МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2025, том 59, №1, с. 1–21, рис. – 0, фото – 7, табл.– 0

Адаптация метода получения трансгенных мышей на основе *in utero* электропорации

Ю.В. Попова [1,2], В.Д. Бец [3], Е.С. Омелина [1], Л.В. Болдырева [1,4], Е.Н. Кожевникова [1, 2 *]

[1] Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия

[2] Новосибирский государственный аграрный университет, 630039 Новосибирск, Россия

[3] Новосибирский государственный технический университет, 630073 Новосибирск, Россия

[4] Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, 630117 Новосибирск, Россия

[*]e-mail: kozhevnikova@mcb.nsc.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

МАТЕРИАЛЫ

Ниже перечислены реагенты, оборудование и приборы, которые использовались в этом исследовании. Вместо них можно использовать аналогичные материалы от других производителей.

Реагенты

Реагенты для приготовления смеси для редактирования генома и для in vitro тестирования sgRNA

1. EnGen sgRNA Synthesis Kit (NEB, кат. № E3322S)
2. Мишень-специфичные ДНК олигонуклеотиды
3. Monarch RNA Cleanup Kit (NEB, кат. № T2040S)
4. EnGen Spy Cas9-NLS белок (NEB, кат. № M0646T)
5. GeneRuler 1 kb Plus DNA маркер (Thermo Fisher Scientific, кат. № SM1332)
6. T4 ДНК лигаза (Evrogen, кат. № LK001)
7. ScaI эндонуклеаза (New England Biolabs Inc., кат. № R3122)
8. pBlueScript SK (+) вектор
9. *E. coli* TOP10 электрокомпетентные клетки
10. Nuclease-free вода

Реагенты для проведения i-GONAD

1. EmbryoMax Advanced KSOM Embryo Medium (Sigma, кат. № MR-101-D)
2. EmbryoMax M2 Medium (Sigma-Aldrich, кат. № MR-015-D)
3. Минеральное масло (Sigma-Aldrich, кат. № M8410-100ML)
4. Opti-MEM I Reduced Serum Medium (ThermoFisher Scientific, кат. № 31985062)
5. Гиалуронидаза (Roanal, кат. № 08091)
6. Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) (Prospec, кат. № HOR-272)
7. Human Chorionic Gonadotropin (HCG) (Prospec, кат. № HOR-250)
8. Коммерческий препарат “Zoletil 100” (водный раствор медетомидина гидрохлорида, 100 mg/ml) (для ветеринарии) (Virbac, France)
9. Коммерческий препарат “Domitor” (водный раствор медетомидина гидрохлорида, 1 mg/ml) (для ветеринарии) (Orion Pharma, Finland)
10. Коммерческий препарат “Rimadyl” (раствор для инъекций, 5%) (для ветеринарии) (Zoetis, Brazil)
11. Fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) (Sigma-Aldrich, кат. № FD4-1G)
12. Opti-MEM Medium (Thermo Fisher Scientific, кат. № 31985062)

13. Trypan Blue Stain, 0.4% (Thermo Fisher Scientific, кат. № T10282);
14. Phosphate buffer saline (PBS) without Ca2+ and Mg2+, pH 7.2 (Thermo Fisher Scientific, кат. № 70013032)
15. Физраствор (для растворения и разведения веществ для их дальнейшего инъекционного введения), 0.9%
16. Медицинский клей “БФ-6”, спиртовой раствор для наружного применения (Verteks, Russia)
17. Chemi-спрей, противовоспалительное и антибактериальное средство (для ветеринарии) (Industrial Veternaria S.A. Invesa, Spain)
18. Агароза (Bioron, кат. № 604005)
19. Дезинфицирующее средство “Комбидез” (KiiltoClean, Russia)
20. Этанол, 70% (для дезинфекции)
21. Спиртовой раствор йода, 5%
22. mQ H_2O

Реагенты для генотипирования

1. BioMaster HS-Taq PCR-Color (2×) (Biolabmix, кат. № MHC010-200)
2. Набор для выделения ДНК и РНК из агарозных гелей (Biolabmix, кат. № N-Gel-250)
3. BigDye Terminator v3.1 cycle Sequencing kit (ThermoScientific, кат. № 4337455)
4. Протеиназа K (20 mg/ml) (SibEnzyme, кат. № E347)
5. Pfu полимераза (SibEnzyme, кат. № B310)
6. EcoRV эндонуклеаза (SibEnzyme, кат. № SE-E059)
7. SDS (Applichem, кат. № A1112.0500)
8. EDTA (0.5M, pH=8.0) (Sigma, кат. № BCBQ4662V)
9. Агароза (Bioron, кат. № 604005)
10. TrisHCl (1M, pH=8.0)
11. NaCl (5M)
12. KAc (5M)
13. Хлороформ
14. Этанол, 96%
15. mQ H_2O

Оборудование

Оборудование, используемое во всех процедурах

1. 1.5 мл микроцентрифужные пробирки (SSI, кат. № EP-150-J)
2. Флаконы: 15 и 50 мл (Axygen, кат. № SCT-15ml-500, кат. № SCT-50ml-500)
3. Наконечники с фильтрами: 10, 200 и 1000 мкл (Accumax, кат. № Ac-AT-10-S-F-R; NEST, кат. № N-312012; SSI, кат. № SSI-4337NSFS)
4. Автоматические пипетки: 0.5-10, 2-20, 20-200 и 100-1000 мкл (IKA Pette vario, кат. № 0020011211, № 0020011213, № 0020011215, № 0020011216)
5. Перчатки: S, M и L размер (Kimberly-Clark, кат. № 57371, № 57372, № 57373)
6. Стеклянные бутылки: 100, 250, 500 и 1000 мл (Rasotherm, кат. № 95206001, № 95206002, № 95206003, № 95206004)
7. Парафильм M (Pechiney Plastic Packaging Company, кат. № PM 996)

Оборудование для проведения i-GONAD

1. Одежда для оперирования: стерильные маски, хирургические шапочки, бахилы и медицинские халаты либо костюмы.
2. Чашки Петри: 3.5 и 10 см диаметр (Biologix, кат. № 07-3035; Next, кат. № 704002)

3. Шприцы инсулиновые одноразовые трехкомпонентные, с несъемной ультрамикроиглой 29G (0.33×12.7 мм), 1 мл (SFM, кат. № U-100)
4. Шприцы одноразовые, трехкомпонентные, игла 21G (0.3×40 мм), 5 мл (INEKTA, кат. № 1016542)
5. Шприцы Luer Lock одноразовые трехкомпонентные, без иглы, 50 мл (Vogt Medical GmbH, кат. № 0154-375-291-137)
6. Фильтры для шприца, 0.22 мкм (TTP, кат. № 99722)
7. Хирургическая рассасывающаяся шовная нить PGA (полигликолид или полигликолевая кислота) с иглой, USP 5/0, 75 см, HR-20 (Lintex, кат. № HR-20)
8. Малярная лента (для фиксирования лап животных)
9. Вата хирургическая
10. Стерильные, впитывающие салфетки, плотность 50 г/м^2, 10×10 см (Mastmed, Russia, кат. № 613013)
11. Безворсовые салфетки для чистки оптики, 21.3×11.4 см, (Kimtech Science, кат. № 7552)
12. Бумажные салфетки
13. Фильтровальная бумага
14. Силиконовый коврик (размер 30×30 см)
15. Контейнер для взвешивания мышей
16. Защитный щиток или очки (необходимы для защиты лица во время стрижки животного!)
17. «Mouth pipette» («мундштук», наконечник с фильтром (20 или 200 мкл), силиконовая трубка ~30 см, 2 шт. наконечника без фильтра 200 мкл) со стеклянными микропипетками (для проведения инъекций в яйцевод)
18. Стеклянный капилляр, 1.0 мм O.D. × 0.58 мм I.D. (Harvard Apparatus Ltd, кат. № GC100F-10)
19. Полиэтиленовый пакет для сбора и утилизации медицинских отходов класса Б, 5 л, 33×30 см

