

ЕФЕКТИВНІСТЬ ДНК ІНТЕГРАЦІЇ ТА ВИЖИВАНІСТЬ ЗИГОТ МИШЕЙ ЗА УМОВ ПРОНУКЛЕАРНОЇ МІКРОІН'ЄКЦІЇ

О. Штапенко^{1*}, А. Мадіч², С. Федорова¹

¹Інститут біології тварин НААН України України
вул. В. Стуса, 38, Львів 79034, Україна

²Кембриджський університет, CB10 1SA, Великобританія
e-mail: shtapenko31@gmail.com

Застосуванням методу мікроін'єкції у пронуклеус зигот мишей було продемонстровано, що трансгенна конструкція, яка містить ген *LOC 78634*, що кодує спермальний білок на акросомальній частині сперматозоїда, здатна інтегруватись у геном реципієнта з достатнім рівнем трансгенної експресії. Мікроін'єкції 2 і 4 пкл розчину ДНК, що містить 5,4 нг/мкл екзогенної ДНК, як і введення ТЕ буфера, знижує життєздатність зигот, однак нижча концентрація розчину ДНК (2 пкл) зумовлює кращу здатність ембріонів мишей розвиватися до стадії бластоцисти поза організмом і забезпечує кращу плацентажію ін'єктованих зигот після ембріональної трансплантації, порівняно з ін'єкціями розчину ДНК з концентрацією 4 пкл ($p < 0,05$). Рівень імплантації зигот після ін'єкції у пронуклеус трансгену у тій чи іншій концентрації був суттєво вищий за відсоток зигот, які досягнули стадії бластоцисти поза організмом: 36,7 % та 30 % за умов експерименту *in vivo* порівняно з 8,6 % і 5,7 % за умов *in vitro*, що доводить доцільність безпосередньої трансплантації ембріонів реципієнтові. Ефективність трансгенезу у групах становила 6,7 % та 3,3 % для концентрації екзогенної ДНК конструкції 2 і 4 пкл/мл, відповідно. Серед 20 народжених нащадків було ідентифіковано 3 трансгенні мишки (15 %), дві самки та один самець, що підтверджено електрофорезом продуктів ампліфікації ПЛР-аналізу з ДНК тканин.

Ключові слова: мікроін'єкція, інтеграція ДНК, імплантація, експресія

Розробка й удосконалення ефективності технології переносу генів дає змогу вивчати механізми функціонування окремих ділянок ДНК, регуляції їхньої експресії, активації промоторів на різних етапах онтогенезу. Внесення чужорідної генетичної інформації викликає дестабілізацію геному реципієнта. Важкопередбачуваним є подальший розвиток трансгенів, що пов'язують із частотою генної модифікації та неконтрольованою експресією. Це істотно утруднює використання трансгенезу як у дослідницьких, так і в прикладних цілях. У зв'язку з цим важливого значення набуває пошук найбільш ефективних форм генних конструкцій і умов їхнього введення, а також створення модельних систем для пошуку закономірностей взаємодії між трансгеном і геномом зиготи-реципієнта [5].

Здійснення трансгенної експресії у різних типах клітин досягається за рахунок використання генної конструкції, в якій основна кодуєча послідовність ДНК-ділянок розташована після клітино-специфічної промоторної частини гена. Використання такої з'єднаної конструкції для мікроін'єкції у пронуклеус заплідненої яйцеклітини, яку потім трансплантують у яйцепровід самки-реципієнта, спричиняє трансгенну інтеграцію [4, 15]. Позитивні трансгенні нащадки, які відрізняються від братів і сестер за фенотипом (у мишей використовують забарвлення хутра), схрещуються, а їхніх нащадків аналізують за експресією введених гетерогенних генів (прижиттєві зразки тканин). У разі позитивного аналізу таких нащадків використовують для накопичення генетичного матеріалу зі стабільною інтеграцією та експресією трансгена.

