

МЕТОДЫ ВВЕДЕНИЯ ВЕЩЕСТВ И ОРГАНЕЛЛ В КЛЕТКУ В ТЕХНОЛОГИЯХ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ

© В. А. Никитин

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл.;
электронный адрес: vnikitin2001@rambler.ru, mgmac@phys.protres.ru

Приведена классификация по способу проникновения через мембрану порядка 40 методов введения в живую клетку генетического материала, веществ и органелл (описаны в монографии: В. А. Никитин «Микроинъекция», <http://cam.psn.ru>). Каждый из этих методов имеет свои особенности, преимущества и недостатки в отношении выживаемости клеток, эффективности введения, универсальности, возможностей технического осуществления. В данной работе мы остановились на описании ряда новых и усовершенствованных нами подходов, методов и приборов для микрохирургии и микроинъекции клеток с помощью стеклянных микропипеток с целью их применения в области клеточной инженерии. Обсуждаются проблемы низкой эффективности клонирования клеток и необходимость создания таких методических приемов микрохирургии и микроинъекции клетки, которые минимизировали бы возможность ее повреждения при проведении микрооперации.

Ключевые слова: микрохирургия единичной клетки, микроинъекция, пересадка ядер, клонирование, клеточная инженерия.

В клеточной и генной инженерии, генетике и биологии развития введение веществ и органелл в живую клетку применяют для изучения влияния генов на наследственность, исследования вопросов дифференцировки и развития клеток и тканей, взаимодействия ядра и цитоплазмы, проведения тонких операций на клетках, пересадки ядер с целью получения клонов, в том числе из стволовых клеток (Wilmut et al., 1997; Шкуматов, 2001; Illmensee, 2002; Di Bernardino et al., 2003; Gurdon, Byrne, 2003; Hochedlinger, Jaenisch, 2003; Batchelder et al., 2005). Создатели и разработчики методов проникновения в клетку предлагают различные их классификации и в целях систематизации, и для того чтобы помочь экспериментаторам выбрать тот способ введения, который может быть наиболее пригоден для решения конкретных задач. Так, Селис (Celis, 1984) делит методы микроинъекции на три типа в зависимости от способа доставки макромолекул в реципиентные клетки: прямая микроинъекция стеклянными микропипетками, доставка веществ с помощью переносчиков и перенос веществ за счет создания условий переноса. Риджуэй (1991), характеризуя методы введения генетического материала в клетки млекопитающих, делит эти методы на четыре типа. Первый тип — трансфекция введением ДНК в клетки в форме, облегчающей прохождение через клеточную мембрану: микроэлектрофорез, электропорация. Са-фосфатный метод и обработка поликатионами (Graham, Van der Eb, 1973; Huther, Andra, 1980; Ocho et al., 1981; Neumann et al., 1982; Sussman, Milman, 1984; Gopal, 1985). Второй тип — это слияние клеток-мишеней с ДНК, упакованной в «тени» эритроцитов или липосомы (Furusawa et al., 1974; Loyter et al., 1975; Kaltoft, Celis,

1978; Krieger et al., 1978; Schaefer-Ridder et al., 1982; Celis, 1984). Высокий уровень трансфекции достигнут при непосредственной микроинъекции в ядро клетки в ставших классическими работах (Diacumakos, 1973; Capreschi, 1980; Graessmann et al., 1980). Это третий тип методов, широко используемых для трансгенеза (Hanahan, 1985; Ornitz et al., 1985; Niemann et al., 2005; Smith, Mohun, 2005; Derouazi et al., 2006). Четвертый тип микроинъекции генов (Риджуэй, 1991) — это использование рекомбинантных вирусов (Van der Putten et al., 1985), что, несмотря на ряд ограничений и недостатков метода, применяется во многих исследованиях (см. обзоры: Colosimo et al., 2000; Stanford et al., 2001; Tesson et al., 2005). В недавнем обзоре (Stephens, Pepperkok, 2001) авторы делят множество способов пересечения плазменной мембраны на три класса: прямая микроинъекция с помощью стеклянных капилляров, перенос молекул с помощью переносчиков и пермеабиллизация плазменной мембраны с использованием химических веществ, биологических токсинов или электрических импульсов. В последнем, 4-м, издании «Молекулярной биологии клетки» (Alberts et al., 2002) методы введения веществ или органелл в клетку разделены на четыре группы: прямая микроинъекция с помощью микропипетки, метод электропорации, метод с использованием переносчиков вещества («теней» эритроцитов, липосом и др.) и биолитинг с использованием «генетического ружья». Несмотря на возрастающий интерес к неинъекционным методам, ни один из них не стал пока широко распространенным.

В таблице представлена проведенная нами классификация около 40 методических приемов введения гене-

Введение чужеродного материала в клетку

Метод	Литературный источник
I. Прямая микроинъекция (микроманипуляционные методы): микроинъекция под давлением через стеклянные микропипетки	Diacumakos, 1973; Graessmann et al., 1980; Viigipuu, Kallio, 2004 Yamamoto et al., 1982
прокол клеток микроиглой, проходящей через раствор инъецируемого материала микроинъекция в сочетании с микроэлектрофорезом микроэлектрофорез	Lo, 1983 Bowman, Tedeschi, 1980; Ocho et al., 1981; Александров, 1983; Первис, 1983 Laffafian, Hallett, 1998
введение липидов и связанных с липидами молекул в цитоплазму без проникновения кончика микропипетки в клетку («slam» — simple lipid-assisted microinjection) введение макромолекул с помощью стеклянной микропипетки с наружным диаметром 0.2 мкм в иммобилизованные (прикрепленные к субстрату) кроветворные клетки спинного мозга	Davis et al., 2000
II. Биологическая баллистика (биолистика): высокоскоростной механической пробой клетки биолистическая трансфекция при помощи частиц золота, ускоренных под действием электрического поля	Klein et al., 1992 Johnston, 1990; Bridgman et al., 2003
III. Перфорационные: электропорация обработка клеток ультразвуком перфорация плазматической мембраны при помощи фильтров соскабливание клеток с субстрата в присутствии экзогенного материала центрифугирование клеток в среде с ДНК в сочетании с электропорацией осмотическая перфорация плазматической мембраны пробой клетки лазерным микролучом	Neumann et al., 1982; Hibbitt et al., 2006 Nozaki et al., 2003; Zarnitsyn, Prausnitz, 2004 Siebrasse et al., 2002 Fechheimer et al., 1987 Li et al., 1999 Lieber et al., 1987 Kurata et al., 1986; Tao et al., 1987
IV. Опосредованное введение:	Willadsen, 1986; Чайлахян и др., 1987; Gao, 2006 Antonov, 1990 Bardsley, 1990 Gil'iano et al., 1988; Prince et al., 1999 Miller et al., 2000
а) действие физических факторов электрослияние кариопласта клетки-донора с энуклеированной клеткой-реципиентом термослияние клеток электроакустическое слияние клеток слияние клеток после γ -облучения слияние клеток после облучения их поверхности инфракрасным лазером б) действие химических и биологических факторов слияние клеток и микроклеток-доноров с клетками-реципиентами с помощью политэтиленгликоля (ПЭГ), фитогемагглютинаина, ПЭГ/ДМСО копреципитация Са-фосфатный метод Sr-фосфатный метод использование порообразующего токсина — стрептолизина-О в) действие биологических факторов слияние клеток и микроклеток-доноров с клетками-реципиентами с помощью инактивированного вируса Сендай использование «теней» эритроцитов использование липосом	McNeill, Brown, 1980; Sanford, Stubblefield, 1987; Kishi et al., 2003; Yang, Shen, 2006 Ishiura et al., 1982; Walters, Welsh, 1999 Reddel et al., 1988; Jackman et al., 1998 Walev et al., 2001
перенос генов включением их в клетки бактериальных протопластов	Fournier, Ruddle, 1977; Mann, Lovell-Badge, 1984; Yabuuchi et al., 2004 Furusawa et al., 1974; Boogard, Dixon, 1983 Fraley, Papahadjopoulos, 1982; Schaefer-Ridder et al., 1982; Ropert, 1999 Rassoulzadegan et al., 1982; Gokhale et al., 1993
перенос генов с изолированными хромосомами	McBride, Ozer, 1973; Scangos, Ruddle, 1981; Hadlaczky, 2001 Kando, Okayama, 1990 Gopal, 1985 Lewis et al., 1980; Lopata et al., 1984
метод Тэн-Окаямы ДЭАЭ-декстрановый метод спонтанное поглощение нуклеиновых кислот в присутствии криопротекторов и многоатомных спиртов перенос ДНК в ядра клеток млекопитающих с помощью агробактерий	Ziemienowicz et al., 1999
V. Трансфекция с помощью «векторных систем»: использование вирусов доставка сегментированной чужеродной ДНК в эмбриональные клетки с помощью сперматозоидов после совместной инкубации рецепторопосредованный эндоцитоз молекулярных конструкций	Mellon et al., 1981; Dani, 1999; Conese et al., 2004 Lavitrano et al., 1989; Pittoggi et al., 2006
использование моноклональных антител доставка веществ в лизосомы макрофагов при помощи Protozoa для молекулярной терапии	Соболев и др., 1994; Soboлев et al., 1998; Ivanova et al., 1999; Hwa Kim et al., 2005 Tagawa et al., 1988; Yano et al., 2000 Vaccaro, 2000

