

УДК 57.089.32

Простые советы как повысить эффективность создания мышей с отредактированным геномом

О. А. Аверина^{1,2*}, М. Ю. Высоких², О. А. Пермяков¹, П. В. Сергиев^{1,3}¹Институт функциональной геномики, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

*E-mail: averina.olga.msu@gmail.com

Поступила в редакцию 08.08.2019

Принята к печати 07.02.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10937

РЕФЕРАТ Редактирование генома модельных организмов, в первую очередь мышей, стало необходимым условием как для изучения функциональной роли генов, так и для разработки новых лекарственных средств. Эффективность практического применения новейших подходов геномного редактирования зачастую можно повысить с помощью простых приемов, связанных с биологическими особенностями лабораторных животных. Нами обобщен опыт, полученный в ходе трехлетней работы по микроинъекции компонентов системы CRSIPR/Cas9 в более чем 10 000 яйцеклеток. Практически проверены такие подходы к повышению эффективности создания мышей с измененным геномом, как выбор оптимальных линий животных, используемых в качестве доноров оплодотворенных яйцеклеток, а также в качестве суррогатных матерей. Проведено сравнение эффективности схем суперовуляции для получения максимального количества оплодотворенных яйцеклеток от каждой мыши. Представленные результаты будут полезны лабораториям, стремящимся к быстрому и эффективному получению новых линий мышей с заданными изменениями генома.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА редактирование генома, трансгенные мыши, суперовуляция, доноры эмбрионов, самки-реципиенты эмбрионов.

ВВЕДЕНИЕ

Технология получения мышей с измененным геномом создана в 1980-х годах [1–5] и направлена на исследование функций генов, генетических механизмов возникновения заболеваний человека и разработке способов их лечения [6, 7]. Эта технология оказывает существенное воздействие на такие смежные области науки, как ветеринария и сельское хозяйство [8, 9]. Первые протоколы процедуры получения мышей с измененным геномом опубликованы более 30 лет назад. В настоящее время эта технология продолжает совершенствоваться, и основные усилия ученых сконцентрированы на создании новых молекулярных инструментов редактирования генома [10–13]. При этом, для создания новых линий мышей с измененным геномом важны технические аспекты получения таких мышей. Независимо от того, какой генетический редактор используется, схема работы по получению мышей с измененным геномом проходит несколько стандартных стадий. Во-первых, это суперовуляция самок, используемых в качестве доноров оплодотворенных

яйцеклеток, и ссаживание их с самцами. Во-вторых, выделение яйцеклеток и микроинъекция компонентов системы генетического редактирования. И, в-третьих, это внедрение эмбрионов, перенесших процедуру микроинъекции, в яйцевод псевдобеременной самки-реципиента, вынашивание и выкармливание мышат. Каждая стадия этого процесса нуждается в оптимизации для достижения максимальной эффективности (рис. 1). Задачами данного исследования был подбор условий для получения максимально возможного количества оплодотворенных яйцеклеток, подходящих для микроинъекций и последующей эффективной подсадки эмбрионов с целью рождения максимально возможного числа жизнеспособных мышат, доживающих впоследствии до репродуктивного возраста.

Представленные данные собраны в течение трехлетнего периода, в ходе которого выделено свыше 10 000 яйцеклеток из примерно 850 мышей, проведены операции по внедрению эмбрионов более чем 300 суррогатным матерям, у которых родилось больше 380 мышат, прошедших процедуру редактирования