Приборы

1. Электропоратор (*in vivo* и *in vitro* электропоратор CUY21EDIT II) (BEX CO LTD, кат. № CUY21EDIT2)
2. Электрод пинцетного типа (BEX CO LTD, кат. № LF650P3)
3. Миницентрифуга-вортекс “Micro-spin” (Biosan, кат. № BS-010201-AAA)
4. Центрифуга (Eppendorf, кат. № 5417R)
5. T100 амплификатор (Bio-rad, кат. № 1861096)
6. Термостат (Biosan, кат. № BS-010401-QAA)
7. NanoDrop (NanoDrop Technologies, кат. № ND-1000)
8. Микроскоп (Zeiss, кат. № Stemi 2000)
9. Вертикальный пуллер игл (микрокузница) для изготовления микропипеток из стеклянных капилляров путем вытягивания их кончиков
10. Термоковрики (для рептилий) (максимальная температура 38°C): размер 14×15 см (1 шт.) и 28×53 см (2-3 шт.)
11. Лабораторные весы (OHAUS corp., кат. № Scout II/SC2020)
12. Триммер (машинка для стрижки волос)
13. Таймер

Хирургические инструменты

1. Лезвия для скальпеля (RWD, кат. № S31010-01)
2. Скальпель-ручка (RWD, кат. № S32004-13)
3. Съемник лезвий с ручки-скальпеля (RWD, кат. № S33009-06)

4. Микропинцет-Str, длина 34 мм, кончик 0.35×0.55 мм, 11 см (RWD, кат. № F13002-11)
5. Пинцет перевязочный Str, ширина кончика 1.4 мм, длина зубцов 19 мм, 15.5 см (RWD, кат. № F12016-15)
6. DIEFFENBACH Bulldog Клипсы-Str / 14×4 мм / 48 мм (RWD, кат. № R33001-48)
7. MAYO-HEGAR Иглодержатель-Str / 17.5×1.75 мм / 14 см (RWD, кат. № F31034-14)
8. IRIS T.C. Ножницы (закругленные кончики)-S/S Str / 9 см (RWD, кат. № S18004-09)
9. Пинцет перевязочный без насечек -45°Cvd, S/S, кончик 0.5×0.2 мм, 10 см (RWD, кат. № F12013-10)
10. VANNAS Пружинные ножницы (треугольные кончики)-S/S Str / 8×1.55 мм / 8 см (RWD, кат. № S11001-08)
11. VANNAS Пружинные ножницы (треугольные кончики)-S/S Str / 3.5×1.3 мм / 8 см (RWD, кат. № S11035-08)

МЕТОДЫ

Примечание: все манипуляции с животными проводятся строго в специальной одежде (стерильные маски, хирургические шапочки, бахилы, медицинские халаты или костюмы)!

Подготовка смеси для редактирования генома. sgRNA к гену *Il10* разработана с использованием веб-инструмента CHOPCHOP (https://chopchop.cbu.uib.no/) для выбора целевых участков для CRISPR/Cas9 и протокола «Target-specific oligo design» к набору EnGen sgRNA Synthesis Kit, *S. pyogenes* (NEB, кат. № E3322). В результате мы использовали два ДНК-олигонуклеотида – Il10_ex1_sg (к экзону 1 гена *Il10*) и Il10_ex2_sg (к экзону 1 гена *Il10*). Последовательности олигонуклеотидов:

Il10_ex1_sg – 5’ TTCTAATACGACTCACTATAGCAGCATAGCAGTGCTGAGCCGTTTT AGAGCTAGA 3’

Il10_ex2_sg – 5’ TTCTAATACGACTCACTATAGCTAACCGACTCCTTAATGCGTTTTA GAGCTAGA 3’

sgRNA к экзону 1 и экзону 2 гена *IL10* были синтезированы с использованием праймеров Il10_ex1_sg и Il10_ex2_sg, соответственно, и EnGen sgRNA Synthesis Kit (NEB, кат. № E3322S). Синтезированные sgRNA были очищены с использованием Monarch RNA Cleanup Kit (https://www.neb.com/en/products/t2040-monarch-rna-cleanup-kit-50-ug) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию чистых sgRNA определяли с помощью NanoDrop.

Для приготовления раствора для редактирования генома компоненты CRISPR смешивали так, чтобы конечная концентрация компонентов составляла 1 мг/мл для белка Cas9-NLS (NEB, кат. № M0646T) и 30 мкМ для sgRNAs. Этот раствор доводили с помощью

среды Opti-MEM I Reduced Serum Medium (ThermoFisher Scientific, кат. № 31985062) до объема 1,5 мкл/яйцевод для электропорации.

Клонирование плазмид и тестирование sgRNA *in vitro*. Для анализа синтезированных sgRNA мы провели анализ с использованием нуклеазы Cas9 *in vitro*. Для этого проводили ПЦР-амплификацию целевых локусов гена *Il10* в общем растворе объемом 25 мкл с использованием наборов праймеров Il10_ex1_gDNA_F/Il10_ex1_gDNA_R и Il10_ex2_gDNA_F/Il10_ex2_gDNA_R к экзону 1 и экзону 2 гена *Il10* соответственно. Последовательности олигонуклеотидов:

Il10_ex1_gDNA_F – 5’ ATTGCATGGTTTAGAAGAGGGA 3’

Il10_ex1_gDNA_R – 5’ TTATTGTCTTCCCGGCTGTACT 3’

Il10_ex2_gDNA_F – 5’ AGTCCTTGCATTCACGTTCTTT 3’

Il10_ex2_gDNA_R – 5’ GACTTACTGGAATGGTGATCTGTTGC 3’.

Продукты ПЦР очищали из агарозного геля с использованием набора для выделения ДНК и РНК в агарозных гелях (Biolabmix, кат. № N-Gel-250). После очистки продукты ПЦР и вектор pBlueScript SK (+), предварительно расщепленный эндонуклеазой EcoRV (SibEnzyme, кат. № SE-E059) при 37°C в течение 1 ч, лигировали при +4°C в течение ночи с ДНК-лигазой T4 (Evrogen, кат. № LK001). Затем 1 мкл лигазной смеси использовали для трансформации TOP10 электрокомпетентных клеток *E. coli*. Конечные конструкции, содержащие фрагменты экзона 1 и экзона 2 гена *Il10*, проверяли секвенированием по Сэнгеру и расщепляли эндонуклеазой ScaI (New England Biolabs Inc., кат. № R3122) при 37°C в течение 1 ч для линеаризации плазмид.

Реакции расщепления *in vitro* проводили в соотношении 20:120:1 (Cas9-NLS:sgRNA:DNA-конструкция) в общем объеме 30 мкл при 37°C в течение 1 ч в соответствии с инструкциями производителя (протокол NEB кат. № M0646). Каждую реакцию смешивали с загрузочным красителем и разделяли в 1% агарозном геле в буфере 1× TAE (Tris base/Acetic acid/EDTA).

Подготовка беременных самок мышей (гормональная стимуляция). Мы используем процедуру суперовуляции для самок мышей C57BL/6, поскольку ранее было показано, что генетическая модификация в инбредных линиях мышей, представляющих интерес, таких как C57BL/6, по-прежнему является сложной задачей из-за их низкой фертильности и выживаемости эмбрионов [1]. Процедуру i-GONAD следует проводить на 0,7 день после оплодотворения (d.p.c., days post coitum) [2], поэтому мы использовали следующий протокол для спаривания самок с самцами, адаптированными к световому режиму нашего вивария (фотопериод 12 ч/12 ч свет/темнота, [00:00-12:00-00:00]):

1. День 1, 11:00. Руками (в перчатках) осторожно вынуть животное из клетки и зафиксировать его в левой руке: большой и указательный пальцы фиксируют загривок животного, а мизинец прижимает хвост к ладони. Внутрибрюшинно ввести PMSG (5 IU) (Prospec, кат. № HOR-272) в количестве 100 мкл/мышь с помощью инсулинового шприца. Раствор PMSG приготовить в соответствии с инструкцией производителя, затем разделить на аликвоты по 1 мл и хранить при температуре -20°C. *Примечание: растворы гормонов не фильтруют!*
2. День 2, пауза.
3. День 3, 11:00 утра. Животное взять в руки, как описано в пункте №1. Внутрибрюшинно ввести HCG (5 IU) (Prospec, кат. № HOR-250) в количестве 100 мкл/мышь с помощью инсулинового шприца. Рабочий раствор HCG приготовить в соответствии с инструкцией производителя, затем разделить на аликвоты по 1 мл и хранить при температуре -20°C. *Примечание: растворы гормонов не фильтруют!*
4. После инъекции HCG сразу поместить самок в клетку к самцу (1-2 самки на 1 самца).
5. День 4, 10:00. Проверить самок на наличие вагинальных пробок (признак успешного спаривания). Дальнейшие манипуляции с самками проводить, начиная с 12:30 (примерно 0,7 d.p.c.).

