ОНТОГЕНЕЗ, 2013, том 44, № 6, с. 403–408

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭМБРИОЛОГИЯ

УДК 591.39:535

ПОЛУЧЕНИЕ ХИМЕРНЫХ БЛАСТОЦИСТ МЫШИ МЕТОДАМИ ЛАЗЕРНОЙ НАНОХИРУРГИИ

© 2013 г. А. К. Шахбазян[1, 2], В. З. Тарантул[3], А. Д. Залесский[1], А. В. Рябова[4], В. Б. Лощенов[4], С. А. Антонов[3], И. А. Гривенников[3], А. С. Кривохарченко[5], А. В. Карменян[6], В. А. Надточенко[1]

[1]Институт химической физики РАН
119991 Москва, ул. Косыгина, 4
[2]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3
[3]Институт молекулярной генетики РАН
123182 Москва, пл. Академика Курчатова, д. 2
[4]Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН
119991, Москва, ул. Вавилова, 38
[5] Max-Delbruck Center for Molecular Medicine Robert-Rossle-Str. 10, Berlin, 13092 Germany
[6] Biophotonics and Molecular Imaging Research Center (BMIRC) National Yang-Ming University, Taipei, R.O.C., 11221 Taiwan
E-mail : avetik@rambler.ru

Поступила в редакцию 13.06.13 г.
Окончательный вариант получен 24.06.13 г.

Описано получение химерных бластоцист мыши методами лазерной нанохирургии без использования какой-либо другой дополнительной техники. Для проведения экспериментов был разработан и сконструирован специальный лазерный микроманипулятор. В экспериментах использовали эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мыши, трансформированные вектором pEF-GFP, кодирующим флуоресцирующий зеленый белок. ЭСК с помощью лазерного микроманипулятора вводили в перивителлиновое пространство мышиных эмбрионов на стадии 8-и клеток. Оперированные эмбрионы культивировали *in vitro* до стадии вылупления из *zona pellucida*. Наличие флуоресценции и ее точную локализацию регистрировали на конфокальном микроскопе. Впервые было продемонстрировано, что включения введенных лазерным микроманипулятором ЭСК, обнаруживаются как во внутренней клеточной массе (ВКМ), так и в трофэктодерме химерной бластоцисты. Технология проведения нанохирургических операций на ранних доимплантационных эмбрионах млекопитающих с помощью лазерной техники открывает большие возможности не только для решения фундаментальных задач экспериментальной эмбриологии млекопитающих, но эта технология также может быть использована как перспективный метод получения химерных и трансгенных животных с заданным экспериментаторами генотипом.

Ключевые слова: лазерная нанохирургия, доимплантационные эмбрионы млекопитающих, эмбриональные стволовые клетки, зеленый флуоресцирующий белок, химерные бластоцисты.

DOI: 10.7868/S0475145013060104

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все работы связанные с получением генетически модифицированных млекопитающих путем введения эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) в доимплантационные эмбрионы (в основном на стадии бластоцисты), осуществляются главным образом с применением традиционных подходов (агрегация клеток, микроинъекции) (Nagy et al., 2003), а в последние годы с использованием пьезомикроманипуляторов (Hu et al., 2013). Одновременно с этим активно развиваются новые технологии, связанные с использованием лазеров для манипуляций различными биологическими объектами, в том числе с клетками и ранними доимплантационными эмбрионами млекопитающих (Karmenyan et al., 2009; Krivokharchenko et al., 2012). В данной работе впервые продемонстрирована возможность получения химерных бластоцист мыши с