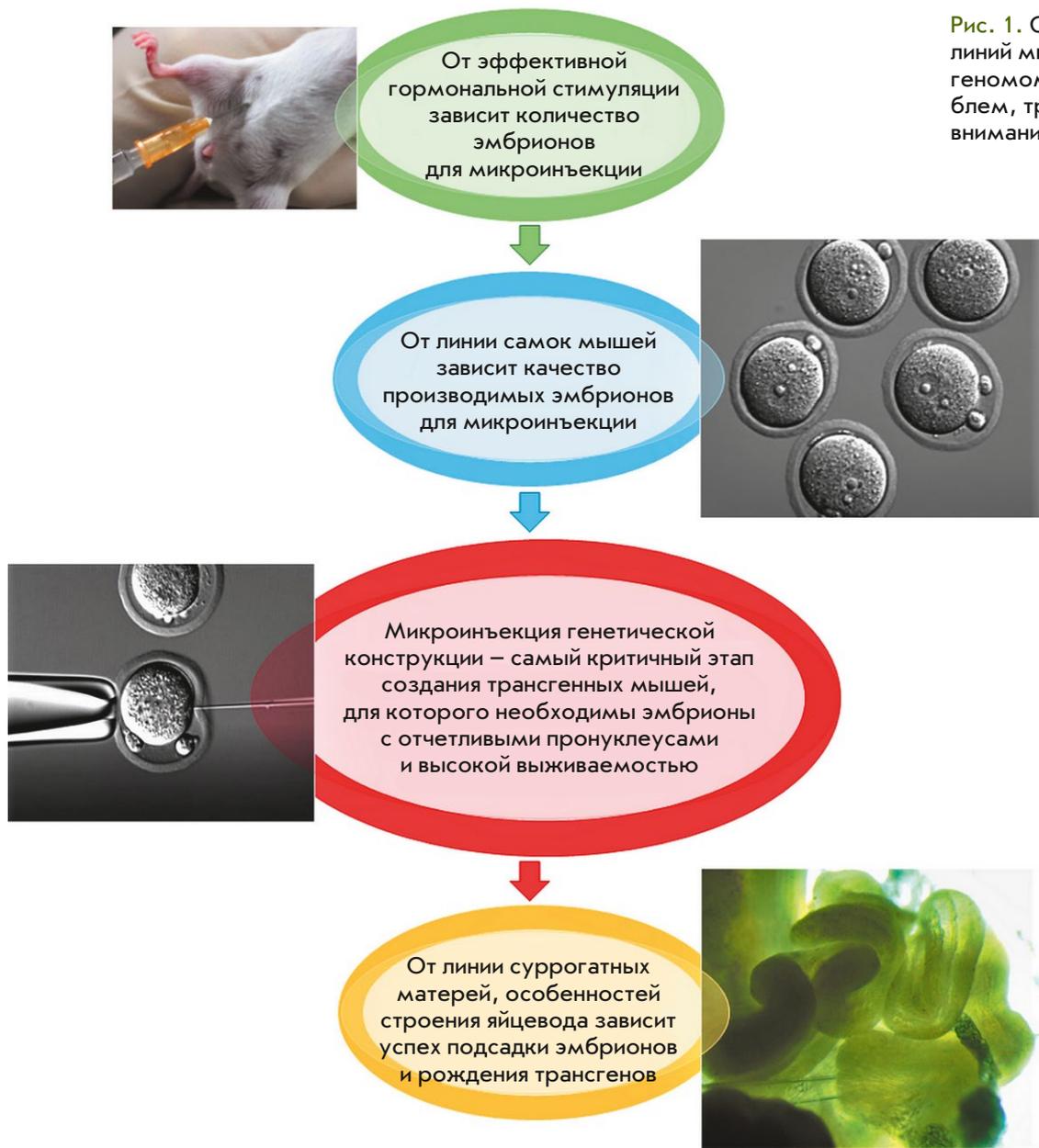


Рис. 1. Схема получения линий мышей с измененным геномом с указанием проблем, требующих особого внимания на каждом этапе

генома. Были отобраны 34 линии мышей с направленным изменением 16 генов (таблица).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования

В нашем исследовании были использованы лабораторные мыши, полученные из Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия). Все манипуляции осуществляли по протоколу, одобренному локальной комиссией по биоэтике Исследовательского центра вирусно-экспериментального комплекса ООО «НИИ Митоинженерии МГУ» (Москва, Россия) (<http://www.wesc-msu.ru/>), заключение комиссии № 67 от 28 апреля

2015 года. В качестве доноров яйцеклеток использовали: 713 самок гибридов F1 C57Bl/6 × CBA (F1), 92 самки инбредной линии CBA, 55 самок инбредной линии FVB. Для покрытия самок-доноров использовали по 10 самцов F1 и FVB. Вазэктомии и последующему ссаживанию с самками-реципиентами (по 46 мышей F1 и CD1) были подвержены 10 самцов F1 и 10 – аутбредной линии CD1. Эстральный цикл анализировали у 10 самок CBA и F1.

Условия содержания лабораторных мышей

Животных содержали по пять особей в индивидуально вентилируемых клетках (система IVC, TECNIPLAST S.p.A., Италия) при свободном доступе к корму (гранулированный автоклавируемый комбикорм произ-

Значимые параметры оптимизации методов получения мышей, прошедших процедуру редактирования генома

Эффективность получения яйцеклеток, пригодных для микроинъекции								
Линия мышей	Тип гормональной нагрузки	Число мышей, прошедших супероуляцию и ссаженных с самцами	Число покрытых мышей	Медиана доли покрытых мышей	Число выделенных зигот	Медиана числа зигот на одну мышь	Число зигот, перенесших микроинъекцию	Медиана доли зигот, перенесших микроинъекцию, от общего числа выделенных
Гибрид F1 C57Bl/6 × CBA	ГСЖК & ХГЧ	2007	619	0.40	5124	8.39	2215	0.43
Гибрид F1 C57Bl/6 × CBA	Антисыворотка ингибина + ГСЖК & ХГЧ	166	105	0.67	3499	33.20	1191	0.33
Инбредная линии CBA	ГСЖК & ХГЧ	540	92	0.15	721	5.11	386	0.50
Инбредная линии FVB	Антисыворотка ингибина + ГСЖК & ХГЧ	105	64	0.60	1449	22.83	696	0.41

Эффективность получения потомства от суррогатных матерей после подсадки яйцеклеток, прошедших микроинъекцию			
Линия мышей	Число подсаженных эмбрионов, перенесших микроинъекцию	Число рожденных мышат	Медиана доли рожденных мышат от числа подсаженных эмбрионов
Гибрид F1 C57Bl/6 × CBA	1361	145	0.053
Аутбредная линия CD1	1532	154	0.040

водства Sniff Spezialdiäten GmbH, Германия) и воде, очищенной обратным осмосом; в среде, свободной от специфических патогенов, при световом режиме 12/12 (включение света в 09:00), в помещениях с кратностью воздухообмена не менее 15 об/ч, с температурой воздуха 20–24 °С, влажностью 30–70%. В качестве подстилки использовали деревянную щепу Lignocel (JRS, Германия). Все материалы, поступающие к животным, были стерильными.

Получение оплодотворенных яйцеклеток для микроинъекций

Для получения зигот у мышей вызывали супероуляцию путем внутрибрюшинного введения гормонов по двум протоколам:

1) 200 мкл (8ЕМ) гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК, препарат Фоллимаг®, ЗАО «МОСАПРОГЕН», Россия) с 10 до 12 утра, с последующей инъекцией 200 мкл (8ЕМ) хорионического гонадотропина человека через 48 ч (ХГЧ, препарат Хорулон®, MSD Animal Health, корпорация Merck, Нидерланды).

2) 100–140 мкл антисыворотки ингибина с ГСЖК (препарат CARD HyperOva®, Cosmobio LTD, Япония, патент № 5927588) в 5 ч вечера и через 48 ч, в 3 ч дня инъекция 200 мкл хорионического гонадотропина человека (ХГЧ, препарат Хорулон®, MSD Animal Health, корпорация Merck).

После введения ХГЧ самок мышей ссаживали с самцами соответствующей линии. Успешность опло-

дотворения определяли на следующее утро по наличию вагинальных пробок [14]. Извлечение яичника и яйцевода с последующим выделением зигот производили согласно протоколу Cho от 2009 года [6].

