

**ПОЛУЧЕНИЕ ИММУНОДЕФИЦИТНОЙ ЛИНИИ НОКАУТНЫХ
МЫШЕЙ ПО ГЕНУ *IFNAR1* И ПРОБЛЕМЫ ПРОТОКОЛА
ТРАНСГЕНЕЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6**

Сметанникова Н. А.¹,
Давлетшина Г. И.¹,
Кораблев А. Н.¹

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

**GENERATION OF AN IMMUNODEFICIENT IFNAR1 KNOCKOUT
MOUSE LINE AND CHALLENGES OF THE TRANSGENESIS
PROTOCOL USING THE C57BL/6 STRAIN**

Smetannikova N. A. ^a,
Davletshina G. I. ^a,
Korablev A. N. ^a

^a Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-Being (FBRI SRC VB "Vector", Rospotrebnadzor).

Резюме

Лабораторная мышь является наиболее изученной и детально охарактеризованной моделью для биомедицинских исследований и является популярным объектом в вирусологии. Однако, вследствие межвидовых различий между мышью и человеком зачастую невозможно проведение экспериментов из-за невосприимчивости мышей ко многим вирусам человека. Один из путей решения этой проблемы – это получение нокаутных мышей с ослабленным иммунитетом. Такие мыши являются универсальными моделями для вирусологических исследований из-за неспецифической повышенной восприимчивостью к различным патогенам человека. Использование таких мышей позволяет проводить с вирусами, для которых нет генетически-модифицированных линий мышей со специфической восприимчивостью. В настоящем исследовании представлены результаты работы по получению нокаутной линии мышей по гену *Ifnar1* при помощи двух разных подходов с использованием системы геномного редактирования CRISPR. Первый – это одномоментное удаление экзона и интеграция фланкированного loxP-сайтами экзона. Второй – это двухэтапная интеграция loxP-сайтов для фланкирования экзона без его удаления. Оба подхода применяются для получения conditional (условного, программируемого) нокаута. Также, для обоих подходов является характерным удаление экзона и получение мышей с классическим (конститутивным) нокаутом. В классических схемах трансгенеза принято получать эмбрионы для микроинъекции от самок-гибридов первого поколения, так как это упрощает работу. Однако, после получения генетически модифицированных мышей требуется проведения времязатратных возвратных скрещиваний для получения конгенных линий. Тем не менее, современные технологии позволяют использовать инбредные линии мышей для получения эмбрионов и микроинъекции, что значительно сокращает время для получения генетически-модифицированных линий мышей. В нашей работе мы использовали инбредную линию мышей C57BL/6 (SPF-виварий ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) для получения эмбрионов и микроинъекции. Однако, при проведении данных работ мы столкнулись с несколькими проблемами. Во-первых, мы отмечаем значительное снижение эффективности стандартного протокола суперовуляции. Во-вторых, мы столкнулись с проблемой плохой приживаемости инъецированных эмбрионов после эмбриотрансфера. Обе эти проблемы кардинальным образом снизили эффективность протоколов трансгенеза и затруднили получение целевых нокаутных линий мышей. Наиболее вероятным объяснением проблем, которые возникли в ходе нашей работы, может быть дрейф генов. А самым простым и эффективным способом решения данных проблем является покупка инбредных линий мышей является их покупка из зарубежных вивариев, в которых соблюдаются современные правила по контролю генетической стабильности.

Ключевые слова: CRISPR, редактирование генома, иммунодефицитные линии мышей, дрейф генов, нокаут генов, *Ifnar1*.

Abstract

The laboratory mouse is one of the most extensively studied and well-characterized model organisms in biomedical research and is widely used in virology. However, due to interspecies differences between mice and humans, certain experiments are often impossible because mice are naturally resistant to many human viruses. One possible solution is the generation of knockout mice with reduced immunity. Such models exhibit increased susceptibility to various human pathogens and enable studies of viruses for which no specific mouse models currently exist.

In this study, we report the generation of a knockout mouse line targeting the *Ifnar1* gene using two CRISPR-based genome editing strategies. The first involves simultaneous exon deletion and integration of an exon flanked by loxP sites, while the second employs a two-step process to flank the exon with loxP sites without deletion. Both approaches aim to create conditional knockout models but can also produce constitutive knockouts through exon removal.