Для самок линии CD-1 гормональная стимуляция не применялась. Для спаривания самок подсаживали в клетку к самцу (1-2 самки на 1 самца) в 11:00. На следующий день (10:00) проверяли самок на наличие вагинальных пробок, затем манипуляции с самками производили, начиная с 12:30 (примерно 0.7 d.p.c.).

Предоперационная подготовка:

1. Подготовка стеклянных микропипеток для инъекции в ампулу яйцевода. Подготовка капилляров проводилась по ранее опубликованным протоколам [3]. С помощью вертикального пуллера (микрокузницы) из стеклянных капилляров изготовить микропипетки, вытягивая кончики. Стеклянный капилляр должен быть достаточно тонким и острым, чтобы не повредить ткани при введении растворов в яйцевод. И, в то же время, его внутренний диаметр на кончике должен быть достаточным для того, чтобы легко выдувать раствор с помощью системы «Mouth pipette» (Рисунок S1). Для одного эксперимента (4-5 животных) требуется 3-4 капилляра.

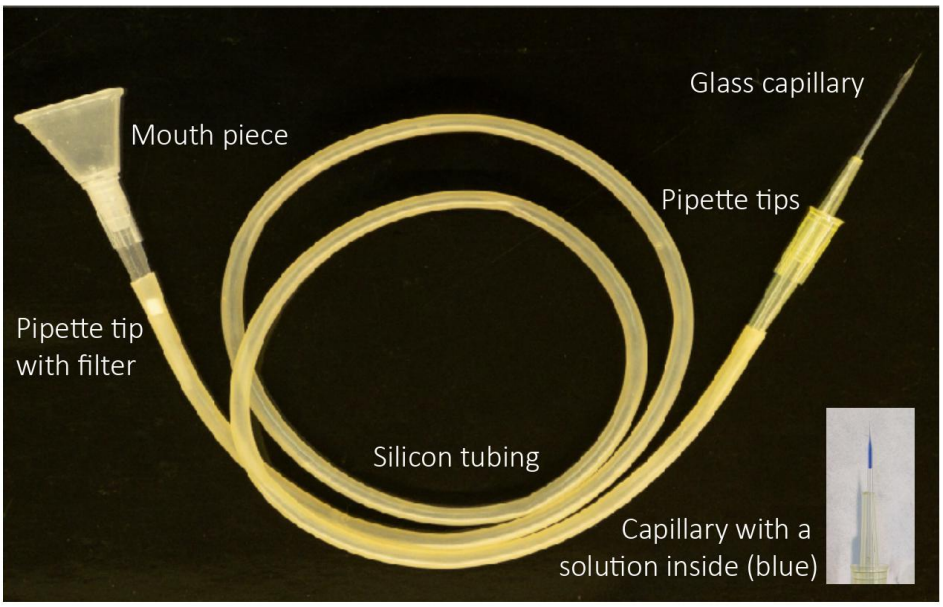

Рисунок S1. **"Mouth pipette".** Общий вид и увеличенное изображение стеклянного капилляра с раствором внутри (синим цветом; справа внизу).

2. Подготовка рабочего места к операции (инъекция в яйцевод) (Рисунок S2).

а. Чистую клетку для мышей поместить на термоковрик размером 28×53 см (температура нагрева 35-37ºС); в одной клетке не более 4-5 животных.

б. В чистую стеклянную бутылку (объемом 250 или 500 мл) поместить стерильные ватные шарики в спиртовой раствор йода (5%).

в. Подготовить салфетки для изоляции операционного поля. В впитывающих салфетках (10×10 см) (Mastmed, Россия, кат. № 613013) сделать отверстие 2×2 см в центре каждой салфетки. Перед операцией салфетки простерилизовать.

г. Подготовить фильтровальные салфетки для удаления крови и других жидкостей во время операции. Для этого нарезать фильтровальную бумагу размером примерно 1×1 см, автоклавировать перед использованием в отдельной емкости. Во время операции часть стерильных фильтровальных салфеток из стерилизационного контейнера поместить в стерильную чашку Петри.

д. Подготовить салфетки для накрывания яйцевода во время электропорации. Для этого салфетки для оптики (Kimtech Science, кат. № 7552) нарезать на полоски размером примерно 3×7 мм, затем поместить их в отдельную емкость (предпочтительно небольшой герметичный стеклянный бюкс) и автоклавировать.

е. Нарезать малярный скотч на полоски, размер которых удобен для фиксации лап животного во время операции.

ж. Приготовить свежий раствор 1× PBS (Thermo Fisher Scientific, кат. № 70013032), далее профильтровать его с помощью фильтра для шприца (TTP, кат. № 99722) и 2-

3 мл налить в стерильную чашку Петри (диаметром 3,5 см). Раствор необходим для смачивания фильтровальной бумаги, салфеток для накрывания яйцевода и электродов.

з. Стерильные инструменты и хирургическую рассасывающуюся PGA нить с иглой поместить в стерильную чашку Петри (диаметром 10 см).

и. Подготовить рабочее место для операции. На силиконовый коврик (размер 30×30 см) сверху поместить лист фильтровальной бумаги (размер ~25×25 см) и закрепить его малярным скотчем. Поверх фильтровальной бумаги положить термоковрик (размер 14×15 см) и установить температуру нагрева 35-37ºС.

к. Приготовили раствор для редактирования генома (конечная концентрация белка Cas9-NLS и sgRNAs составила 1 мг/мл и 30 мкМ соответственно) и добавить к нему краситель Trypan Blue Stain (0,4%) (Thermo Fisher Scientific, кат. № T10282), необходимый для визуализации инъекции раствора в яйцевод (10 частей инъекционного раствора на 1 часть красителя). На одну мышь расходуется 3 мкл приготовленного раствора (1,5 мкл на яйцевод). Затем с помощью подготовленной системы «Mouth pipette» набрать необходимое количество раствора в готовый капилляр.

