

## ИССЛЕДОВАНИЕ ДОИМПЛАНТАЦИОННОГО РАЗВИТИЯ ЗАРОДЫШЕЙ МЫШЕЙ, ПОМЕЧЕННЫХ ГЕНОМ ЗЕЛЕННОГО ФЛУОРЕСЦИРУЮЩЕГО БЕЛКА (EGFP)

© А. В. Сорокин,<sup>1</sup> Е. М. Нониашвили,<sup>1</sup> О. В. Кидготко,<sup>1</sup> Л. К. Сасина,<sup>1,\*</sup>  
Т. Д. Алейникова,<sup>1</sup> М. М. Шавловский,<sup>1</sup> С. И. Городецкий,<sup>2</sup> А. П. Дыбан<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург,  
и <sup>2</sup> Институт молекулярной биологии РАН, Москва;  
\* электронный адрес: sassinal@googlemail.com

В настоящей работе исследовали развитие *in vitro* зародышей, в пронуклеусы которых инъецировали клонированные фрагменты ДНК с геном зеленого белка, с усиленной флуоресценцией (*EGFP*) под контролем разных регуляторных элементов (промоторов, энхансеров, стоп-сигналов и т. д.). Показано, что вне зависимости от особенностей генетических конструкций сама процедура микроинъекций тормозит развитие. Часть трансгенных зародышей может блокироваться на разных стадиях дробления или при формировании морул и бластоцист. Обнаружено, что большинство трансгенных зародышей являются мозаиками. При этом трансгенные клетки зачастую попадают в трофэктодерму, т. е. не входят в состав внутренней клеточной массы, из которой развиваются ткани зародыша.

Ключевые слова: зародыши мыши, ген *EGFP*, трансгенные зародыши, активация зиготических генов.

Принятые сокращения: ДСН — додецилсульфат натрия, п. н. — пары нуклеотидов, ЭДТА — Na<sub>2</sub> этилендиамин тетрауксусной кислоты, EGFP — enhanced green fluorescence protein — белок с усиленной зеленой флуоресценцией, R26 — Rosa26.

Определение судьбы меченых клеток, экспрессирующих ген зеленого белка и его разновидности, позволяет решать различные актуальные биологические задачи. Так, в частности, этот методический прием успешно используется для изучения экспрессии зиготических генов в эмбриогенезе лабораторных мышей, крыс и других млекопитающих. Этой тематике посвящено большое количество публикаций, в том числе ряд обстоятельных обзоров (Takada et al., 1997; Chauhan et al., 1999; Kato et al., 1999). Однако некоторые аспекты этой проблемы, в частности природа мозаицизма у трансгенных зародышей, исследованы недостаточно полно. В настоящей работе у доимплантационных мышинных зародышей изучали экспрессию гена, кодирующего синтез зеленого белка с усиленной флуоресценцией (*EGFP*). Было использовано шесть генетических конструкций, в которых ген *EGFP* находился под контролем различных регуляторных элементов (промоторов, энхансеров и т. д.). У зародышей, развивавшихся из зигот, инъецированных этими конструкциями, исследовали динамику появления маркерного флуоресцирующего зеленого белка. Остается неясным, является ли мозаицизм результатом механического повреждения пронуклеусов либо токсическим эффектом зеленого белка. Сформулирована гипотеза, согласно которой овулировавшие яйцеклетки не различают чужеродную ДНК. Показано, что мозаицизм обусловлен эпизодическим состоянием гена *EGFP* или нестабильной интеграцией его в хромосому.

### Материал и методика

Опыты были проведены на гибридных мышах C57BL/СВА (F1) в возрасте 8—10 нед, полученных из питомника «Рапполово» РАМН. Для гормональной стимуляции самкам вводили по 7 ед. сывороточного гонадотропина (PMSG фирмы «Интервет») и через 48 ч инъецировали по 10 ед. хорионического гонадотропина (hCG фирмы «Интервет»). После этого самок подсаживали на ночь в клетку с самцами. Через 18 ч отбирали самок с копуляционными пробками и умерщвляли их дислокацией шейных позвонков. Извлекали яйцеводы и помещали их в каплю среды M2. Под бинокулярной лупой МБС-12 выделяли из ампул яйцеводов яйцеклетки в окружении клеток кумулюса. Этот материал переносили в капли среды M2, содержащей гиалуронидазу (300 МЕ/мл). Затем при помощи микропипетки освобождали яйцеклетки от фолликулярных клеток, промывали их несколько раз свежими порциями среды M2, переносили в капли среды M2, содержащей цитохалазин В (5 мкг/мл), и оставляли их до начала опыта на 30—40 мин при 37 °С под слоем вазелинового масла в инкубаторе (в газовой смеси 5 % CO<sub>2</sub> с воздухом).

В работе использовали 6 конструкций, несущих ген *EGFP* под контролем различных промоторов, а также другие регуляторные элементы. Карты этих конструкций приведены на рис. 1.