тического и другого материала по способу проникновения в клетку. Все эти группы методов кардинально различаются техникой своей реализации. Следует отметить, что основная масса методов является или доставкой веществ в цитоплазму, или «трековой» — перенос вещества через цитоплазму в ядро, при котором на пути переноса остается следовое количество вводимых молекул. Каждый метод имеет свои особенности, преимущества и недостатки в отношении выживаемости клеток, эффективности введения, универсальности и возможностей технического осуществления. К способам прямой, адресной доставки веществ относится прежде всего метод микроинъекции в клетку и ее органеллы через стеклянные микропипетки, на котором мы остановимся в настоящей работе. Будут рассмотрены некоторые подходы, приемы и устройства — как усовершенствованные, так и вновь созданные нами на основе представлений цитологии и клеточной инженерии для прямого переноса в клетку и из клетки генетического и иного материала с помощью стеклянных микропипеток, в том числе при клонировании млекопитающих методом пересадки ядер.

Объекты исследования. Работы проводили на ранних эмбрионах млекопитающих — мышах CBWA-тетрагибридах (albino), CBA × C57 (agouti) и C57BL/6. Возраст мышей не превышал 1.5—2.0 мес.

Культивирование оперированных яйцеклеток и определение жизнеспособности эмбрионов проводили *in vitro* в модифицированной синтетической питательной среде Виттена (Whitten, 1971), содержащей 10 мкМ Na₂ ЭДТА (Abramczuk et al., 1977), в специальных камерах (Березовская и др., 1986) при 37 °С в присутствии 5 % CO₂ в течение 24—72 или 24—48 ч соответственно.

Микрохирургия. Для микрохирургии в среду вводили цитохалазин Б в дозе 5 мкг/мл (Serva) (Hoppe, Illmensee, 1977). Микрохирургическую операцию по удалению мужского и женского пронуклеусов с последующим введением полученного таким образом кариопласта под *zona pellucida* энуклеированной зиготы проводили, руководствуясь описанием микрооперации (McGrath, Solter, 1983), со значительными модификациями, описанными ниже. Время инкубации зигот в среде до операции не превышало 15 мин. Все манипуляции с клетками проводили при комнатной температуре и в основном по разработанному в процессе исследования методу, с помощью специальных оригинальных микроинструментов и приборов.

Реконструкция клетки методом пересадки ядер. Мы используем понятие «реконструкция клетки» для обозначения восстановления единичной клетки как целого и восстановления ее жизнедеятельности путем манипуляций, включающих в себя пересадку ядер, разделение клеток ранних предимплантационных эмбрионов, микроинъекцию, электрослияние и др., в результате чего она приобретает новые или аналогичные предыдущим качества.

Самой распространенной технологией реконструкции клетки, или клонирования, является пересадка ядер — из эмбриональной или соматической клетки, а в последнее время и из стволовых клеток — в энуклеированный ооцит или оплодотворенную яйцеклетку. Пересадка ядер осуществляется в несколько этапов: энуклеация клетки-реципиента, аспирация ядра клетки донора в микропипетку, микроинъектирование кариопласта клетки-донора в энуклеированную клетку-реципиент или

слияние его с оопластом клетки-реципиента с помощью нехирургических методов, например электрического импульса, инактивированного вируса Сендай, полиэтиленгликоля.

Общепринято проводить пересадку ядер по следующей схеме: клетку фиксируют с помощью микроприсоски-держателя и вводят в нее различные микроинструменты для микрохирургии. При таком способе удерживания клетки невозможно избежать значительных ее деформаций и даже повреждения (Никитин, Фесенко, 2006). Было показано, что практически сразу после начала фиксации клетки с использованием отрицательного давления, создаваемого в микроприсоске-держателе, часть бластомера заходит в пипетку, а на фотографиях, сделанных после микроинъекции, наблюдается значительное уменьшение перивителлинового пространства эмбриона, а затем и уменьшение бластомера, что можно объяснить только утечкой их содержимого. Кроме того, излишнее присасывание части клетки во время операции создает внутри нее высокое давление, и при прохождении микроинструмента в клетку из нее происходит вытекание цитоплазмы через перфорацию мембраны.

Полученные к настоящему времени сведения не вызывают сомнения в важности перивителлинового пространства для развития эмбриона (Talbot, Dandekar, 2003). Перивителлиновое пространство является хорошо сбалансированной средой, в которой происходит развитие зародыша до момента выхода его из *zona pellucida*. Лишить его хотя бы части воды и компонентов означает изменить осмотический баланс всей клетки и заставить ее перестраиваться и адаптироваться к изменившемуся окружению (Garin et al., 1996).

Мы искали возможность оптимизировать процесс фиксации клетки микропипеткой, и такой метод был найден — удерживание клеток за счет использования капиллярных сил микропипетки-держателя, направленный прежде всего на снижение повреждений клетки и ее органелл в сложных условиях микрохирургии под контролем микроскопа (Бондарев и др., 1987). Усиление удерживания клетки предложенным методом на порядок или даже на два порядка ниже обычно используемого. Микропипетку-держатель погружали в среду, в которой производили микрохирургическую операцию, и она тотчас же заполняла внутреннюю полость микроинструмента за счет капиллярных сил. Затем в его полости создавали положительное давление (при помощи микроинъектора или шприца) до появления в поле зрения микроскопа мениска среда—воздух. После этого микропипетку-держатель подводили вплотную к клетке и прекращали подачу положительного давления внутрь нее, при этом всасывание среды и фиксация клетки продолжались за счет капиллярных сил до наступления равновесия. Давление, не превышающее величины, достаточной для фиксации клеток, получали изменяя положение мениска внутри полости микропипетки-держателя: чем дальше он от выходного отверстия микроинструмента, тем меньше усилие присасывания, причем не за счет искусственно создаваемого отрицательного давления, а за счет капиллярных сил.

Впоследствии мы фиксировали клетку по-другому, вообще без использования отрицательного давления, с помощью капсулы-держателя, которую изготавляли на микроузнице по форме клетки (рис. 1).

Этот микроинструмент мы использовали в разработанном и изготовленном нами совместно с Институтом приборостроения РАН микроманипуляторе для пересад-

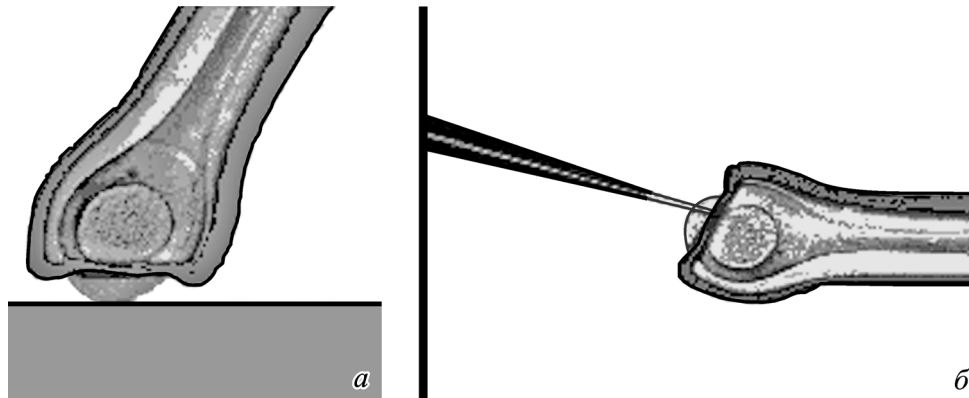


Рис. 1. Капсула-держатель для фиксации клетки без использования отрицательного давления.

а — клетку помещают в полость капсулы, используя упор, например стенку микрокамеры; *б* — микроинъекция в клетку.