Подсадка эмбрионов суррогатным матерям

Для успешной имплантации эмбрионов у самок-реципиентов перед операцией вызывали состояние псевдобеременности – самок ссаживали с вазэктомизированными самцами и в день операции проверяли наличие вагинальной пробки, что является показателем псевдобеременности [14, 15]. Операцию по подсадке эмбрионов в воронку яйцевода производили согласно протоколу Cho от 2009 года [6].

Анализ эстрального цикла

Для оценки стабильности эстрального цикла у самок-доноров в одно и то же время суток (вторая половина дня) в течение 14 дней брали вагинальный мазок согласно методике Ekambaram от 2017 года [16]. Стадии эстрального цикла определяли по клеточному составу вагинального мазка [17–19].

Статистический анализ данных

Статистическую обработку данных проводили при помощи непараметрического теста Манна–Уитни (U-критерий). Результаты представлены в формате медиан, в качестве разбросов – квартили 0.25 и 0.75.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе рассмотрены подходы к оптимизации получения оплодотворенных яйцеклеток для эффективной микроинъекции и минимизации их потери при последующих манипуляциях. Первостепенной задачей при создании трансгенных мышей является получение максимально возможного количества качественных зигот от одной мыши для процедуры микроинъекции. Нами проанализирована эффективность разных протоколов гормональной стимуляции для суперовуляции у доноров яйцеклеток. С целью повышения выживаемости эмбрионов после введения генетической конструкции мы выбрали линию мышей, самки которых производят зиготы, более устойчивые к проникновению микроинъекционной иглы и подходящие по структуре для пронуклеарных введений. Следующий критический этап – подсадка оплодотворенных яйцеклеток, переживших микроинъекцию, суррогатной матери и их последующее внутриутробное и постнатальное развитие. В связи с этим мы выбрали линию мышей, самки которых лучше подходят на роль суррогатной матери по таким критериям, как плодовитость и хорошие характеристики материнского поведения. Выбор линии опирался также на возможность более успешного проведения микрохирургических операций по подсадке эмбрионов.

Выбор способа суперовуляции

Важным фактором, влияющим на эффективность создания мышей с измененным геномом, является число овулировавших ооцитов. Для увеличения эффективности их выхода используют методы суперовуляции, которые искусственно стимулируют фолликулогенез и вызывают овуляцию путем гормональной обработки. У мышей суперовуляцию традиционно вызывают комплексным применением гормонов ГСЖК и ХГЧ [20, 21]. Эффективность данной схемы стимуляции зависит не только от линии мышей, но и от качества гормональных препаратов, значительно различающегося у разных производителей.

За последние годы показано, что введение сыворотки, содержащей антитела к ингибину, стимулирует суперовуляцию [22]. Ингибин – это белковый гормон, который, действуя на клетки гипофиза, подавляет выработку фолликулостимулирующего гормона [23]. Инактивация ингибина с помощью антител способствует созреванию фолликулов [24]. Недавно схему суперовуляции модернизировали, включив в нее на первом этапе стимуляции совместное введение сыворотки, содержащей ГСЖК, и антител к ингибину [25].

Мы сравнили продуктивность самок мышей после гормональной стимуляции смесью ГСЖК и ХГЧ

или комбинацией данных гормонов на фоне антител к ингибину. В первом случае средний выход составил 9 зигот, однако при добавлении к ГСЖК антител к ингибину число получаемых от каждой мыши овулировавших яйцеклеток возросло на 275% ($p < 0.01$ U-критерий Манна–Уитни) (среднее – 34, максимум – 50) (рис. 2, таблица). Это усовершенствование позволило снизить количество животных для проведения эксперимента, что отразилось на уменьшении затрат на их разведение и содержание, а главное, увеличило выход выживших после введения генетической конструкции эмбрионов для последующей подсадки суррогатной матери.

Выбор линии самок-доноров яйцеклеток

Ряд исследований свидетельствует о том, что для эффективности процесса создания мышей с измененным геномом важен генетический фон мышей – доноров оплодотворенных яйцеклеток [26–28]. Популярностью пользуются гибридные самки F1, одним из родителей которых является подробно генетически охарактеризованная и часто используемая инбредная линия C57Bl/6 (B6). Самки F1 за счет эффекта гибридной силы отличаются повышенной фертильностью, лучше реагируют на суперовуляцию, дают большое количество яйцеклеток [29, 30], а их зиготы до 8 раз эффективнее переживают микроинъекцию по сравнению с инбредными линиями [16]. Однако эмбрионы от родителей F1 генетически отличаются друг от друга и содержат разные комбинации полиморфных генетических участков, которые различаются в исходных инбредных линиях, что может приводить к случайным искажениям результатов из-за возможного влияния различий в ге-

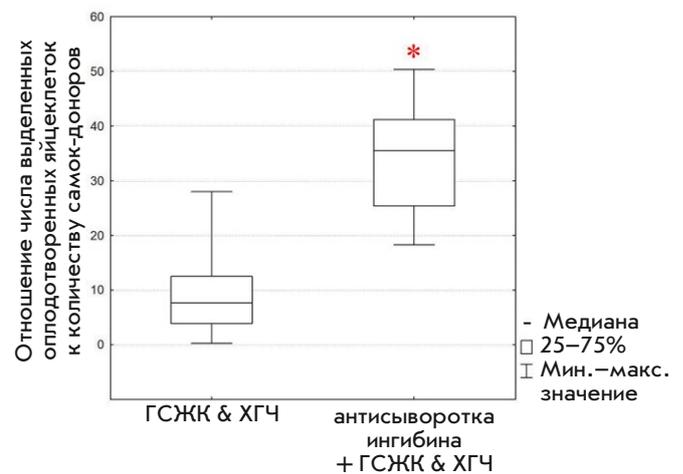


Рис. 2. Влияние способа гормональной стимуляции самок мышей гибридов F1 C57Bl/6 × CBA на количество овулировавших яйцеклеток. * $p < 0.01$ Манна–Уитни (U-критерий)