Исходная плаزمида *pR26-EGFP* (Kisseberth et al., 1999) была любезно предоставлена Dr. E. P. Sandgren

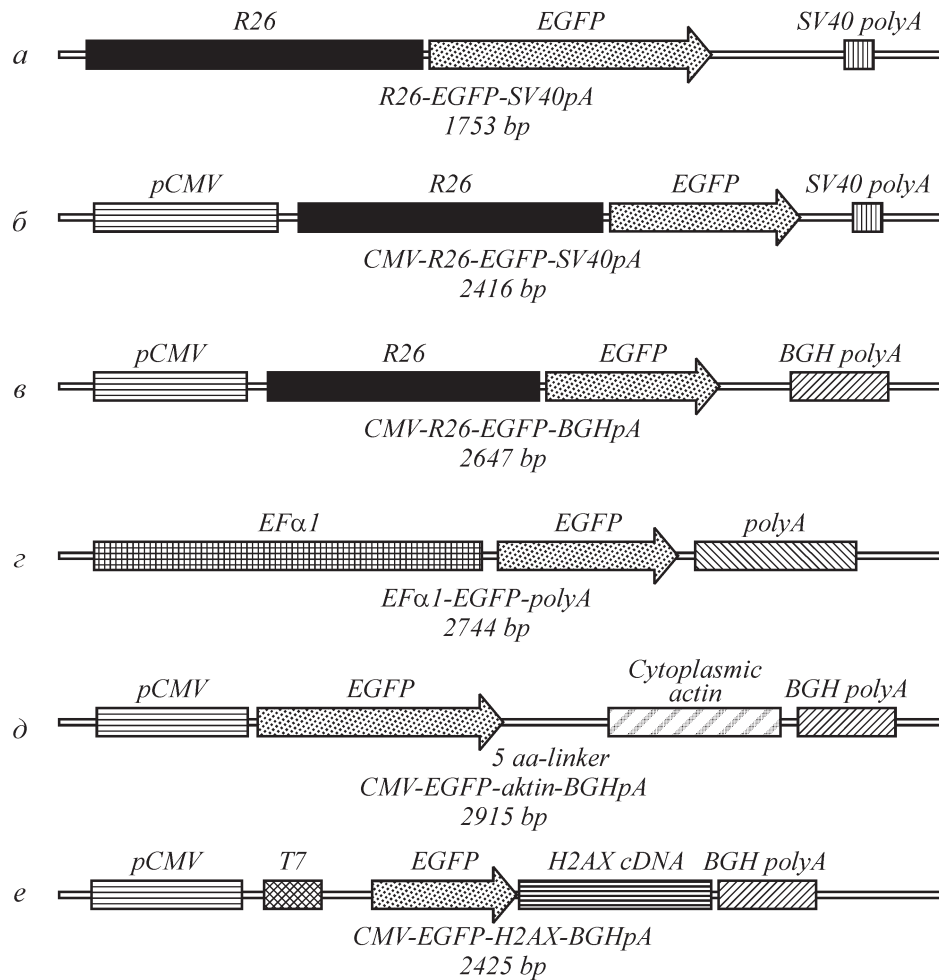


Рис. 1. Структура инъекцированных конструкций, содержащих ген *EGFP*.

*a–e* — соответственно конструкции 1—6. *EGFP* — ген зеленого флуоресцирующего белка, *R26* — промотор *Rosa26*, *CMV* — промотор цитомегаловируса, *SV40 polyA* — сайт полиаденилирования вируса *SV40*, *BGH polyA* — сайт полиаденилирования бычьего гормона роста, *Cytoplasmic actin* — ген цитоплазматического актина дрозофилы, *5aa-linker* — линкерная последовательность, соответствующая 5 аминокислотам, *EFα1* — фактор элонгации, *bp* — пары оснований.

(Университет Висконсин, Мэдисон, США). Для микроинъекций использовали вырезанный фрагмент *R26-EGFP-SV40polyA* (рис. 1, *a*) рестриктазами *Sall* (со стороны промотора *Rosa26*) и *AflIII* (со стороны *SV40polyA*). Размер полученного фрагмента составлял 1800 п. н.

Для повышения уровня экспрессии *EGFP* была создана новая конструкция № 2 на основе двух промоторов (*CMV* и *R26*) и гена *EGFP*. В этом случае из исходной плазмиды вырезали фрагмент *CMV-R26-EGFP-SV40polyA* рестриктазами *Sall* (со стороны *R26*) и *XbaI* (со стороны *EGFP*) (рис. 1, *б*).

Для того чтобы дополнительно повысить уровень экспрессии *EGFP*, была создана конструкция № 3 на основе промоторов *CMV* и *R26*, гена *EGFP* и стоп-кодона бычьего гормона роста, который увеличивает стабильность мРНК. Фрагмент *CMV-R26-EGFP-BGHpolyA* был вырезан рестриктазами *NruI* (со стороны *CMV*) и *PvuII* (со стороны *BGHpolyA*). Размер полученного фрагмента составлял 2590 п. н. (рис. 1, *в*).

Конструкция № 4 (рис. 1, *г*) *EFα1-EGFP-polyA* содержала промотор фактора элонгации 1 человека и ген зеленого флуоресцирующего белка. Этот фрагмент был вырезан из плазмиды рестриктазами *HindIII* и *EcoRI* (Takada et al., 1997).

Конструкция № 5 (рис. 1, *д*) *CMV-EGFP-actin-BGHpolyA* несла ген *EGFP*, слитый с геном актина дрозофилы, под контролем промотора *CMV* (Verkhusha et al., 1999).

Конструкция № 6 (рис. 1, *е*) *CMV-EGFP-H2AX-polyA* была любезно предоставлена проф. Н. В. Томилиным (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Плазмиду, экспрессирующую *EGFP-H2AX*, выделяли путем субклонирования кДНК человеческого гистона *H2AX* в экспрессионном векторе GFP-Торо (Invitrogen), в котором ген *GFP* был слит с N-концом кДНК *H2AX* (Siino et al., 2002), и эту конструкцию идентифицировали ПЦР по появлению характерного диагностического фрагмента.