Мікроін'єкція плазмідних генно-інженерних конструкцій у пронуклеуси зигот є основним методом отримання трансгенних тварин. Суттєві зміни стосуються використання лентовірусів як методу модифікації трансгенів, або застосування принципово новітніх технологій, зокрема, систем ZNF, TALEN та CRISPR/Cas9 мРНК [7, 20]. Однак застосування лентовірусних трансгенів виявилось низькоефективним, а цитоплазматична ін'єкція Cas9 mRNA/sgRNA поки що утруднена через високий відсоток лізованих ооцитів після мікроін'єкції, хоча і є високорезультативною в окремих випадках. Хоча, на відміну від ZNF і TALEN, використання системи CRISPR/Cas9 потребує конструювання короткого олігомера, адже до системи CRISPR/Cas9 входять короткі некодуючі РНК (gRNA), які комплементарно взаємодіють з ДНК мішенню, маркуючи таким чином специфічну ділянку ДНК для подальшого розрізання Cas9 нуклеазою [2].

Застосування методу пронуклеарної мікроін'єкції ДНК-конструкцій у дослідницьких лабораторіях і ефективність переносу генів залишається досить низькою, що обмежує використання цього методу для отримання трансгенних сільськогосподарських тварин. Однією з причин, що стримує застосування трансгенних технологій, є низька частота інтеграції рекомбінантних генів у геном тварин-реципієнтів, механізм якої до кінця не з'ясовано [12]. Ефективність трансгенезу у мишей становить лише 2 %, а генетична інтеграція не перевищує 15 % [1]. Отримання стійкої інтеграції та експресії трансгену в геномі реципієнта (зиготи) зі стійкими заданими ознаками у ряді поколінь нащадків – основна мета трансгенезу і його суть.

Процедура виконання трансгенних мікроін'єкцій є технічно прецедентною, а результативність залежить від методичних підходів, які лежать у технічній і біологічній площині. Зокрема, ефективність методу обумовлена кількістю зигот, що залишилися життєздатними після мікроін'єкції генної конструкції у пронуклеус, їхньою здатністю до подальшого дроблення й утворення двобластомерних ембріонів та імплантації в організмі матері. Це спонукає до пошуку нових і вдосконалення наявних підходів [8, 16, 19].

Підвищити ефективність технології мікроін'єкції ДНК у пронуклеус зиготи можливо за рахунок оптимізації кожного з етапів. Більшість ембріонів гинуть після мікроін'єкції генних конструкцій, під час мікроін'єкції та у пренатальному періоді розвитку. На частоту інтеграції гена впливає ступінь очищення ін'єкційного розчину, форма і склад генної конструкції та концентрація ДНК, інгредієнти ін'єкційного буферу, якість зигот, а також виконання методу мікроін'єкції. Результати досліджень на різних видах тварин показали, що частота інтеграції окремих генів може залежати від форми плазміди. Зокрема, при введенні ДНК у пронуклеус зигот миші інтеграція кільцевої форми становила до 8 %, а лінійної – зростала до 24–31 % [10]. Метод мікроін'єкції ДНК добре відпрацьований і досить консервативний, тому його оптимізація передбачає ретельний підбір буферних середовищ та оптимальної концентрації розчину для мікроін'єкції.

Сперматогенез є одним із найбільш динамічних багатостадійних процесів, пов'язаних із диференціацією чоловічих гамет, який контролюється сотнями генів і перебуває під впливом багатьох внутрішніх та зовнішніх чинників. Дослідження особливостей дозрівання спермій, зокрема, змін структури мембран спермій і прояв акросомної реакції, що забезпечує злиття з оолеомою, penetрацію блискучої оболонки та запліднення яйцеклітини, допоможуть з'ясувати біохімічні закономірності сперматогенезу на молекулярному та клітинному рівнях. До одного з білків акросомного матриксу належить LOC 78634. Встановлено, що при дозріванні сперматозоїдів відбуваються зміни у розподілі LOC 78634-білка, який на початку формування акросоми локалізується в перинуклеальній частині біля елементів комплексу Гольджі та проакросомних гранулах сперматид, а також

спостерігається в акросомі епідидимальних спермій [14]. Також було показано, що LOC 78634 вивільняється при акросомній взаємодії, що вказує на важливу роль досліджуваного білка для забезпечення повноцінності проходження акросомної реакції та подальшого запліднення [18].

Метою досліджень було з'ясувати вплив різної концентрації екзогенної модифікованої форми лінійної ДНК для мікроін'єкції у пронуклеус зигот мишей.