Traditionally, embryos for microinjection are obtained from first-generation hybrid females, which simplifies the procedure but requires laborious backcrossing to establish congenic lines. Modern techniques now allow the use of inbred strains for embryo collection and microinjection, significantly reducing the time needed to generate genetically modified mice.

In our work, we used the inbred C57BL/6 strain (SPF-vivarium, IC&G SB RAS, Novosibirsk) for embryo collection and microinjection. However, we encountered two main challenges: a marked decrease in the efficiency of the standard superovulation protocol and poor survival rates of injected embryos after transfer. These issues substantially lowered the overall efficiency of the transgenesis workflow and delayed the production of the desired knockout lines.

The most plausible explanation for these difficulties is genetic drift in the local mouse colony. The most effective solution is to obtain inbred mouse strains from international facilities that maintain strict genetic quality control. Such an approach would ensure genetic stability, improve reproducibility, and enhance the efficiency of genome editing experiments in inbred mouse lines.

Keywords: CRISPR, genome editing, immunodeficient mouse lines, genetic drift, gene knockout, *Ifnar1*.

1 Введение

Редактирование генома – одна из наиболее динамично развивающихся областей современной генетики и молекулярной биологии. Отдельное место в данном направлении занимает редактирование генома лабораторной мыши (*Mus musculus*), что связано с исторической популярностью мышей как модели для биомедицинских исследований, а также из-за высокой степени гомологии мышинового и человеческого геномов. Кроме того, мышь, как объект для биологии имеет эффективные и детально разработанные подходы для модификации генома [31, 32]. Активное развитие методов генетической модификации мышей началось в 1980-х годах [22] и продолжает совершенствоваться по настоящее время [48].

Наиболее распространенными методами получения трансгенных и генетически модифицированных мышей являются пронуклеарная (и цитоплазматическая) микроинъекция зигот [22, 48], а также метод получения химер [27, 52]. Пронуклеарная микроинъекция традиционно использовалась для внесения трансгенов со случайной интеграцией в геном [44], тогда как метод получения химер позволяет осуществлять целевое редактирование генома с использованием эмбриональных стволовых клеток [27, 52]. Несмотря на более высокую сложность и трудоемкость метода получения химер, он позволял получать линии мышей с целевыми модификациями в геноме, чего нельзя было добиться при помощи пронуклеарной микроинъекции.

С появлением и усовершенствованием современных технологий редактирования генома, таких как, нуклеаз на основе цинковых пальцевых (ZFN), TALEN и, в большей степени, системы CRISPR/Cas9 значительно повысилась точность и эффективность целевых геномных модификаций [48]. А комбинация метода пронуклеарной микроинъекции и системы CRISPR/Cas9 позволила получать мышей с направленными генетическими модификациями, включая нокауты генов [43], точечные мутации [6] и целевые интеграции [3, 36].

В настоящее время редактирование генома мышей широко применяется как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях и направлено на изучение функции генов [34], регуляторных регионов ДНК [33], моделирование человеческих патологий [33], получение гуманизированных моделей мышей [5, 29] и прочего. Эти модели являются ключевыми инструментами для изучения патогенеза заболеваний, тестирования лекарственных препаратов [5] и разработки новых терапевтических стратегий. Также, генетически-модифицированные мыши активно используются в вирусологических исследованиях [16, 28, 38].

Животные, в том числе и мыши являются распространенной моделью для изучения инфекционных заболеваний человека [15, 16, 51], в том числе для тестирования терапии [41]. Однако, использование мышей в вирусологических экспериментах затруднено из-за межвидового барьера между человеком и мышью, который препятствует заражению грызунов вирусами, патогенными для людей [9, 35, 40]. В таких случаях исследователи

нередко прибегают к использованию приматов, что значительно увеличивает стоимость и продолжительность проектов [12, 17, 30]. Решение проблемы невосприимчивости мышей к вирусным заболеваниям человека стало возможным благодаря технологиям редактирования генома, при этом существует несколько подходов к преодолению этого барьера.