В отцовский пронуклеус одноклеточных зародышей в возрасте 24—26 ч (после hCG) вводили 1 пкл раствора клонированных фрагментов ДНК в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в концентрации, соответствующей 2000 копиям на 1 пкл. Микроинъекции производили при помощи двух позиционеров микроманипулятора фирмы «Лейц», установленных на станине с инвертированным микроскопом Лейц-Диаверт. Этот микроскоп был оснащен конденсатором и оптикой для фазово-контрастной микроскопии и эпифлуоресцентным осветителем

Т а б л и ц а 1

## Развитие инъекцированных зародышей через 72—96 ч культивирования

Общее число зародышей		Зигот, <sup>a</sup> %	2—3 бластомера, <sup>a</sup> %	4—8 бластомеров, <sup>a</sup> %	Морулы или бластоцисты, <sup>a</sup> %	Погибшие, <sup>a</sup> %
Опыт <sup>b</sup>	1560	58 (3.7 ± 0.5)	159 (10.3 ± 0.8)	488 (31.2 ± 1.2)	705 (45.1 ± 1.3)	150 (9.6 ± 0.8)
Контроль	214	2 (0.9 ± 0.6)	17 (7.9 ± 1.8)	58 (27.1 ± 3.0)	134 (62.6 ± 3.3)	3 (1.4 ± 0.8)

<sup>a</sup> В скобках указана доля (и ее ошибка, %) инъекцированных зародышей, достигших указанных стадий развития.  
<sup>b</sup> Суммарное количество инъекцированных зародышей по всем шести конструкциям (рис. 1).

Phloetopak 2. Зиготы, выжившие после микроинъекции, помещали в капли среды M16 под слоем вазелинового масла и культивировали при 37 °C в инкубаторе (в газовой смеси воздуха и 5 % CO<sub>2</sub>), а затем через различные промежутки времени (12—96 ч) определяли наличие или отсутствие специфичной зеленой флуоресценции, характеризующей экспрессию гена *EGFP*. В качестве контроля культивировали интактные мышинные зиготы.

Для получения трансгенных мышей использовали зиготы, инъекцированные в мужской пронуклеус конструкцией № 1. Эти зародыши трансплантировали в ампулу яйцевода псевдобеременным самкам. Каждой самке трансплантировали по 15—20 зародышей. У мышат (на 21—30-е сут после рождения) из кончика хвоста выделяли геномную ДНК. Для этого кусочек хвоста длиной примерно 1 см измельчали ножницами, помещали в 700 мкл буфера (50 мМ Трис, 100 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl и 1 % ДСН), добавляли 35 мкл раствора протеиназы К (10 мкг/мл) и инкубировали в течение ночи при 55 °C. Лизаты охлаждали во льду 10 мин, добавляли 300 мкл 6 М раствора NaCl, инкубировали во льду в течение 15 мин и центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость отбирали в чистую пробирку и осаждали ДНК равным объемом изопропилового спирта. Выпавший в осадок клубок ДНК переносили в чистую пробирку, промывали 70%-ным этанолом, центрифугируя при 12 000 об/мин в течение 10 мин, осадок сушили на воздухе и растворяли в подходящем объеме буфера ТЭ. Затем ДНК очищали путем последовательных экстракций смесью фенол-хлороформа и хлороформа и пересаждали этанолом. Для обнаружения гена *EGFP* проводили ПЦР с использованием пары праймеров 5'-TGA ACC GCA TCG AGC TGA AGG G-3S и 5'-TCC AGC AGG ACC ATG TGA TCG C-3' в следующем режиме: 5 мин при 94 °C, затем 30 циклов 1 мин при 94 °C, 1 мин при 50 °C и 1 мин при 72 °C, затем элонгация при 723 °C в течение 10 мин. Диагностический продукт ПЦР имеет длину 306 п. н.

Для исследования экспрессии зеленого белка (EGFP) зародышей культивировали в течение 72—96 ч. Через различные промежутки времени чашки Петри вынимали из инкубатора и помещали на нагревательный столик (37 °C) инвертированного микроскопа Диаверт. Капли с зародышами сначала рассматривали в проходящем свете под фазовым контрастом, затем при эпифлуоресцентном освещении с использованием фильтра В1 для FITC (480 нм) и определяли наличие или отсутствие специфичной зеленой флуоресценции и затем фотографировали цифровым фотоаппаратом Olympus C-40ZOOM. Изображения изучали и обрабатывали, используя программное обеспечение Adobe Photoshop.

Полученные в экспериментах цифровые данные обрабатывали по правилам вариационной статистики (Рокитский, 1973, с. 172—173), вычисляя среднюю (статистическую) ошибку процента.

## Результаты

Экспрессия гена *EGFP* после интродукции в отцовский пронуклеус рекомбинантных молекул ДНК. В табл. 1 суммированы результаты опытов с шестью генетическими конструкциями, в которых ген *EGFP* находился под контролем различных регуляторных элементов. Было исследовано развитие *in vitro* 1560 подопытных (инъекцированных) и 214 контрольных (интактных) зародышей. Обе группы зародышей культивировали одновременно. Обнаружено, что в подопытной группе погибает больше зародышей, чем в контрольной группе. Число зародышей, остановившихся в развитии на различных стадиях дробления, было выше в подопытной группе, чем в контроле. Все различия между контрольной группой и объединенной подопытной группой статистически достоверны.

