

Создание химерных животных и чистых линий животных при помощи оптико-лазерного манипулятора.

А.А. Осыченко¹, А.Д. Залесский^{1,2}, А.В. Рябова³, В.А. Надточенко^{1,2}.

¹Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

²Московский физико-технический институт (государственный университет)

³ Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН 119991, Москва, ул. Вавилова, 38

Для изучения редких болезней, носящих в том числе и генетический характер, нужно большое количество материала. В основном, эксперименты и разработки проводятся на животных. Получить большое количество животных, имеющих определенную мутацию, требует много времени и средств. Технология получения химерных животных и чистых линий при помощи оптико-лазерного манипулятора послужит для быстрого и относительно дешевого получения линий животных с заданными свойствами.

В настоящее время наиболее распространены два классических метода получения трансгенных животных. Первый метод – получение инъекционных химер и дальнейшее скрещивание животных для получения чистых линий. Этот метод занимает достаточно много времени (приходится ждать несколько поколений мышей, пока появится чистая линия) [1]. Вторым методом: инъекция генетической конструкции при помощи микроиглы в мужской пронуклеус зиготы. Этот метод позволяет получать трансгенное животное уже в первом поколении, однако имеет определенные ограничения и недостатки. Во-первых, процедура прокалывания эмбриона травматична сама по себе: повреждается плазматическая мембрана, цитоплазма, прокалывается пронуклеус, в котором хранится ДНК. Во-вторых, нельзя заранее предугадать, в какое конкретно место встроится генетическая конструкция, и не нарушит ли она работу жизненно важных генов эмбриона. В-третьих, необходим генетический анализ каждой полученной особи, чтобы определить, является ли она трансгенной [2].

Предлагаемый новый метод сочетает в себе достоинства первых двух, но избегает их недостатков. Предварительно было показано, что при помощи оптико-лазерного материала можно получать химерные бластоцисты мыши [3].

В данной работе трансгенные и химерные животные получали только оптико-лазерными методами, полностью отказавшись от механических манипуляторов. В работе было использовано три типа лазерного излучения: диодный лазер с длиной волны 1,48 мкм – для перфорации блестящей оболочки эмбриона; непрерывный лазер с длиной волны 700 нм – для захвата ЭСК и введения их под оболочку эмбриона, и фемтосекундный лазер с длиной волны 700 нм – для получения тетраплоидных эмбрионов путем слияния двух бластомеров. Эмбриональные стволовые клетки, в которые встроен ген зеленого флуоресцирующего белка (green fluorescence protein, GFP), вносили в диплоидные и тетраплоидные эмбрионы мыши на разных стадиях развития. Полученные эмбрионы анализировали при помощи конфокальной микроскопии для локализации флуоресценции GFP. Было показано, что ЭСК встраивались в трофобласт и внутреннюю клеточную массу (ВКМ) эмбрионов – т.е., происходила химеризация (рис. 1, А). Если клетки вносили в тетраплоидный эмбрион, но свечение GFP было локализовано только в ВКМ – получался трансгенный эмбрион (рис. 1, Б).

Были получены живые плоды после внесения химерных эмбрионов в матку ложнобеременной самки.

Настоящий метод способен повысить скорость и эффективность процесса получения химерных и трансгенных животных (чистых линий).

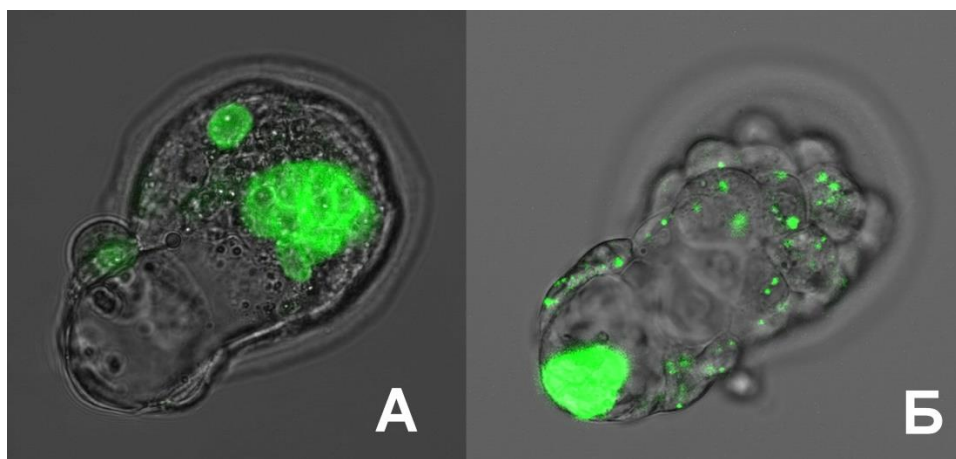


Рисунок 1. Свечение GFP в бластоцистах мыши. А – химерная бластоциста (свечение трофобластической оболочки и части ВКМ). Б – бластоциста чистой линии (свечение ВКМ целиком).

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-53-52046.

Литература.

1. Gardner R.L. Mouse chimaeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. // Nature. 1968. V. 220. P. 596 – 597.
2. Fujii W., Kakuta S., Yoshioka S., Kyuwa S., Sugiura K., Naito K. Zygote-mediated generation of genome-modified mice using *Streptococcus thermophilus* 1-derived CRISPR/Cas system. // Biochem Biophys Res Commun. 2016. V. 477. N. 3. P. 473-476
3. Shakhbazian A.K., Tarantul V.Z., Zalesskiĭ A.D., Riabova A.V., Loshchenov V.B., Antonov S.A., Grivennikov I.A., Krivocharchenko A.S., Karmenian A.V., Nadtochenko V.A. Obtainment of chimeric blastocysts of mice by methods of laser nanosurgery // Ontogenez. 2013. V. 44. N. 6. P. 403-408.