ки ядер единичных клеток (рис. 2). Принципиальная особенность этого микроманипулятора в том, что его головка устроена таким образом, что в ней возможно монтировать два и больше микроинструментов, которые могут двигаться относительно друг друга по трем координатам. Специально для работы на этом микроманипуляторе было разработано 10 оригинальных комбинированных микроинструментов (рис. 3, *А*), которые можно использовать без привлечения дополнительных микроманипуляторов.

Так, например, если мы фиксируем клетку при пересадке ядер капсулой-держателем, то микропипетку для хирургии можно вводить из ее полости. В результате для операции достаточно одного микроманипулятора, а не двух и более, как обычно. Кроме того, при таком способе проведения микрооперации появляется возможность работать на клетках с различной ригидностью: фиксируется непосредственно нужный участок мембраны, и изнутри капсулы-держателя вводится микрохирургический инструмент. Используя двухканальный микроотсос-ирригатор и подавая в него отрицательное и положительное давление, можно проводить вымывание яйцеклеток из яйцеводов или из рогов матки животных, промывание полости органов, перфузию и смену растворов в проточной микрокамере. С помощью специальных микропетель различных видов с переменным диаметром (рис. 3) мы проводили разделение ранних эмбрионов на стадии двух бластомеров (Никитин и др., 1980). Если Шпеманн (Spemann, 1938) для разделения яйцеклеток тритона или амфибий использовал волос новорожденного ребенка, то эти микропетли можно изготовить на микроузнице из капроновых нитей вплоть до диаметра 7—10 мкм и применять их в качестве микролигатур для яйцеклеток мышей, крыс, кроликов и крупного рогатого скота. При этом каждую из них можно сделать многоразовой: в ушко петли продевают нить, свободные концы которой закрепляют в держателе другого микроманипулятора, нить оттягивают и возвращают петлю в исходное положение.

Следующий этап реконструкции клетки — перенос в нее генетического материала или извлечение его, в данном случае энуклеация. Наш опыт показывает, что микрохирургия яйцеклеток — самый ответственный этап пересадки ядер (или пронуклеусов), так как проникновение микропипетки в клетку всегда сопровождается ее деформациями и в разной степени повреждениями. Кроме того, длительные деформации клетки приводят к замет-

ным утечкам из нее клеточного содержимого. Резкие изменения давления возникают, как правило, от засорения

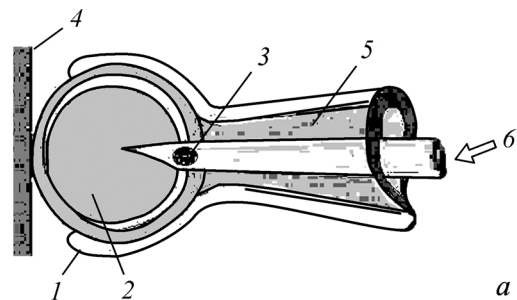


Рис. 2. Схема пересадки ядер (*а*) и микроманипулятор для пересадки ядер (*б*).

1 — капсула-держатель, 2 — бластомер, 3 — ядро для пересадки, 4 — стеклянная пластинка для упора, после пересадки ядра снимается, 5 — изотонический раствор, 6 — подача давления для пересадки ядра.

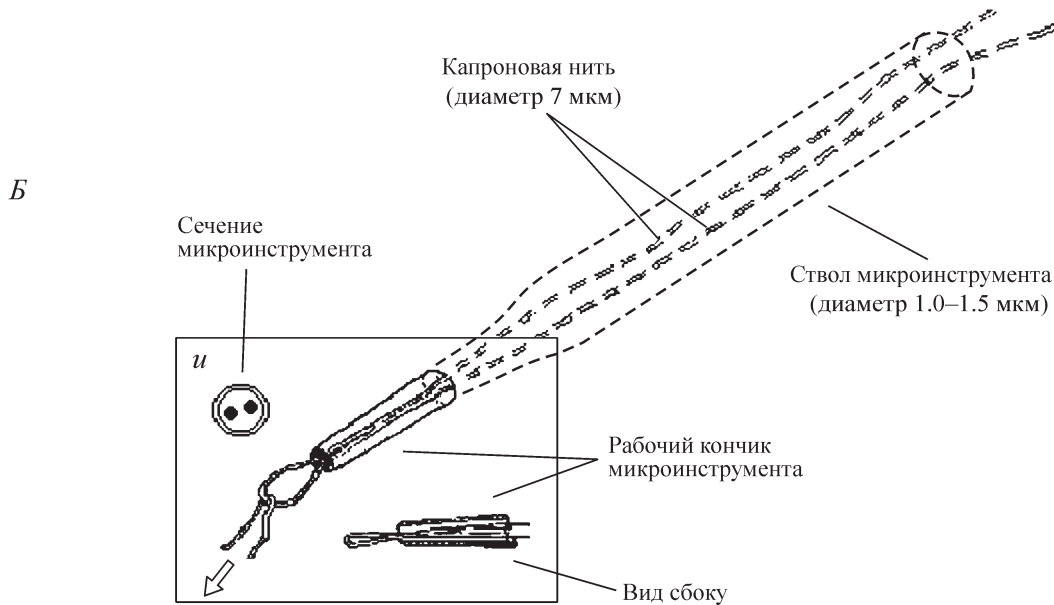
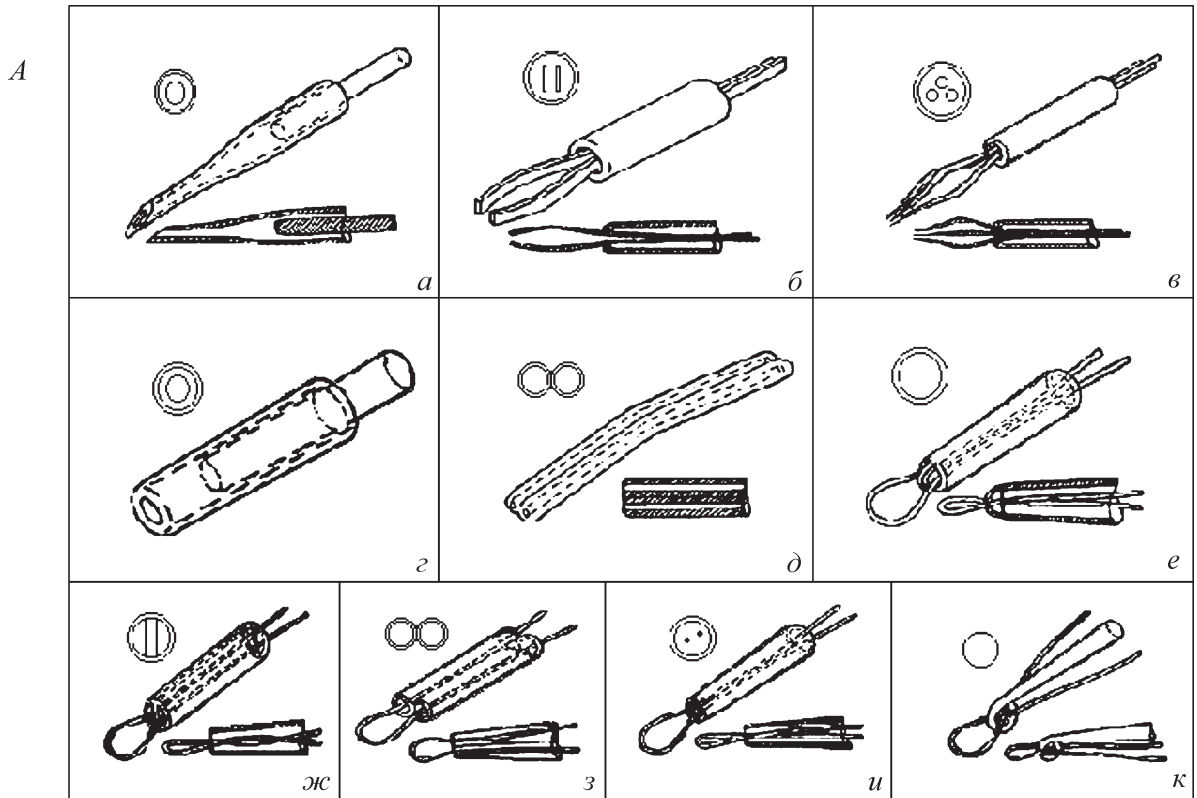


Рис. 3. Микроинструменты.