После инъекций конструкций № 1—5 наблюдали цитоплазматическую локализацию EGFP. В случае с конструкцией № 6 наблюдали флуоресценцию в ядре. Конструкция № 6 содержала ген зеленого белка, слитого с геном гистона *H2AX*. Этот ген экспрессировался на одноклеточной стадии, локализуясь в гаплоидных пронуклеусах зиготы. Примечательно, что генетическая конструкция *CMV-H2AX-EGFP-polyA* не только транскрибируется, но и транслируется на одноклеточной стадии. При этом генопродукт, т. е. зеленый белок, сшитый с гистоном *H2AX*, избирательно локализуется в пронуклеусах одноклеточного зародыша (рис. 2, I). По-видимому, эта генетическая конструкция имеет сигнальные последовательности гистона *H2AX*, обуславливающие накопление зеленого белка в гаплоидных ядрах.

Люминесцентный анализ показал, что часть зародышей начинает флуоресцировать в 1-е сут после инъекции. Одни из этих зародышей находились на одноклеточной, а другие — на двухклеточной стадии развития.

Наиболее сильная люминесценция наблюдалась в зародышах, которые оставались на одноклеточной стадии, имея биологический возраст 46 ч, эквивалентный фазе G<sub>2</sub> второго клеточного цикла (рис. 2, II).

Через 72—96 ч исследовали 1560 зародышей (табл. 2). Зародыши, экспрессирующие ген *EGFP*, были обнаружены после инъекции каждой из исследованных конструкций. Примечательно, что специфичную зеленую флуоресценцию, свидетельствующую о наличии

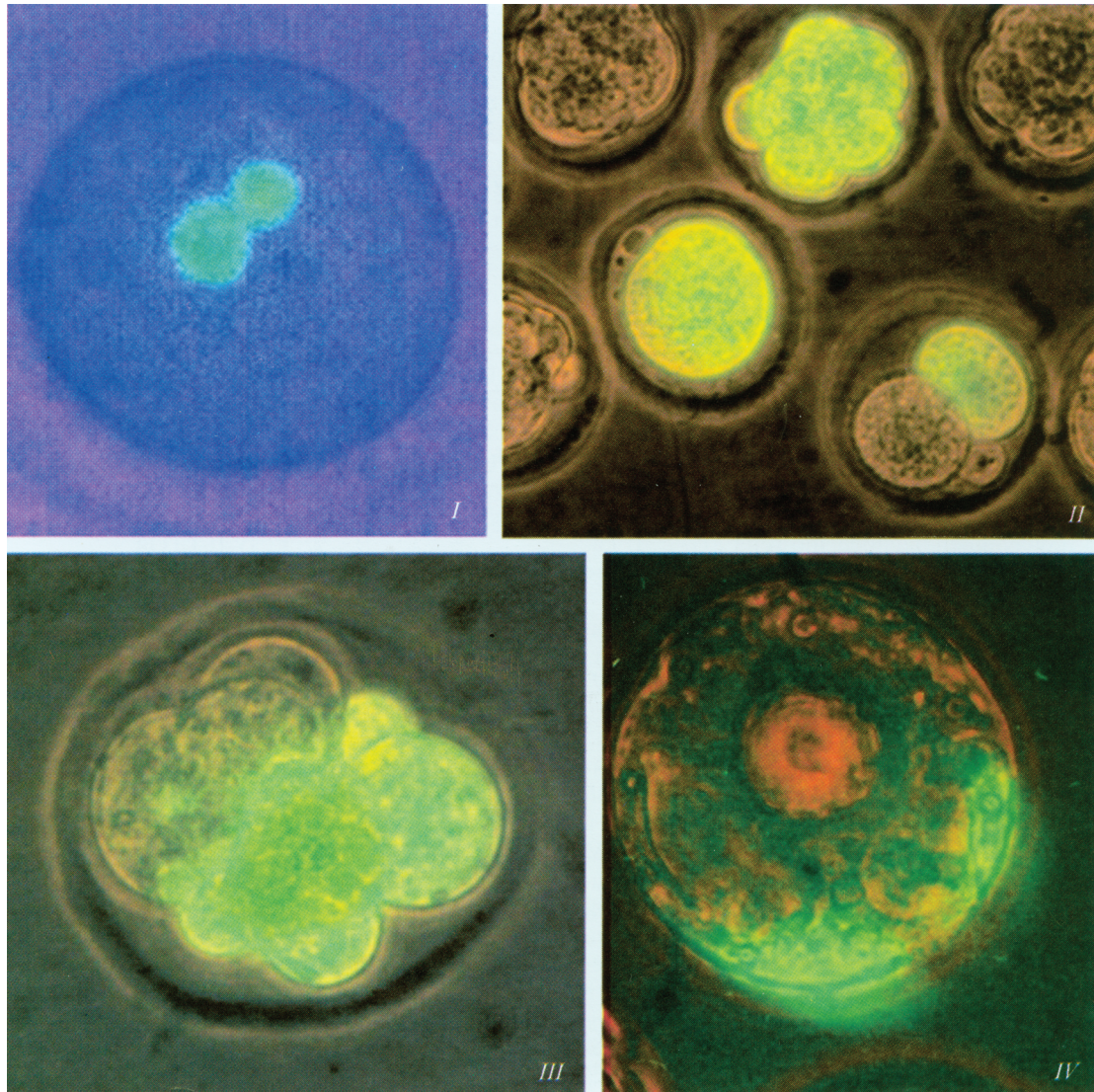


Рис. 2. Экспрессия гена *EGFP* после микроинъекции рекомбинантных молекул ДНК в пронуклеус зиготы.