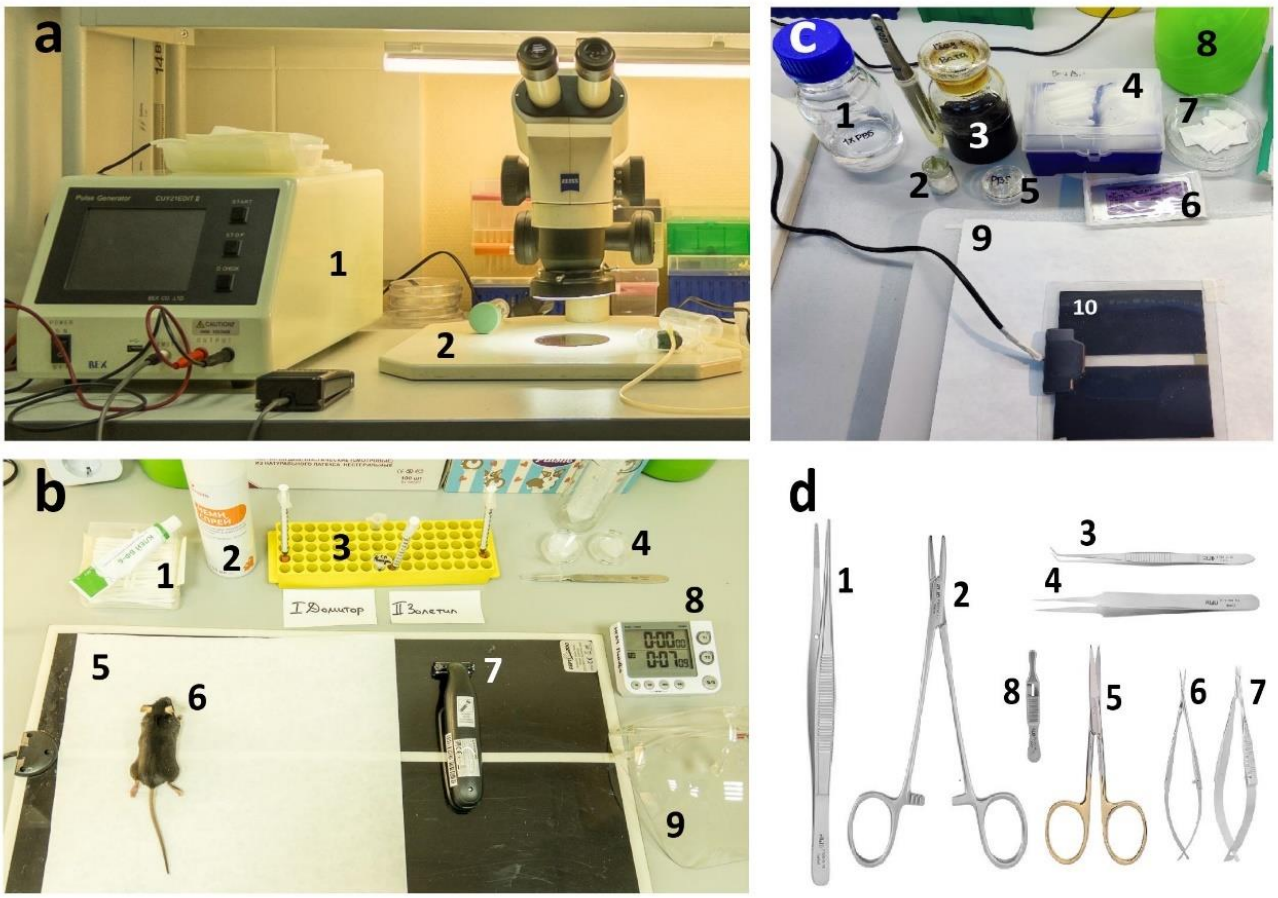

Рисунок S2. **Предоперационная подготовка. A-C.** Рабочее пространство для инъекции в ампулу яйцевода. **A.** Зона электропорации. 1. Электропоратор (BEX CO LTD, кат. № CUY21EDIT2); 2. Микроскоп (Zeiss, кат. № Stemi 2000). **B.** До- и послеоперационное рабочее место. 1. Медицинский клей “БФ-6”; 2. Chemi-спрей; 3. Инсулиновые шприцы с готовыми растворами; 4. Пластина из агарозного геля для защиты глаз (3.5 см чашка Петри с агарозным гелем внутри, скальпель (RWD, кат. № S31010-01, кат. № S32004-13) для нарезки агарозного геля); 5. Термоковрик (28×53 см) с фильтровальной бумагой сверху (25×25 см); 6. Мышь под наркозом; 7. Триммер (машинка для стрижки волос); 8. Таймер; 9. Защитный щиток для лица. **C.** Зона операции. 1. 1× PBS (фильтрованный); 2. Салфетки для накрывания яйцевода во время электропорации (Kimtech Science, кат. № 7552) (3×7 мм) в небольшом герметичном стеклянном бюксе (стерильные); 3. Стерильные ватные шарики в 5% растворе йода; 4. Салфетки для изоляции операционного поля (10×10 см) (Mastmed, Russia, кат. № 613013) с 2×2 см отверстием в центре каждой салфетки (стерильные); 5. 3.5 см чашка Петри с 1× PBS (фильтрованный); 6. Хирургическая PGA рассасывающаяся нить с иглой (Lintex, кат. № HR-20); 7. 10 см чашка Петри с салфетками из фильтровальной бумаги для удаления крови и других жидкостей во время операции (1×1 см) (стерильные); 8. Этанол (70%) в распылителе (для дезинфекции); 9. Зона оперирования – силиконовый коврик (30×30 см), накрытый фильтровальной бумагой (25×25 см); 10. Термоковрик (14×15 см). **D.** Хирургические инструменты. 1. 5. Пинцет перевязочный (RWD, кат. № F12016-15); 2. Иглодержатель (RWD, кат. № F31034-14); 3. 9. Пинцет перевязочный без насечек (RWD, кат. № F12013-10); 4. Микропинцет (RWD, кат. № F13002-11); 5. Ножницы (закругленные кончики) (RWD, кат. № S18004-09); 6. Пружинные ножницы (треугольные кончики) (RWD, кат. № S11001-08); 7. Пружинные ножницы (треугольные кончики) (RWD, кат. № S11035-08); 8. Клипсы (RWD, кат. № R33001-48).

3. Настройки электропорации. В нашей работе мы используем электропоратор с прямоугольными импульсами (BEX CO LTD, кат. № CUY21EDIT2), как опубликовано ранее [2]. Перед запуском установить следующие параметры: Pd A – 100 мА; Pd on – 5,00 мс; Pd off – 50,00 мс; Pd cycle – 3; Pd V – 60 В; Decay – 10%; Decay Type: Log; mode – Square (mA) (+/−) в соответствии с [4].

Pd – направляющие импульсы, которые доставляют ДНК, РНК и т. д. внутрь клетки. Pd A – максимальный ток. Pd on – длина импульса. Pd off – интервал между импульсами. Pd cycle – количество импульсов. Pd V – напряжение. Decay – скорость затухания. Square (mA) mode – режим постоянного тока. Режим постоянного тока обеспечивает стабильный ток по всему яйцеводу, даже если обхват электродом пинцетного типа непостоянен в ходе испытаний. (+/−) – полярность квадратных импульсов попеременно. Описание режимов взято с официального сайта производителя (https://www.bexnet.co.jp/english/product/device/invivoinvitro/cuy21edit2.html).

Хирургическая операция (*in utero* ввод):

1. Инъекция анестезии и анальгезии. Для анестезии и анальгезии нами используется коммерческий препарат «Домитор» (водный раствор медетомидина гидрохлорида, 1 мг/мл) (для ветеринарии) (Orion Pharma, Финляндия) и коммерческий препарат «Золетил 100» (водный раствор медетомидина гидрохлорида, 100 мг/мл) (для ветеринарии) (Virbac, Франция). Схема процедуры анестезии, а также концентрация препаратов, применялась

согласно [5]. Использование данной схемы позволяет животному находиться в состоянии покоя около 120-180 мин. Подробное описание процедуры ниже:

а. Руками (в перчатках) осторожно вынуть мышь за хвост из клетки и измерить массу тела, затем вернуть животное в клетку.

б. «Домитор»: вскрыть и подписать дату вскрытия на флаконе, хранить исходный раствор не более 3 месяцев. Исходный раствор развести физиологическим раствором в 20 раз (до концентрации 0,05 мг/мл). Приготовить аликвоты рабочего раствора по 1 мл и хранить при температуре -20°С.

в. «Золетил 100»: приготовить стоковый раствор (100 мг/мл) согласно инструкции производителя. Затем полученный раствор аликвотировать по 50-100 мкл в пробирки по 1,5 мл и хранить при температуре -20°С. Для приготовления рабочего раствора стоковый раствор развести в 20 раз физиологическим раствором (до концентрации 5 мг/мл). Разведенный препарат хранить не более 5 суток при температуре +4ºС (не замораживать, так как эффективность препарата снижается).

г. Руками (в перчатках) осторожно фиксировать мышь в левой руке: большой и указательный пальцы фиксируют холку животного, а мизинец прижимает хвост к ладони. Внутрибрюшинно ввести рабочий раствор «Домитора» (концентрация 0,05 мг/мл, что соответствует 0,1 мкг/мкл) в количестве 10 мкл на 1 г массы тела животного (т.е. 250 мкл разведенного раствора на животное массой 25 г) с помощью инсулинового шприца. Вернуть животное в клетку.

д. Через 10 мин животному с помощью инсулинового шприца внутрибрюшинно ввести рабочий раствор «Золетила 100» (концентрация 5 мг/мл) в количестве 10 мкл на 1 г массы тела животного (т.е. 250 мкл разведенного раствора на животное массой 25 г).

е. После этого поместить мышь на термоковрик (35-37ºС).

ж. Глубина наркоза считается достаточной для проведения хирургической операции, если у наркотизированного животного отсутствуют рефлекторные реакции, мышцы расслаблены, наблюдается глубокое и ритмичное дыхание. Поэтому последующие манипуляции проводить через 10 мин после инъекции «Золетила 100» для мышей массой ≥ 20-30 г и через 15 мин для животных массой 35-40 г.

з. После вхождения в наркоз глаза мыши накрыть пластиной 1% агарозного геля (готовится на воде, комнатной температуры после полного застывания) толщиной 3-4 мм для предотвращения высыхания роговицы (Рисунок S3.A). Для приготовления пластины геля удобного размера используется чашка Петри диаметром 3.5 см, в которую наливается 1% агарозный гель. Далее затвердевший гель необходимо

разделить на две равные части (полукруги) скальпелем (RWD, кат. № S31010-01, № S32004-13).