Первый из них – гуманизация мышей с помощью трансгенеза. Поскольку некоторые вирусы используют специфические рецепторы или иные белковые факторы для проникновения в клетки человека и дальнейшего размножения, целью гуманизации является экспрессия этих факторов в организме мыши. Генетические конструкции могут интегрироваться либо случайным образом (классический трансгенез), либо в определенное положение в геноме (knock-in). Эти конструкции обеспечивают экспрессию человеческих белков, необходимых для заражения [15, 39].

С использованием такого подхода были получены трансгенные мыши, экспрессирующие человеческий рецептор ACE2, что сделало их восприимчивыми к коронавирусам (MERS, SARS-CoV-2) [15, 39]. Кроме того, была разработана модель, в которых экспрессия гена *hACE2* осуществляется под контролем Cre-рекомбиназы, что позволяет получать линии мышей с тканеспецифичной экспрессией гена *hACE2* [10].

Помимо генетической гуманизации, существует метод гуманизации иммунной системы мышей путем трансплантации гемопоэтических стволовых клеток человека иммунодефицитным линиям мышей. В результате у животных формируются компоненты человеческой иммунной системы. Такие модели широко применяются в исследованиях вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), а также для тестирования антиретровирусной терапии [4, 51].

Еще одним подходом к преодолению межвидового барьера является создание мышей с ослабленным иммунитетом за счет нокаута ключевых или вспомогательных генов иммунной системы [16, 38, 49]. Данные линии мышей обладают неспецифической повышенной восприимчивостью к различным патогенам, включая вирусы [18, 20].

В настоящей работе представлены данные о получении линии мышей с нокаутом гена *Ifnar1*, которая широко используется в вирусологических исследованиях [18, 20], а также обсуждаются проблемы, которые возникли при проведении экспериментов с использованием инбредной линии C57BL/6 и возможные пути их решения.

2 Материалы и методы

Дизайн системы CRISPR и получение компонентов для микроинъекции.

Подбор последовательностей хнРНК (sgRNA) был осуществлен в онлайн программе benchling.com с алгоритмом оценки on-target активности по Doench et al. [13] и off-target активности по Hsu et al. [25]. Последовательности хнРНК представлены в Таблице 1. Праймеры для генотипирования были подобраны в онлайн программе в Primer Blast (NCBI), а последовательности праймеров представлены в Таблице 2.

Плазмидный вектор pT7-gRNA (<https://www.addgene.org/46759/>) был использован для клонирования последовательностей выбранных хнРНК-1 и хнРНК-2 по методу Golden Gate. В качестве матрицы для получения хнРНК-3 и хнРНК-4 были использованы ПЦР-продукты, полученный с использованием праймеров FWD-хнРНК-3 и REV-хнРНК, и FWD-хнРНК-3 и REV-хнРНК соответственно [6] (Таблица 2). Далее, полученные матрицы были использованы для проведения *in vitro* транскрипции (Биолабмикс, Т7-tr-20), а полученная РНК выделена и очищена при помощи набора Monarch RNA Cleanup T2040L.

Матричная РНК Cas9 была получена при помощи *in vitro* транскрипции с использованием набора «HiScribe T7 ARCA mRNA Kit» (NEB, E2065S) и плазмиды pT7hCas9 (содержит ген Cas9 под контролем Т7-промотора) в качестве ДНК-матрицы. Выделение и очистку мРНК Cas9 проводили при помощи набора Monarch RNA Cleanup (NEB, T2040L).

В качестве длинной одноцепочечной ДНК была использована кДНК. Получение кДНК состояло из нескольких последовательных этапов. На первом этапе была получена плазида, содержащая: 1) Т7-промотор; 2) левое плечо гомологии (chr16:91286049-91286416, 368 п.н., GRCm39/mm39); 3) loxP-сайт, 4) второй экзон гена *Ifnar1* (chr16:91286417-91286717, 301 п.н., GRCm39/mm39); 5) loxP-сайт; 6) правое плечо гомологии (chr16:91286718-91287206, 489 п.н., GRCm39/mm39). На втором этапе была проведена реакция *in vitro* транскрипция (Биолабмикс, Т7-tr-20), а полученная РНК выделена и очищена при помощи набора Monarch RNA Cleanup (NEB, T2040L). На третьем этапе была синтезирована кДНК с использованием ОТ-М-MuLV-RN (Биолабмикс, R01-50) и очищена при помощи набора Monarch RNA Cleanup (NEB, T2040L).