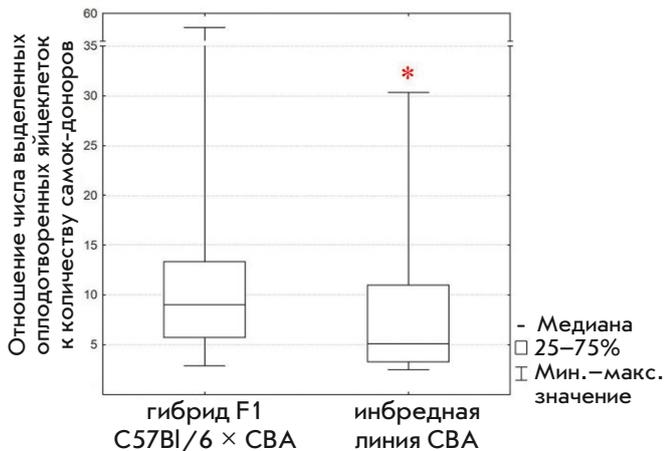


Рис. 3. Количество овулировавших яйцеклеток у самок мышей инбредной линии SWA и гибридов F1 C57Bl/6 × SWA. Суперовуляцию вызывали инъекциями смеси ГСЖК и ХГЧ. * $p < 0.05$ Манна–Уитни (U-критерий)

нетическом фоне на фенотип [30]. Для нивелирования неблагоприятных эффектов трансгенных мышей, полученных при редактировании генома гибридов F1, необходимо проводить через процедуру обратного скрещивания и выводить на одну из инбредных родительских линий. Это приводит к дополнительным затратам на разведение и содержание, а также увеличивает промежуток времени между рождением мышей с измененным геномом и началом экспериментальных исследований.

В экспериментах по изучению фенотипа трансгенных мышей предпочтительнее использовать инбредные линии, обладающие одинаковыми геномами. Самым распространенным генетическим фоном трансгенных мышей является линия В6. Тем не менее, несмотря на хорошую реакцию молодых самок В6 на стимуляторы суперовуляции [30], их одноклеточные эмбрионы имеют зернистую цитоплазму и мелкие, плохо различимые пронуклеусы. Кроме того, зиготы В6 плохо переносят микроинъекцию, которая приводит к повышенной смертности эмбрионов этой линии [31, 32], вследствие чего их использование для получения трансгенных мышей представляется малоэффективным.

Мы решили оценить продуктивность самок линии SWA, часто используемой как родительская для гибридов F1 вместе с C57Bl/6 [16, 33]. На этом этапе нашей работы в качестве гормональной стимуляции самок SWA и F1, задействованных как объект сравнения, мы использовали комбинацию ГСЖК и ХГЧ без добавления антисыворотки ингибина. Оказалось, что инбредные самки SWA дают на 21% ($p < 0.05$ U-критерий Манна–Уитни) меньше зигот, чем гибридные мыши (рис. 3, таблица), что может быть связано с разными концентрациями эндогенных

гормонов или с различной чувствительностью яичников к экзогенным гонадотропинам, которая может влиять на количество овулировавших ооцитов [34]. Для того чтобы выявить возможную причину низких репродуктивных показателей линии SWA, мы проверили стабильность эстрального цикла мышей этой линии. Оказалось, что по сравнению с гибридными мышами, у которых эструс наступает стабильно каждые 4–5 дней, что нормально для лабораторных мышей [8, 9, 35], у мышей линии SWA значимо ($p < 0.05$ U-критерий Манна–Уитни) чаще фиксировались провалы в наступлении эструса на фоне пролонгации стадии метэструса (рис. 4). При этом эффективность покрытия самок SWA была на 55% ($p < 0.01$ U-критерий Манна–Уитни) ниже, чем гибридных особей (рис. 5, таблица). Эти данные свидетельствуют о нестабильности эстрального цикла самок линии SWA, что, вероятно, и приводит к низкой эффективности покрытия и слабой реакции на суперовуляцию. При этом, согласно опубликованным данным, эмбрионы, полученные от самок SWA, по ряду параметров уступают гибридным, они значительно хуже переносят не только процедуру микроинъекции, но и криоконсервацию [33].

Поскольку согласно приведенным выше данным и результатам собственных исследований линии SWA и C57Bl/6 оказались малоприспособленными для получения большого количества оплодотворенных яйцеклеток [31, 32], перед нами встал вопрос выбора инбредной линии, которая могла бы использоваться в этом качестве.

Зиготы линии FVB были ранее описаны как подходящие для пронуклеарных инъекций [30]. Мы проверили возможность использования этой линии, применяя усовершенствованную систему гормональной стимуляции самок с добавлением антисыворотки ингибина. Мы показали, что самки FVB менее эффективно реагируют на суперовуляцию и дают на 32% ($p < 0.05$ U-критерий Манна–Уитни) меньше зигот, чем гибриды F1 (рис. 6, таблица).