Примечание: Все последующие манипуляции с животными необходимо проводить на термоковрике (35-37ºС)!

2. Подготовка животного к операции.

и. Обязательно проверить глубину наркоза (животное не реагирует на щипки пальцев и хвоста). Побрить операционную зону на спине триммером. Процедуру выполнять в защитном щитке или очках, чтобы защитить лицо от шерсти животного.

к. Поместить животное спиной вверх на термоковрик (размер 14×15 см) с температурой нагрева 35-37ºС. Лапы животного закрепить на термоковрике полосками малярного скотча (Рисунок S3.B).

л. Обработать кожу на спине мыши этанолом (70%), далее протереть сухим стерильным ватным шариком, затем обработать стерильным ватным шариком, смоченным в йодном спирте (5%) (Рисунок S3.B). Поверх животного поместить операционную салфетку так, чтобы отверстие 2×2 см находилось над зоной операции. Салфетку закрепить полосками малярной ленты на термоковрике (Рисунок S3.C).

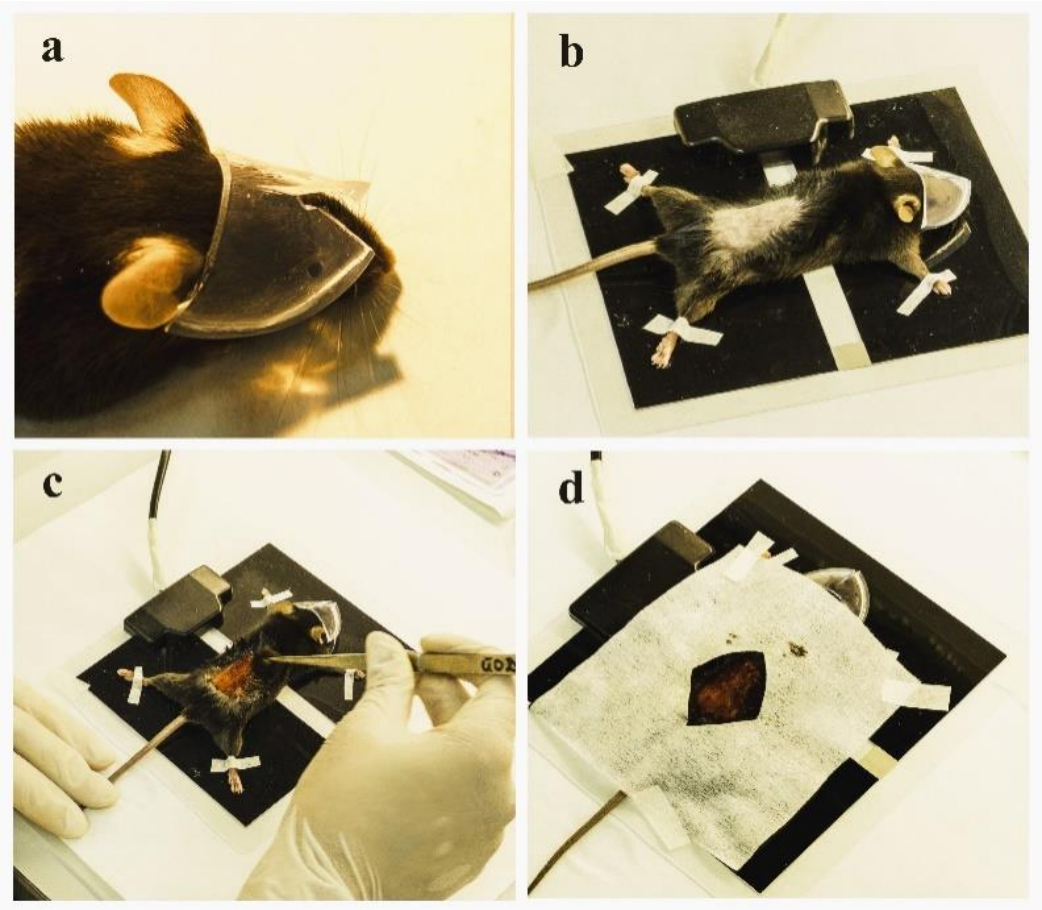

Рисунок S3. **Подготовка животного к операции. A.** Глаза мыши накрыть пластиной из 1% агарозного геля. **B.** Животное поместить спиной вверх на термоковрик (35–37ºC), лапы прикрепить к термоковрику полосками малярной ленты. **C.** Операционное поле обработать этанолом и спиртовым раствором йода. **D.** Операционная салфетка с отверстием над операционным полем закреплена малярным скотчем на термоковрике.

3. Разрез для внутрибрюшинного доступа к яйцеводу.

м. Одной рукой приподнять кожу спины с помощью пинцета (RWD, кат. № F12016 15). Другой рукой, используя ножницы (RWD, кат. № S18004-09), вдоль позвоночника в области 4-5го поясничных позвонков выполнить сагиттальный («вертикальный») разрез длиной около 1 см (Рисунок S4.A-B). Последовательно работайте с яйцеводами, сначала проделайте все манипуляции с левым яйцеводом. Намочить салфетку из фильтровальной бумаги (размер 1×1 см) в 1× PBS (в стерильной чашке Петри, диаметр 3,5 см), поместить справа от разреза на кожу.

н. Поместить микропинцет (RWD, кат. № F13002-11) внутрь под разрез на коже, сместить влево от позвоночника, приподнять мышечную ткань в области физиологического расположения левого яичника (слева от позвоночной мышцы). Затем ножницами произвести разрез брюшной стенки, размер не более 0,5 см (Рисунок S4.C).

o. Затем осторожно с помощью микропинцета вытащить за жировую ткань яичник, яйцевод и часть рога матки и помещали органы на влажную салфетку (Рисунок S4.D). Прикрепить зажим «bulldog» (RWD, кат. № R33001 48) к жировой ткани над яичником, чтобы предотвратить втягивание органов обратно в брюшную полость (Рисунок S4.E).

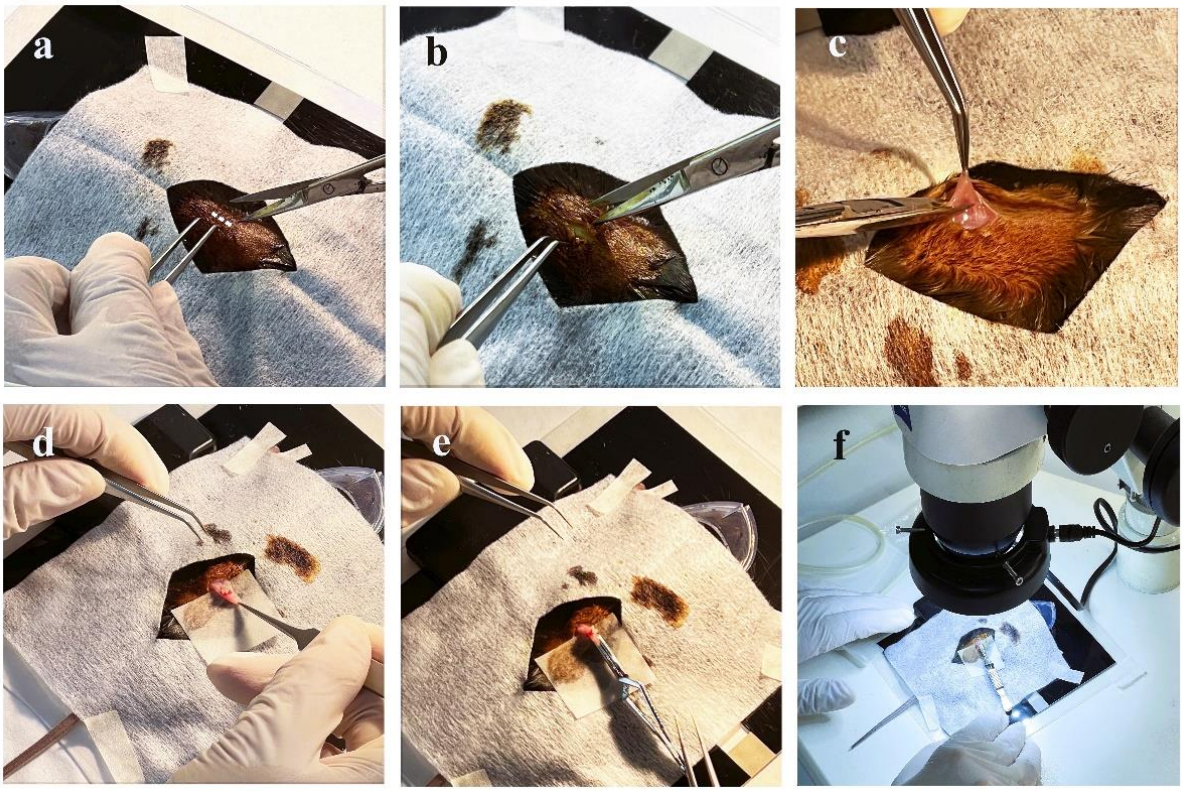

Рисунок S4. 3. Разрез для внутрибрюшинного доступа к яйцеводу. A-B. Сагиттальный («вертикальный») разрез около 1 см (пунктирной линией). **C.** Разрез брюшной полости размером не более 0,5 см. **D.** Яичник, яйцевод и часть рога матки, помещенные на влажную салфетку. **E.** Зажим «bulldog», прикрепленный к жировой ткани над яичником. **F.** Поместить мышь под бинокулярный микроскоп.

