

Поддержание генетически модифицированных линий мышей: вклад в развитие биокolleкций в России

Е.С. Петрова¹, кандидат технических наук, старший научный сотрудник,
А.В. Громова², кандидат ветеринарных наук, научный сотрудник,
М.С. Анисименко³, младший научный сотрудник,
Л.А. Рубан¹, С.А. Егорова¹, зав. виварием НИИФФМ,
И.Ф. Петровская⁴, директор ООО «ЭМБИ», Т.Г. Амстиславская^{1,5}, доктор биологических наук,
главный научный сотрудник, зам. директора НИИФФМ по научной работе, Т.В. Липина^{1,5},
кандидат биологических наук, зав. лабораторией экспериментальных
моделей патологии когниции и эмоций

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины», 630117, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4, к. 904;

² Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, 664047, Россия, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78;

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», 630117, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12;

⁴ Общество с ограниченной ответственностью «Экспериментальные модели для биологических испытаний» (ООО «ЭМБИ»), 630093, Россия, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 10;

⁵ Новосибирский государственный университет, 630090, Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, E-mail: petrovaes@physiol.ru

Резюме. Потребность в биомедицинских исследованиях на мышах с генетическими нарушениями возрастает постоянно во всем мире. Неотъемлемой частью работы ученых является эффективное сотрудничество между научно-исследовательскими группами как внутри одной страны, так и на международном уровне. Процесс импорта генетически модифицированных мышей в Россию сопряжен с выполнением ряда условий, поскольку необходимо оформление таких документов, как сертификат здоровья, генетический паспорт, интеллектуальные права на передачу той или иной линии мышей, договор о научном сотрудничестве. Рассматривается процедура доставки генетических линий мышей из центра фенотипики (Toronto Centre for Phenogenomics, Канада, <http://www.phenogenomics.ca/>) в виварий НИИФФМ РАН (Россия). На примере питомника НИИФФМ, содержащего модифицированных мышей линий DISC1-Q31L, DISC1-L100P, PDE4B-M220T, Clstn2-KO и составляющих уникальную научную установку «Биологическая коллекция – генетические биомодели нейropsychических заболеваний», описана организация поддержания племенного ядра биокolleкции, включая регулярную проверку на патогены, возвратное скрещивание генетически модифицированных мышей с мышами дикого типа и их генотипирование. Представленные данные могут быть полезны для продуктивного расширения биокolleкций в России.

Ключевые слова: генетические линии мышей, биокolleкция, разведение, содержание, генотипирование.

Для цитирования: Петрова Е.С., Громова А.В., Анисименко М.С., Рубан Л.А., Егорова С.А., Петровская И.Ф., Амстиславская Т.Г., Липина Т.В. Поддержание генетически модифицированных линий

мышей: вклад в развитие биокolleкций в России. Лабораторные животные для научных исследований. 2018; 2. <https://doi.org/10/29926/2618723X-2018-02-01>

Maintenance of genetically modified mouse lines: input to the development of bio-collections in Russia

E. Petrova¹, PhD, Senior Researcher, A. Gromova², Ph.D., Researcher,
M. Anisimenko³, L. Ruban¹, S. Egorova¹, Head vivarium,
I. Petrovskaya⁴, Director,

T. Amstislavskaya^{1,5}, Doctor of biological sciences, Senior Researcher, deputy Director,
T. Lipina^{1,5}, PhD., the head laboratory of experimental models of the pathology
of cognition and emotions

¹Federal State Budgetary Scientific Institution, Scientific Research Institute of Physiology and Basic Medicine, 630117, Russia, Novosibirsk, street Timakova, 4, r. 904;

²FSHI «Irkutsk Research Antiplague Institute of Siberia and Far East» of Rospotrebnadzor, 664047, Russia, Irkutsk, street Trilissera, 78;

³Federal State Budgetary Scientific Institution, Scientific Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, 630117, Russia, Novosibirsk, street Timakova, 2/12;

⁴Experimental Models for Bio-assay, Limited Liability Company (EMBI, LLC), 630093, Russia, Novosibirsk, street Academician Lavrentyev, 10;

