

EGÉR KIMÉRA UTÓDOK LÉTREHOZÁSA INJEKTÁLT ÉS MÉLYHŰTÖTT BLASZTOCISZTÁKBÓL*

POLGÁR ZSUZSANNA — BODÓ SZILÁRD — KOBOLÁK JULIANNA — SOLOMON MAMO —
TÁNCOS ZSUZSANNA — TÓTH SZABOLCS — GÖRHÖNY BOTOND — DINNYÉS ANDRÁS

ÖSSZEFOGLALÁS

Biológiai kísérleti rendszerekben gyakran előfordul, hogy nem áll rendelkezésre megfelelő számú recipiens állat a kísérletben létrehozott embriók beültetéséhez. Ilyen esetekben rendkívül hasznos, ha rendelkezésre áll egy megbízható embrióátrolási rendszer.

A kísérleti rendszerben, a szerzők, 69 blasztociszta stádiumú embriót injektáltak ES sejtekkel egér kiméra utódok létrehozására. Hat-nyolc hetes korú szuperovuláltatott, ICR nőtényekből blasztocisztaakat nyertek ki. A blasztociszta-injektálást Piezo mikroinjektor segítségével hajtották végre. Az embriók blasztocöljébe 10–12, ép membránnal rendelkező ES sejtet injektáltak be. Az ES-klónokat két génkiűtött sejtvonal (R1, HM-1) elektroporált kionjaiból válogatták, PCR analízist követően.

A mikromanipuláció után 35 embriót vitrifikáltak, és 34 injektált blasztocisztát még frissen, vazektomizált hímekkel párosztatott, álvemhes ICR recipiens nőtényekbe ültettek.

A vitrifikációs eljárás során 6,5 M glicerolt tartalmazó úgynevezett VS3 vitrifikációs oldatot használtak. Az embriókat 0,25 ml-es műszalmákba töltötték és folyékony nitrogénben tárolták a beültetés napjáig.

Hat, 6–8. hetes korú, álvemhes ICR recipiens nőténybe, egyoldali uterus-transzferrel ültettek 8–14 injektált, illetve injektált mélyhűtött-felolvasztott blasztocisztát.

A beültetést követő 19–21. napon, a mélyhűtés nélküli embriók 38,24%-a, a mélyhűtötték 39,29%-a született meg ($P > 0,005$, χ^2 teszt). A nem mélyhűtött blasztocisztákból született egerek 46,15%-a, a nitrogénben tároltak 36,36%-a volt kiméra.

Mivel a mélyhűtés nélküli kontroll csoporthoz képest nem tapasztaltak jelentős eltérést a született utódok arányát tekintve, megállapítható, hogy az alkalmazott vitrifikációs eljárás alkalmas mikromanipuláción átesett embriók hosszú távú tárolására.

SUMMARY

Polgár, Zs.Ms. – Bodó Sz. – Kobolák, J.Ms. – Solomon, M. – Táncos, Zs.Ms. – Tóth, Sz. – Görhöny, B. – Dinnyés, A.: PRODUCTION OF CHIMERIC MICE FROM INJECTED AND VITRIFIED BLASTOCYSTS

Recently a large number of knock out mice have been produce in many laboratories. Microinjection of embryonic stem (ES) cells into mouse blastocysts is one of the most important techniques for production of knockout or transgenic mice. In the biological experimental systems are eventuated to have no available recipients. In that case a dependable cryopreservation method is very important to keep the valuable embryos safe.

In the project 69 blastocysts were injected with ES cells to produce chimeric mice. ICR females (6-8 weeks old) were use to obtain blastocysts. The blastocyst injection was made by piezo-micromanipulator. Ten to twelve ES cells with intact membrane were injected into the blastocoel cavity. The ES clones were selected by PCR from two successful electroporated cell lines (R1, HM1).

After the micromanipulation, 35 injected blastocysts were vitrified and 34 fresh injected blastocysts were transferred to pseudo-pregnant recipients. The cryopreservation method used VS3a solution which contain 6.5 M glycerol. The embryos were loaded into 0.25 ml plastic straws and kept in liquid nitrogen until the transfer day. One time 8-14 fresh or vitrified-thawed injected blastocyst were transferred directly one uterus horn of 6 pseudopregnant recipients.