Короткие олигонуклеотиды, выступающие в качестве матриц для фланкирования третьего экзона *Ifnar1* loxP-сайтами были синтезированы коммерчески (ДНК-синтез, Москва), последовательности представлены в Таблице 2. Схема ожидаемых генетических модификаций представлена на Рисунке 1.

Получение и микроинъекция эмбрионов, эмбриотрансфер.

Для получения ооцитов были использованы самки линии C57BL/6 (SPF-виварий ИЦиГ СО РАН). Была проведена суперовуляция 7,5 Ед PMSG/мышь (Фоллигон, MSD) в 18:00 в первый день и 7,5 Ед hCG/мышь (Хорулон, MSD) в 18:00 в третий день. Утром четвертого дня из яйцееводов самок были вымыты ооциты, а от самцов линии C57BL/6 (SPF-виварий ИЦиГ СО РАН) получены сперматозоиды. *In vitro* оплодотворение проводили согласно протоколу [46].

Для получения мышей с одномоментным фланкированием loxP-сайтами второго экзона была проведена микроинъекция пронуклеусов зигот раствором, содержащим хнРНК-1 25 нг/мкл, хнРНК-2 25 нг/мкл, мРНК-Cas9 50 нг/мкл и кДНК 25 нг/мкл [1, 2].

Для фланкирования LoxP-сайтами третьего экзона была проведена цитоплазматическая микроинъекция зигот раствором, содержащим хнРНК-3

25 нг/мкл, мРНК-Cas9 50 нг/мкл и оцДНК-3 25 нг/мкл. На следующий день была проведена цитоплазматическая микроинъекция обоих бластомеров двухклеточных эмбрионов раствором, содержащим хнРНК-4 25 нг/мкл, мРНК-Cas9 50 нг/мкл и оцДНК-4 25 нг/мкл [1, 2].

После микроинъекции, двухклеточные эмбрионы были трансплантированы псевдобеременным самкам CD-1 (SPF-виварий ИЦиГ СО РАН) с использованием ингаляционного изофлуранового наркоза в воронку яйцевода [1, 7, 23]

Все процедуры, проводимые с животными проведены в соответствии с Директивой Европейского Парламента и Совета Европейского Союза (2010/63/EU) и одобрены этическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ Вектор Роспотребнадзора (протокол № 5, 31 августа 2023).

Генотипирование полученных мышей.

Выделение ДНК проводили при помощи лизиса с протеиназой K, а затем смесь очищали при помощи смеси фенол-хлороформа (1:1). ДНК осаждали изопропанолом, а затем промывали 70% этанолом. Растворенную ДНК в воде использовали для проведения ПЦР с использованием Taq-полимеразы по стандартному протоколу (последовательности праймеров для генотипирования указаны в Таблице 2). Продукты анализировали при помощи гель-электрофореза в агарозном геле. Подготовку образцов для секвенирования осуществляли при помощи набор BrilliantDye™ Terminator, v 3.1 (NimaGen), а прочтение проводили на анализаторе Applied Biosystems Sanger Sequencing 3500 Series Genetic Analyzers (ThermoFisher). Схема генотипирования представлена на Рисунке 2.

3 Результаты

Дизайн экспериментов для получения нокаута гена *Ifnar1*.

Для получения нокаутной линии мышей с условным (программируемым, conditional) нокаутом по гену *Ifnar1* было выбрано два разных подхода. Целью первого подхода является одномоментная вставка двух loxP-сайтов, фланкирующих второй экзон гена *Ifnar1* (Рисунок 1А). Кроме того, при данном подходе ожидается получение мышей с делецией второго экзона (конститутивный нокаут) [37]. Для получения нокаутных мышей была использована пронуклеарная микроинъекция компонентов системы CRISPR/Cas9 (двух хнРНК и мРНК Cas9) и длинной одноцепочечной ДНК в роли матрицы для репарации. В качестве одноцепочечной ДНК была использована кДНК (оцДНК-1) (Рисунок 1А).