*I* — одноклеточный зародыш (зигота) спустя 24 ч после инъекции плазмиды *H2AX-EGFP*; белок локализован в хроматине пронуклеусов. *II* — локализация *EGFP* в зародышах: остановившемся на одноклеточной стадии, в одном из blastомеров двухклеточного зародыша, в моруле, с экспрессией *EGFP* во всех blastомерах. *III* — морула, в которой ген *EGFP* экспрессируется в отдельных blastомерах. *IV* — blastоциста с мозаично светящимися клетками трофобласты.

продукта гена *EGFP*, наблюдали у 126 из 1560 (8.1 %) инъектированных зародышей. При этом 30.2 % флуоресцирующих зародышей находились на стадии поздних морул или ранних blastоцист. 20.6 % зародышей с зеленым белком остановились в развитии на одноклеточной стадии, имея биологический возраст, соответствующий стадии ранней blastоцисты.

Ген *EGFP* транскрибировался и транслировался не только у нормально развивающихся зародышей, достигших стадии морулы (рис. 2, *II*) и blastоцисты, но и у тех зародышей, которые остановились на более ранних стадиях развития. На рис. 2, *III* видно, что у дробящихся зародышей флуоресцируют не все, а лишь некоторые blastомеры, т. е. эти зародыши были мозаиками по экспрессии *EGFP*. Такие зародыши встречались чаще, чем зародыши, у которых флуоресцировали все blastомеры. Это относится как к двухклеточным зародышам (рис. 2, *II*), так и к blastоцистам (рис. 2, *IV*).

Экспрессия гена *EGFP* у зародышей потомков трансгенного самца. Часть зародышей, в которые была инъектирована конструкция № 1, трансплантировали в яйцеводы ложнобеременным самкам. У родившихся мышат (поколение  $F_0$ ) были выявлены три трансгенных самца. Один из них (самец № 9) стабильно передавал трансген потомству.

При исследовании зародышей, полученных от самок, оплодотворенных этим трансгенным самцом, наблюдалась иная картина, чем у зародышей, в пронуклеус которых инъектировали рекомбинантные молекулы ДНК с геном *EGFP*.

Прижизненная люминесцентная микроскопия зародышей, полученных от трансгенного самца № 9, свидетельствует о том, что у потомков этого самца ген *EGFP* не экспрессируется в зиготе и на двухклеточной стадии. На стадии 4 blastомеров у 4 из 27 зародышей визуализировался зеленый белок. На стадии 8 blastомеров треть зародышей экспрессировала этот ген.

Таблица 2

## Экспрессия гена EGFP в зародышах через 72—96 ч культивирования

Номер конструкции <sup>а</sup>	Всего инъецировано зигот	Всего с зеленым белком <sup>б</sup>	1 бластомер <sup>в</sup>	2—3 бластомера <sup>в</sup>	4—8 бластомеров <sup>в</sup>	Морулы, бластоцисты <sup>в</sup>	Дегенерирующие зародыши <sup>в</sup>
1	742	59 (7.9 ± 0.9)	15 (25.4 ± 5.7)	8 (13.6 ± 4.5)	4 (6.7 ± 3.3)	20 (33.8 ± 6.2)	12 (20.3 ± 5.2)
2	193	15 (7.8 ± 1.9)	7 (46.6 ± 12.9)	2 (13.3 ± 8.8)	3 (20.0 ± 10.3)	2 (13.30 ± 8.8)	1 (6.6 ± 6.4)
3	144	14 (9.7 ± 2.5)	6 (42.9 ± 13.2)	5 (35.7 ± 12.8)	1 (7.1 ± 6.9)	1 (7.1 ± 6.9)	1 (7.1 ± 6.9)
4	350	14 (4.0 ± 1.1)	4 (28.6 ± 2.1)	2 (14.3 ± 9.4)	0	7 (50.0 ± 13.4)	1 (7.1 ± 6.0)
5	111	19 (17.1 ± 3.6)	4 (21.1 ± 9.4)	7 (36.8 ± 11.1)	0	8 (42.1 ± 11.3)	0
6	20	5 (25.0 ± 9.9)	4 (80.0 ± 17.9)	1 (20.0 ± 17.9)	0	0	0
Итого	1560	126 (8.1 ± 0.7)	26 (20.6 ± 3.6)	25 (19.8 ± 3.6)	8 (6.3 ± 2.2)	38 (30.2 ± 4.1)	15 (11.9 ± 2.9)

<sup>а</sup> Приведены данные экспрессии гена *EGFP* в зародышах, достигших указанных стадий развития через 72—96 ч после инъекции следующих конструкций: № 1 *R26-EGFP SV40polyA*, № 2 *CMV-R26-EGFP-SV40polyA*, № 3 *CMV-R26-EGFP-BGHpolyA*, № 4 *EFa1-EGFPpolyA*, № 5 *CMV-EGFP-actin-BGHpolyA* и № 6 *CMV-EGFP-H2AX-BGHpolyA*. <sup>б</sup> В скобках указаны доля и ее ошибка (%) от общего числа инъецированных зародышей. <sup>в</sup> То же от общего числа зародышей, синтезирующих зеленый белок (см.: <sup>6</sup>).