* A kutatást az OTKA T046171; NKTH BIO-00017/2002, TET TR3/03 támogatta

On the 19–21 pregnancy days, the transfer of the blastocysts to pseudopregnant recipients, 38.24% of the vitrified blastocysts and 39.29% of the fresh blastocysts were born as healthy young. ($p > 0.005$ by χ^2 test). The efficiencies of coat chimera mice were 46.15% for the fresh blastocysts and 36.36% for the cryopreserved ones.

In the work, they have not observed big different between the rate of the cryopreserved and fresh blastocysts. This study demonstrated the vitrification method that was used could be successful for the long term storage of the injected mice blastocysts.

BEVEZETÉS

Napjainkban transzgénikus és génkiütött (knock out, KO) egereket számos laboratóriumban állítanak elő. Transzgénikus állatok előállítása több módszerrel lehetséges. Az egyik legelterjedtebb eljárás a zigóta mikroinjektálás DNS oldattal. Azonban nem csak ezzel a módszerrel lehetséges egy, az utódokra tovább adódó genetikai módosítás létrehozása, hanem sejtvonalak segítségével is. Ilyenkor a Petri-csészében, *in vitro* körülmények között tenyésztett sejtek manipulálhatóak (pl.: elektroporálással, lipofekcióval, stb.), majd embrióba ültethetők. Testi sejtek tenyésztéseinek manipulálásakor transzgénikus egyed csak a sejtmag-átültetési klónozás révén nyerhető. Azonban embrionális őssejteket alkalmazva, azok blasztociszta stádiumú embriók blasztocöljébe injektálhatók. Az így bejuttatott sejtek képesek integrálódni a belső sejtcsomóba, majd az embrió szöveteivé differenciálódni, ún. kiméra állatot hozva létre. A homológ rekombináció lehetőségét kihasználva, pedig az ES sejtek hatékony rendszert képviselnek az ún. génkiütött állatok létrehozására is.

Az embriológiai kísérletekben gyakran előfordul, hogy nincs elegendő számú recipiens állat az embriók beültetéséhez. Habár egerek esetében is lehetőség van a recipiensek hormonális szinkronizálására, azonban ilyenkor jelentősen csökken az implantáció hatékonysága (Ertzeid és Storeng, 2001). Ezért a laboratóriumi gyakorlatban, az egerek természetes, négy napos, ivari ciklusát használják ki az álvemhes nőtények létrehozására. Ennek ellenére előfordul, hogy a vazektomizált hímekek párosztatott nőtények közül nincs megfelelő számú recipiens nőtény. Ilyen esetekben rendkívül hasznos, ha rendelkezésre áll egy megbízható embrióátviteli rendszer, amivel az embriók megőrizhetők a beültetésig.

Kísérleteinkben egy egyszerű embrió mélyhűtési metodikát (Dinnyés és mtsai, 1996) alkalmaztunk az injektált blasztocisztákon. Eredményeink alapján megállapítható, hogy az alkalmazott vitrifikációs eljárás alkalmas a mikromanipuláción átesett embriók hosszú távú tárolására.

ANYAG ÉS MÓDSZER

ES sejtek tenyésztése

A sejtek tenyésztését Nagy és mtsai (2003) kézikönyvében közölt protokollját követve végeztük, az alábbiak szerint. Az ES sejtek differenciálatlan állapotban való fenntartásához mitomicin C antibiotikum kezelt (Sigma, 10 $\mu\text{g/ml}$),

13,5 napos egér embrió kötőszövetes részeiből származó embrionális fibroblaszt (MEF) tápláló sejtréteget használtunk. A sejteket DMEM médiumban (Gibco) tenyésztettük, 15% FCS kiegészítés mellett (Hyclone). A médium L-glutamin (Gibco; 2mM), β -merkaptotoethanol (Sigma; 0,1 mM), Na-piruvát (Gibco, 1mM) nem esszenciális aminosav (Sigma, 10mM), penicillin (Gibco, 50 U/ml), streptomycin (Gibco, 50 μ g/ml) és rekombináns egér Leukémia Inhibitor Faktor (ESGRO-LIF; Chemicon; 1000 U/ml) kiegészítést tartalmazott. A sejteket kétnaponta passzáltuk át Tripszin:EDTA (0,25% tripszin; Gibco) kezelést végezve, új mitomicin C kezelt fibroblaszt sejtrétegre, az optimális sejtszám beállítását követően.