Второй подход заключается в двухэтапной интеграции loxP-сайтов в геном для фланкирования третьего экзона гена *Ifnar1* (Рисунок 1Б). Как и для одномоментного подхода интеграции LoxP-сайтов, в данном случае также возможно возникновение делеций экзона [24]. Для получения нокаутных мышей этим способом был проведен первый раунд цитоплазматической микроинъекции компонентов системы CRISPR/Cas9 (хнРНК-3 и мРНК Cas9) и оцДНК-3 в зиготы мышей (одноклеточная стадия). Для второго раунда микроинъекции была использована смесь компонентов CRISPR/Cas9

(хнРНК-4 и мРНК Cas9) и оцДНК-4, которая была введена в цитоплазму обоих бластомеров каждого двухклеточного эмбриона (Рисунок 1Б). Помимо вставки LoxP-сайтов возможно также возникновение делеции третьего экзона.

Получение мышей с нокаутом гена *Ifnar1*.

Для получения нокаутных мышей первым (одномоментным) подходом была выполнена микроинъекция 345 зигот линии C57BL/6, полученных от 24 самок (эффективность суперовуляции составила 14,38 зигот/мышь). Инъецированные эмбрионы, достигшие двухклеточной стадии (263 эмбриона, выживаемость 76,23%) были трансплантированы 16 псевдобеременным самкам CD-1. В результате родилось 13 мышат, а рождаемость составила 5%. Данные представлены в Таблице 1.

В результате проведения эмбриотрансфера была замечена низкая приживаемость эмбрионов линии C57BL/6, а также сниженный ответ самок линии C57BL/6 в протоколе суперовуляции. Низкая эффективность суперовуляции может быть вызвана плохим качеством гормональных препаратов или являться особенностью линии мышей. Причиной плохой приживаемости эмбрионов могут быть токсическое воздействие материалов для культивирования эмбрионов (чашки Петри, среды для культивирования, эмбриональное масло и прочее), компонентов для микроинъекции (токсичность, off-target эффекты и прочее), а также особенность линии мышей-доноров ооцитов или линии-реципиента.

Для выявления вышеперечисленных возможных проблем следующие эксперименты по получению нокаутных мышей по гену *Ifnar1* проводились с внутренним контролем, а именно параллельной суперовуляцией самок линии CD-1, *in vitro* оплодотворением их ооцитов, микроинъекцией и культивированием эмбрионов CD-1, а также совместным эмбриотрансфером эмбрионов от линии C57BL/6 и CD-1.

Для следующего раунда микроинъекций и получения нокаутных мышей первым подходом были получены 122 зиготы линии C57BL/6 и 135 зигот линии CD-1. Далее, была проведена пронуклеарная микроинъекция 122 зигот линии C57BL/6 и 80 зигот линии CD-1, а оставшиеся 55 неинъецированных зигот линии CD-1 были культивированы в качестве контроля. Далее, был проведен эмбриотрансфер 100 двухклеточных эмбрионов B6 и 20 эмбрионов CD-1 пяти псевдобеременным самкам CD-1 (по 20 эмбрионов B6 и 4 эмбриона CD-1 каждой самке), а также 35 эмбрионов CD-1 двум псевдобеременным самкам CD-1 (17 и 18 эмбрионов). В результате родились две мыши линии C57BL/6 (рождаемость 2% от подсаженных эмбрионов) и восемь мышей CD-1 (рождаемость 15% от подсаженных эмбрионов CD-1). Эффективность суперовуляции самок C57BL/6 составила 13,56 эмбрионов/мышь, а самок линии CD-1 составила 33,75 ооцита/мышь (от 4 самок было получено 135 ооцитов). Контрольные 55 неинъецированных зигот линии CD-1 успешно поделились на следующий день и было получено 55 двухклеточных эмбрионов. Выживаемость эмбрионов линии C57BL/6 после микроинъекции

составила 81,97%, а для линии CD-1 – 68,75%. Результаты представлены в Таблице 1.