У 2 зародышей, флуоресцировавших на 8-клеточной стадии, зеленый белок не обнаруживался на стадии поздней морулы. На стадии бластоцисты перестали флуоресцировать еще 2 зародыша. Таким образом, есть основание полагать, что трансген *EGFP* под контролем промотора *Rosa26* начинает экспрессироваться позже, чем активируются многие зиготические гены, т. е. со стадии 4—8 бластомеров. Кроме того, в ходе развития некоторых зародышей экспрессия гена зеленого белка прекращалась.

## Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о том, что после микроинъекции в мужской пронуклеус клонированных фрагментов ДНК, несущих ген *EGFP*, этот ген независимо от генетической конструкции может транскрибироваться и транслироваться у одноклеточных зародышей. Известно, что в эмбриогенезе всех млекопитающих существуют два периода: начальный период, когда развитие целиком зависит от реализации материнской генетической информации, т. е. от мРНК и белков, накопившихся в цитоплазме ооцита, и период, когда развитие полностью контролируется зиготическими генами. У разных видов млекопитающих переход от первого периода, где контроль развития осуществляется материнскими генами, ко второму периоду, где контроль развития осуществляется зиготическими генами, происходит на разных стадиях развития (Telford et al., 1990; Schultz, Heyner, 1992; Thompson, 1996; Latham, 1999; Schramm, Bavister, 1999; Schultz et al., 1999; Memili, First, 2000). Так, у мышей этот переход осуществляется в конце двухклеточной стадии. Опубликованы работы, в которых синтез мРНК выявлен раньше, т. е. в отцовских пронуклеусах одноклеточных зародышей мышей (Bouniol-Baly et al., 1995, 1997; Aoki et al., 1997), коров (Plante et al., 1994; Viuff et al., 1996; Memili, First, 2000), обезьян и человека (Daniels et al., 1997; Schramm, Bavister, 1999). Результаты наших исследований подтверждают явление ранней активации зиготических генов.

Биологическая роль ранней транскрипции не выяснена, о чем свидетельствует то, что первые деления у зародышей мышей, коров (Memili, First, 2000), человека и обезьян (Schramm, Bavister, 1999) не блокируются инги-

биторами РНК-полимеразы II. Высказано предположение о том, что на этой стадии имеет место разобщение транскрипции и трансляции, т. е. синтезируемая мРНК транслируется не сразу, а на более поздних стадиях либо часть ее вообще не транслируется (Forlani et al., 1998; Latham, 1999; Kirchhof et al., 2000). Наши данные показывают, что у инъецированных одноклеточных мышинных зародышей ген *EGFP* не только транскрибируется, но и транслируется. Об этом убедительно свидетельствует очень яркая зеленая флуоресценция, т. е. накопление в цитоплазме одноклеточных зародышей большого количества зеленого белка.

Ряд фактов свидетельствует о том, что активация генов у зародышей млекопитающих определяется изменениями свойств цитоплазмы, зависящими от «зиготических часов» (Majumder et al., 1993; Schultz, 1993; Latham, 1999), т. е. от биологического возраста, отсчет которого начинается с момента активации яйца. Логично предположить, что в наших экспериментах также наблюдалась ранняя активация генов, введенных в составе конструкций, поскольку флуоресценция зародышей появлялась в ряде случаев через 24 ч после инъекции, что соответствовало 45—47 ч биологического возраста. Это соответствует G<sub>2</sub>-фазе второго клеточного цикла, когда у нормальных мышинных зародышей осуществляется вторая, т. е. основная, волна активации зиготических генов, которые как транскрибируются, так и транслируются (Wang, Latham, 1997; Latham, 1999).

Показано, что если инъецировать клонированные фрагменты ДНК в мужской пронуклеус, то у трансгенных зародышей образуются характерные продукты зиготических генов (так называемый Transcription-Requiring Complex), причем эти белки появляются на том же сроке, что и в норме, т. е. на двухклеточной стадии (Kirchhof et al., 2000). Однако если заблокировать первый раунд синтеза ДНК, то трансген экспрессируется не на двухклеточной стадии, а раньше, у одноклеточных зародышей (Forlani et al., 1998). Известно, что при подавлении синтеза ДНК первое деление дробления не осуществляется, т. е. зародыши блокируются на одноклеточной стадии. В наших опытах сильно флуоресцирующие, следовательно, экспрессирующие ген *EGFP* трансгенные зародыши находились на одноклеточной стадии. Поэтому вполне возможно, что и в наших опытах экспрессия гена

*EGFP* на одноклеточной стадии является следствием остановки развития в результате блокады первого раунда репликации ДНК. В пользу этого предположения свидетельствует наличие у зеленых одноклеточных зародышей, развитие которых сильно отставало от их биологического возраста, двух гаплоидных пронуклеусов, не объединившихся в одно ядро (рис. 2, I).

Полагают, что в отличие от программируемой регуляции основной волны транскрипции генов РНК-полимеразой II у одноклеточных зародышей осуществляется нерегулируемая транскрипция, мало зависящая от типа промотора (Wiekowski et al., 1993; Beaujean et al., 2000). Наши данные подтверждают эту гипотезу, так как при инъекции в пронуклеус шести генетических конструкций, в которых ген *EGFP* находился под контролем разных промоторов, наблюдалась практически одинаковая частота одноклеточных зародышей с высоким содержанием зеленого белка.