ES sejtek elektroporálása, KO klónok létrehozása

Az elektroporáláshoz a sejteket 800 μ l elektroporációs oldatban vettük fel, 10⁷ sejt/ml koncentrációban. A sejtekhez ezt követően, a bevinni kívánt transzgen konstrukciót 20 μ l dH₂O-ban felvéve kevertük hozzá, majd azonnal elektroporátor küvettába helyeztük (0,4 mm elektród távolság; BioRad) és elektroporáltuk (Genew Pulser X, BioRad; 240 V, 500 μ F, 250 Ω).

Ezt követően a sejteket tenyésztő médiummal hatszoros térfogatra hígítottuk, majd mitomicin C kezelt MEF tápláló sejtréteget tartalmazó, 10 cm-es petricsészékre szélesztettük. Az antibiotikum szelekciót 48 óra múlva kezdtük meg (200 μ g/ml G418). A kiókok szelektálása 2 hét elteltével kezdődött.

A szelektált kiókokat sztereo mikroszkóp alatt (SZH, Olympus) mikropipetta segítségével emeltük ki egyedileg, 96-lyukú tenyésztőedénybe. A klónok felnevelkedését követően a tenyészeteket 3 felé osztottuk, tripszinezést követően, ahol 1/3 rész PCR-analízisre került, 1/3 részt fagyasztásra, míg 1/3 részt további tenyésztésre használtunk fel. A PCR analízist a targetált szekvencia alapján tervezett primerekkel végeztük. A PCR pozitív kiókokat a 96-lyukú tenyésztőedényből izoláltuk, majd 24-lyukú, végül pedig 6 cm-es Petri csészében tenyésztettük tovább, a szokásos ES-tenyésztési protokollt követve. A kiókokat fagyasztáshoz és genomiális DNS izoláláshoz szaporítottuk fel, ahol a szokásos Southern-blot analízissel vizsgáltuk a génkiütés sikerét.

KO ES sejtek felhasználása kiméra előállításra

A sejtek tenyésztése a sztenderd protokoll szerint történt (Nagy és mtsai, 2003). A 24 órával korábban passzált sejteken tripszines kezelést alkalmazva szuszpenziót készítettünk. A sejteket 10 cm-es Petri csészére szélesztettük 15 perc időtartamra (preplating). Ezt követően a le nem tapadó sejteket összegyűjtöttük, majd lecentrifugáltuk és a sejt-pelletet a blasztociszta injektáláshoz kialakított HEPES-pufferelt (Sigma) tápoldatban szuszpendáltuk fel. Ezt követően a sejtuszuszpenziót jégre helyeztük 30 percre, majd injektáltuk azokat.

Egér embriók kinyerése

Kísérleteinkhez, 6–8. hetes, szuperovuláltatott, a vemheség negyedik napján leölt ICR nőtények méhéből blasztocisztákat nyertünk ki. Az embriókat CZB médiumban kultiváltuk a mikromanipulációs beavatkozásig.