А: а–в — микрошприц, микропинцет и микрорасширитель; з–е — микродержатель с выдвижным штоком, микроотсос-ирригатор и микропетля из капилляра с перемычкой; ж–к — микропетля из капилляра со вставкой, микропетля из спаренного капилляра, микропетля из одиночного капилляра и микропетля-«судавка». Б — на примере микропетли из одиночного капилляра (А, и) показан общий вид микроинструментов; стрелка демонстрирует возможность многократного использования микропетли.

микропипетки или образования воздушных пузырьков в системе микроинъектора. Была разработана специальная микропипетка для пересадки ядер, имеющая строго цилиндрическую внутреннюю полость, благодаря чему ядро внутри микропипетки не деформировалось (рис. 4). Кроме того, поверхность стекла микроинструментов обрабатывали силиконизирующими растворами, образующими гидрофобную пленку, которая предотвращала ад-

гезию внутриклеточного материала и исключала или сводила к минимуму связанное с этим повреждение.

За счет специального затачивания с четырех сторон кончика микропипетки для пересадки ядер (рис. 4, а, б) с помощью специального устройства (рис. 5) (Гришин и др., 1987) он легко проходил через *zona pellucida*, не деформируя всю клетку, что было видно под микроскопом, а в момент извлечения его из *zona pellucida* проис-

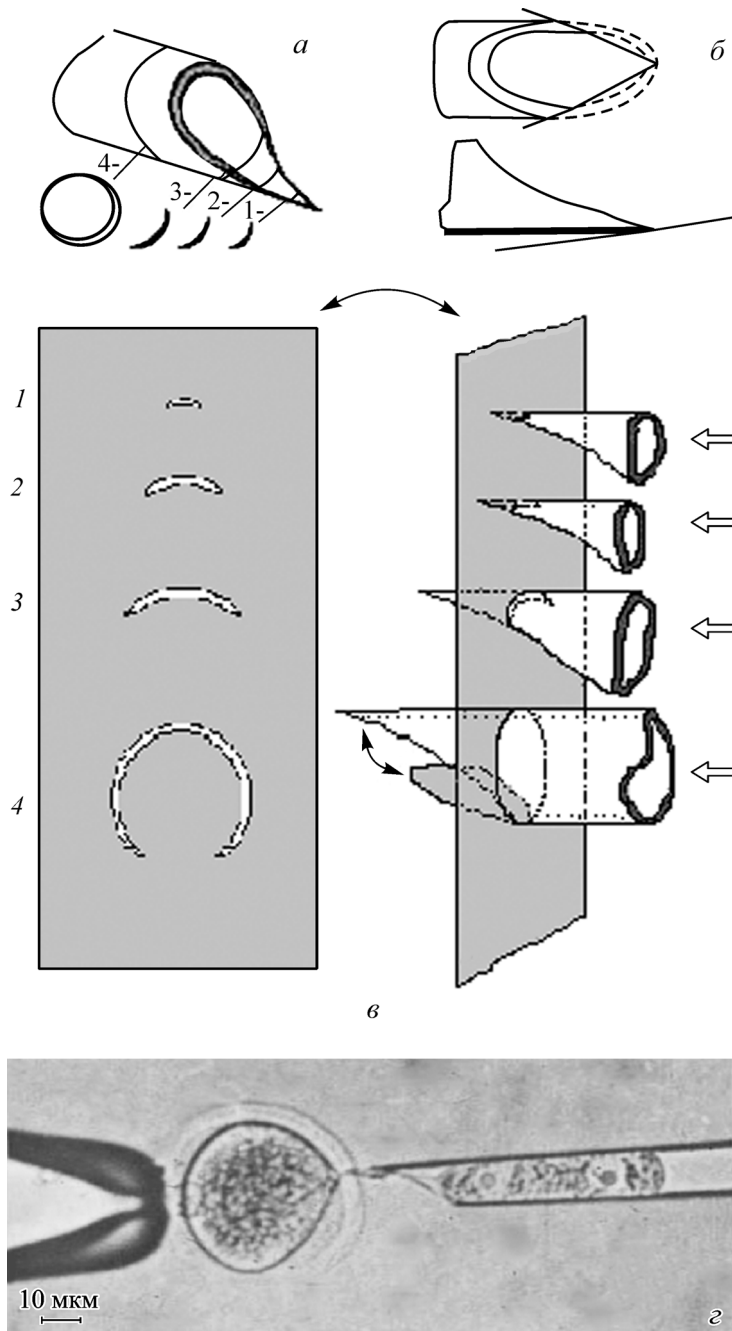


Рис. 4. Схемы формы и заточки кончика микропипетки для пересадки ядер, образования перфорации в процессе проникновения кончика полученной микропипетки через *zona pellucida* и фото пересадки ядер с помощью этой микропипетки.

а, 1–3 — профили кончика; *б* — схема заточки; *в*, 1–4 — этапы образования перфорации в *zona pellucida* клетки; *г* — энуклеация эмбриона мыши, виден короткий тяж цитоплазмы.

ходил отрыв карิโอпласта от цитопласта (рис. 4, *г*). Обычная микропипетка делает перфорацию круглой, и тяж, соединяющий цитопласт с карิโอпластом, при удалении последнего из зародыша часто получается толстым и остается очень длинным после удаления вплоть до окончательного отрыва. При этом происходят потери содержимого клетки, что нежелательно, особенно если цитопласт предполагается использовать в дальнейшем. Это можно видеть на фотографиях в работе авторов (McGrath, Solter, 1983), метод которых используют практически все лаборатории для микрохирургической энук-

леации эмбриона. Новая микропипетка для пересадки ядер производила перфорацию, не расклиняя *zona pellucida*, а разрезая ее по профилю полукруглого сечения кончика. Дальнейшее проникновение микропипетки через *zona pellucida* происходило за счет раздвигания разреза. При удалении карิโอпласта полукруглые разрезы от кончика этой микропипетки легко смыкались, т. е. перфорации получались быстро реparableемыми (рис. 4, *в*, 1–4).

Чувствительность яйцеклеток мыши к микрохирургическим манипуляциям изменялась в течение времени,

предшествующего первому делению. Известно, что от момента оплодотворения до первого дробления вязкость цитоплазмы меняется: вначале она резко повышается, затем снижается и снова повышается к моменту начала дробления яйца (Dalcq, 1932). Учитывая это, операцию проводили именно в этот момент, перед началом деления дробления. Энуклеация зигот задолго до этого момента в большинстве случаев приводила к их разрушению уже на первом этапе. Напротив, непосредственно перед началом дробления микроинструмент входил в zona pellucida легко, и на первом этапе операции гибели клеток практически не наблюдалось. Таким образом, было установлено, что оптимальное время проведения операций — непосредственно перед делением как для клеток-реципиентов, так и для клеток-доноров (Свиридова, Никитин, 1986).

Следует отметить, что удаляемое из клетки ядро всегда окружено мембраной и небольшим слоем цитоплазмы (кариопласт). По данным Захарченко и соавторов (Zakhartchenko et al., 1997), соотношение объема цитопласты и кариопласты влияет на развитие эмбриона после пересадки ядер, при этом наиболее благоприятные условия развития возникают, когда объемы кариопласты и цитопласты одинаковы. Если пересаживать одной микропипеткой оба пронуклеуса сразу, как показано на рис. 4, 2, количество цитоплазмы будет значительно больше.

Операцию мы проводили именно так, поскольку большой объем цитоплазматического окружения был благоприятен для сохранения целостности энуклеированного ядра и способности его к дальнейшему делению. При проведении микрохирургической операции выяснилось, что после прокола zona pellucida микроинструмент внедрялся внутрь клетки, не повреждая ее цитоплазматическую мембрану. Этому способствовало в том числе действие цитохалазина Б, который делает цитоплазматическую мембрану сверхэластичной (Modlinski, 1980).

После микрохирургии жизнеспособными оказались 90 % прооперированных зигот, в то время как, по литературным данным, после микрохирургии пригодными для культивирования оставались только 39 % клеток (Illmensee, Норре, 1981). Кариопласт переносили той же микропипеткой в энуклеированную зиготу под zona pellucida и пересадку ядра завершали с помощью электрослияния. В результате экспериментов с применением описанных приемов и микроинструментов было получено живое и жизнеспособное потомство мышей (Свиридов и др., 1987; Чайлахян и др., 1987). Это позволяет сделать вывод о том, что проведенное по такому протоколу реконструирование зигот сочетанием микрохирургии и электрослияния не вносит заметных нарушений в развитие эмбриона и может быть использовано в широком круге задач по клеточной инженерии.