4. Ввод раствора в ампулу яйцевода.

п. Осторожно поместить мышь под бинокулярный микроскоп (не убирая животное с термоковрика) (Рисунок S4.F). Определить локализацию ампулы яйцевода (увеличенный в диаметре отдел яйцевода, содержащий оплодотворенные зиготы) с помощью бинокулярного микроскопа.

р. Одной рукой аккуратно захватить яйцевод около ампулы микропинцетом так, чтобы было удобно ввести микрокапилляр с раствором в ампулу. Место инъекции раствора лучше расположить ближе к началу ампулы, отступив несколько миллиметров от воронки. Вводить раствор нужно по направлению движения зигот из воронки через яйцевод в маточную трубу.

с. Используя систему «Mouth pipette» с готовым микрокапилляром и раствором внутри, вдуть раствор в ампулу (Рисунок S5.A). Успешность инъекции определить по тому, что введенный раствор (окрашен в синий цвет) визуализируется внутри ампулы, а ампула немного увеличивается в размерах (Рисунок S5.B).

5. Электропорация.

т. Сразу после введения раствора в ампулу яйцевода провести процедуру электропорации. Перед этим смочить салфетку (размером 3×7 мм) в 1× PBS и накрыть ампулу (Рисунок S5.C, стрелка). Присоединить электрод пинцетного типа (BEX CO LTD, кат. № LF650P3) к электропоратору (BEX CO LTD, кат. № CUY21EDIT2) и смочить концы пинцета в 1× PBS.

у. Далее аккуратно (чтобы не сместить раствор и зиготы дальше по яйцеводу) обхватить ампулу электродом-пинцетом (Рисунок S5.D). Важно, чтобы электроды не касались ткани напрямую, а только через стерильную покровную салфетку (размером 3×7 мм). Провести электропорацию с заданными ранее настройками (описаны в разделе «Настройки электропорации»). Показателем успешной электропорации будет появление пузырьков воздуха на стыке электродов и ампулы.

ф. Убирать салфетку с яйцевода. Придерживая жировую ткань над яичником, осторожно отсоединить зажим «bulldog». Затем, используя микропинцет, аккуратно вернуть органы на их физиологическое место в брюшной полости.

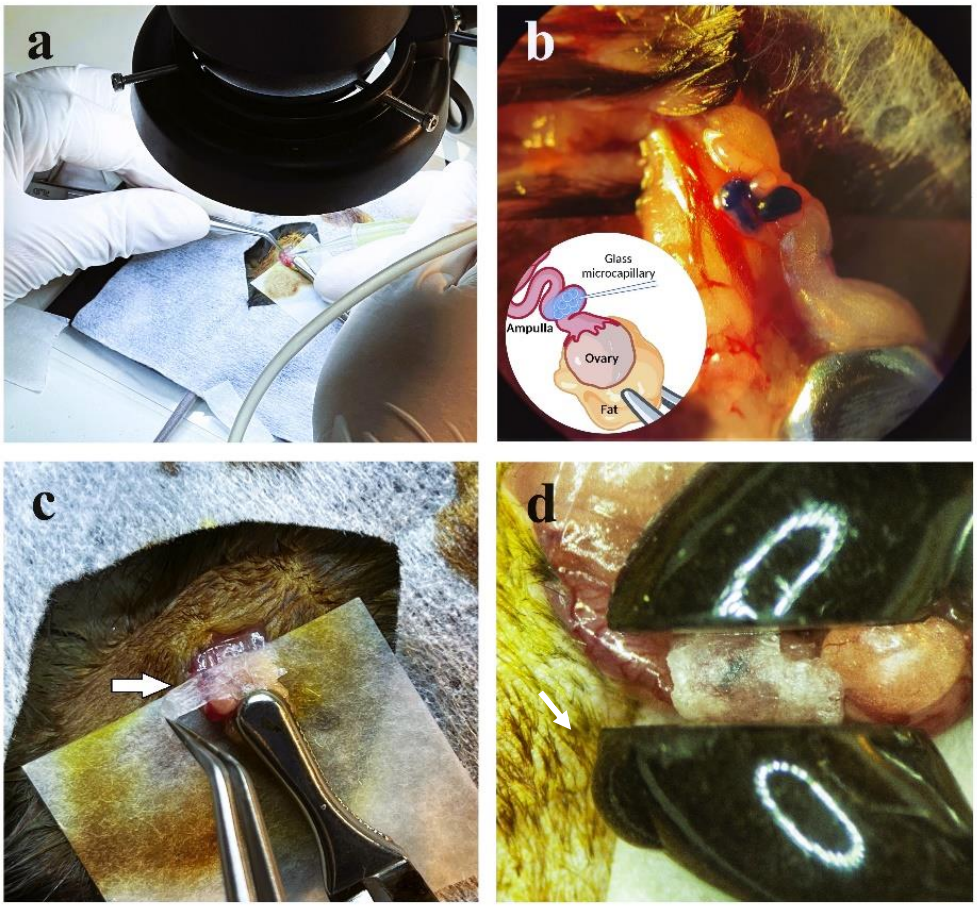

Рисунок S5. 4. Ввод раствора в ампулу яйцевода и электропорация. A-B. Введение раствора в ампулу яйцевода с помощью системы "Mouth pipette". **C.** Покрытый салфеткой (3×7 мм) яйцевод (стрелка). **D.** Захват ампулы яйцевода электродом пинцетного типа.

Манипуляции по введению раствора в ампулу правого яйцевода выполнять, как описано выше. Для удобства (если вы правша) поверните термоковрик с мышью на 180 градусов (чтобы животное располагалось к вам головой).

6. Наложение швов.

х. После завершения манипуляций с правым яйцеводом в брюшную полость ввести 100 мкл 1× PBS, зашить оба мышечных разреза и один на коже хирургической рассасывающейся нитью PGA (Lintex, кат. № HR-20). В своей работе мы используем узловой вертикальный шов, который чаще всего применяется для закрытия послеоперационных ран. Соединение краев тканей следует производить без натяжения, чтобы избежать повреждения тканей.

ц. Иглу следует вводить лицом к оператору – с дальнего края и выводить с ближнего. Зафиксировать дальний край раны пинцетом и осторожно ввести иглу на расстоянии 0,15–0,2 мм от края, затем провести кончик и часть тела иглы через ткани, фиксируя край раны пинцетом.

ч. Затем, взяв ближний край раны, провести кончик и тело иглы сквозь ткань. После этого иглу перехватить иглодержателями (RWD, кат. № F31034-14) и далее продвинуть, натягивая нить. Затем сделать двойной узел. Повторить предыдущие шаги, сделав 2-3 стежка в зависимости от размера раны (Рисунок S6.A-C).