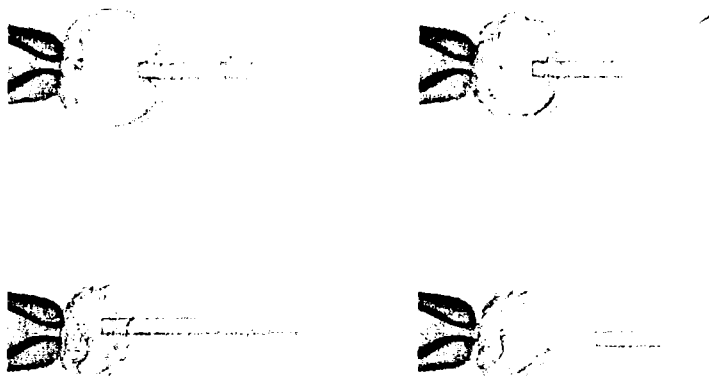
A mikromanipulációs eljárás

A mikromanipulációhoz szükséges mikropipettákat — injektáló kapilláris és tartókapilláris — kapilláris húzó (Sutter) és mikrohuta (Narishige) berendezések segítségével állítottuk elő.

A mikromanipulációt szobahőmérsékleten végeztük CZB-Hepes médiumban, Olympus IX71 inverz mikroszkópra szerelt Narishige mikromanipulátorokkal.

A blasztociszta-injektálást Piezo mikroinjektor segítségével hajtottuk végre. Az embriók blasztocöljébe 10–12 ép membránnal rendelkező összejtet injektáltunk be.

1. ábra: Blasztociszta-injektálás Piezo mikroinjektorral



A blasztocisztákat holder pipetta segítségével rögzítették, majd Piezo kapilláris segítségével injektálták a blasztocölbe az ES sejteket(1)

Fig. 1.: The procedure of blastocyst injection by Piezo microinjector

The blastocysts were immobilized on the tip of a holdig pipette and the Piezo pipette was pushed into the blastocoel cavity to load the ES cells.

Az összejteket két génkiűtött sejtvonal (R1, HM-1) klónjaiból válogattuk, PCR analízist követően.

A munka során két ES sejtvonalat használtunk fel. Az R1 sejtvonalat (p9) egy torontói laboratóriumból kaptuk (Nagy és mtsai, 1993, 2003), valamint a HM-1 (p22) sejtvonalat, amelyet a Roslin Institute bocsátott a rendelkezésünkre (Magin és mtsai, 1992; McEwan és Melton, 2003).

VS3a vitrifikáció

A vitrifikációs eljárás során 6,5 M glicerolt és 6% szarvasmarha szérum albumint (BSA) tartalmazó CZB-H oldatba, úgynevezett VS3a vitrifikációs oldatot használtunk. Az embriókat 20 percig 25%-os VS3a oldatban tartottuk szobahőmérsékleten ezután 65%-os VS3a oldatban átmostuk, majd 1 perc alatt

100% VS3a oldatban 0,25 ml-es műszalmákba töltöttük. A műszalmákat folyékony nitrogén gőzében 3 percig hűtöttük (kb. -150°C -on) és végül folyékony nitrogénben tároltuk a beültetés napjáig. A felolvasztás során a műszalmát 10 másodpercig tartottuk levegőn, majd 10 másodpercre 37°C -os vízfürdőbe helyeztük. A szalma végeinek levágása után az embriókat 0,5 M-os szacharózt tartalmazó CZB-H oldatba helyeztük 1 percre, majd 2-2 percre 0,25, illetve 0,125 M-os szacharóz oldatban átmostuk az embriókat. Ezután CZB-H oldatban maradtak az embriók a beültetésig.

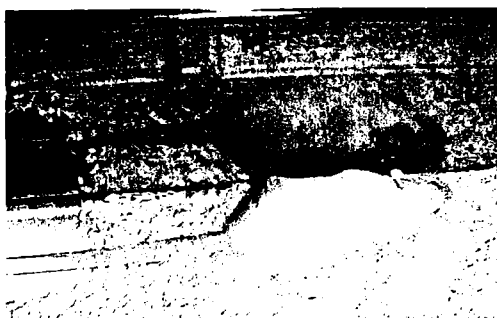
Embrió beültetés

Az embrió beültetéseket a Hogan és mtsai (1994) által leírtak szerint végeztük. Recipiensenként 6–8. hetes korú, álvemhes ICR nőtényt használtunk, 4–6 korai hólyagcsírárt ültettünk a baloldali méhszarvba. Az állatok altatásához 0,015 ml/testsúly gramm 2,5%-os AVERTIN-t használtunk. Egy ültetés alkalomával 8–14 frissen injektált, vagy injektálást követően mélyhűtött, majd később felolvasztott blasztocisztát transzferáltunk.