Введение растворов различных веществ, в том числе ДНК, в клетку. Для прокола мембран клеток или органелл большое значение имеет использование острых, заточенных микропипеток (McGrath, Solter, 1983; Никитин, 1986). Они легче проникают в клетки, производя меньшие механические повреждения мембран. Однако общепринятые устройства для заточки, известные нам, оставляют на микроинструменте продукты шлифовки, не дают возможности регулировать все необходимые манипуляции и не позволяют проводить при большом увеличении микроскопический контроль процессов заточки.

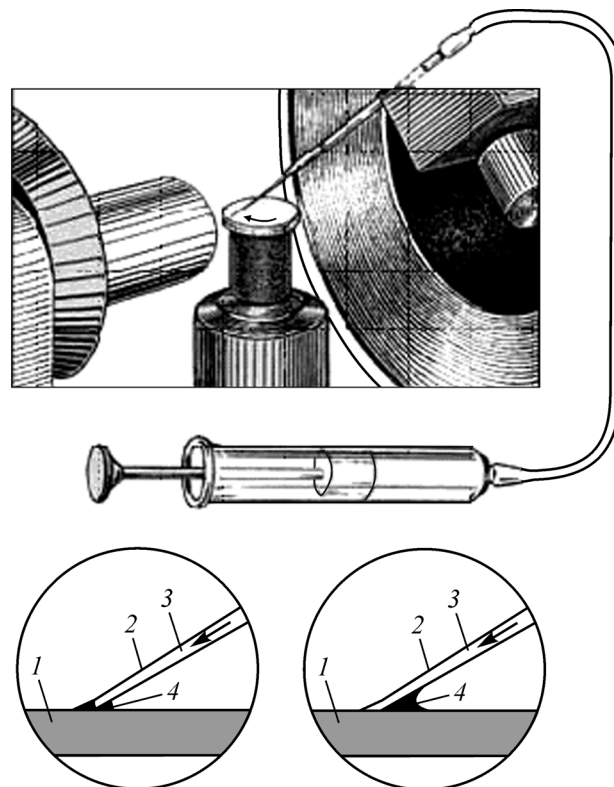


Рис. 5. Схема заточки микропипетки под контролем микроскопа на микрокузнице.

1 — абразивный диск (сапфировое или кварцевое стекло); 2 — микропипетка; 3 — поток воды; 4 — мениск воды: чем он меньше, тем сильнее степень прижима микропипетки к диску. Из микропипетки (2) подается вода, благодаря чему не происходит необратимого засорения ее кончика.

Совместно с Институтом приборостроения РАН было разработано и изготовлено заводским способом по представленному нами проекту устройство для заточки микроинструментов (Гришин и др., 1987), показанное на рис. 5. Основная тонкость процесса заточки микропипеток с помощью этого устройства заключается в том, что потоком воды, подаваемым из полости микропипетки, можно регулировать мениск, образующийся между кончиком микропипетки и абразивным диском: чем меньше этот мениск, тем сильнее прижим кончика микропипетки к абразивному диску и тем более интенсивно происходит заточивание. Этот же поток воды предотвращал необратимое засорение выходного отверстия микропипетки. Окончательная шлифовка заточенного кончика, что очень важно для качественного изготовления микропипетки, осуществлялась при интенсивной подаче воды из полости микропипетки. Помимо этого, в данном устройстве обеспечен контроль всех этапов заточки микроинструментов с помощью микроскопа с большим увеличением.

Многодозовый микроинъектор. Принцип работы и устройство широко распространенных микроинъекторов весьма просты — это микрошприц, соединенный шлангом с микропипеткой. Однако при работе с единичной клеткой всегда стоит задача минимизировать количество вводимого вещества. Чем меньше диаметр поршня шприца и чем меньшее перемещение поршень должен совершить, чтобы вытолкнуть инъецируемый объем из микропипетки, тем меньшую дозу можно ввес-

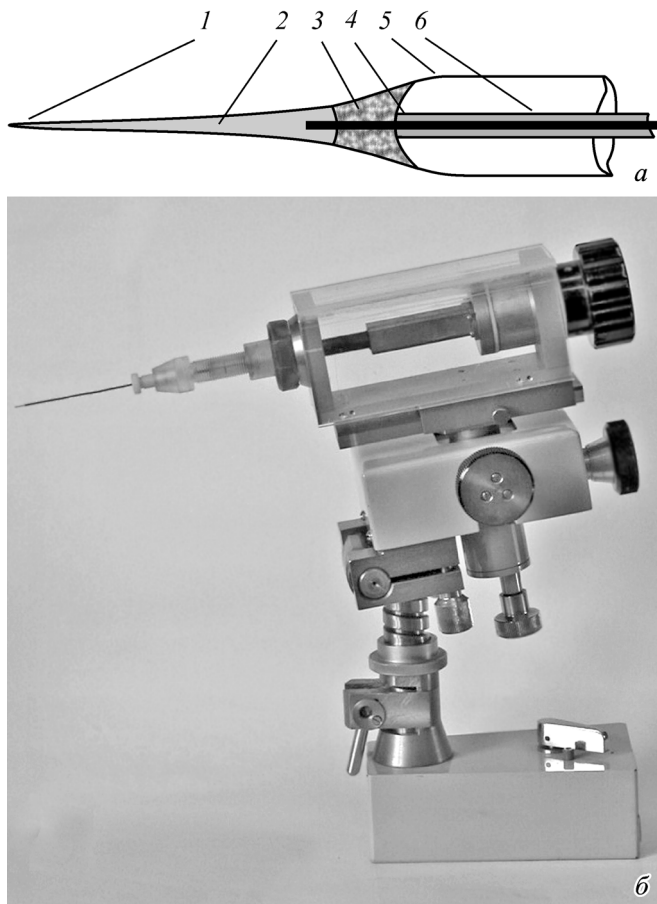


Рис. 6. Схема микропипетки многодозового микроинъектора с плунжером в конической части (а) и общий вид многодозового микроинъектора (б).

1 — кончик микропипетки, 2 — инъецируемый раствор, 3 — уплотнитель для плунжера, 4 — плунжер, 5 — ствол микропипетки, 6 — капилляр, удерживающий уплотнитель.

ти в клетку. Мы использовали для таких целей специально созданный нами многодозовый микроинъектор (Бондарев и др., 1986).

Эта оригинальная конструкция обеспечила получение микродоз с точностью до фемтолитра при достаточной простоте управления (фемтолитр — это 1 мкм^3). Такая точность обеспечивается за счет установки внутрь инъекционной пипетки мерного капилляра, который фактически служит поршнем и управляется с помощью гидравлики, а также за счет оригинально устроенного делителя механического усилия с уникальной величиной редукции перемещения поршня $1 : 40\,000$ по отношению к прилагаемому механическому усилию. Однако с учетом того, что лимитирующим фактором точности доз во всех известных микроинъекторах служит система шлангов, в дальнейшем мы модифицировали этот микроинъектор и использовали его в упрощенном виде, без применения гидравлической передачи и без шланга.

На рис. 6 показаны схема инъецирующей части многодозового микроинъектора и его общий вид. Внутри конусной части микроинъекционной пипетки введен тонкий металлический микростержень (плунжер) (рис. 6, а, 4) диаметром до нескольких десятых миллиметра, фактически служащий поршнем. Система упрощается и увеличивается точность инъецирования через

стеклянные микропипетки. Визуальный контроль истечения минимального объема в обычный оптический микроскоп практически невозможен, но проследить истечение нескольких объемов через кончик диаметром в 1 мкм и меньше — выполнимая задача. Кроме того, отсутствие в данном микроинъекторе системы шлангов, соединяющих дозатор давления со стеклянной микропипеткой, позволило преодолеть этот лимитирующий фактор точности доз во всех известных микроинъекторах.

Проблема реконструкции клетки методами клеточной инженерии — одна из центральных в биологии, так как позволяет подойти к решению ряда принципиальных вопросов биологии развития, молекулярной биологии, геномной и клеточной инженерии, активно вмешиваться в развитие клеток, органов и тканей. Благодаря этим методам получили развитие такие биотехнологии, как фармацевтическое (Wolf et al., 2000), терапевтическое (Shmensee, 2001, 2002; Hochedlinger, Jaenisch, 2003) и репродуктивное клонирование животных (Wolf et al., 1998; Kuhholzer, Prather, 2000; Heyman, 2005; Lagutina et al., 2005; Vajta, Gjerris, 2006). Большие и очевидные сейчас перспективы имеет использование методов реконструкции клетки для сохранения генофонда исчезающих видов животных (Lanza et al., 2000; Li et al., 2006; Pukazhenthil et al., 2006). Однако микрохирургические манипуляции с клеткой, как отмечают многие авторы, являются весьма дорогостоящими, так как требуют использования специального высокотехнологического оборудования, особых подходов для разных задач и для разных животных, а результаты их во многом зависят от профессионализма микрохирурга. В связи с этим важное значение приобретают создание в нашей стране отечественного базового оборудования и разработка новых методов микрохирургии и микроинъекции единичной клетки, которые позволили бы вести собственные исследования и обеспечить обучение специалистов по микрохирургии клетки и микроинъекции в клетку, а также расширить внедрение этих методов в практику работы научно-исследовательских лабораторий и центров по биотехнологии. Данная работа выполнена в русле этих проблем, и исследования в этом направлении продолжаются.