Хотя среднее количество овулировавших яйцеклеток у линии FVB было меньше, чем у гибридов F1 C57Bl/6 × SWA, одноклеточные эмбрионы FVB по сравнению с гибридными имеют «чистую» незернистую цитоплазму, крупные, четко различимые пронуклеусы, которые служат легкими мишенями для микроинъекций (рис. 7), что является решающим фактором для успешного проведения процедуры редактирования генома. Также мы подтвердили данные [36, 32] о высокой устойчивости эмбрионов FVB к процедуре микроинъекции. Наши результаты показывают, что эмбрионы FVB на 22% ($p < 0.05$ U-критерий Манна–Уитни) имеют более высокую выживаемость после микроинъекции по сравнению с гибридами F1

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

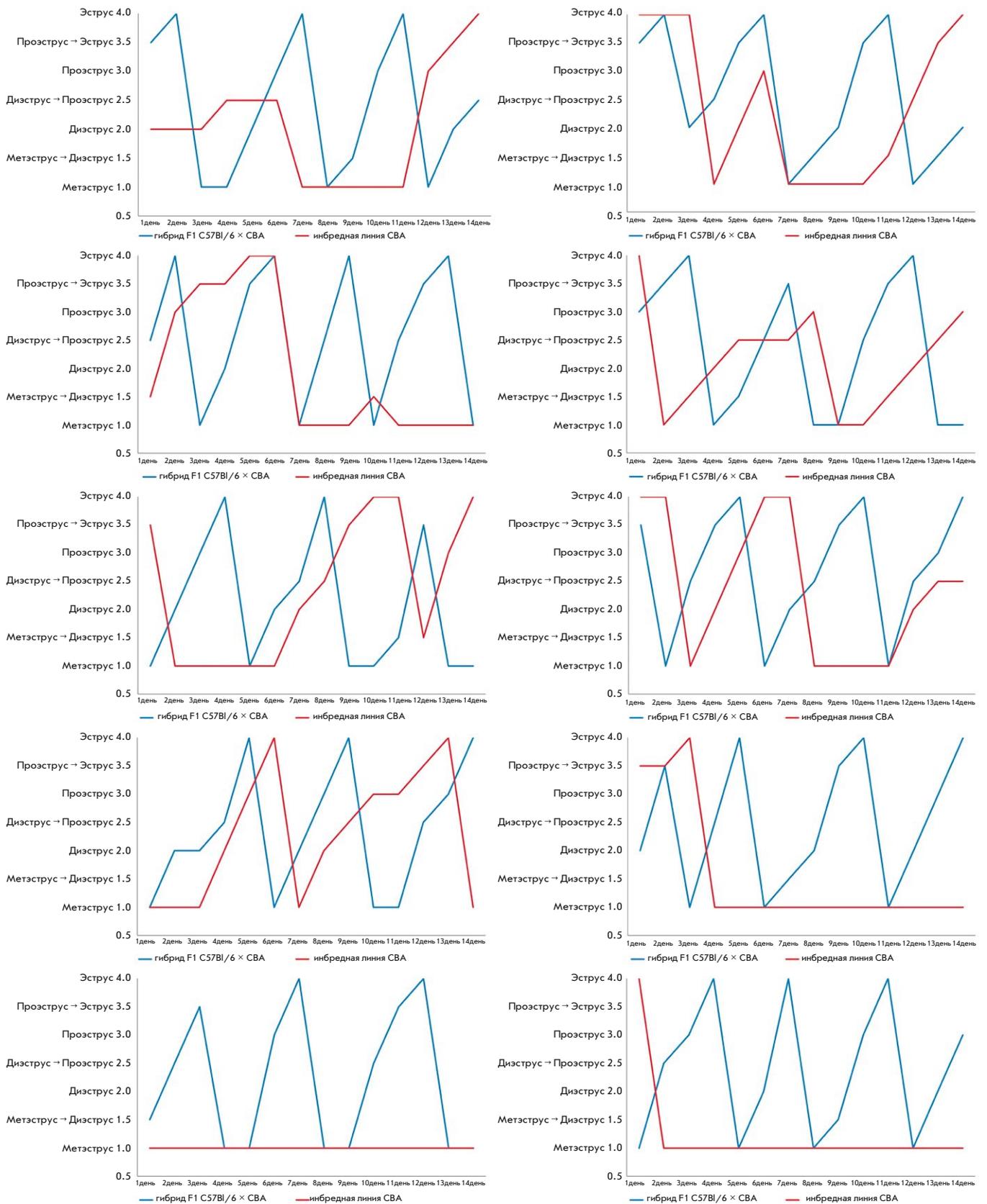


Рис. 4. Динамика эстрального цикла половозрелых самок мышей инбредной линии CBA и гибридов F1 C57Bl/6 × CBA

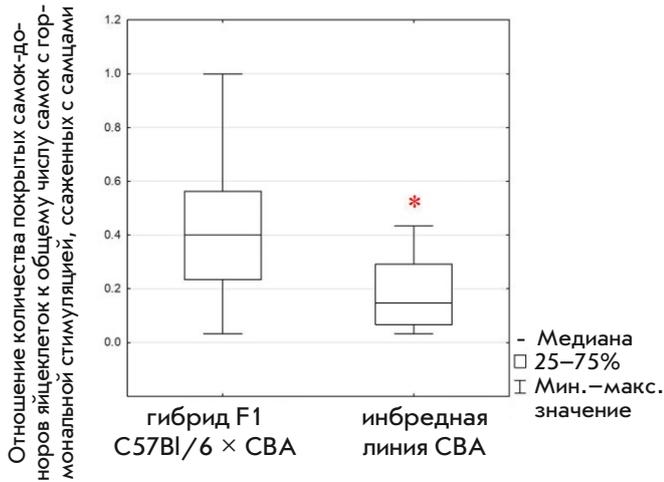


Рис. 5. Эффективность покрытия самок мышей инбредной линии CBA и гибридов F1 C57Bl/6 × CBA самцами соответствующей линии. * $p < 0.01$ Манна–Уитни (U-критерий)