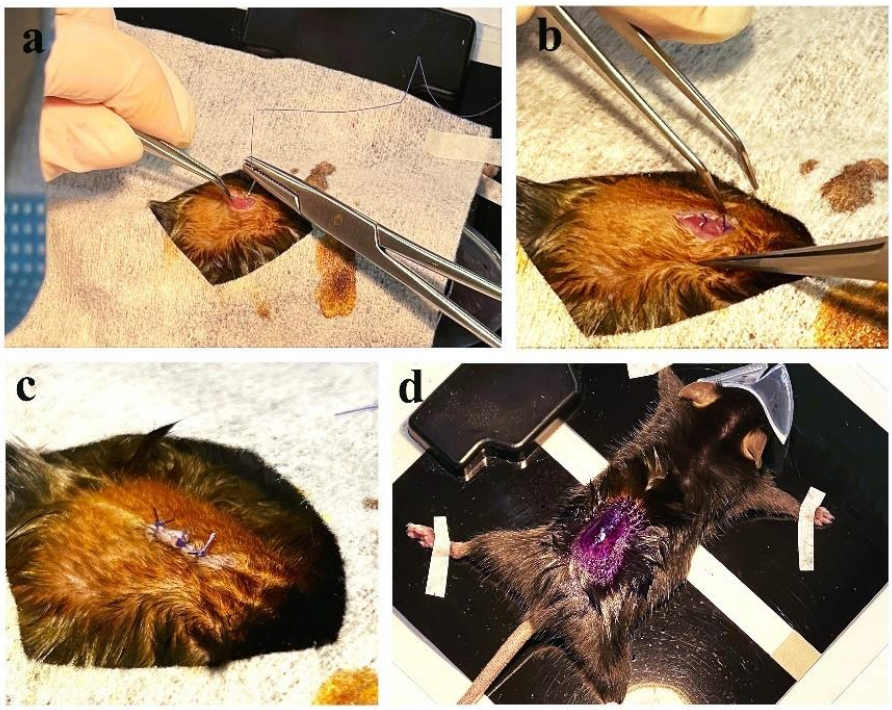

Рисунок S6. **Наложение швов и послеоперационные процедуры. A-B.** Наложение швов на разрезы мышц на брюшной стенке (узловой вертикальный шов). **C.** Наложение шва на разрез кожи (узловой вертикальный шов). **D.** Процедура по уменьшению воспаления с использованием Chemi-спрея и медицинского клея «БФ-6» для защиты шва от снятия мышами.

7. Послеоперационные процедуры

ш. После того, как на кожу спины наложен шов, выполнить послеоперационный уход. Убрать с животного операционную салфетку и обработать рану Chemi-спреем либо аналогичным противовоспалительным и антибактериальным препаратом. После высыхания раствора заклеить шов медицинским клеем «БФ-6» или аналогичным (Рисунок S6.D). Это не позволит мыши быстро снять шов.

щ. Для снятия болевого синдрома после выхода животного из наркоза мы используем препарат «Rimadyl» (Zoetis, Brazil). Его необходимо предварительно развести, так как исходная концентрация (5%) применяется для более крупных животных (кошки, собаки). Рабочий раствор приготовить следующим образом: исходный раствор (5%) разбавить в 20 раз (50 мкл препарата «Rimadyl» + 950 мкл физиологического раствора). Далее полученный раствор развести еще в 1,5 раза (к 300 мкл физиологического раствора добавляем 400 мкл раствора). Готовый раствор хранить

при температуре +4С не более 2 месяцев. Рабочий раствор вводить подкожно в холку по 100 мкл на мышь массой 30 г.

ы. После окончания всех процедур необходимо заменить гелевую пластину для защиты глаз мыши на новую. Затем животное поместить в чистую клетку, размещенную на термоковрике размером 28×53 см (температура нагрева 35-37ºС). Клетку с животным держать на теплом коврике до тех пор, пока животное не выйдет из наркоза. Укрывать животное не нужно, так как укрывной материал может прилипнуть к медицинскому клею «БФ-6» и это создаст дискомфорт для животного в дальнейшем.

При необходимости выполнить вышеперечисленные манипуляции с бóльшим количеством животных. Важно: перед началом работы со следующим животным необходимо обработать все инструменты дезинфицирующим средством, например «Комбидез» (KiiltoClean, Россия). Для этого в фалькон объемом 50 мл налить около 25-30 мл раствора и несколько раз окунуть в него рабочую поверхность инструментов. Мы рекомендуем работать парами, так как это сэкономит время. После электропорации обоих яйцеводов животное передается второму оператору для дальнейшего наложения швов и обработки ран. Первый оператор начинает манипуляции с новым животным.

Послеоперационный уход. В течение 4-5 дней после операции каждое животное проверялось на целостность шва и заживление раны. Обязательно выполнялась обработка швов Chemi-спреем для ускорения заживление шва, а также это не даст животным помешать заживлению раны (Рисунок S7).

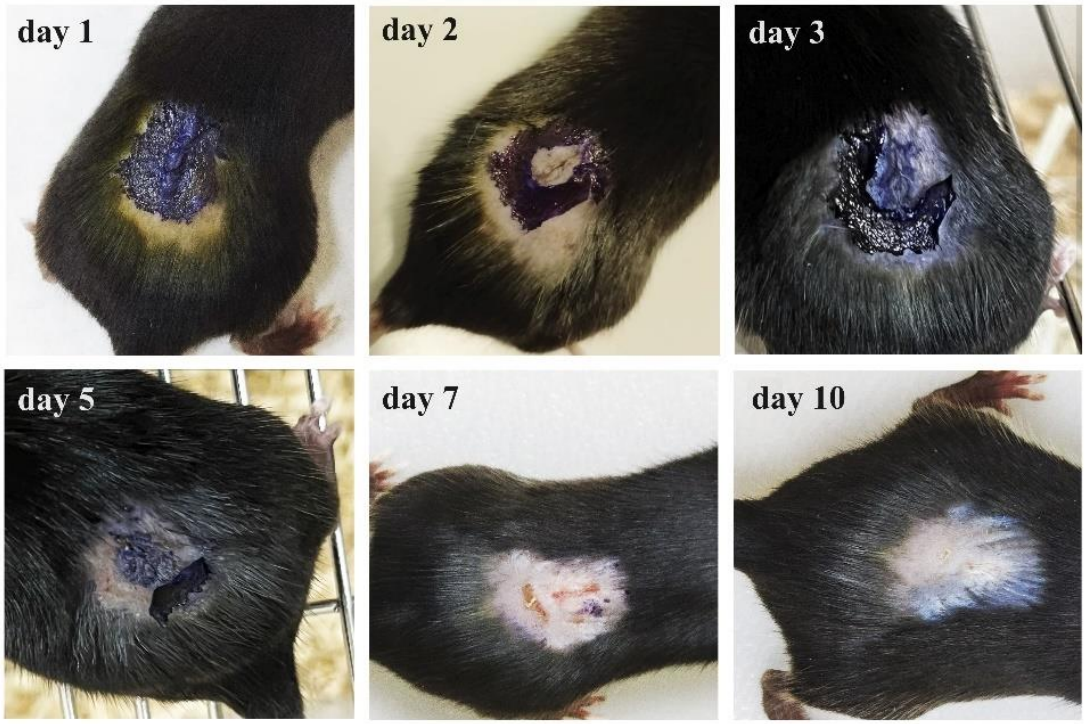

Рисунок S7. Заживление шва после операции: 1-10 день.

Тестирование процедуры электропорации на эмбрионах. Для определения травматичности процедуры электропорации и потенциальной эмбриотоксичности конструкции к гену *Il10* мы решили проверить две группы: контрольную и экспериментальную. Все манипуляции проводились на анестезированных беременных самках CD-1 (0,7 d.p.c.) без гормональной стимуляции (все из пунктов «предоперационная подготовка» и «хирургическая операция», за исключением «наложения швов» и дальнейших процедур). В экспериментальной группе в ампулу яйцевода вводили sgRNA к гену *Il10* (30 мкМ) в Opti-MEM I Reduced Serum Medium (ThermoFisher Scientific, кат. № 31985062) и затем электропорировали. В контрольной группе в ампулу вводили смесь 1× PBS (вместо sgRNA) и Opti-MEM I Reduced Serum Medium и проводили процедуру электропорации на тех же настройках.

Далее в обеих группах выполняли вымывание зигот из ампулы. Для этого у самки вырезали яйцевод, далее в него с помощью системы «Mouth pipette» вводили раствор EmbryoMax M2 Medium (Sigma-Aldrich, кат. № MR-015-D) с гиалуронидазой (Roanal, кат. № 08091) (10 мг/мл в M2 Medium) до полного вымывания всех зигот. Далее зиготы помещали в среду KSOM Medium (Sigma, кат. № MR-101-D) на чашку Петри, покрытую минеральным маслом (Sigma-Aldrich, кат. № M8410-100ML). Затем зиготы инкубировали при температуре 37°C в 5% CO2 в течение 24 ч, после чего подсчитывали количество делящихся клеток.