При культивировании дробились не все «зеленые» зиготы. В отдельных случаях они разделялись на два blastomera неодинакового размера. При этом либо оба blastomera могли содержать зеленый белок, либо зеленый белок находился только в одном из них (рис. 2, II). Мозаичность экспрессии гена *EGFP* наблюдалась нами и на всех последующих стадиях развития трансгенных зародышей вплоть до стадии бластоцисты. У мозаичных зародышей зеленый флуоресцирующий белок содержался лишь в некоторых blastomeraх (рис. 2, III, IV). Мозаичность экспрессии трансгенов, инъектированных в пронуклеус зигот мышей, свиней и коров, описана в ряде статей (Takeda et al., 1991; Burdon et al., 1992; Kubisch et al., 1995a; Chan et al., 1999; Chauhan et al., 1999; Kirchhof et al., 2000). В одних случаях частота мозаичности у инъектированных зародышей была выше, а в других ниже (Burdon et al., 1992; Kubisch et al., 1995a). Полагают, что мозаичность экспрессии трансгенов не зависит от особенностей использованной генетической конструкции (Kirchhof et al., 2000), а является типичной характеристикой самой микроинъекции фрагментов ДНК в пронуклеусы. Наши данные хорошо согласуются с этими представлениями, так как после интродукции в зиготу шести разных генетических конструкций частота образования зародышей, мозаичных по гену *EGFP*, была примерно одинаковой.

Мы предполагаем, что в наших экспериментах усиленный синтез в зиготах большого количества зеленого белка был обусловлен эпизодическим состоянием гена *EGFP*. При этом в зиготе в активном состоянии находится много матриц ДНК, не интегрировавшихся в хромосомы и не подчиняющихся механизмам, регулирующим экспрессию зиготических генов.

Механизмы возникновения мозаичных трансгенных зародышей остаются невыясненными. Этот феномен объясняют либо неравномерным распределением неинтегрированной ДНК в клеточных делениях и внехромосомной репликацией ДНК (Burdon et al., 1992; Chauhan et al., 1999), либо утратой интегрированного в хромосомы трансгена в раннем эмбриогенезе (Kato et al., 1999). Примечательно, что если самкам-реципиентам трансплантировать эмбрионы, мозаичные по гену *EGFP*, то трансгенные особи не рождаются. Для этого нужно трансплантировать зародыши, экспрессирующие ген *EGFP* во всех blastomeraх (Takada et al., 1997; Kato et al., 1999; Kisseberth et al., 1999). Наши данные дают основание думать, что наблюдавшаяся мозаичность, скорее всего, была

обусловлена эпизодическим состоянием гена *EGFP* и(или) непрочной интеграцией этого гена в хромосомы. Эти вопросы нуждаются в более детальном изучении.

Авторы выражают благодарность В. Н. Томилину за оказание технической помощи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 04-04-48993 и 07-04-01216).

#### Список литературы

- Покицкий Г. Ф. 1973. Биологическая статистика. Изд. 3-е. Минск: Высшая школа. 320 с.
- Aoki F., Worrall D. M., Schultz R. M. 1997. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryos. *Develop. Biol.* 181 : 296—307.
- Bouniol-Baly C., Beaujean N. C., Bouniol-Baly C., Monod K., Kissa D., Jullien N., Aulner C., Amirand P., Debey P., Käs E. 2000. Induction of early transcription in one-cell mouse embryos by microinjection of the non-histone chromosomal protein HMG-I. *Develop. Biol.* 221 : 337—354.
- Bouniol-Baly C., Nguyen E. 1995. Endogenous transcription occurs at the 1-cell stage in the mouse embryo. *Exp. Cell Res.* 218 : 57—62.
- Bouniol-Baly C., Nguyen E., Besombes D., Debey P. 1997. Dynamic organization of DNA replication in one-cell mouse embryos: relationship to transcriptional activation. *Exp. Cell Res.* 236 : 201—211.
- Burdon T. G., Wall R. J. 1992. Fate of microinjected genes in preimplantation mouse embryos. *Mol. Reprod. Develop.* 33 : 436—442.
- Chan A., Kukolj G., Skalka A., Bremel R. 1999. Timing of DNA integration, transgenic mosaicism, and pronuclear microinjection. *Mol. Reprod. Develop.* 52 : 406—413.
- Chauhan M. S., Nadir S., Bailey T. L., Pryor A. W., Butler S. P., Notter D. R., Velandar W. H., Gwazdauskas F. C. 1999. Bovine follicular dynamics, oocyte recovery, and development of oocytes microinjected with a green fluorescent protein construct. *J. Dairy Sci.* 82 : 918—926.
- Daniels R., Lowell S., Bolton V., Monk M. 1997. Transcription of tissue-specific genes in human preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* 12 : 2251—2256.
- Forlani S., Bonnerot C., Capgras S., Nicolas J. F. 1998. Relief of a repressed gene expression state in the mouse 1-cell embryo requires DNA replication. *Development.* 125 : 3153—3166.
- Kato M., Yamanouchi K., Ikawa M., Okabe M., Naito K., Tojo H. 1999. Efficient selection of transgenic mouse embryos using EGFP as a marker gene. *Mol. Reprod. Develop.* 54 : 43—48.
- Kirchhof J. W., Carnwath E., Lemme K., Anastasiadis H., Schöler A., Niemann H. 2000. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol. Reprod.* 63 : 1698—1705.
- Kisseberth W. C., Brettingen N. T., Lohse J. K., Sandgren E. P. 1999. Ubiquitous expression of marker transgenes in transgenic mice and rats. *Develop. Biol.* 214 : 128—138.
- Kubisch H. M., Hernandez-Ledezma J. J., Larson M. A., Sikes J. D., Roberts R. M. 1995a. Expression of two transgenes in *in vitro* matured and fertilized bovine zygotes after DNA microinjection. *J. Reprod. Fertil.* 104 : 133—139.
- Kubisch H. M., Larson M. A., Funahashi H., Day B. N., Roberts R. M. 1995. Pronuclear visibility, development and transgene expression in IVM/IVF-derived porcine embryos. *Theriogenology.* 44 : 391—401.
- Latham K. E. 1999. Mechanisms and control of embryonic genome activation in mammalian embryos. *Int. Rev. Cytol.* 193 : 71—124.
- Majumder S., Miranda M., DePamphilis M. L. 1993. Analysis of gene expression in mouse preimplantation embryos demonstrates