Згідно з поставленою метою були окреслені такі завдання: 1. Встановити оптимальну концентрацію вибраної генно-інженерної конструкції, що містила ген *LOC78634* для мікроін'єкції у пронуклеус зигот мишей. 2. Дослідити умови для розвитку зигот мишей поза організмом з метою одержання ембріонів трансферабельних стадій. 3. Продемонструвати можливість імплантації ін'єктованих зигот після трансплантації.

Матеріали та методи

Як вихідний генний конструкт в експерименті було використано плазмиду *pLNCX2* ("Promega" США), що містила ген *LOC 78634* (ген, який кодує акросомальний білок) і репортерний ген *GFP* (ген зеленого флуоресцентного білка). Цей конструкт переклонували у плазмиду *pGEM2*, в якій ген *LOC 78634* перебував під контролем регуляторних ділянок гена *pHspa2* (ген, який кодує білки теплового шоку й індукується у відповідь на гіпертермію) та містив репортерний ген *GFP* [14].

Приготування розчину ДНК для мікроін'єкцій у пронуклеус. Генетичну конструкцію, яка містила потрібний фрагмент ДНК (розміром 4300 п.н.) шляхом гідролізу плазмідного вектора *pGEM2-LOC78634* за допомогою рестрикційних ендонуклеаз *Sall* і *SphI* та розділяли в 0,7 % агарозному гелі. Для елюювання фрагментів ДНК із агарози використовували колонки *Elutip minicolumns* (Scheicher Schuell, Germany) згідно з методикою фірми-виробника. Виділений і очищений фрагмент ДНК для мікроін'єкцій розводили у буфері TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1 mM EDTA) до концентрації розчину ДНК 5,7 нг/мкл. Для мікроін'єкції у пронуклеуси зигот вводили розчин ДНК у концентраціях 2 та 4 пкл/мл, відповідно. Розчин ДНК у концентраціях 2 (Д1) та 4 пкл (Д2) вводили при мікроін'єкції у пронуклеуси зигот.

Вибір тварин і одержання зигот мишей. Дослідження були проведені на білих лабораторних мишах гібридної лінії ICR (CD-1) *Albino*. Зиготи отримували після індукції суперовуляції шляхом внутрішньочеревного (вч) введення самкам гонадотропіну сироватки жеребних кобил (PMSG, Biowet, Drwalew Poland) у кількості 5 МО. Через 48 год самкам вводили (вч) хоріонічний гонадотропін hCG (Pregnyl, Organon) у кількості 5 МО та підсаджували їх до самців. Результативність запліднення оцінювали за наявністю копулятивних корків наступного ранку. Евтаназію тварин здійснювали через 19–20 год після ін'єкції хоріонічного гонадотропіну, дислокацією шийних хребців. Зиготи на стадії двох пронуклеусів вимивали з ампульної ділянки яйцепроводів у середовищі M2 з гіалуронідазою (80 МО/мл) під біокуляром. За 2–3 хв зиготи переносили у чашку з чистим M2 для відмивання від кумулюсних клітин. Після відмивання всі зиготи розподілили на три категорії: зиготи з видимими пронуклеусами, дегенеровані/фрагментовані та сумнівні. Зиготи з видимими пронуклеусами були задіяні в експерименті, сумнівні становили додаткову групу і окремі з них через 1 год у культуральному середовищі виявилися також придатними до мікроін'єкції, дегенеровані/фрагментовані виключили з експерименту.

Отримані зиготи переносили у підготовлені завчасно краплі (500 мкл) культурального середовища KSMO з 5 % фетальною сироваткою теляти (ФСТ) під мінеральним маслом і культивували у термостаті при 37 °C до початку процедури мікроін'єкції.

Метод мікроін'єкції в пронуклеус. Для мікроін'єкції рекомбінантної ДНК використовували скляні капіляри з внутрішнім діаметром 5–10 мкм, виготовлені напередодні витягуванням із капілярної трубочки з мікрофіламентом (тонкостінне тугоплавке скло, діаметром 1 мм) на горизонтальному пулері *Sutter instrument Co P-97*. Мікроін'єкції здійснювали за допомогою механічного мікроманіпулятора *Leica* (German).