⁵Novosibirsk State University, 630090, Russia, Novosibirsk, street Pirogova, 1
e-mail: petrovaes@physiol.ru

Summary. There is a need for biomedical research on mice with genetic impairments, which is fast growing around the world. An essential part of science includes effective cooperation between research groups as within the same country and at the international level. The process of importing the genetically modified mice to the Russian Federation involves a number of requirements, as it is necessary to prepare range of documents, including a health certificate, a genetic passport, intellectual rights to transfer genetic lines, an agreement on scientific collaboration. This article describes the process of shipment of the genetic lines of mice from the center of phenogenomics (Toronto Center for Phenogenomics (<http://www.phenogenomics.ca/>), Canada) to the vivarium of the Institute (Russia). The example of unique biocollection of Scientific Research Institute of Physiology and Basic Medicine (Novosibirsk) containing genetic mouse lines: DISC1-Q31L, DISC1-L100P, PDE4B-M220T, Clstn2-KO, which are the core of the unique scientific installation "Biological collection – genetic biomodels of neuropsychiatric diseases", described how to maintain the breeding colony of the bio-collection, including regular testing for pathogens, backcrossing of genetically modified mouse lines and their genotyping. The presented data can be useful for the productive expansion of bio-collections in Russia.

Key words: mouse genetic lines, bio-collections, breeding, maintenance, genotyping

For citation: Petrova E., Gromova A., Anisimenko M., Ruban L., Egorova S., Petrovskaya I., Amstislavskaya T., Lipina T. Maintenance of genetically modified mouse lines: input to the development of bio-collections in Russia. *Laboratory Animals for Science*. 2018; 2. <https://doi.org/10/29926/2618723X-2018-02-01>

Введение

В настоящее время изучение фундаментальных и прикладных биомедицинских проблем невозможно без проведения исследований на лабораторных животных, где особая роль отведена генетически модифицированным организмам. Благодаря современным молекулярно-клеточным методам появилась возможность создания генетических линий животных. В результате этого у исследователей те-

перь есть уникальный инструмент для выяснения роли того или иного гена как во временном (возможность изучать эффекты гена при его активации/ингибировании в тот или иной период нейроразвития), так и в пространственном (возможность изучать эффекты гена при его активации/ингибировании в той или иной клеточной популяции) измерениях. В настоящий момент мышь является широко используемым организмом для изучения биологии и различных расстройств у человека по нескольким причинам. Во-первых, оба генома мыши и человека содержат 3,1 биллион пар оснований и ~5% геномов состоят из генов, которые идентичны в среднем на 85% [1]. Во-вторых, организм мыши подходит для проведения успешных генетических модификаций, в отличие, например, от крыс. Разработка CRISPR-Cas9 технологии, которая позволяет осуществлять высокоэффективное редактирование генома, используя сайт-направленные ДНК-эндонуклеазы, значительно ускорила создание новых генетических линий мышей [2]. Генетические модели, разработанные на мышах, широко используются в различных областях биологии – от нейронауки и этологических исследований до физиологии и онкологии [3]. Так, в Лаборатории Джексона (The Jackson Laboratory <https://www.jax.org/>) создано более 5000 генетически модифицированных линий мышей, из которых 1500 – модели генетических заболеваний человека [4]. Наконец, содержание и разведение мышей сравнительно дешево и достаточно доступно. На рис. 1 представлена динамика количества публикаций за последние 17 лет при запросе в базе PubMed словосочетания «genetically modified mice», отражающая растущий спрос на генетические линии мышей.