Для получения нокаутных мышей вторым подходом (Рисунок 1Б) была проведена цитоплазматическая микроинъекция 84 зигот линии C57BL/6 (эффективность суперовуляции 14 ооцитов/мышь). Также была проведена цитоплазматическая микроинъекция 122 зигот линии CD-1 без последующего раунда инъекции blastomeres (получены от 4 самок, эффективность суперовуляции 30,5 ооцитов/мышь). Далее, было инъецировано 68 двухклеточных эмбрионов линии C57BL/6, после чего трансплантировано 52 эмбриона (с двумя blastomeres) и 16 эмбрионов (с одним blastomere) линии C57BL/6 и 79 эмбрионов линии CD-1 восьми псевдобеременным самкам линии CD-1. В результате родилось 4 мыши линии C57BL/6 (рождаемость 5%) и 17 мышей линии CD-1 (рождаемость 22%). Выживаемость зигот после однократной микроинъекции для линии C57BL/6 составила 83,33%, а для линии CD-1 – 64,75%. Результаты представлены в Таблице 3.

Анализ мышей

В результате анализа мышей, которые родились после применения первого (одномоментного) подхода не было обнаружено животных с целевой интеграцией loxP-сайтов (ПЦР анализ с парами праймеров F1+LoxP-R и R1+LoxP-F). При анализе животных, направленном на поиск целевой делеции (301 п.н.) второго экзона при помощи ПЦР, была обнаружена одна мышь (№7), которая предположительно имела делецию (Рисунок 2). Однако, при дальнейшем анализе последовательности ПЦР-продукта у F0 №7 была обнаружена нецелевая делеция 297 п.н. в первом интроне (Chr16:90504660-90504956, версия генома мыши GRCm38) в районе хнРНК-1 (Рисунок 3 и Рисунок 5А). Из-за того, что нами не было обнаружено целевых интеграций loxP-сайтов или делеций второго экзона мы провели секвенирование районов целевых сайтов хнРНК для оценки эффективности системы CRISPR. В результате секвенирования по Сенгеру ПЦР-продуктов, полученных от 17 мышей F0, было обнаружено два события редактирования для хнРНК-1 (11,8%) и шесть событий редактирования для хнРНК-2 (35,3%). Таким образом, в результате применения данного подхода не удалось получить мышей как с условным нокаутом, так и с конститутивным.

В результате генотипирования четырех родившихся мышей линии C57BL/6, полученных после применения второго (поэтапного) подхода были обнаружены две мыши, имеющие целевую делецию третьего экзона (конститутивный нокаут). У мыши F0 №1 размер делеции составил 2977 п.н. (Chr16: 90507401-90510377, версия генома мыши GRCm38) (Рисунки 4А и 5Б), а у мыши F0 №4 – 2487 п.н. (Chr16:90507956-90510442, версия генома мыши GRCm38) (Рисунки 4А и 5Б). У F0 №2 при помощи метода ПЦР была выявлена вставка второго loxP-сайта (Рисунок 4Б). Интеграции первого loxP-сайта у родившихся четырех мышей не было выявлено. Дополнительно был проведен ПЦР для определения целостности последовательности ДНК в районе хнРНК-3. В результате анализа не удалось получить ПЦР-продукты (Рисунок 4В), что

свидетельствует о возникновении потенциальной делеции в данном районе ДНК, а данная мышь не может быть использована для повторной вставки первого loxP-сайта. От обеих мышей с делецией третьего экзона были получены потомки первого поколения, несущие родительские модификации.

4 Обсуждение

Современные методы геномного редактирования, а именно система CRISPR, произвели своего рода революцию в области получения генетически модифицированных мышей. Благодаря этим технологиям стало возможным получение мышей с целевыми интеграциями в геном при помощи микроинъекции зигот. Более того, современные эмбрионами позволяют отказаться от использования гибридов для получения эмбрионов и проводить модификации сразу на необходимом генетическом фоне, а чаще всего используют инбредную линию мышей C57BL/6.