Зиготи переносили у мікроін'єкційну камеру зі середовищем M2 під мінеральною олією, по 15 зигот у кожній сесії. Перед початком роботи на мікроманіпуляторі фіксували утримуючу піпетку зліва та ін'єкційну голку справа. Мікроін'єкційну голку сполучали силіконовою трубкою з мікроін'єктором *Eppendorf*. Використовували підігрів столика мікроскопа, на якому розташовували камеру для проведення маніпуляцій. Розчином ДНК наповнювали ін'єкційну скляну голку, використовуючи дію капілярних сил, і закріплювали її в маніпуляторі. Положення обох мікроінструментів (фіксуючої піпетки та мікроін'єкційної голки) щодо мікроін'єкційної камери регулювали за допомогою лівого і правого мікроманіпуляторів. Мікроін'єкції проводили під інвертованим мікроскопом *Axiovert 35* при збільшенні 400×.

Кожну зиготу утримували скляною піпеткою та ін'єктували 1–2 пкл розчину ДНК у чоловічий пронуклеус. Про успішність процедури вказувало візуальне збільшення об'єму пронуклеуса [11, 13]. Після завершення мікроін'єкції зиготи оцінювали морфологічно, відокремлювали від лізованих зародків (дегенерованих внаслідок мікроін'єкції) та продовжували культивування упродовж 3–4 діб до утворення кавітаційної порожнини (умови розвитку *in vitro*) або ж переносили у краплі M2 для безпосередньої трансплантації псевдовагітним реципієнтам (розвиток *in vivo*).

Трансплантація зигот. Статевозрілих самок вагою не менше 24 г, яких синхронізували за аналогічною схемою і спаровували з вазектомованими самцями, використовували як реципієнтів для ембріональної трансплантації. Загальну анестезію тварин проводили з використанням 2,5 % розчину авертину (*Avetun, Sigma*) з розрахунку 15 мкл на 1 г ваги.

Зиготи трансплантували в ампулу яйцепроводу самиці-реципієнта по 7–8 ембріонів у кожен яйцепровід. Після трансплантації ембріонів кожную самку утримували в окремій клітці упродовж усього періоду вагітності.

Аналіз зразків тканин. Аналіз інтеграції трансгена в геном зиготи реципієнта проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). На 14-ту добу після народження у мишей відбирали зразки тканини кінчика хвоста для виділення ДНК [9] і аналізу інтеграції. Фрагмент гена *GFP* ампліфікували за допомогою *Taq*-полімерази у буфері з 2,5 мМ $MgCl_2$ за наявності 2 мМ *dNTP* та 10 пмоль кожного праймера у таких режимах: денатурація при 94 °C – 3 хв; далі 4 цикли при: 94 °C – 20 с, 62 °C – 30 с, 72 °C – 35 с; 8 циклів при: 94 °C – 20 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 35 с; 25 циклів при: 94 °C – 20 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 35 с та останній синтез при: 72 °C – 10 хв. Для ампліфікації репортерного гена *GFP* використовували праймери прямий F: 5-CAAAGGAGGAAAGTGGCAAA-3 і зворотний R: 3-GAACTTCAGGGTCAGCTTGC-5, підібрані за допомогою комп'ютерної програми OLIGO 4.0. Величина продукту ампліфікації становила 377 п.н. Електрофоретичне розділення фрагментів ДНК проводили в горизонтальному 0,8 % агарозному гелі з бромистим етидієм [6].

Результати і їхнє обговорення

Важливим завданням введення генно-інженерної конструкції у пронуклеуси зигот є здатність зародків до подальшого розвитку. Відомо, що на виживаність зигот після мікроін'єкції рівень імплантації та частоту інтеграції трансгена впливає багато факторів, зокрема, концентрація робочого розчину ДНК-конструкції, склад буферу для розведення,

стадії клітинного циклу зигот і технічне виконання методу [17]. Представлені нижче результати досліджень відображають основні показники подальшого розвитку зигот унаслідок мікроін'єкції трансгенної конструкції, що містила ген *LOC78634*, у концентраціях 2 і 4 пкл/мл порівняно з ін'єктованим буфером ТЕ (позитивний контроль) та інтактними ембріонами мишей (негативний контроль) при культивуванні *in vitro*, а також після трансплантації реципієнтам.