that the primary role of enhancers is to relieve repression of promoters. *EMBO J.* 12 : 1131—1140.

Memili E., First N. L. 2000. Regulation of gene expression during early bovine embryogenesis: a review of timing and mechanism as compared to other species. *Zygote*. 8 : 87—96.

Plante L., Plante C., Shepherd D. L., King W. A. 1994. Cleavage and <sup>3</sup>H-uridine incorporation in bovine embryos of high *in vitro* developmental potential. *Mol. Reprod. Develop.* 39 : 375—383.

Schramm R. D., Bavister B. D. 1999. Onset of nucleolar and extranucleolar transcription and expression of fibrillar in macaque embryos developing *in vitro*. *Biol. Reprod.* 60 : 721—728.

Schultz G. A. 1993. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *BioEssays*. 15 : 531—538.

Schultz G. A., Heyner S. 1992. Gene expression in pre-implantation mammalian embryos. *Mutat. Res.* 296 : 17—31.

Schultz R. M., Davis W. J., Stein P., Svoboda P. 1999. Reprogramming of gene expression during preimplantation development. *J. Exp. Zool.* 285 : 276—282.

Siino J. S., Nazarov I. B., Svetlova M. P., Solovjeva L. V., Adamson R. H., Zalenskaya I. A., Yau P. M., Bradbury E. M., Tomilin N. V. 2002. Photobleaching of GFP-labeled H2AX in chromatin: H2AX has low diffusional mobility in the nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297 : 1318—1323.

Takada T., Lida K., Awaji T., Itoh K., Takahashi R., Shibui A., Yoshida K., Sugano S. A., Tsujimoto G. 1997. Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. *Nat. Biotechnol.* 15 : 458—461.

Takeda S., Toyoda Y. 1991. Expression of SV40-LacZ gene in mouse preimplantation embryos after pronuclear microinjection. *Mol. Reprod. Develop.* 30 : 90—94.

Telford N. A., Watson A. J., Schultz G. A. 1990. Transition from maternal to embryonic control of development: a comparison of several species. *Mol. Reprod. Develop.* 26 : 90—100.

Thompson E. 1996. Chromatin structure and gene expression in the preimplantation mammalian embryo. *Reprod. Nutr. Develop.* 36 : 619—635.

Verkhusha V. V., Tsukita S., Oda H. 1999. Actin dynamics in lamellipodia of migrating border cells in the *Drosophila* ovary revealed by a GFP-actin fusion protein. *FEBS Lett.* 445 : 395—401.

Viuff D., Avery B., Greve A., King W. A., Hyttel P. 1996. Transcriptional activity in *in vitro* produced bovine 2- and 4-cell embryos. *Mol. Reprod. Develop.* 43 : 171—179.

Wang Q., Latham K. E. 1997. A role for protein synthesis during embryonic genome activation in mice. *Mol. Reprod. Develop.* 47 : 265—270.

Wiekowski M., Miranda M., DePamphilis M. L. 1993. Requirements for promoter activity in mouse oocytes and embryos distinguish paternal pronuclei from maternal and zygotic nuclei. *Develop. Biol.* 159 : 366—378.

Поступила 15 I 2008

#### THE STUDY OF PREIMPLANTATION DEVELOPMENT OF MICE EMBRYOS LABELLED WITH GREEN FLUORESCENT PROTEIN GENE (EGFP)

A. V. Sorokin,<sup>1</sup> E. M. Nonyashvili,<sup>1</sup> O. V. Kidgotko,<sup>1</sup> L. K. Sasina,<sup>1,\*</sup> T. D. Aleynikova,<sup>1</sup>  
M. M. Shavlovsky,<sup>1</sup> S. I. Gorodetzky,<sup>2</sup> A. P. Dyban<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine RAMS, St. Petersburg, and <sup>2</sup> Institute of Molecular Biology RAS, Moscow;  
\* e-mail: sassinal@googlegmail.com

One of the crucial problems of developmental biology is the study of mechanisms of regulation of gene expression in early embryogenesis. Here we studied dynamics of mosaic appearance of a marker fluorescent protein in *in vitro* developing mice embryo derived from zygotes after microinjections to male pronuclei of cloned DNA fragment carrying EGFP under control of different promoters. Main attention was paid to initial stages of development, when structural rearrangements and reprogramming of both parental genomes, activation of zygotic genes, and control of development by embryo genome take place.

Key words: mice embryos, *EGFP* gene, transgenic embryos, zygotic genes activation.