В классических схемах трансгенеза принято использовать гибридов первого поколения для получения ооцитов, чаще всего F1 C57BL/6 x DBA2 из-за их лучшей устойчивости к микроинъекции и большей продукции ооцитов [7, 23]. Однако, после получения мышей-основателей линии требуется длительное проведение возвратных скрещиваний для создания конгенной линии [14]. Благодаря разработке современных методов возможно использование инбредных линий мышей при создании генно-модифицированных линий, что исключает необходимости в таких возвратных скрещиваниях и экономит время для проведения экспериментов.

Кроме того, существует проблема «мутации-пассажира» (Passenger Mutations), при которой невозможна полная замена генома одной линии на геном целевой линии в области интеграции трансгена. Эта проблема может приводить к искажению результатов научных экспериментов [45]. Однако, она может быть решена повторным получением генетически-модифицированной линии мышей, но с использованием животных инбредной линии [6].

Наша работа была направлена на получение условного (программируемого) нокаута гена *Ifnar1* с применением двух различных подходов. При помощи подхода одномоментной интеграции для фланкирования loxP-сайтами второго экзона нам не удалось получить как целевой интеграции, так и ожидаемой делеции второго экзона. Данный результат связан с низкой эффективностью системы CRISPR, а также дополнительными проблемами в протоколе трансгенеза. Во втором подходе, основанном на поэтапном фланкировании loxP-сайтами третьего экзона, было получено две линии мышей с целевой делецией третьего экзона, а также одну мышь с интеграцией одного из loxP-сайтов. Однако, мышь с интеграцией не может быть использована для дальнейшего введения второго loxP-сайта, так как в области второго предполагаемого сайта произошла делеция, препятствующая последующей интеграции другого loxP-сайта. Несмотря на то, что микроинъекции для последовательной интеграции loxP-сайтов были разобщены во времени были получены мыши с делециями третьего экзона, что является характерным для оригинального протокола [24].

При выполнении работы по нокаутированию гена *Ifnar1* мы столкнулись с дополнительными проблемами. Первая проблема — сниженный ответ самок линии C57BL/6 на гормональную суперовуляцию (примерно 14 эмбрионов/мышь). Вторая — низкая приживаемость эмбрионов линии C57BL/6 после трансплантации (рождаемость около 5%). Однако, использование мышей линии CD-1 для получения зигот, микроинъекции и эмбриотранфера исключило технические проблемы протокола трансгенеза. Данные проблемы существенно снизили эффективность метода трансгена для получения линии мышей с нокаутом гена *Ifnar1*. Также, мы столкнулись с такими же проблемами и при проведении других экспериментов по получению генетически-модифицированных мышей с использованием той же самой линии C57BL/6 (неопубликованные данные). Для сравнения можно привести работу, которая была проведена в начале 2018 года с использованием линии мышей C57BL/6 из того же источника (SPF-виварий ИЦиГ СО РАН) и приживаемостью эмбрионов 21.52% и 25.54% в двух разных экспериментах [6].

Для выявления возможных причин низкой эффективности протокола трансгенеза нами был применен подход совместной трансплантации эмбрионов от разных линий мышей. Эмбриотрансфер эмбрионов линии CD-1 позволил исключить сразу несколько проблем, а именно проверить качество гормонов для суперовуляции, качество культурального пластика, сред и минерального масла для культивирования эмбрионов, а также исключить токсичность компонентов для микроинъекции. Поэтому, были исключены перечисленные причины плохого ответа на самок линии C57BL/6 на суперовуляцию, а также плохой приживаемости эмбрионов. Предложенный нами подход может быть использован как метод универсального контроля при возникновении проблем на разных этапах протоколов трансгенеза, так как мыши CD-1 используются в качестве реципиентов и всегда есть в наличии. Кроме того, подсадка небольшой доли эмбрионов линии CD-1 может способствовать развитию нормальной беременности у мышей, стимулируя гормональную систему матери. В свою очередь, это может способствовать нормальной имплантации и дальнейшему развитию эмбрионов от целевой линии мышей. После рождения, мышата от линии CD-1 дополнительно стимулируют лактацию, что может помочь в решении проблемы каннибализма у мышей. При работе с эмбрионами линии CD-1 стоит учесть, что зиготы чуть хуже переносят микроинъекцию чем зиготы C57BL/6, однако, различимость пронуклеусов у зигот CD-1 лучше.