Отже, зиготи, яким ін'єктували генно-інженерну конструкцію у концентрації 2 пкл/мл, належали до 1-ї дослідної групи. У пронуклеус зигот 2-ї дослідної групи ін'єктували трансген у концентрації 4 пкл/мл. До 3-ї дослідної групи належали зиготи, у пронуклеус яких вводили ТЕ буфер (позитивний контроль). Як негативний контроль використовували інтактні зиготи, які культивували в аналогічному середовищі упродовж 4 діб. Відсоток розвинутих зародків визначали від кількості життєздатних зигот на початковій стадії культивування (табл. 1).

Таблиця 1

Розвиток зигот мишей до стадії бластоцисти за умов мікроін'єкції у пронуклеус трансгена в різних концентраціях, n=160

Основні показники	Групи зигот			
	К ⁺	Д1	Д2	К ⁻
Ін'єктовані зиготи, n-%	21	105	120	–
Зиготи, які перенесли ін'єкцію, n-%	20	70	70	14
Ембріони на стадії 2-4 клітин, n-%	9 – 45%	30 – 42,9	25 – 35,7%*	10 – 71,4%
Ембріони на стадії бластоцисти, n-%	1 – 5%	6 – 8,6%	4 – 5,7%	3 – 21,4%

Примітка: * $p < 0,05$; К⁺ позитивний контроль, зиготи ін'єктовані ТЕ-буфером; Д1 – зиготи, мікроін'єктовані ДНК концентрацією 2 пкл/мл; Д2 – зиготи, мікроін'єктовані ДНК концентрацією 4 пкл/мл; К⁻ – негативний контроль, інтактні зиготи

За 1-шу і 2-гу добу культивування не спостерігали значних відмінностей між зиготами позитивного контролю (ТЕ буфер) та 1-ї дослідної групи (2 пкл). Зокрема, відсоток ембріонів, які подолали 2–4-клітинну стадію розвитку, становив 42,9 % у 1-й дослідній групі проти 45 % у позитивному контролі. Збільшення концентрації ДНК до 4 пкл/мл знизило здатність ін'єктованих зигот до подальшого розвитку. Тільки 35,7 % зигот досягнуло стадії дроблення 2–4-клітини, що становило вірогідну різницю із 1-ю дослідною групою ($p < 0,05$).

Відсоток зигот, які досягнули стадії бластоцисти у 1-й дослідній групі, був вищим порівняно з позитивним контролем: 8,6 % проти 5 %. Мікроін'єкція екзогенної ДНК у концентрації 4 пкл/мл стримала розвиток зигот до бластоцитарної стадії: лише 5 % ембріонів демонстрували ознаки кавітації та первинної диференціації бластомерів. Отримані результати вказують, що використана генетична конструкція не перешкоджає розвитку зародків і не чинить токсичного впливу, про що свідчить здатність зигот після мікроін'єкції розвиватися до стадії бластоцисти за умов *in vitro*.

У наступному експерименті вивчали рівень імплантації зигот за ін'єкції різних концентрацій трансгену у пронуклеус після хірургічної трансплантації псевдовагітним самкам. У результаті гормональної стимуляції 6-ти самок було вимито 255 зигот. Із них 120 оцінено як такі, що містять видимі пронуклеуси і можуть бути використані для мікроін'єкції вибраної генної конструкції у концентрації 2 пкл (n=60) і 4 пкл (n=60). Після проведення мікроін'єкції було відібрано і трансплантовано 60 із 84 зигот, які добре перенесли мікроін'єкцію у пронуклеус. Для цього було використано 4 самиці-реципієнти, кожній із яких хірургічно пересадили по 15 зигот. Через 21 день у 3-х із 4-х самок-реципієнтів вагітність закінчилася народженням здорового молодняка. Серед 20 народжених мишенят отримано 3 трансгенні нащадки, 1 самець і 2 самочки.

Дані ефективності інтеграції гена *LOC78634* у народжених мишей в результаті трансплантації зигот після мікроін'єкції у пронуклеус представлено нижче (табл. 2).