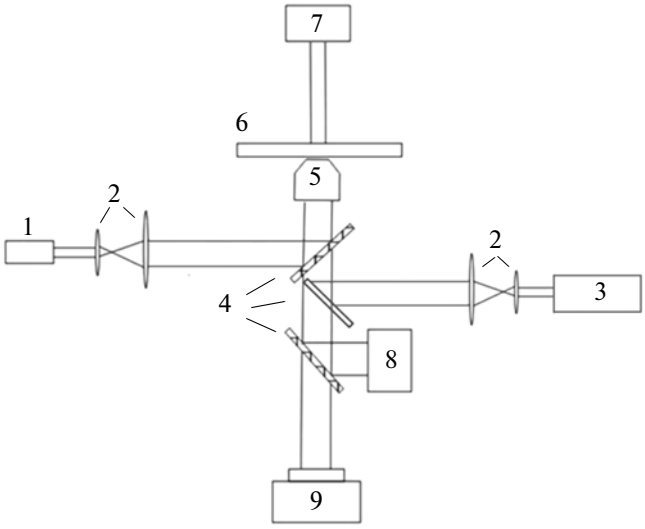


Рис. 1. Принципиальная оптическая схема, использованная в эксперименте: 1 – титан-сапфировый лазер непрерывного излучения в диапазоне 750–850 нм фирмы Avesta; 2 – телескоп – расширитель лазерного пучка; 3 – диодный лазер; 4 – три дихроичных зеркала; 5 – объектив микроскопа; 6 – предметный столик; 7 – источник освещения; 8 – флуориметр/счетчик фотонов; 9 – видеокамера.

применением усовершенствованной лазерной нанохирургии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали как оригинальные, специально разработанные для данных экспериментов методы и подходы, так и стандартные, применяемые в клеточной биологии и клеточной инженерии.

Получение эмбрионов

Для экспериментов эмбрионы получали от суперовулированных самок мышей линии C57BL/6, спаренных с самцами линии CBA. Суперовуляцию проводили по стандартной схеме с использованием гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (PMSG, Intervet) и человеческого хорионического гонадотропина (hCG, Intervet). Животных умерщвляли путем дислокации шейных позвонков. Эмбрионы получали путем промывания яйцеводов. Все манипуляции с эмбрионами проводили в среде M2 (Sigma), для длительного культивирования использовали среду M16 (Sigma), CO_2 инкубатор (Sanyo) и 4-луночные пластиковые чашки “Nunclon” (Nunc).

Лазерный микроманипулятор

Микрохирургические операции были выполнены на установке мультиплексного лазерного манипулятора разработанного в ИХФ РАН. Принципиальная схема оптического блока использованного в эксперименте представлена на рис. 1.

В данной работе в мультиплексном лазерном манипуляторе использовали инвертированный оптический микроскоп (Olympus IX71). В поле микроскопа через объектив с высокой числовой апертурой заводили лазерное излучение от двух лазеров. Использовали объективы ЛОМО М-ФЛЮАР 100×/1.3 или Olympus LCAch N 40x/0.55 Ph2. Сфокусированное излучение титан-сапфирового непрерывного лазера 790 нм в предметной плоскости, где находится исследуемый образец, выполняло роль “оптического пинцета”. Пространственные манипуляции над клетками проводили путем их перемещения относительно фокального пятна при движении предметного столика. Перемещение предметного столика осуществляли либо “вручную” либо с помощью позиционных пьезо-двигателей, причем, в последнем случае, обеспечивается точность перемещений близкая к десяти нанометрам. Непрерывный диодный лазер с контролируемой экспозицией, длина волны 1.48 мкм, мощность в поле микроскопа 80 мВт использовали для проведения микрохирургических операций с блестящей оболочкой эмбриона и получения отверстия с размером около 10 мкм. Визуальный контроль осуществлялся с помощью видеокамеры (Sony ExwaveHAD). Установка также была оснащена спектрометром с фотоприемниками для регистрации спектров флуоресценции объекта исследования.

Культура эмбриональных стволовых клеток

ЭСК мыши линии R1 культивировались в среде α-MEM (Gibco, США), с 15% фетальной бычьей сывороткой, 2 мМ L-глутамина, и добавками 20 мкМ смеси витаминов, 100 мкМ заменимых аминокислот, 100 мкМ пирувата натрия, 80 мкМ меркаптоэтанола (ICN, США) и 20 мкг/мл гентамицина. ЭСК культивировались в чашках Петри, которые обрабатывались 0.1% желатином, или на чашках с фидерным слоем эмбриональных фибробластов мыши. При культивировании ЭСК на чашках покрытых желатином, в культуральную среду также добавлялся рекомбинантный LIF в концентрации 10 нг/мл. Эмбриональные фибробласты мыши выделялись из 13–14 дневных эмбрионов мыши 129 линии по стандартной методике. Фибробласты культивировались на чашках Петри диаметром 35 мм в среде DMEM (Gibco, США) с 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина (ICN, США) и 80 мкг/мл гентамицина. Для получение фидерного слоя фибробласты обрабатывались митомицином С (1.5 часа, 3 мкг/мл) в ростовой среде и после этого три раза отмывались раствором Хенкса. На следующий день фидерные слои использовались для посева ЭСК. Все клеточные культуры поддерживались в CO_2 инкубаторе в атмосфере 5% CO_2 и при температуре 37°С.