Авторы выражают искреннюю признательность проф. А. С. Соболеву (Институт биологии гена РАН) за полезную критику и советы при написании данной статьи.

Список литературы

- Александров А. А. 1983. Метод электрофореза в физиологии. Л.: Наука. 148 с.
- Березовская О. П., Межевская Л. М., Вепринцев Б. Н. 1986. Метод культивирования доимплантационных зародышей мыши. Онтогенез. 17 : 5—553—555.
- Бондарев В. А., Иванов Е. Г., Ларин В. Т., Никитин В. А., Попов Ю. А., Хохлов А. М., Цалкович А. Э. 1986. Многозондовый микроинъектор: А. с. 1223917.
- Бондарев В. А., Иванов Е. Г., Никитин В. А., Попов Ю. А., Хохлов А. М. 1987. Способ закрепления клеток на микропипетке: А. с. 1616680.
- Гришин А. Ф., Иванов Е. Г., Никитин В. А., Попов Ю. А., Хохлов А. М., Цалкович А. Э. 1987. Способ заточки стеклянных микропипеток и устройство для его осуществления: А. с. 1315248.
- Никитин В. А. 1986. Техника изготовления микроинструментов для исследования клеток под микроскопом. Пушкино: ОНТИ НЦБИ АН СССР. 122 с.

- Никитин В. А., Гольдман И. Л., Клецко Н. Г., Волыничук В. Ф. 1980. Методические рекомендации по изготовлению и применению микроинструментов для микроманипуляции с эмбрионами млекопитающих. М.: ВАСХНИЛ. 24 с.
- Никитин В. А., Фесенко Е. Е. 2006. Биофизические аспекты реконструкции единичной клетки методами клеточной инженерии. Биофизика. 51 : 8—673—678.
- Первис Р. 1983. Микроэлектродные методы внутриклеточной регистрации и ионофореза. Пер. с англ. М.: Мир. 208 с.
- Риджуэй Э. А. Дж. 1991. Векторы экспрессии млекопитающих. В кн.: Сельскохозяйственная биотехнология: векторные системы молекулярного клонирования. М.: ВО Агропромиздат. 438—464.
- Свиридова Т. А., Никитин В. А. 1986. Техника пересадки ядер и пронуклеусов в яйцеклетки мышей. В кн.: Приборное оснащение и автоматизация экспериментальных исследований в области биотехнологии. Пушкино: ОНТИ НЦБИ АН СССР. 7—12.
- Свиридова Т. А., Чайлахян Л. М., Никитин В. А., Вепринцев Б. Н. 1987. Метод локального электрослияния пронуклеусов с энуклеированной зиготой. ДАН СССР. 295 (1) : 241—244.
- Соболев А. С., Розенкранц А. А., Никитин В. А. 1994. Способ направленной генетической трансформации молочной железы животного и устройство для введения генетического материала в молочный проток молочной железы животного. Патент РФ № 20252487.
- Чайлахян Л. М., Вепринцев Б. Н., Свиридова Т. А., Никитин В. А. 1987. Электростимулируемое слияние клеток в клеточной инженерии. Биофизика. 32 : 5—874—887.
- Шкуматов А. А. 2001. Клонирование: прошлое, настоящее... будущее? Проблемы репродукции. 6 : 1—16.
- Abramczuk J., Solter D., Koprowski H. 1977. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos, in chemically defined medium. Develop. Biol. 61 : 378—383.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. Molecular biology of the cell. 4th ed. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>.
- Antonov P. A. 1990. Thermofusion of cells. Biochim. biophys. acta. 1051 : 279—281.
- Bardsley D. W., Liddell J. E., Coakley W. T., Clarke D. J. 1990. Electroacoustic production of murine hybridomas. J. Immunol. Methods. 129 : 41—47.
- Batchelder C. A., Hoffert K. A., Bertolini M., Moyer A. L., Mason J. B., Petkov S. G., Famula T. R., Anderson G. B. 2005. Effect of the nuclear-donor cell lineage, type, and cell donor on development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. Cloning Stem Cells. 7 : 238—254.
- Boogaard C., Dixon G. H. 1983. Red cell ghost-mediated microinjection of RNA into *HeLa* cells. I. A comparison of two techniques for the entrapment and microinjection of tRNA and mRNA. Exp. Cell Res. 143 : 175—190.
- Bowman C., Tedeschi H. 1980. Electrophoretic injection of a fluorescent dye into giant mitochondria and mitoplasts. Science. 209 : 1251—1252.
- Bridgman P. C., Brown M. E., Balan I. 2003. Biolistic transfection. Methods Cell Biol. 71 : 353—368.
- Capocchi M. R. 1980. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. Cell. 22 (2, Pt 2) : 479—488.
- Celis J. E. 1984. Microinjection of somatic cells with micropipettes: comparison with other transfer techniques. Biochem. J. 233 : 281—291.
- Colosimo A., Goncz K. K., Holmes A. R., Kunzelmann K., Novelli G., Malone R. W., Bennett M. J., Gruenert D., C. 2000. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. Biotechniques. 29 : 314—338, 320—322, 324 passim.
- Conese M., Auriche C., Ascenzioni F. 2004. Gene therapy progress and prospects: episomally maintained self-replicating systems. Gene Ther. 11 : 1735—1741.
- Dalq A. 1932. Arch. d'Anat. Micr. XXVIII. 223. (Цит. по: Гексли Дж. С., де Бер Г. П. 1936. Основы экспериментальной эмбриологии. М.; Л.: Биомедгиз. 468 с.).
- Dani S. U. 1999. The challenge of vector development in gene therapy. Braz. J. Med. Biol. Res. 32 : 133—145.
- Davis B. R., Yannariello-Brown J., Prokopishyn N. L., Luo Z., Smith M. R., Wang J., Carsrud N. D., Brown D. B. 2000. Glass needle-mediated microinjection of macromolecules and transgenes into primary human blood stem/progenitor cells. Blood. 95 : 437—444.
- Derouazi M., Flaction R., Girard P., de Jesus M., Jordan M., Wurm F. M. 2006. Generation of recombinant *Chinese hamster* ovary cell lines by microinjection. Biotechnol. Lett. 28 : 373—382.
- Dicumakos E. G. 1973. Methods for micromanipulation of human somatic cells in culture. Methods Cell Biol. 7 : 287—311.
- Di Berardino M. A., McKinnell R. G., Wolf D. P. 2003. The golden anniversary of cloning: a celebratory essay. Differentiation. 71 : 398—401.
- Fechheimer M., Boylan J. F., Parker S., Sicken J. E., Patel G. L., Zimmer S. G. 1987. Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 84 : 8463—8467.
- Fournier R. E., Ruddle F. H. 1977. Microcell-mediated transfer of murine chromosomes into mouse, *Chinese hamster*, and human somatic cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74 : 319—323.
- Fraley R., Papahadjopoulos D. 1982. Liposomes: the development of a new carrier system for introducing nucleic acid into plant and animal cells. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 96 : 171—191.
- Furusawa M., Nishimura T., Yamaizumi M., Okada Y. 1974. Injection of foreign substances into single cells by cell fusion. Nature. 249 : 449—450.
- Gao S. 2006. Protocols for nuclear transfer in mice. Methods Mol. Biol. 325 : 25—33.
- Garin C. F., Heras H., Pollero R. J. 1996. Lipoproteins of the egg perivitelline fluid of *Pomacea canaliculata* snails (Mollusca: Gastropoda). J. Exp. Zool. 276 : 307—314.
- Gil'iano N. Ia., Malinovskii O. V., Khair M. B. 1988. In vivo cell fusion induced by fast neutrons and gamma-rays. Dokl. Akad. Nauk. SSSR. 301 (6) : 1484—1487.
- Gokhale D. V., Puntambekar U. S., Deobagkar D. N. 1993. Protoplast fusion: a tool for intergeneric gene transfer in bacteria. Biotechnol. Adv. 11 : 199—217.
- Gopal T. V. 1985. Gene transfer method for transient gene expression, stable transformation, and cotransformation of suspension cell cultures. Mol. Cell. Biol. 5 : 1188—1190.
- Graessmann A., Graessmann M., Mueller C. 1980. Microinjection of early SV40 DNA fragments and T antigen. Methods Enzymol. 65 : 816—825.
- Graham F. L., Van der Eb A. J. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology. 52 : 456—467.
- Gurdon J. B., Byrne J. A. 2003. The first half-century of nuclear transplantation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1000 : 8048—8052.
- Hadlaczky G. 2001. Satellite DNA-based artificial chromosomes for use in gene therapy. Curr. Opin. Mol. Ther. 3 : 125—132.
- Hanahan D. 1985. Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. Nature. 315 : 115—122.
- Heyman Y. 2005. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. Reprod. Nutr. Develop. 45 : 353—361.
- Hibbitt O., Coward K., Kubota H., Prathalingham N., Holt W., Kohri K., Parrington J. 2006. In vivo gene transfer by electroporation allows expression of a fluorescent transgene in hamster testis and epididymal sperm and has adverse effects upon testicular integrity or sperm quality. Biol. Reprod. 74 : 95—101.
- Hochedlinger K., Jaenisch R. 2003. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. N. Engl. J. Med. 349 : 275—286.
- Hoppe P. S., Illmensee K. 1977. Microsurgically produced homozygous-diploid uniparental mice. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74 : 5657—5661.
- Huther G., Andra J. 1980. Microelectrophoresis-experience and uses. Z. Med. Lab. Diagn. 21 : 67—77.
- Hwa Kim S., Hoon Jeong J., Joe C. O., Gwan Park T. 2005. Folate receptor mediated intracellular protein delivery using PLL-PEG-FOL conjugate. J. Control Release. 103 : 625—634.