Таблиця 2

Інтеграція гена *LOC78634* внаслідок мікроін'єкції у пронуклеуси зигот миші, n=120

Основні показники	Групи зигот	
	Д1 – 2пкл	Д2 – 4пкл
Ін'єктовані зиготи, n	60	60
Зиготи, які перенесли ін'єкцію, n-%	53 – 88,3 %**	31 – 45,6 %
Трансплантовані зиготи, n	30	30
Використані самки-реципієнти, n	2	2
Вагітні самки-реципієнти, n-%	2 – 100 %	1 – 50 %
Народжені мишенята, всього, n	11	9
Рівень імплантації ін'єктованих зигот, %	11/30 – 36,7 %	9/30 – 30 %
із них трансгенних, n	2	1
Ступінь інтеграції, %	2/11 – 18,2 %	1/9 – 11,1 %
Загальна ефективність трансгенезу, %	2/30 – 6,7 %	1/30 – 3,3 %

Примітки: ** p<0,01; Д1 – дослідна група 1; Д2 – дослідна група 2

Аналізуючи вплив концентрації ДНК-конструкції, яка використана для пронуклеарної мікроін'єкції, на виживання ембріонів і ступінь інтеграції трансгена можна стверджувати, що трансплантація ін'єктованих генотом *LOC78634* зигот концентрацією 2 та 4 пкл була успішною в обох групах, однак рівень виживаності зигот унаслідок мікроін'єкції вірогідно відрізнявся, склавши 88,3 % і 45,6 %, у першій і другій дослідній групі, відповідно (p<0,01). В обох групах реципієнтам було трансплантовано 30 мікроін'єктованих зигот, по 7–8 зигот у кожен яйцепровід. Рівень імплантації становив 36,7 % та 30 % без вірогідної різниці між групами. Із 20 народжених нащадків одержано 3 трансгенних мишенят, що становить 15 % інтеграції гена *LOC78634* в експерименті, або 18,2 % за умов ін'єкції екзогенної ДНК у концентрації 2 пкл і 11,1 % – у концентрації 4 пкл/мл.

Загальна ефективність трансгенезу становила 6,7 % та 3,3 %, відповідно: серед народжених тварин було ідентифіковано 3 трансгенні мишки: дві самки та один самець. Електрофореграму продуктів ампліфікації ПЛР-аналізу з ДНК тканин хвостів народжених мишенят представлено на рис. 1.



Рис. 1. Електрофореграма ампліконів, обмежених праймерами EGF1 (s) і EGF1 (as), у ПЛР-аналізі геномної ДНК нащадків мишей, отриманих після трансплантації зигот мікроін'єктованих ДНК конструкцією *LOC78634*: 1–9, та 10–15 – зразки ДНК, виділені з тканин хвостів народжених нащадків («+» – трансгенні миші); К+ – позитивний контроль (плазміда pHst-GFP); К- – негативний контроль (mix PCR); М – маркер (pBS/MspI). Стрілка вказує на положення фрагмента розміром 377 п.н., що відповідає експресії гена GFP у трансгенних мишей

Ефективність інтеграції отриманого трансгена залежить від типу використаного при створенні конструкції вектора, розміру та форми рекомбінантної ДНК. Тому після створення нових генно-інженерних конструкцій важливим етапом є їхнє тестування з урахуванням, зокрема, впливу концентрації ДНК на життєздатність зародків після маніпуляцій, ступеня інтеграції трансгена, що дасть змогу при потребі модифікувати отриману генну конструкцію та вибрати найбільш перспективну для подальшого отримання трансгенних тварин.

В одній із робіт після аналізу результатів отримання трансгенних мишей мікроін'єкцією 12 генно-інженерних конструкцій автори дійшли до висновку, що загальна ефективність технології за однакових умов проведення мікрomanipуляцій залежить від використаної генної конструкції, ступеня її очищення у процесі підготовки до проведення операцій, тоді як ефективність інтеграції введеної генної конструкції не залежить від рівня приживлення мікроін'єктованих зигот [3]. При відносно низьких показниках приживлення зигот 3,3 % і 6,8 % для генних конструкцій *LTF 2* та *PU 2*, вихід трансгенних тварин становив 1,4 % і 1,6 % та був аналогічним як і при використанні конструкцій *PU 2* та *PU 4*, коли приживлення мікроін'єктованих яйцеклітин було значно вищим і становило 9,2 % та 11,8 %. Порівняно з іншими даними, у наших дослідженнях при використанні генної конструкції *LOC78634* в обох досліджуваних концентраціях трансгена і частота інтеграції (18,2 % та 11,1 %), і ефективність трансгенезу (6,7 % та 3,3 %) перебували на відносно високому рівні.