Конструирование вектора

Вектор pEF-GFP был получен на основе коммерчески доступного вектора pcEGFP-C1 (Invitrogen, США), несущего ген устойчивости к селективному антибиотику неомицину. Последовательность промотора фактора элонгации P EF1A была получена из вектора pBudCE4.1 с помощью рестрикции по сайтам NheI/XhoI и клонирована по липким концам в промежуточный вектор pSPT18. Конечный вектор рестрицирован BglII/HindIII, при этом вырезался фрагмент промотора P CMV. Далее pSPT18 была рестрицирована по BamHI/HindIII, и фрагмент P EF1A клонирован в вектор pcEGFP-C1 по сайтам BglII/HindIII.

Характеристика клеток линии R1-EF-GFP

Трансфекцию ЭСК проводили липосомальным методом с помощью метафектена (BioTex, Германия). Для трансфекции использовали 1 мкг плазмидной ДНК на 600 000 клеток и 3 мкл метафектена на 1 мл среды. Клетки инкубировали 2 ч при 37°С в CO_2 инкубаторе. Затем к клеткам добавляли еще 2 мл среды и продолжали инкубацию в течение 2-х суток в тех же условиях. Потом к клеткам добавляли неомицин в концентрации 20 мкг/мл для селекции трансфицированных клеток. Селекцию проводили в течение 10–14 дней со сменой среды с антибиотиком каждые три дня. Клетки, экспрессирующие GFP, наращивали, а затем подвергали криоконсервации. Из трансфицированных клеток выделялась тотальная РНК и анализировалась экспрессия транскрипционных факторов Nanog, SOX2, OCT4 с помощью ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. По экспрессии факторов плюрипотентности между клетками исходной линии R1 и трансгенными клетками R1-EF-GFP различий не обнаруживалось. Также проводилось кариотипирование клеток и анализ экспрессии поверхностных маркеров, таких как щелочная фосфатаза (AP) и SSEA-1 (CD15/Lewis-X).

Конфокальная микроскопия

Локализацию флуоресценции на вылупляющихся бластоцистах фиксировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM-710 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany). Образцы из чашек для *in vitro* культивирования переносились на стерильные чашки Петри с тонким стеклянным дном толщиной 0.16 мм в среде для манипуляций M2. Для получения изображений использовали объектив Plan-Apochromat с увеличением 20× (апертура 0.8). Возбуждение флуоресцентного белка производили лазером с длиной волны 458 нм и максимальной плотностью мощности 25 мВт, регистрировали флуоресценцию в диапазоне 460–600 нм при конфокальной диафрагме диаметром 151 μм, размер изображений – 1024 × × 1024 пикселей (159 нм/пиксель), скорость сканирования 1.27 μс/пиксель (1.56 с/изображение). Для получения 3D реконструкции проводили сканирование по оси Z с шагом 1 μм. В результате получали наложение 3D реконструкций флуоресцентного изображения и изображения, полученного в режиме проходящего света.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для проведения экспериментов эмбрионы выделяли из яйцеводов суперовулированных самок на стадии 2-х бластомеров, которые культивировали *in vitro* до стадии 8 клеток (морула). Эксперимент состоял из двух этапов. Сначала, используя диодный лазер, проводили перфорацию блестящей оболочки (*zona pellucida*) с таким расчетом, чтобы возможно было в образовавшееся отверстие ввести стволовые клетки диаметром порядка 10 мкм. Параметры лазерного пучка в поле микроскопа были оценены в рамках теории распространения гауссовского пучка: перетяжка $2w_0 = 1.22\,\lambda/\mathrm{NA}$, где NA числовая апертура; $z_0 = (\pi w_0)^2/\lambda$ (Silfvast et al.,

Рис. 2. Морула с перфорированной блестящей оболочкой. Стрелкой указано место перфорации.

