК *EnvM4*, которым мы фланкировали ген *LacZ*, находящийся под промотором гена β-глобина человека, и эхансер гена *Hoха2* мыши (рисунок).

*Выживаемость эмбрионов после введения трансгенов в ооциты.* Для оценки выживаемости эмбрионов после введения в ооциты трансге-

**Таблица 1.** Выживаемость эмбрионов после введения трансгенов в ооциты

Трансген	Число эмбрионов		
	2–4-клеточных (2-е сут культивирования <i>in vitro</i> )	на стадии бластоцисты (4-е сут культивирования <i>in vitro</i> )	на 9.5–11.5-е сут развития <i>in utero</i>
1446 (19 экспериментов)	132 [281] <sup>1</sup> <b>(46.98)</b>	105 <b>(37.37)</b>	22 [247] <sup>2</sup> <b>(8.9)</b>
<i>LIRI</i> (16 экспериментов)	164 [267] <sup>1</sup> <b>(61.42)</b>	139 <b>(52.06)</b>	19 [70] <sup>2</sup> <b>(27.1)</b>
Контроль 1* (14 экспериментов)	187 [251] <sup>1</sup> <b>(74.5)</b>	158 <b>(62.94)</b>	–
Контроль 2** (12 экспериментов)	55 [60] <sup>1</sup> <b>(91.67)</b>	25 <b>(41.67)</b>	–

Примечания. В квадратных скобках указано: <sup>1</sup>число инъецированных ооцитов, <sup>2</sup>число трансплантированных зигот; в круглых – %; \* прокол оболочки ооцита; \*\* введение в ооцит буфера TE.

нов 1446 и *LIRI*, культивируемых *in vitro* в среде Виттена, проводили подсчет числа выживших двух- и четырехклеточных эмбрионов (2-е сут культивирования); зародышей, достигших стадии бластоцисты (4-е сут культивирования), а также эмбрионов на 9.5–11.5-е сут развития *in utero*.

Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что выживаемость на двух- или четырехклеточной стадии и на стадии бластоцисты достоверно различается в группах эмбрионов, трансформированных трансгенами 1446 и *LIRI* (рисунок). Выживаемость эмбрионов, которым вводили трансген *LIRI*, приближается к таковой в группе интактных эмбрионов и достоверно выше (примерно в 1.5 раза) в группе эмбрионов, которым вводили трансген 1446.

На 9.5–11.5-е сут развития выживаемость эмбрионов, трансформированных трансгеном *LIRI*, уже в три раза превышает таковую эмбрионов, трансформированных трансгеном 1446. Одним из возможных объяснений этого феномена может быть то, что трансген *LIRI* оказывает меньший повреждающий эффект по сравнению с трансгеном 1446.

*Эффективность трансгенеза при использовании трансгенов 1446 и LIRI.* Наличие трансгена *LacZ* определяли методом ПЦР в эмбрионах 4 и 9.5–11.5 сут развития. В качестве контроля на наличие геномной ДНК в образцах использовали праймеры на гены глицеральдегидрогеназы (эмбрионы 4 сут развития) и  $\beta$ -глобина мыши (эмбрионы 9.5–11.5 сут развития).

Результаты, представленные в табл. 2, свидетельствуют об отсутствии значимых различий в выявлении числа трансгенных эмбрионов при использовании трансгенов 1446 и *LIRI* на стадии бластоцисты (4-е сут развития). При этом выживаемость 4-суточных зародышей, трансформированных трансгеном *LIRI*, в 1.5 раза превышает таковую у зародышей, трансформированных трансгеном 1446 (табл. 1). Ситуация резко меняется при анализе эмбрионов 9.5–11.5 сут развития (табл. 2). Общая эффективность трансгенеза (отношение числа трансгенных зародышей к общему числу пересаженных эмбрионов) при использовании трансгена *LIRI* (2.9%) близка к средней для мыши (2%) (Brem, 1993). Однако с учетом выживаемости эмбрионов мыши (табл. 1) эффек-

**Таблица 2.** Эффективность трансгенеза эмбрионов мыши

Трансген	Количество трансгенных эмбрионов по отношению к числу, %			
	инъецированных ооцитов	проанализированных бластоцист	трансплантированных зигот	выживших эмбрионов
	4-е сут культивирования <i>in vitro</i>		9.5–11.5-е сут развития <i>in utero</i>	
1446	<b>7.0</b> (281)	<b>18.6</b> (105)	<b>0</b> (247)	<b>0</b> (22)
<i>LIRI</i>	<b>7.9</b> (267)	<b>15.1</b> (139)	<b>2.9</b> (70)	<b>10.5</b> (19)

Примечание: в скобках указано число исследованных эмбрионов.