- Illmensee K. 2001. Cloning in reproductive medicine. *J. Assist. Reprod. Genet.* 18 : 451—467.
- Illmensee K. 2002. Biotechnology in reproductive medicine. *Differentiation.* 69 : 167—173.
- Illmensee K., Hoppe P. C. 1981. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell.* 23 : 9—18.
- Ishiura M., Hirose S., Uchida T., Hamada Y., Suzuki Y., Okada Y. 1982. Phage particle-mediated gene transfer to cultured mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2 : 607—616.
- Ivanova M. M., Rosenkranz A. A., Smirnova O. A., Nikitin V. A., Sobolev A. S., Landa V., Naroditsky B. S., Ernst L. K. 1999. Receptor-mediated transport of foreign DNA into preimplantation mammalian embryos. *Mol. Reprod. Develop.* 54 : 112—120.
- Jackman R. W., Stapleton T. D., Masse E. M., Harvey V. S., Meyers M. S., Shockley T. R., Nagy J. A. 1998. Enhancement of the functional repertoire of the rat parietal peritoneal mesothelium *in vivo*: directed expression of the anticoagulant and antiinflammatory molecule thrombomodulin. *Hum. Gene Ther.* 9 : 1069—1081.
- Johnston S. A. 1990. Biolistic transformation: microbes to mice. *Nature.* 346 : 776—777.
- Kalioft K., Celis J. E. 1978. Ghost-mediated transfer of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase into deficient Chinese hamster ovary cells by means of polyethylene glycol-induced fusion. *Exp. Cell Res.* 115 : 423—428.
- Kando A., Okayama B. 1990. *Biosci. Ind.* 48 : 446—448.
- Kawai S., Nishizawa M. 1984. New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* 4 : 1172—1174.
- Kishi M., Itagaki Y., Takakura R., Sudo T., Teranishi M. 2003. Effect of polyethylene glycol and dimethyl sulfoxide on the fusion of bovine nuclear transfer using mammary gland epithelial cells. *Cloning Stem Cells.* 5 : 43—49.
- Klein T. M., Arentzen R., Lewis P. A., Fitzpatrick-McElligott S. 1992. Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Biotechnology.* (N. Y.) 10 : 286—291.
- Krieger M., Brown M. S., Faust J. R., Goldstein J. L. 1978. Replacement of endogenous cholesterol esters of low density lipoprotein with exogenous cholesteryl linoleate. Reconstitution of a biologically active lipoprotein particle. *J. Biol. Chem.* 253 : 4093—4101.
- Kuhholzer B., Prather R. S. 2000. Advances in livestock nuclear transfer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222 : 240—245.
- Kurata S., Tsukakoshi M., Kasuya T., Ikawa Y. 1986. The laser method for efficient introduction of foreign DNA into cultured cell. *Exp. Cell Res.* 162 : 372—378.
- Laffafian I., Hallett M. B. 1998. Lipid-assisted microinjection: introducing material into the cytosol and membranes of small cells. *Biophys. J.* 75 : 2558—2563.
- Lagutina I., Lazzari G., Duchi R., Colleoni S., Ponderato N., Turini P., Crotti G., Galli C. 2005. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction.* 130 : 559—567.
- Lanza R. P., Cibelli J. B., Diaz F., Moraes C. T., Farin P. W., Farin C. E., Hammer C. J., West M. D., Damiani P. 2000. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2 : 79—90.
- Lavitrano M., Camaioni A., Fazio V. M., Dolci S., Farace M. G., Spadafora C. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell.* 57 : 717—723.
- Lewis W. H., Srinivasan P. R., Stokoe N., Siminovitch L. 1980. Parameters governing the transfer of the genes for thymidine kinase and dihydrofolate reductase into mouse cells using metaphase chromosomes of DNA. *Somatic Cell Genet.* 6 : 333—347.
- Li L. H., Ross P., Hui S. W. 1999. Improving electrotransfection efficiency by post-pulse centrifugation. *Gene Ther.* 6 : 364—372.
- Li Z., Sun X., Chen J., Leno G. H., Engelhardt J. F. 2006. Factors affecting the efficiency of embryo transfer in the domestic ferret (*Mustela putorius furo*). *Theriogenology.* 66 : 183—190.
- Lieber M. R., Hesse J. E., Nickol J. M., Felsenfeld G. 1987. The mechanism of osmotic transfection of avian embryonic erythrocytes: analysis of a system for studying developmental gene expression. *J. Cell Biol.* 105 : 1055—1065.
- Lo C. W. 1983. Transformation by iontophoretic microinjection of DNA: multiple integrations without tandem insertions. *Mol. Cell. Biol.* 3 : 1803—1814.
- Lopata M. A., Cleveland D. W., Sollner-Webb B. 1984. High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucl. Acids Res.* 12 : 5705—5717.
- Loyter A., Zakai N., Kulka R. G. 1975. «Ultramicroinjection» of macromolecules or small particles into animal cells. A new technique based on virus-induced cell fusion. *J. Cell. Biol.* 66 : 292—304.
- Mann J. R., Lovell-Badge R. H. 1984. Inviability of parthenogenones is determined by pronuclei, not egg cytoplasm. *Nature.* 310 : 66—67.
- McBride O. W., Ozer H. L. 1973. Transfer of genetic information by purified metaphase chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70 : 1258—1262.
- McGrath J., Solter D. 1983. Nuclear transplantation in the mouse by microsurgery and cell fusion. *Science.* 220 : 1300—1302.
- McNeill C. A., Brown R. L. 1980. Genetic manipulation by means of microcell-mediated transfer of normal human chromosomes into recipient mouse cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 77 : 5394—5398.
- Mellon P., Parker V., Gluzman Y., Maniatis T. 1981. Identification of DNA sequences required for transcription of the human alpha 1-globin gene in a new SV40 host-vector system. *Cell.* 27 (2, Pt 1) : 279—288.
- Miller C. R., Clapp P. J., O'Brien D. F. 2000. Visible light-induced destabilization of endocytosed liposomes. *FEBS Lett.* 467 : 52—56.
- Modlinski J. A. 1980. Preimplantation development of micro-surgically obtained haploid and homozygous diploid mouse embryos and effects of pretreatment with Cytochalasin B on enucleated eggs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 60 : 153—161.
- Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. H. 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 11 : 841—845.
- Niemann H., Kues W., Carnwath J. W. 2005. Transgenic farm animals: present and future. *Rev. Sci. Tech.* 24 : 285—298.
- Nikitin V. A., Khokhlov A. M., Larin V. T., Fikhite B. A. Method and device for performing microoperation on cells. USA Patent Number: 4, 619, 899.
- Nozaki T., Ogawa R., Feril L. B., Jr., Kagiya G., Fuse H., Kondo T. 2003. Enhancement of ultrasound-mediated gene transfection by membrane modification. *J. Gene Med.* 5 : 1046—1055.
- Ocho M., Nakai S., Tasaka K., Watanabe S., Oda T. 1981. Microinjection of nucleic acids into cultured mammalian cells by electrophoresis. *Acta Med. Okayama.* 35 : 381—384.
- Ornitz D. M., Pamiter R. D., Hammer R. E., Brinster R. L., Swift G. H., MacDonald R. J. 1985. Specific expression of an elastase-human growth hormone fusion gene in pancreatic acinar cells of transgenic mice. *Nature.* 13 : 600—602.
- Pittoggi C., Beraldi R., Sciamanna I., Barberi L., Giordano R., Magnano A. R., Torosantucci L., Pescarmona E., Spadafora C. 2006. Generation of biologically active retro-genes upon interaction of mouse spermatozoa with exogenous DNA. *Mol. Reprod. Develop.* 73 : 1239—1246.
- Prince P. R., Ogburn C. E., Moser M. J., Emond M. J., Martin G. M., Monnat R. J., Jr. 1999. Cell fusion corrects the 4-nitroquinoline 1-oxide sensitivity of Werner syndrome fibroblast cell lines. *Hum. Genet.* 105 (1—2) : 132—138.
- Pukazhenthil B., Comizzoli P., Travis A. J., Wildt D. E. 2006. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. *Reprod. Fertil. Develop.* 18 (1—2) : 77—90.
- Rassoulzadegan M., Binetruy B., Cuzin F. 1982. High frequency of gene transfer after fusion between bacteria and eukaryotic cells. *Nature.* 295 : 257—259.
- Reddel R. R., Ke Y., Gerwin B. I., McMenamin M. G., Lechner J. F., Su R. T., Brash D. E., Park J. B., Rhim J. S., Harris C. C. 1988. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection