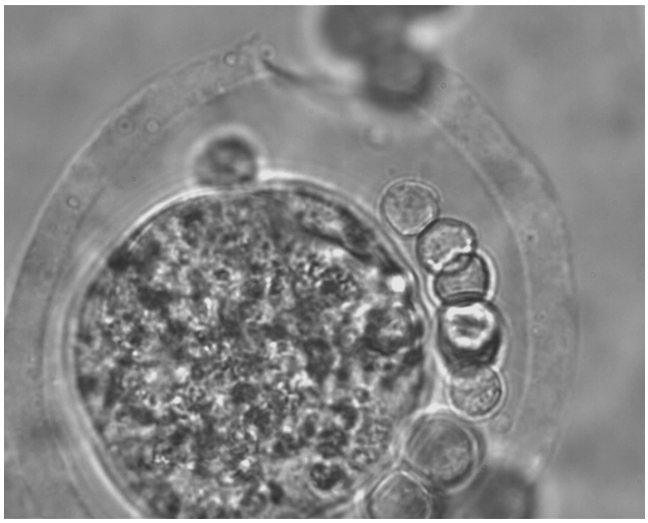


Рис. 3. Эмбриональные стволовые клетки, введенные в перивителлиновое пространство эмбриона.

2004). Для апертуры NA = 1.3 параметры пучка составляют w_0 = 0.69 мкм, z_0 = 1.02 мкм, при NA = = 0.55 – w_0 = 1.64 мкм, z_0 = 5.7 мкм. Коэффициент поглощения воды для длины волны 1.48 мкм составляет 0.003 см$^{-1}$ (Hale et al., 1973). Оценка температуры разогрева в области перетяжки дает величину близкую к 75°С. Экспериментально показано, что при этих параметрах воздействия эффективно происходит перфорация блестящей оболочки эмбриона и существенно отрицательного воздействия на эмбрион операция перфорации не оказывает (рис. 2).

На втором этапе при помощи непрерывного титан-сапфирового лазера 790 нм выполнялся оптический захват модифицированных эмбриональных стволовых клеток и их перемещение под блестящую оболочку эмбриона через полученное ранее отверстие (рис. 3). Параметры гауссовского пучка в поле микроскопа при NA = 1.3 w_0 = 0.37 мкм, z_0 = = 0.55 мкм и при NA = 0.55 w_0 = 0.88 мкм, z_0 = 3.1 мкм. Коэффициент поглощения воды для этой длины волны пренебрежимо мал и составляет порядка 10^{-9} см$^{-1}$.

Далее эти эмбрионы культивировали в CO_2 инкубаторе в среде M16 до стадии вылупляющейся бластоцисты.

Как видно на рис. 4 (см. цветную вклейку), флуоресценция наблюдается как в клетках ВКМ, так и трофэктодермальных клетках образующейся химерной бластоцисты.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, в данной работе показано, что предложенная методика проведения лазерной операции позволяет получить химерные бластоцисты мыши. Преимуществом данной методики является: 1) высокая скорость проведения операции – в настоящей работе операция занимала не более 2 мин без оптимизации отдельных стадий по времени, время операции может быть существенно сокращено за счет оптимизации; 2) возможность точного контроля воздействия лазерного излучения на каждой стадии операции за счет регулировки мощности лазера и времени экспозиции; 3) сфокусированное излучение 790 нм, соответствующее окну прозрачности биообъекта, позволяет эффективно вводить клетки в перивителлиновое пространство эмбриона без использования механических микроманипуляторов, и без негативного воздействия на клетку.