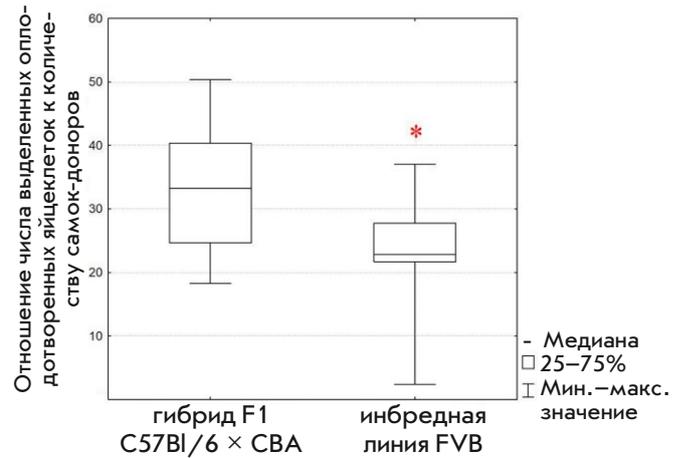


Рис. 6. Количество оплодотворившихся яйцеклеток у самок мышей инбредной линии FVB и гибридов F1 C57Bl/6 × CBA. Суперовуляцию вызывали инъекциями смеси ГСЖК с добавлением антисыворотки ингибина и ХГЧ. * $p < 0.05$ Манна–Уитни (U-критерий)

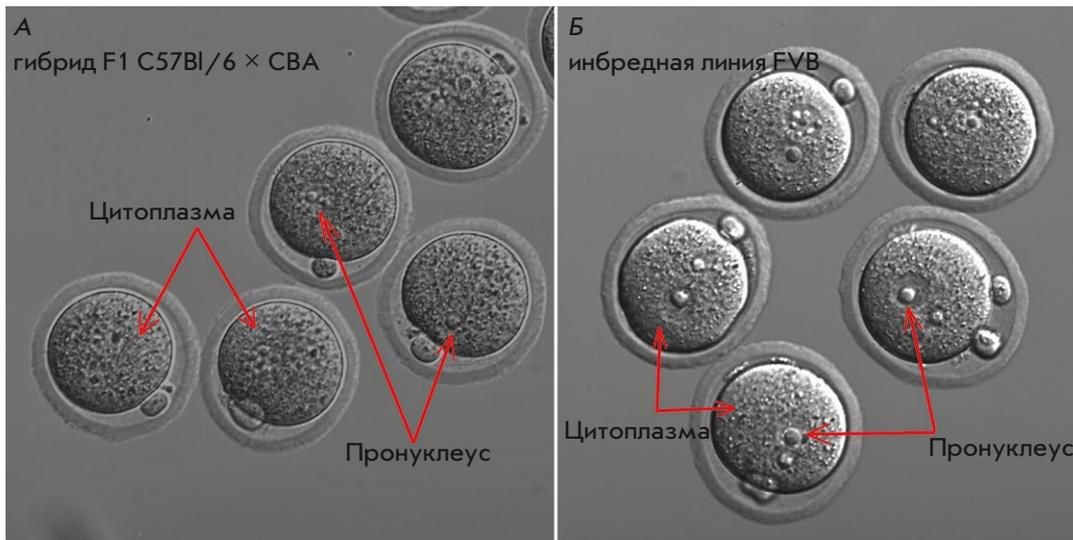


Рис. 7. Особенности структуры оплодотворенных яйцеклеток, предназначенных для микроинъекции генетической конструкции: А – зернистая цитоплазма и плохо различимые пронуклеусы у гибридов F1 C57Bl/6 × CBA; Б – однородная цитоплазма и четко очерченные пронуклеусы у инбредной линии FVB

(рис. 8, таблица). Таким образом, мы пришли к выводу, что самки инбредной линии FVB наилучшим образом подходят в качестве производителей эмбрионов для процедуры редактирования генома.

Выбор линии мышей для использования самок в качестве суррогатных матерей

Следующим этапом в технологии получения трансгенных мышей является подсадка микроинъектированных эмбрионов в инфундибулум и их последующее внутриутробное развитие. Существенную роль здесь играет выбор линии для получения псевдобеременных самок – суррогатных матерей [16, 19, 37]. Процедура микроинъекции крайне травматична для эмбрионов. Сравнение нативных и микроинъ-

ектированных зародышей показало, что последние значительно отстают в эмбриональном развитии [38]. Это накладывает особую ответственность на оператора при проведении операции и подборе суррогатной матери, поскольку при выполнении этой задачи исследователь может столкнуться с рядом ограничений. Небольшие репродуктивные пути мыши и положительное давление в яйцевомеде может привести к обратному выталкиванию эмбрионов в раскрытую полость яичника после подсадки в инфундибулум. Кровь и/или слизь на кончике капилляра может привести к его закупориванию и потере эмбрионов во время операции. Наконец, дефекты маточной восприимчивости, сокращение матки также могут стать причинами неудачной беременности [39].

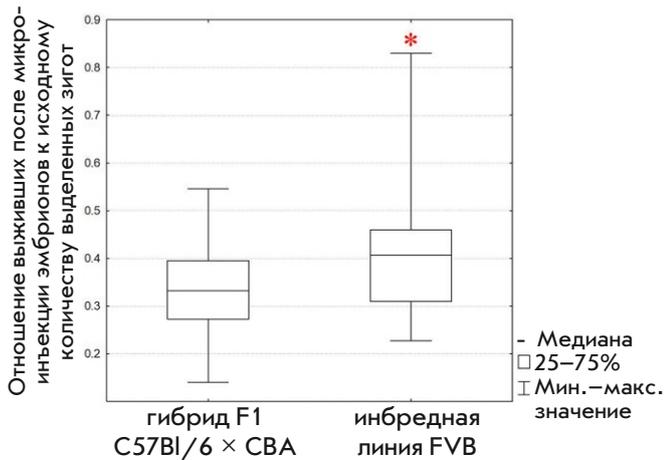


Рис. 8. Влияние генетического фона самок мышей инбредной линии FVB и гибридов F1 C57Bl/6 × CBA на выживаемость эмбрионов после микроинъекции. * $p < 0.05$ Манна–Уитни (U-критерий)

Чтобы оптимизировать проведение операции по подсадке микроинъецированных эмбрионов, обеспечить стабильное протекание беременности, успешное рождение и выживание помета, важно, чтобы линия самки-реципиента имела хорошие репродуктивные характеристики и ярко выраженное материнское поведение [5]. Это подтверждается сообщениями о том, что показатели имплантации эмбрионов и рождаемости мышей разного генетического происхождения в высокой степени зависят от характеристик линии приемной матери [37].