EREDMÉNYEK

Kísérleti rendszerünkben 69 blasztociszta stádiumú embriót injektáltunk ES sejtekkel egér kiméra utódok létrehozására. A mikromanipuláció után 35 embriót vitrifikáltunk, és 34 injektált blasztocisztát még frissen, vazektomizált hímekkel pároztatott, álvemhes ICR recipiens nőtényekbe ültettünk. A 34 kontroll injektált embrióból 13 (38,24%) született meg, míg a 34 mélyhűtött injektált embrióból a felolvasztás után 28 került beültetésre, amiből 11 (39,29%) született meg (1. kép).

1. kép: Kiméra utód



Picture 1.: Chimera progeny

A megszületett utódok közül a kontroll csoportban 46,15% lett kiméra, míg ugyanez a mélyhűtött-felolvasztott csoportban 36,36% volt (1. táblázat).

Kiméra utódok létrehozása mélyhűtött illetve frissen beültetett injektált blasztocisztákból

	Injektált blasztociszta(1)	Mélyhűtött (VS3a)(2)	Beültetett(3)	Élve született(4)	Kiméra(5)
Kontroll(6)	34	0	34	13/34 38,24%	6/13 46,15%
Mélyhűtött(2)	35	34	28	11/28 39,29%	4/11 36,36%

Table 1.: Chimeric mice produced from vitrified and fresh ES injected blastocysts injected blastocysts(1), vitrified(2), transferred(3), live offsprings(4), chimeras(5), control(6)

KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink alapján elmondható, hogy az a mélyhűtési metodika, amit alkalmaztunk, az injektált blasztocisztákon nem befolyásolta az élveszületett utódok arányát a kontroll csoporthoz képest (38,24% vv. 39,29%). Ezért az adott kísérleti rendszerben az alkalmazott vitrifikációs eljárás alkalmas mikromanipuláción átesett embriók hosszú távú tárolására.

A kimérák arányát tekintve a mélyhűtött csoporton belül 10%-kal csökkent a kimérák aránya a kontrollcsoportéhoz képest, azonban ez a különbség az alacsony egyedszám miatt statisztikailag nem volt igazolható.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönet mondani az állatházi gondozónak *Bara Sándorné Katalinnak*, valamint a labor asszisztenciának *Kungl Gyögyinek* és *Chelemen Mártának*.

IRODALOM

- Dinnyés, A. – Carolan, C. – Lonergan, P. – Massip, A. – Mermillod, P.(1996) Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced in vitro in synthetic oviductal fluid. *Theriogenology*, 46. 1425–1439.
- Ertzeid, G. – Storeng, R.(2001) The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Human Reproduction*, 16. 221–225.
- Hogan, B. – Beddington, R. – Constantini, F. – Lacy, E.(1994): Manipulating the mouse embryo. Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Hartor, Laboratory Press, NY, USA, 178–181.
- Magin, T.M. – McWhir, J. – Melton, D.W.(1992) A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic Acids Res.*, 20. 14. 3795–3796.
- McEwan, C. – Melton, D.W.(2003) A simple genotyping assay for the Hprt null allele in mice produced from the HM-1 and E14TG2a mouse embryonic stem cell lines. *Transgenic Res.*, 4. 519–20.

- Nagy, A. – Gertsenstein, M. – Vinterstein, K. – Behringer, R.(2003): Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. 3rd Edition. Cold Spring Harbour, NY, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 800.
- Nagy, A. – Rossant, J. – Nagy, R. – Abramow-Newerly, W. – Rode, J.C.(1993): Derivation of completely culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. Proc Natl. Acad Sci., USA, 90. 8424–8428.

Érkezett: 2006. február

Szerzők címe: Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Állatbiológiai Intézet

Authors' address: Agricultural Biotechnology Center (ABC), Department of Animal Biology
H-2101 Gödöllő, Szent Györgyi A. u. 4.