Для подтверждения эффективности электропорации Fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) (Sigma-Aldrich, кат. № FD4-1G) разводили до концентрации 10 мкг/мкл в среде Opti MEM, вводили в ампулу яйцевода мышей CD-1 в объеме 1,5 мкл/яйцевод с последующей электропорацией. Далее зиготы вымывали и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

Генотипирование потомства. На 21-22 день после процедуры i-GONAD самки дают потомство. Необходимо проверять гнезда на наличие мертвых детенышей, так как самки мышей C57BL/6 могут поедать свое потомство. Мертвых детенышей необходимо удалять из клетки, а образец ткани сохранить для генотипирования (удобнее всего взять хвост). Выживших детенышей отсаживали от матерей в возрасте 4-5 недель, помещали в чистые клетки (однополые братья и сестры содержатся вместе). Генотипирование выполняли по следующему протоколу:

1. Выделение геномной ДНК из хвостов и ушей (хлороформная экстракция и осаждение).

а. Перед забором материала автоклавировать и высушить пробирки объемом 1,5 мл. Собрать небольшие (около 5 мм) кусочки ткани (уши или хвосты) в пробирки, промаркировать пробирки. Образцы хранить при температуре -20°C или -70°C до выделения ДНК.

б. Приготовить буфер «A» (объем 50 мл): TrisHCl (1M, pH=8,0) (2,5 мл, конечная концентрация 50 мМ), NaCl (5M) (1 мл, конечная концентрация 100 мМ), EDTA (0,5M, pH=8,0) (2,5 мл, конечная концентрация 25 мМ); mQ H2O (44 мл). Хранить буфер «A» при комнатной температуре.

в. Приготовить лизирующий буфер (объем 10 мл): 10% SDS (500 мкл, конечная концентрация 0,5%), буфер «A» (9,5 мл). Не хранить лизирующий буфер более 1 дня после приготовления.

г. Добавить 250 мкл лизирующего буфера и 2 мкл Протеиназы К (20 мг/мл; SibEnzyme, кат. № E347) на образец. Инкубировать образцы при 56°C в течение ночи.

д. Гомогенизировать образцы, сбросить капли с помощью миницентрифуги. К образцам добавите 105 мкл KAc (5M), тщательно перемешать, сбросить капли с помощью миницентрифуги (на этом этапе оставшиеся в образцах белки выпадают в осадок, раствор становится белым). Добавить 375 мкл хлороформа, перемешать. *ВНИМАНИЕ: хлороформную экстракцию выполнять в вытяжном шкафу!*

е. Центрифугировать образцы при 12000 rcf в течение 10 мин при 20°C. После центрифугирования образец разделяется на фракции: нижняя — хлороформ;

интерфаза — белки, дебрис; верхняя — водная фаза, содержащая ДНК. Подготовить чистые пробирки объемом 1,5 мл, подписать в соответствии с выделяемыми образцами. Аккуратно (не касаясь интерфазы и хлороформа!) отобрать 180 мкл водной фазы в чистую пробирку. *ВНИМАНИЕ: после экстракции слить оставшееся содержимое пробирок в «Слив органики», открытые пробирки и пластик оставить проветриваться под вытяжкой!*

ж. К 180 мкл водной фазы добавить 540 мкл 96% этанола, тщательно перемешать и инкубировать 60 мин при -20°C. Центрифугировать образцы при 12000 rpm в течение 15 мин при 20°C. После центрифугирования на дне пробирки наблюдается белый осадок ДНК. Осторожно удалить супернатант, не касаясь осадка ДНК. Добавить 700 мкл 70% этанола, перемешать. Центрифугировать при 12000 rpm в течение 5 мин при 20°C.

з. Осторожно удалить супернатант, не задевая осадок ДНК. Высушить осадок. *Примечание: необходимо, чтобы спирт полностью испарился!* Добавить 50-100 мкл mQ H2O, тщательно перемешать. Определить концентрацию ДНК и проверить чистоту образцов с помощью NanoDrop.

2. Получение ПЦР продуктов. Для подготовки ПЦР-проб использовать набор BioMaster HS-Taq PCR-Color (2×) (Biolabmix, кат. № MHC010-200) согласно протоколу производителя. На реакцию брали 100 нг образца ДНК. В качестве положительного контроля использовали образцы ДНК от интактных животных линии C57BL/6, в качестве отрицательного контроля – mQ H2O. Для ПЦР использовали следующие праймеры: Il10_ex1_gDNA_F / Il10_ex1_gDNA_R (размер продукта ПЦР 259 п.н.), Il10_ex2_gDNA_F / Il10_ex2_gDNA_R (размер продукта ПЦР 371 п.н.), Il10_ex2_gDNA_F1 (5’ AAACTCTCCTTTCCACAGTTGC 3’) / Il10_ex2_gDNA_R (размер продукта ПЦР 475 п.н.).

После ПЦР образцы наносили на 2% агарозный гель, приготовленный на 0,5× TBE (Tris/Borate/EDTA). Образцы нужного размера (Таблица S3) вырезали из геля, используя скальпель и трансиллюминатор. Продукты ПЦР выделяли из геля с помощью набора для выделения ДНК и РНК из агарозных гелей (Biolabmix, кат. № N-Gel-250) согласно протоколу производителя.

3. Секвенирование (по Сэнгеру). Нуклеотидную последовательность ДНК определяли с помощью BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (ThermoScientific, кат. № 4337455) согласно протоколу производителя. В качестве матрицы использовали продукт ПЦР после выделения из агарозного геля. Для секвенирования использовали праймеры Il10_ex1_gDNA_F, Il10_ex2_gDNA_F и Il10_ex2_gDNA_F1. Секвенирование проводили с

помощью капиллярного секвенатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

4. Клонирование плазмид. После идентификации животного с нарушенным участком гена *Il10*, соответствующим сайту связывания sgRNA и ниже его, необходимо провести процедуру клонирования для более точного определения места нарушения в гене. Для этого продукты ПЦР обрабатывали полимеразой Pfu (SibEnzyme, кат. № B310) при 37°C в течение 30 мин для получения тупых концов, затем очищали в геле с использованием набора для выделения ДНК и РНК из агарозного геля (Biolabmix, кат. № N-Gel-250) и лигировали с вектором pBlueScript SK (+) +4°C в течение ночи с использованием ДНК-лигазы T4 (Evrogen, кат. № LK001). Вектор предварительно расщепляли при 37°C в течение 1 ч эндонуклеазой EcoRV (SibEnzyme, кат. № SE-E059). 1 мкл лигазной смеси использовали для трансформации TOP 10 электрокомпетентных клеток E. coli. Окончательные конструкции, содержащие фрагменты экзона 1 и экзона 2 гена *Il10*, были проверены секвенированием по Сэнгеру, как описано выше.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Melo-Silva CR, Knudson CJ, Tang L, Kafle S, Springer LE, Choi J, et al. Multiple and consecutive genome editing using i-GONAD and breeding enrichment facilitates the production of genetically modified mice. *Cells* 2023, **12**:1343. https://doi.org/10.3390/CELLS12091343

[2] Ohtsuka M, Sato M, Miura H, Takabayashi S, Matsuyama M, Koyano T, et al. I-GONAD: A robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases. *Genome Biol* 2018, **19**:1–15. https://doi.org/10.1186/S13059-018-1400-X/TABLES/1

[3] Meyer-Dilhet G, Courchet J. In utero cortical electroporation of plasmids in the mouse embryo. *STAR Protoc* 2020, **1**. https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100027

[4] Gurumurthy CB, Sato M, Nakamura A, Inui M, Kawano N, Islam MA, et al. Creation of CRISPR-based germline-genome-engineered mice without ex vivo handling of zygotes by i-GONAD. *Nat Protoc* 2019, **14**: 2452–2482. https://doi.org/10.1038/s41596-019-0187-x

[5] Saydakova S, Morozova K, Snytnikova O, Morozova M, Boldyreva L, Kiseleva E, et al. The Effect of Dietary Phospholipids on the Ultrastructure and Function of Intestinal Epithelial Cells. *Int J Mol Sci* 2023, **24**: 1788. https://doi.org/10.3390/ijms24021788