Использование инбредных мышей в качестве суррогатных матерей неэффективно [40]. Чаще всего они становятся «плохими» матерями, что может привести к гибели помета мышей с измененным геномом. Отдельную трудность представляет гибель большей части микроинъецированных эмбрионов после подсадки в яйцевод суррогатной матери. Если в матке выживает только один или два эмбриона, то они могут стать слишком большими, чтобы родиться без ущерба для самих себя и/или матери, а самки некоторых линий вообще могут не заботиться о малочисленных пометах, что тоже приведет к гибели новорожденных трансгенных мышей [5]. Часто в качестве приемных матерей выбирают гибридных самок F1 [18, 19, 28], которые считаются «хорошими» матерями, способными родить и сохранить помет, состоящий даже из двух особей [19, 37]. Сообщалось, что в роли суррогатных матерей используют как гибридных, так и аутбредных мышей [32, 41, 42].

В нашей работе мы сравнили эффективность использования в качестве суррогатных матерей гибридных самок F1 и аутбредных CD1. По результатам трехлетних исследований можно сделать

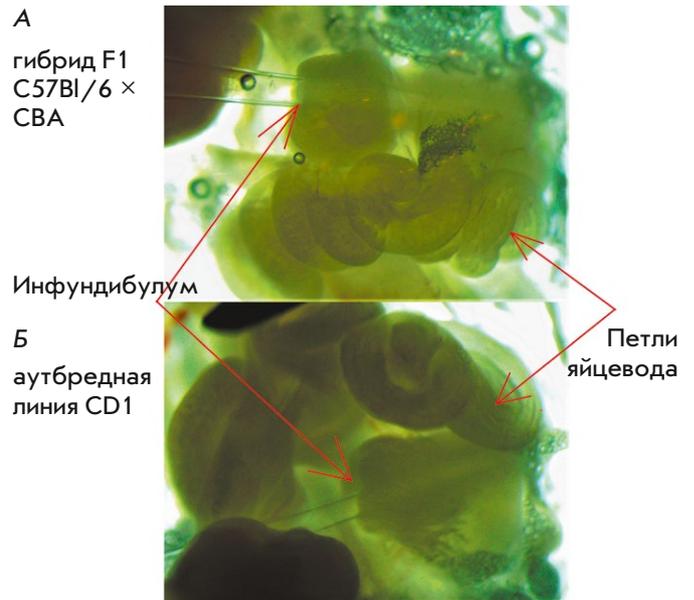


Рис. 9. Особенности строения инфундибулума у суррогатных матерей. А – инфундибулум у гибридов F1 C57Bl/6 × CBA с толстыми стенками и узким входом, Б – инфундибулум у самок CD1 крупный, с тонкими стенками и широким входом

заключение, что по эффективности вынашивания и характеристикам материнского поведения достоверных различий между мышами F1 и CD1 не обнаружено, обе эти линии могут успешно использоваться в качестве суррогатных матерей. Однако самкам CD1 намного удобнее проводить операции по внедрению эмбрионов, чем гибридным мышам. Действительно, как сообщает один из мировых лидеров по производству лабораторных грызунов – Charles River Laboratories, аутбредные мыши CD1 идеальны именно для хирургических операций и использования в качестве суррогатных матерей [43]. Отличительной чертой самок CD1 является больший размер ампулы яйцевода, чем у F1 B6 × CBA [44]. Со своей стороны, мы отмечаем, что, в отличие от F1, самки CD1 имеют крупный, с более тонкими стенками и широким входом яйцевод (рис. 9, таблица). Использование в качестве реципиентов аутбредных самок CD1 позволяет получать трансгенных животных также эффективно, как и при использовании гибридов F1 B6 × CBA.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проанализировав различные схемы создания трансгенных мышей, мы провели ряд изысканий по подбору экспериментальных условий, оптимальных для каждой стадии протокола:

1. Гормональная стимуляция с использованием антисыворотки ингибина значительно (примерно

в 3 раза) повышает продуктивность самок – доноров оплодотворенных яйцеклеток, по сравнению с традиционной гормональной стимуляцией.

2. В качестве доноров наиболее целесообразно использовать мышей линии FVB, зиготы которых имеют пронуклеусы с четкими границами, а эмбрионы обладают высокой выживаемостью после микроинъекции. У этой линии отсутствует необходимость обратного скрещивания с носителем инбредного генетического бэкграунда.

3. Аутбредные самки CD1 так же подходят в качестве суррогатных матерей, как и гибриды F1 B6 × CBA. ●