Аналізуючи результати розвитку мікроін'єктованих у пронуклеус зигот, можна припустити, що пріоритетним вибором є безпосередня трансплантація таких зигот псевдовагітним самкам, оскільки культуральне середовище не забезпечує достатніх умов для надолуження бластомерної критичної маси або ж не зумовлює утворення клітинних комплексів, необхідних для перетікання процесів, які супроводжують первинну диференціацію ембріональних бластомерів і перехід до наступної стадії. Зокрема, рівень імплантації зигот після ін'єкції у пронуклеус трансгена у тій чи іншій концентрації був вищий за відсоток зигот, які досягнули стадії бластоцисти поза організмом: 36,7 % та 30 % за умов *in vivo* експеримента порівняно до 8,6 % і 5,7 % за умов *in vitro*.

Використана генно-інженерна конструкція, яка містить ген *LOC78634*, за умов мікроін'єкції у пронуклеуси зигот мишей, характеризується здатністю до інтеграції у геном зиготи-реципієнта. Показано, що концентрація трансгена у кількості 2 пкл сприяє зростанню частоти інтеграції до 18,2 % та ефективності трансгенезу 6,7% порівняно з концентрацією 4 пкл/мл з 11,1 % та 3,3 %, відповідно. Пріоритетним вибором є безпосередня трансплантація таких зигот псевдовагітним самкам, оскільки культуральне середовище не забезпечує достатніх умов для надолуження бластомерної критичної маси ембріонами, навіть якщо вони успішно подолали двоклітинний блок дроблення. Рівень інтеграції та ефективність трансгенезу ін'єктованих зигот розвинутих у бластоцисти або повноцінні організми за концентрації вибраної екзогенної ДНК 2 і 4 пкл становить 8,6 % і 5,7 % за умов *in vitro* та 36,7 % і 30 % за умов експеримента *in vivo*.

Ця робота виконана в *M.Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice* за підтримки гранту *National Cancer Institute, NCI, Bethesda (USA)*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дзіцюк В., Себа М. Трансгенез у тваринництві – перспективи і проблеми // Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та Держ. н.-д. контрол. ін-ту ветпрепаратів та корм. добавок. 2012. Вип. 13. № 3/4. С. 420–423.