Считается, что ЭСК мыши, введенные в бластоцисты, при формировании химер плохо или вообще не дифференцируются в трофэктодерму (Nagy et al., 1990; Beddington et al ., 1989). Вместе с тем, различные регуляторные факторы и стимулы в условиях *in vitro* могут обеспечивать дифференцировку ЭСК мыши в клетки трофэктодермы (Niwa et al., 2000; Schenke-Layland et al., 2007), что указывает на существование у них такого потенциала. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что перенос ЭСК мыши в 8-ми клеточный эмбрион с помощью лазерной технологии приводит к тому, что эти клетки при дифференцировке эффективно включаются как в ВКМ, так и в трофэктодерму. Ранее сходные результаты были получены при создании химер с использованием гибридов ЭСК с соматическими клетками (Do et al., 2011; Kruglova et al., 2008).

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе было использовано также оборудование Центра коллективного пользования ФГБУН Института молекулярной генетики РАН “Центр клеточных и генных технологий”. Исследование было поддержано грантами программы Президиума РАН на 2013–2017 гг. “Молекулярная и клеточная биология” и Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 11-04-01337 и № 13-04-00598). А также Проектом РФФИ № “11-03-00705-а” “Физико-химические процессы образования и наноструктурирования полимерных объектов инициируемые многофотонным поглощением под действием фемтосекундных лазерных импульсов” и Программой Президиума РАН “Поддержка инноваций и разработок” на 2013 год, проект “Новая технология получения чистых линий генетически модифицированных лабораторных мышей методами фемтосекундной лазерной микрохирургии”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Beddington R.S., Robertson E.J. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo // Development 1989. V. 105. P. 733–737.

Do J.T., Choi H.W., Choi Y. et al. Pluripotent hybrid cells contribute to extraembryonic as well as embryonic tissues // Stem Cells and Development. 2011. V. 20. P. 1063–1069.

Hale G.M., Querry M.R. Optical Constants of Water in the 200-nm to 200-microm Wavelength Region // Appl. Opt. 1973. V. 12. P. 555–563.

Hu M., Wei H., Zhang J. et al. Efficient production of chimeric mice from embryonic stem cells injected into 4- to 8-cell and blastocyst embryos // J. Animal Sci. and Biothechnology. 2013. V. 4. № 1. P. 12.

Karmenyan A.V., Shakhbazyan A.K., Sviridova-Chailakhyan T.A. et al. Use of picosecond infrared laser for micromanipulation of early mammalian embryos // Molecular Reproduction & Development. 2009. V. 76. P. 975–983.

Krivokharchenko A.S., Karmenyan A.V., Sarkisov O.M. et al. Laser fusion of mouse embryonic cells and intra-embryonic fusion of blastomeres without affecting the embryo integrity // PLOS ONE. 2012. V. 7. Issue12. P. e50029.

Kruglova A.A., Kizilova A.E., Zhelezova A.I. et al. Embryonic stem cell/fibroblast hybrid cells with near-tetraploid karyotype provide high yield of chimeras // Cell Tissue Res. 2008. V. 334. P. 371–380.

Nagy A., Gocza E., Diaz E.M. et al. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse // Development. 1990. V. 110. 815–821.

Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K. et al. Production of chimeras. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 2003.

Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells // Nat. Genet. 2000. V. 24. P. 372–376.

Schenke-Layland K., Angelis E., Rhodes K. et al. Collagen IV induces trophoectoderm differentiation of mouse embryonic stem cells // Stem. Cells. 2007. V. 25. P. 1529–1538.

Silfvast W.T. Laser Fundamentals. Cambridge. New York, NY. 2004.

Obtainment of Chimeric Blastocysts of Mice by Methods of Laser Nanosurgery

A. K. Shakhbazyan[a, b], V. Z. Tarantul[c], A. D. Zalessky[a], A. V. Ryabova[d], V. B. Loshchenov[d], S. A. Antonov[c], I. A. Grivennikov[c], A. S. Krivokharchenko[e], A. V. Karmenyan[f], and V. A. Nadtochenko[a]

[a] *Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

[b] *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, 142290 Moscow oblast, Russia*

[c] *Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Akademika Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia*

[d] *Prokhorov Institute of General Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, ul. Vavilova 38, 119991 Russia*

[e] *Max-Delbruck Center for Molecular Medicine, Robert-Rossle-Str. 10, Berlin, 13092 Germany*