via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res.* 48 : 1904—1909.

Roport C. 1999. Liposomes as a gene delivery system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32 : 163—169.

Sanford J. A., Stubblefield E. 1987. General protocol for microcell-mediated chromosome transfer. *Somat. Cell Mol. Genet.* 13 : 279—284.

Scangos G., Ruddle F. H. 1981. Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells — a review. *Gene.* 14 (1—2) : 1—10.

Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. H. 1982. Liposomes as gene carriers: efficient transformation of mouse L cells by thymidine kinase gene. *Science.* 215 : 166—168.

Siebrasse J. P., Coutavas E., Peters R. 2002. Reconstitution of nuclear protein export in isolated nuclear envelopes. *J. Cell Biol.* 158 : 849—854.

Smith S. J., Mohum T. J. 2005. Frog transgenesis made simple. *Nat. Methods.* 2 : 897—898.

Sobolev A. S., Rosenkranz A. A., Smirnova O. A., Nikitin V. A., Neugodova G. L., Naroditsky B. S., Shilov I. N., Shatski I. N., Ernst K. 1998. Receptor-mediated transfection of murine and ovine mammary glands *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 273 : 7928—7933.

Spemann H. 1938. In: Embryonic development and induction. New York: Hafner Publ. Co. 210—211.

Stanford W. L., Cohn J. B., Cordes S. P. 2001. Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 2 : 756—768.

Stephens D. J., Pepperkok R. 2001. The many ways to cross the plasma membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98 : 4295—4298.

Sussman D. J., Milman G. 1984. Short-term, high-efficiency expression of transfected DNA. *Mol. Cell. Biol.* 4 : 1641—1643.

Tagawa M., Ito T., Kanno M., Okitsu A., Sakamoto T., Imai K., Kuwabara I., Koseki H., Matsubara H., Lau Y. F. et al. 1988. Method of genomic DNA cloning by the combination of cosmid shuttle vector and monoclonal antibody. *Microbiol. Immunol.* 32 : 1073—1078.

Talbot P., Dandekar P. 2003. Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals? *Microsc. Res. Tech.* 61 : 349—357.

Tao W., Wilkinson J., Stanbridge E. J., Berns M. W. 1987. Direct gene transfer into human cultured cells facilitated by laser micropuncture of the membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 84 : 4180—4184.

Tesson L., Cozzi J., Menoret S., Remy S., Usal C., Fraichard A., Anegon I. 2005. Transgenic modifications of the rat genome. *Transgenic Res.* 14 : 531—546.

Vaccaro D. E. 2000. Symbiosis therapy: the potential of using human protozoa for molecular therapy. *Mol. Ther.* 2 : 535—538.

Vajta G., Gjerris M. 2006. Science and technology of farm animal cloning: state of the art. *Anim. Reprod. Sci.* 92 (3—4) : 211—230.

Van der Putten H., Botteri F. M., Miller A. D., Rosenfeld M. G., Fan H., Evans R. M., Verma I. M. 1985. Efficient insertion of genes

into the mouse germ line via retroviral vectors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 82 : 6148—6152.

Viigipuu K., Kallio P. 2004. Microinjection of living adherent cells by using a semi-automatic microinjection system. *Altern. Lab. Anim.* 32 : 417—423.

Valev I., Bhakdi S. C., Hofmann F., Djonder N., Valeva A., Aktories K., Bhakdi S. 2001. Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98 : 3185—3190.

Walters R., Welsh M. 1999. Mechanism by which calcium phosphate coprecipitation enhances adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther.* 6 : 1845—1850.

Whitten W. K. 1971. Nutrient requirements for culture of pre-implantation embryos *in vitro*. *Adv. Biosci.* 6 : 129—141.

Willadsen S. M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature.* 320 : 63—65.

Wilmot I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., Campbell K. H. S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 385 : 810—813.

Wolf C. R., Smith G., Smith R. L. 2000. Science, medicine, and the future. *Pharmacogenetics. BMJ (Clinical research ed.)* 320 : 987—990.

Wolf D. P., Meng L., Ely J. J., Stouffer R. L. 1998. Recent progress in mammalian cloning. *J. Assist. Reprod. Genet.* 15 : 235—239.

Yabuuchi A., Yasuda Y., Kato Y., Tsumoda Y. 2004. Effects of nuclear transfer procedures on ES cell cloning efficiency in the mouse. *J. Reprod. Develop.* 50 : 263—268.

Yamamoto F., Furusawa M., Furusawa I., Obinata M. 1982. The «pricking» method. A new efficient technique for mechanically introducing foreign DNA into the nuclei of culture cells. *Exp. Cell Res.* 142 : 79—84.

Yang J., Shen M. H. 2006. Polyethylene glycol-mediated cell fusion. *Methods Mol. Biol.* 325 : 59—66.

Yano L., Shimura M., Taniguchi M., Hayashi Y., Suzuki T., Hatake K., Takaku F., Ishizaka Y. 2000. Improved gene transfer to neuroblastoma cells by a monoclonal antibody targeting RET, a receptor tyrosine kinase. *Hum. Gene Ther.* 11 : 995—1004.

Zakhartchenko V., Stojkovic M., Brem G., Wolf E. 1997. Karyoplast-cytoplasm volume ratio in bovine nuclear transfer embryos: effect on developmental potential. *Mol. Reprod. Develop.* 48 : 332—338.

Zarnitsyn V. G., Prausnitz M. R. 2004. Physical parameters influencing optimization of ultrasound-mediated DNA transfection. *Ultrasound Med. Biol.* 30 : 527—538.

Ziemiencowicz A., Gorlich D., Lanka E., Hohn B., Rossi L. 1999. Import of DNA into mammalian nuclei by proteins originating from a plant pathogenic bacterium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 3729—3733.

Поступила 12 X 2006

METHODS OF SUBSTANCES AND ORGANELLES INTRODUCTION IN LIVING CELL FOR CELL ENGINEERING TECHNOLOGIES

V. A. Nikitin

Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region; e-mail: vnikitin2001@rambler.ru, mgmac@phys.protres.ru

We have presented the classification of more than 40 methods of genetic material, substances and organelles introduction into a living cell. Each of them has its characteristic advantages, disadvantages and limitations with respect to cell viability, transfer efficiency, general applicability, and technical requirements. In this article we have enlarged on the description of our developments of several new and improved approaches, methods and devices of the direct microinjection into a single cell and cell microsurgery with the help of glass micropipettes. The problem of low efficiency of mammalian cloning is discussed with emphasis on the necessity of expertizing of each step of single cell reconstruction to begin with microsurgical manipulations and necessity of the development of such methods of single cell reconstruction that could minimize the possible damage of the cell.

Key words: single cell microsurgery, microinjection, nuclear transfer, cloning, cell engineering.