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 17-75-30027 – в части подбора схемы гормональной стимуляции и РФФИ № 18-29-07005 – в части подбора линий для суперовуляции. Работа была также поддержана программой развития МГУ и научной школой МГУ по функциональной геномике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chan A.W.S. // Cloning. 1999. V. 1. P. 25–46.
- Brinster R.L., Chen H.Y., Trumbauer M., Senechal A.W., Warren R., Palmiter R.D. // Cell. 1981. V. 27. P. 223–231.
- Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E., Trumbauer M.E., Rosenfeld M.G., Birnberg N.C., Evans R.M. // Nature. 1982. V. 300. № 5893. P. 611–615.
- Brinster R.L., Chen H.Y., Trumbauer M.E., Yagle M.K., Palmiter R.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 13. P. 4438–4442.
- Hogan B., Costantini F., Lacy E. Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986. P. 332.
- Cho A., Haruyama N., Kulkarni A.B. // Curr. Protoc. Cell. Biol. 2009. V. 42. P. 19.11.1–19.11.22.
- Gurumurthy C.B., Lloyd K.C.K. // Dis. Model. Mech. 2019. V. 8. № 12(1). P. dmm029462.
- Bagis H., Papuccuoulu S. // Tr. J. Veterinary Animal Sci. 1997. V. 21. P. 287–292.
- Hogan B., Beddington R., Costantini F., Lacy E. Manipulating the Mouse Embryo. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. P. 497.
- Ménoret S., Tesson L., Remy S., Usal C., Ouisse L.H., Brusselle L., Chenouard V., Anegon I. // Transgenic Res. 2017. V. 26. № 5. P. 703–708.
- Volobueva A.S., Orekhov A.N., Deykin A.V. // Braz. J. Med. Biol. Res. 2019. V. 52. № 5. P. e8108.
- Chugunova A., Loseva E., Mazin P., Mitina A., Navalayeu T., Bilan D., Vishnyakova P., Marey M., Golovina A., Serebryakova M., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 12. № 116(11). P. 4940–4945.
- Yamamoto Y., Gerbi S.A. // Chromosoma. 2018. V. 127. № 4. P. 405–420.
- Behringer R., Gertsenstein M., Vintersten N.K., Nagy A. // Cold Spring Harb. Protoc. 2016. V. 2016. № 8.
- Murphy D., Carter D.A. Transgenesis Techniques Principles and Protocols. Part of the Methods in Molecular Biology™ book series. Totowa, N.J.: Humana Press, 1993. V. 18. P. 467.
- Ekambaram G., Sampath Kumar S.K., Joseph L.D. // J. Clin. Diagn. Res. 2017. V. 11. № 1. P. AC05–AC07.
- Caligioni C.S. // Curr. Protoc. Neurosci. 2009. V. 48. A.4I.1–A.4I.8.
- Byers S.L., Wiles M.V., Dunn S.L., Taft R.A. // PLoS One. 2012. V. 7. № 4. P. 35538.
- Paccola C.C., Resende C., Stumpp T., Miraglia S.M., Cipriano I.M. // Anim. Reprod. 2013. V. 10. № 4. P. 677–683.
- Gates A.H. // Nature. 1956. V. 177. № 4512. P. 754–755.
- Luo C., Zuñiga J., Edison E., Palla S., Dong W., Parker-Thornburg J. // J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 2011. V. 50. № 4. P. 471–478.
- Yan L., Li H., Shi Z. // Anim. Reprod. Sci. 2015. V. 163. P. 1–9.
- Makanji Y., Zhu J., Mishra R., Holmquist C., Wong W.P., Schwartz N.B., Mayo K.E., Woodruff T.K. // Endocr. Rev. 2014. V. 35. № 5. P. 747–794.
- Kishi H., Okada T., Otsuka M., Watanabe G., Taya K., Sasamoto S. // J. Endocrinol. 1996. V. 151. № 1. P. 65–75.
- Takeo T., Nakagata N. // PLoS One. 2015. V. 10. № 5. P. e0128330.
- Mann J.R., McMahon A.P. // Methods Enzymol. 1993. V. 225. P. 771–781.
- Auerbach A.B., Norinsky R., Ho W., Losos K., Guo Q., Chatterjee S., Joyner A.L. // Transgenic Res. 2003. V. 12. № 1. P. 59–69.
- Murphy D. // Methods Mol. Biol. 2008. V. 461. P. 71–109.
- Lambert R. Breeding Strategies for Maintaining Colonies of Laboratory Mice. A Jackson Laboratory Resource Manual. Bar Harbor: The Jackson Laboratory, 2009. P. 28.
- Pinkert C. Transgenic Animal Technology. A Laboratory Handbook. 3d ed. Amsterdam: Elsevier, 2014. P. 71–107.
- <https://tasq.uq.edu.au/pronuclear-injection>.
- Kumar T.R., Larson M., Wang H., McDermott J., Bronshteyn I. // Methods Mol. Biol. 2009. V. 590. P. 335–362.
- Keskintepe L., Agca Y., Pacholczyk G.A., Machnicka A., Critser J.K. // Biol. Reprod. 2001. V. 65. № 2. P. 407–411.
- Redina O.E., Amstislavsky S.Ya., Maksimovsky L.F. // J. Reprod. Fertil. 1994. V. 102. № 2. P. 263–267.
- Cora M.C., Kooistra L., Travlos G. // Toxicol. Pathol. 2015. V. 43. № 6. P. 776–793.
- Taketo M., Schroeder A.C., Mobraaten L.E., Gunning K.B., Hanten G., Fox R.R., Roderick T.H., Stewart C.L., Lilly F., Hansen C.T., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 6. P. 2065–2069.
- DePamphilis M.L., Herman S.A., Martínez-Salas E., Chalifour L.E., Wirak D.O., Cupo D.Y., Miranda M. // Biotechniques. 1988. V. 6. № 7. P. 662–680.
- Lin T.P. // Science. 1966. V. 151. P. 333–337.
- Munne S., Alikani M., Tomkin G., Grifo J., Cohen J. // Fertil. Steril. 1995. V. 64. № 2. P. 382–391.
- Rose C., Schwegler H., Hanke J., Yilmazer-Hanke D.M. // Theriogenology. 2012. V. 77. № 9. P. 1883–1893.
- Modzelewski A.J., Chen S., Willis B.J., Lloyd K.C.K., Wood J.A., He L. // Nat. Protoc. 2018. V. 13. № 6. P. 1253–1274.
- Mahabir E., Volland R., Landsberger A., Manz S., Na E., Urban I. // J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 2018. V. 57. № 2. P. 110–114.
- <https://www.criver.com/products-services/find-model/cd-1r-igs-mouse?region=3616>
- Haydar B. // Turk J. Vet. Anim. Sci. 2002. V. 26. P. 329–333.