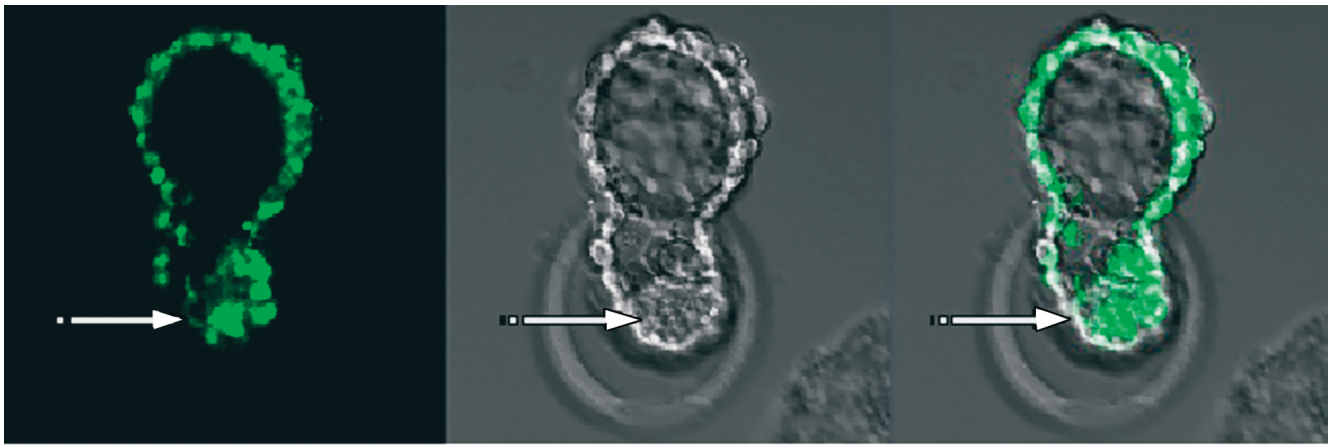
[f] *Biophotonics and Molecular Imaging Research Center (BMIRC), National Yang-Ming University, Taipei, R. O. C., 11221 Taiwan*

e-mail: avetik@rambler.ru

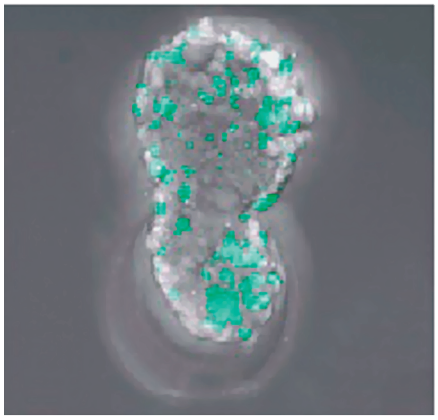
Received June 13, 2013; in final form, June 24, 2013

Abstract—The procedure of obtainment of chimeric blastocysts of mice by laser nanosurgery methods without using any other techniques is described. To perform the experiments, a special laser micromanipulator was invented. The murine embryonic stem cells (ESC), which were transformed with *pEF-GFP* vector, encoding the green fluorescent protein, were used in the experiments. ESC were introduced into the perivitelline space of murine embryos at the stage of 8 cells using the laser micromanipulator. The operated embryos were cultured in vitro until the stage of emergence from *zona pellucida*. The fluorescence and its precise localization were registered using a confocal microscope. It was shown for the first time that the inclusions of ESC introduced with the lased micromanipulator were found not only in the inner cell mass (ICM) but also in the trophectoderm of the chimeric blastocyst. The technology of nanosurgical operations at early stage preimplanted mammalian embryos using laser techniques opens great opportunities not only for solution of fundamental tasks of experimental embryology of mammals but also for obtainment of chimeric and transgenic animals with predetermined genotype.

Keywords: laser nonosurgery, preimplanted mammalian embryos, embryonic stem cells, green fluorescent protein, chimeric blastocysts



а б в



г

Рис.4
а – Флуоресцирующие ЭСК, включившиеся в трофэктодерму и ВКМ вылупляющейся бластоцисты;
б – та же бластоциста в проходящем свете;
в – наложение фотографий а и б (стрелкой указано место локализации ВКМ);
г – проекция 3D реконструкции бластоцисты на горизонтальную плоскость. Серый цвет – изображение в проходящем свете. Зеленый – флуоресценция GFP.