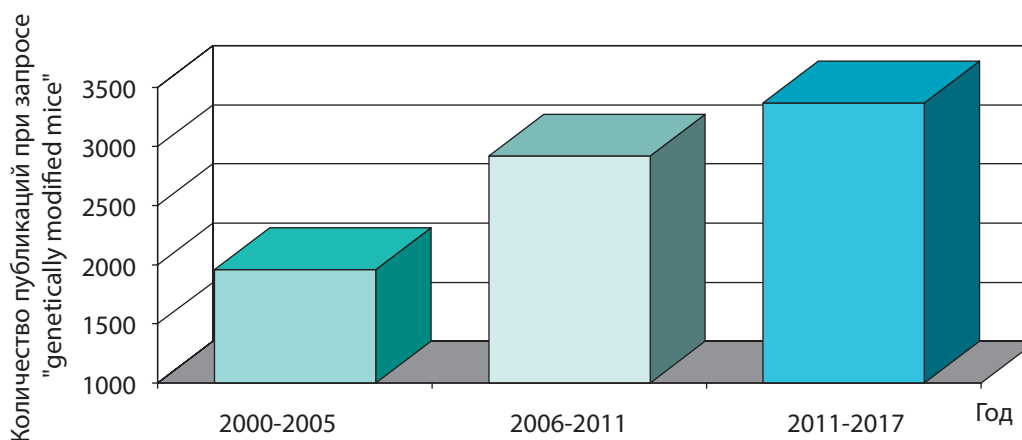


Рис. 1. Динамика числа публикаций с 2000 по 2017 г. при запросе в базе PubMed словосочетания «genetically modified mice»

Разнообразие генотипов мышей привело к созданию в 2005 г. Международной организации Federation of International Mouse Resources – FIMRe (<http://www.fimre.org>), которая объединяет 17 национальных центров генетических ресурсов Северной Америки, Европы, Азии, Австралии и координирует их работу [5]. Генетически модифицированные линии мышей доступны из различных международных ресурсов, включая, центр региональных ресурсов мутантных мышей

(IMMRRRC, <http://www.mmrrc.org>), Европейский архив мутантных мышей (EMMA, <http://www.emmanet.org>), питомник Taconic Farms (<http://www.taconic.com>), Японский биоресурсный центр RIKEN (http://www.brc.riken.jp/rmpd/mouse_phenome_about.html), Лаборатория Джексон (<http://www.jax.org>).

В России не так много питомников, содержащих генетически модифицированные линии мышей. Например, к биоресурсным центрам (со статусом SPF; specific pathogen free – отсутствие патогенных микроорганизмов) относятся питомник лабораторных животных «Пушино», в котором содержатся 7 генетических линий; питомник на базе SPF-вивария ИЦиГ СО РАН (Новосибирск) включает коллекцию из 13 генетически модифицированных линий мышей; SPF-виварий ИФАВ РАН (Черноголовка) – 7 линий мутантных мышей.

Для изучения нейробиологических механизмов ментальных расстройств на базе НИИ физиологии и фундаментальной медицины (Новосибирск) в 2016 г. была создана биоресурсная коллекция генетических мышей «Биологическая коллекция – генетические биомодели нейропсихиатрических расстройств» (<http://www.physiol.ru/structure/ckpunu/unu>), включающая 4 генетические линии: DISC1-Q31L, моделирующая депрессивно-подобное состояние; DISC1-L100P, соответствующая модели шизофрении [6]; PDE4B-M220T, проявляющая эндотипы посттравматического стрессового расстройства [7]; Clstn2-KO, моделирующая расстройство аутистического спектра с проявлением гиперактивности [8, 9]. Для поддержания биоресурсной коллекции питомника необходимо выполнять ряд обязательных методических процедур, регламентирующих разведение животных, обновление племенных ядер, включая возвратное скрещивание с диким типом, плановый контроль соответствия генотипа и эндотипов каждой генетической линии.

Введение в мировую практику требований системы GLP (Good Laboratory Practice) для проведения доклинических испытаний лекарственных веществ привело к еще более жестким условиям к стандартизации содержания животных. Стандартность лабораторного животного определяется не только его генетическим статусом, технологией разведения и содержания, но и состоянием его здоровья. По состоянию здоровья лабораторные животные делятся на следующие категории: конвенциональные – содержащиеся в открытой системе (1-я категория); улучшенные конвенциональные – находящиеся в барьерной системе неполного типа. Исходными животными этой категории могут быть только животные более высокого класса качества (SPF); 2-я категория качества животных соответствует таковой, именуемой во многих странах MD (Minimal Diseases); 3-я и 4-я категории соответствуют категории SPF животных, содержащихся в строгой барьерной системе; 5-я категория включает гнотобиоты (безмикробных) или аксенных животных, содержащихся в изоляторах. Стандартность животных определяется мониторингом их статуса на патогены в соответствии с категорией. Контроль состояния животных осуществляется регулярно с минимальной частотой для животных 1-й и 2-й категорий – 1 раз в 6 мес, для 3-й и 4-й категории – 1 раз в 2–3 мес, для 5-й категории – 1 раз в 6 мес.