2. *Зиновьева Н. А., Волкова Н. А., Багиров В. А., Брем Г.* Трансгенные сельскохозяйственные животные: современное состояние исследований и перспективы // Экологическая генетика. 2015. Т. XIII. 5, № 2. С. 58–76.
3. *Кадулин С. Г., Ермолкин Т. Г., Андреева Л. Е.* Анализ пересадки микроинъецированных зигот при получении трансгенных мышей // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 2. С. 1–6.
4. *Козикова Л. В., Росохацкий С. И., Душевская А. М., Андреева Л. Е.* Паттерн экспрессии репортерных генов трансгенных эмбрионов домашних животных и рыб // Достижения науки и техники АПК. 2010. № 5. С. 55–57.
5. *Максименко О. Г., Дейкин А. В., Ходарович Ю. М., Георгиев П. Г.* Использование трансгенных животных в биотехнологии: перспективы и проблемы // Acta Naturae. 2013. Т. 5. № 1(16). С. 33–47.
6. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. К.: Мир, 1984. 479 с.
7. *Немудрый А. А., Валетдинова К. Р., Медведев С. Р., Закиян С. М.* Система редактирования геномов TALEN и CRISPR/CAS – инструменты открытий // Acta Naturae. 2014. № 3 (22). Т. 6. С. 20–42.
8. *Никитин В. А.* Методы введения веществ и органелл в клетку в технологиях клеточной инженерии // Цитология. 2007. Т. 49. № 8. С. 631–641.
9. Новое в клонировании ДНК. Методы / под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1989. 368 с.
10. *Brinster R. L., Chen H. Y., Trumbauer M. E. et al.* Factor affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. Vol. 82. P. 4438–4442.
11. *DeMayo J. L., Wang J., Liang D. et al.* Genetically Engineered Mice by Pronuclear DNA microinjection // Curr. Protoc. Mouse Biol. 2012. Vol. 1. N 2. P. 245–262.
12. *Hirabayashi M., Takahashi R., Ito K. et al.* A comparative study on the integration of exogenous DNA into mouse, rat, rabbit and pig genomes // Exp. Anim. 2001. Vol. 50(2). P. 125–131.
13. *Ittner L. M., Gotz J.* Pronuclear injection for the production of transgenic mice // Nature protocols. 2007. N 2. P. 1206–1215.
14. *Korfanty J., Toma A., Wojtas A. et al.* Identification of a new mouse sperm acrosome-associated protein // Reproduction. 2012. Vol. 143. P. 749–757.
15. *Madich A., Brown E., Pearson L. et al.* Generation of chimeric mice: Comparison of the effects of holding conditions of blastocysts to Embryonic Stem cells injection // 65th AALAS meeting (poster 168/abstract). San-Antonio, TX, October 19–23rd, 2014.
16. *Madich A., Brown E., Pearson L. et al.* Comparative analysis of the injectability of in vivo derived Morulae reaching Blastocyst stage in KSOM or M15 // 12th ICTT meeting. Edinburgh. October 4–6th, 2014. P. 74.
17. *Murakami M., Ideguchi S., Fahrudin M. et al.* Influence of the DNA amount per microinjection on the development and EGFP expression in bovine embryos // Arch. Tierz., Dummerstorf. 2003. Vol. 46 (1). P. 25–30.
18. *Nguyen E. B., Westmuckett A. D., Moore K. L.* SPACA7 is a novel male germ cell-specific protein localized to the sperm acrosome that is involved in fertilization in mice // Biol. Reprod. 2014. Vol. 90(1). P. 1–13.
19. *Park J. S., Han Y. M., Lee C. S. et al.* Improved development of DNA-injected bovine embryos co-cultured with mouse embryonic fibroblast cells // Anim. Reprod. Sci. 2000. Vol. 59. P. 13–22.
20. *Yang H., Wang H., Shivalila C. S. et al.* One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering // Cell. 2013. Vol. 154(6). P. 1370–1379.

Стаття: надійшла до редакції 04.04.17

доопрацьована 24.04.17

прийнята до друку 26.04.17

GENE INTEGRATION EFFICIENCY AND ZYGOTES SURVIVING IN MICE AT PRONUCLEAR MICROINJECTION

O. Shtapenko¹*, A. Madich², S. Fyodorova¹

¹*Institute of Animal Biology, NAAS of Ukraine
38, V. Stus St., Lviv 79034, Ukraine*

²*Cambridge University, CB10 ISA, UK
e-mail: shtapenko31@gmail.com*

By applying the microinjection into pronuclear of murine zygotes we demonstrated the successful integration of gene *LOC 78634* construction at a comparative level efficiency and transgenesis. The study showed the feasibility to increase the number of survived eggs and the capability to develop to blastocyst stage if gene concentration reduced to 2 pl/ml instead 4 pcl/ml, however both as gene and TE buffer microinjection are being led to less surviving in culture. The higher embryo implantation of the injected zygotes been noticed at lower gene concentration also ($p < 0.05$). We demonstrated that the percentage of implanted embryos at two different gene concentrations is elevated to compare to those that generated blastocysts in a Petri dish: 36.7 % and 30 % *in vivo* after embryo transfer versus 8.6 % and 5.7 % *in vitro* culture. Due to *in vitro* culture is leading to unstable transgene expression, the embryo transfer directly after gene microinjection is preferable. The method described here can provide a strong basis for transgenesis efficiency 6.7 % and 3.3 % for two different gene concentrations 2 and 4 pl/ml, accordingly. We also demonstrated that 3 transgenic offspring from 20 newborn pups been identified successfully with PCR amplification of tail tissue samples.

Keywords: microinjection, DNA integration, expression