тивность трансгенеза при использовании трансгена *LIR1* в три раза выше средней.

Интересно отметить, что при введении в структуру трансгена (слева от промотора) единичных копий MARs (Matrix Attachment Regions) эффективность трансгенеза мыши на стадии бластоцисты составляет 7% (по отношению к проанализированному эмбрионам) (Gutierrez-Adam, Pintado, 2000). Результаты нашей работы показывают, что с помощью фрагментов яДНК, фланкирующих трансген и его регуляторные элементы, эффективность трансгенеза на стадии бластоцисты (табл. 2) повышается в два раза.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что введение в конструкцию трансгена фрагментов хромосомной ДНК, обуславливающих “заякоривание” интерфазных хромосом на ядерной оболочке, приводит к 3-кратному повышению выхода трансгенных зародышей мыши за счет повышения их жизнеспособности (по крайней мере, до 9.5–11.5 сут развития). Мы предполагаем, что это может быть связано с компартиментализацией трансгена как в хромосомах, так и в целом в интерфазном ядре, не мешающей правильной реализации генетической программы развития. Следует отметить, что до 9.5–11.5 сут в развитии зародышей мыши есть несколько критических периодов, где происходит репрограммирование генома.

*Авторы выражают глубокую благодарность Б.В. Конюхову за критическое ознакомление с рукописью и ценные замечания.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Андреева Л.Е., Серова И.А. Влияние микроманипуляционной техники, применяемой для трансгенеза, на развитие мышей // Онтогенез. 1992. Т. 23. № 6. С. 637–643.  
 Глазков М.В. Границы структурно-функциональных единиц эукариотических хромосом // Генетика. 1998. Т. 32. № 5. С. 593–604.

Глазков М.В. Ассоциация хромосом с ядерной оболочкой и упорядоченность пространственной организации генетического материала в интерфазном ядре // Цитология и генетика. 1999. Т. 2. № 2. С. 79–88.

Глазков М.В., Клейманс А., Киреева Н.Н. Специфичность ДНК-белковых взаимодействий в формировании розеткоподобных структур и в ассоциации интерфазных хромосом с ядерной оболочкой // Молекулярная биология. 1998. Т. 32. № 5. С. 869–874.

Глазков М.В., Дрозд С.Ф., Полтараус А.Б. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей хромосомной ДНК, выделенных из ядерных оболочек и из сердцевин розеткоподобных структур интерфазных хромосом мыши // Генетика. 1999. Т. 35. № 2. С. 266–270.

Кадулин С.Г., Ермолкевич Т.Г., Андреева Л.Е. Анализ пересадки микроинъецированных зигот при получении трансгенных мышей // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 2. С. 109–114.

Шабарина А.Н., Прилепа Е.И., Глазков М.В. Необычная нуклеотидная последовательность ДНК, выделенная из ядерных оболочек гепатоцитов мыши // Генетика. 2006. Т. 42. № 7. С. 879–886.

Abramczuk J., Solter D., Koprowski R. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one cell embryos in chemically defined medium // Devel. Biol. 1977. V. 61. P. 378–383.

Brem G. Transgenic animals // Biotechnology. V. 2. Genetic fundamentals and engineering / Ed. Puhler A. N.Y. et al.: Weinheim, 1993. P. 745–832.

Brinster R.L., Chen H.Y., Trumbauer M.E. et al. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mouse by microinjecting eggs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 4438–4442.

Capelson M., Corces V.G. Boundary element and nuclear organization // Biol. Cell. 2004. V. 96. P. 617–629.

Gutierrez-Adam A., Pintado B. Effect of flanking matrix attachment regions on the expression of microinjected transgenes during preimplantation development of mouse embryos // Transgen. Res. 2000. V. 9. P. 81–89.

Hogan B., Constantini F., Lacy E. Manipulating the mouse embryo. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1986. 332 с.

## Survival of Transgenic Mouse Embryos Carrying Different Genetic Constructs

M. V. Glazkov<sup>a</sup>, S. F. Drozd<sup>a</sup>, P. K. Golovatenko-Abramov<sup>b</sup>,  
 M. Yu. Martynova<sup>b</sup>, and A. P. Nesterova<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

<sup>b</sup> Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, ul. Gubkina 3, Moscow, 119991 Russia

e-mail: MVGlazkov@yandex.ru

**Abstract**—The survival of transgenic mouse embryos was studied as a function of the transgene structure. The data obtained indicate that the introduction of a chromosomal DNA fragment providing for the anchoring of interphase chromosomes on the nuclear envelope increases the efficiency of transgenesis in mice threefold due to their increased viability.

*Key words:* transgenesis, embryonic viability, compartmentalization of genes in the nucleus.