Цель настоящей публикации – обсуждение вопросов приобретения мутантных мышей из международных источников, поддержания чистоты генетической линии в локальных питомниках России, а также предоставления методических рекомендаций по содержанию и генотипированию генетически модифицированных линий мышей на примере биоколлекции на базе НИИФФМ.

Материал и методы

Лабораторные животные. Линия мышей DISC1-Q31L несет точечную мутацию (замена одного нуклеотида) во 2-м экзоне гена *DISC1* (Disrupted-in-Schizophrenia-1), приводящую к замене глутамина на лейцин в положении 31-й аминокислоты в DISC1 протеине. Мыши линии DISC1-L100P с точечной мутацией во 2-м экзоне гена *DISC1*, приводящей к замене лейцина на пролин в положении 100-й аминокислоты в белке DISC1. Линия PDE4B-M220T несет мутацию в 7-м экзоне гена *PDE4B* (Phosphodiesterase 4B), приводящая к замене метионина на треонин в 220-м положении протеина PDE4B. Линия мышей *Clstn2-KO* с нокаутом гена *кальсинтенин-2* (*calsyntenin-2*; *Clstn2-KO*). Мутантные линии мышей (DISC1-Q31L; DISC1-L100P; PDE4B-M220T) были созданы при сотрудничестве лаборатории профессора Дж. Родера с исследователями биоресурсного центра RIKEN [6], а *Clstn2-KO* линия была получена при взаимодействии с лабораторией профессора А.-М. Крэга [8].

Импорт генетических линий мышей в Россию. Организацию ввоза генетических линий мышей из Центра феногеномики (Торонто, Канада; <http://www.phenogenomics.ca/>) в виварий НИИФФМ (<http://www.physiol.ru/>; Новосибирск, Россия) осуществляло ООО «ЭМБИ» (<https://academpark.com/residents/1648/>; <http://embiresearch.com>). Были подготовлены следующие документы:

- контракт поставки лабораторных мышей между Центром феногеномики и ООО «ЭМБИ»;
- счет на оплату контракта;
- международный ветеринарный сертификат здоровья;
- генетический паспорт на каждую генетическую линию;
- разрешение на ввоз от Россельхознадзора через пункты пропуска, расположенные на внешней границе Таможенного союза, в которых осуществляется пограничный государственный ветеринарный контроль.

Общее число ввозимых самцов и самок четырех генетических линий мышей составило 45, т.е. более установленного Россельхознадзором (по правилам Россельхознадзора число животных не должно превышать 50). Доставка генетически модифицированных мышей производилась компанией «Мировой курьер» (<https://www.worldcourier.com/>) и заняла 5 дней, включая отправку из Торонто (24.06.2014) и получение ООО «ЭМБИ» в Новосибирске (28.06.2014).

Инбредное разведение гомозиготных генетических линий мышей. Разведение генетических линий осуществляют по принципу тесного инбридинга в 2 этапа: 1-й этап – работа с племенным ядром и 2-й – ступенчатое расширенное воспроизвод-

ство для использования в экспериментах (племенное стадо). Племенное ядро линии представляет собой группу животных, состоящую из размножающихся пар репродуктивного возраста (родных братьев и сестер) в соотношении 1 самец/1 самка. В пределах племенного стада к 1 самцу подсаживают 2 самки. Обязательна регистрация инбредного возраста каждого гнезда, которая определяется количеством поколений, обозначается «F» и номером поколения. Все рожденные от 1-го поколения (F1) инбредного разведения потомки (помет) считаются 2-м поколением (F2), при скрещивании которого рождается 3-е поколение (F3) и т.д. Данные генетико-селекционные процедуры являются основополагающими для исключения возможности генетической контаминации (случайных скрещиваний) и потери гомозиготности линий.

Обновление племенных ядер гомозиготных генетических линий мышей. Для поддержания каждой генетической линии формируют 8–12 родительских гнезд, которые при выбраковке подвергают обновлению за счет ссаживания особей из детей (пометов) генетических линий, достигших половозрелого возраста, находящихся в непосредственно родственных связях. Родительские племенные ядра по истечении репродуктивного возраста (7–8 мес) подвергаются выбраковке (эвтаназии с последующей утилизацией). При падеже/признаках нежизнеспособности самки или самца в родительской паре гнезда выбраковывается все гнездо. При разведении генетических линий мышей биоресурсной коллекции, соблюдая инбридинг, необходимо организовать возвратное скрещивание каждой мутантной/нокаутной линии с контрольной линией – мыши дикого типа C57Bl/6NCr1 для получения гетерозиготных животных. Затем полученных гетерозиготных самцов и самок используют для создания гнезд с целью формирования потомства, состоящего из 25% мышей дикого типа, 50% – гетерозигот и 25% – гомозиготных особей в одном помете. Полученных животных маркируют (рис. 2) и генотируют для дальнейшего формирования новых гнезд между гомозиготными особями. Данная процедура осуществляется с регулярностью 1 раз в 1–2 года.



Рис. 2. Схема маркировки ушей для их дальнейшего генотипирования и экспериментальных работ. По индивидуальным меткам на левом и правом ухе присваиваются порядковые номера от 1 до 5 для каждой особи

Определение патогенов. Мониторинг здоровья генетических линий мышей выполняется в соответствии с рекомендациями FELASA (Федерация европейских научных ассоциаций по лабораторным животным) методом иммуноферментного анализа (ИФА) с детекцией вирусов специфичными антителами в сыворотке или плазме крови и методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения бактерий и вирусов в фекалиях и мазках из ротовой полости [10]. Для исследования патогенов у мышей отбирали биологический материал и направляли в лабораторию ООО «Белки-Биотехнологии» (<https://www.bbt-lab.com>).

Для определения вирусов методом ИФА необходимо отобрать плазму или сыворотку крови. Допустимо ее разведение фосфатно-солевым буфером не более чем в 10 раз. Объем неразведенной сыворотки 1 образца на 1 патоген должен составлять 5 мкл, т.е. для анализа вирусов, рекомендуемых FELASA, необходимо не менее 50 мкл сыворотки. Для определения бактерий верхних дыхательных путей методом ПЦР берется мазок из ротовой полости. Зонд не должен касаться рабочих поверхностей и рук. Анализ остальных бактерий из списка FELASA проводится в образцах фекалий животных методом ПЦР. Для исследования требуется 1 г фекалий от каждого исследуемого животного.

Контроль микробиологического статуса конвенциональных мышей в виварии НИИФФМ осуществляется следующими методами:

Тест-система. Метод состоит в исследовании животных высокой категории качества (SPF) с известным исходным состоянием после пребывания их в течение определенного срока (8 нед и более) в колонии конвенционального разведения.

Выборка животных из популяции колонии. Метод включает общее посмертное, микробиологическое и гистологическое обследование. Шансы обнаружить инфекцию зависят от числа проверенных животных по отношению к общему числу особей в колонии (%), а также от степени распространения инфекции среди животных. Мыши отбираются из каждой зоны обитания, где минимальная выборка составляет не менее 10 особей, 5 из которых – в возрасте 10–12 нед, 5 – старше 6 мес.

Плановая проверка животных на инфекции. Метод позволяет обнаружить патогены или повреждения, угрожающие здоровью колонии и качеству проводимых экспериментов.

Результаты мониторинга здоровья хранятся у руководителя, курирующего биоресурсную коллекцию генетических линий мышей на бумажном носителе, который должен быть заверен подписью и печатью лаборатории, где выполнялось исследование.