Наиболее вероятным объяснением проблем, которые возникли в ходе нашей работы, может быть дрейф генов [50]. Его эффекты становятся заметны при длительном инбредном разведении, а проблема дрейфа генов не является новой и известна научному сообществу уже давно [11, 21, 47].

Одним из решений проблемы генетического дрейфа, может быть, замена используемых линий мышей на аналогичные линии из вивариев, которые контролируют качество животных. Это позволит привести используемые

линии в соответствии с международными стандартами, а также обеспечит воспроизводимость результатов [8]. Кроме того, дрейф генов может быть причиной невоспроизводимости результатов в биологических исследованиях [19, 26].

Другой известный подход для решения проблемы дрейфа генов при инбредном разведении мышей, который был предложен и используется The Jackson Laboratory (JaxLab) — это криоконсервация эмбрионов [47, 50]. Данный подход был успешно реализован для создания криобанков эмбрионов наиболее часто используемых линий мышей в JaxLab. Например, для линии C57BL/6 была отобрана пара основателей 223-го поколения (так называемые «Адам» и «Ева»), от которых в течение двух последующих генераций получили многочисленное потомство (F225). От этих потомков были получены зиготы, которые впоследствии подвергли криоконсервации. Этот криоархив используется для последующего разведения поколений F226–F230, что позволяет минимизировать эффекты дрейфа генов и обеспечивает генетическую стабильность линии. Также, генетический материал от исходной пары используется в качестве референса для мышей линии C57BL/6 [42]. Аналогичная схема применяется и для других линий [47].

При внедрении подобного подхода в национальных центрах разведения лабораторных животных необходимо, во-первых, провести полную смену колоний мышей на животных из надежных источников с покупкой лицензии для коммерческого разведения. После этого, необходимо провести криоконсервацию эмбрионов с целью создания большого криоархива. Далее, криоархив может быть использован для постоянного и своевременного обновления мышей в разведении по аналогии со схемой из JaxLab. При использовании описанной схемы, но с использованием собственных линий мышей требуется провести фенотипирование и оценить ключевые параметры линии, например, установить среднее число мышат в помете, динамику прироста массы тела и другие характеристики. Важно учитывать, что такие линии, будучи сублиниями от исходных, должны получить собственную номенклатуру. Кроме того, результаты, полученные с использованием этих сублиний, могут оказаться невоспроизводимыми при сравнении с результатами, полученными на мышах из JaxLab или других международных репозиториях.

Благодарности

Исследование выполнено в рамках Государственного задания Роспотребнадзора ГЗ-10/21.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Последовательности хнРНК. В скобках указана последовательность PAM.

Table 1. Sequences of sgRNAs. The PAM sequence is given in round brackets.

№ #	Название Name	Последовательность 5' → 3' (PAM) Sequence 5' → 3' (PAM)
1	хнРНК-1 sgRNA-1	CATGTGCCACTATTACCCTG (GGG)
3	хнРНК-2 sgRNA-2	ATCGAACGTAAGGTGACTGAT (TGG)
4	хнРНК-3 sgRNA-3	AGGAGGCAGCTTCGTGACGA (CGG)
5	хнРНК-4 sgRNA-4	CTTTCCTGGTAACTTACCAG (AGG)

Таблица 2. Последовательности праймеров для генотипирования и олигонуклеотидов.

Table 2. Sequences of primers for genotyping and oligonucleotides.

№ #	Название Name	Последовательность 5' → 3' Sequence 5' → 3'
1	FWD- хнPHK- 3 FWD- sgRNA- 3	GTTAATACGACTCACTATAGAGGAGGCAGCTTCGTG ACGA GTTT TAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA
2	FWD- хнPHK- 4 FWD- sgRNA- 4	GTTAATACGACTCACTATAGCTTTCCTGGTAACTTAC CAG GTTT TAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA
3	REV- хнPHK REV- sgRNA	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATA ACG GACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTA
4	оцДНК- 3 ssDNA- 3	AATAAATTCTCTTAGTATGACTGCCACTGTATGTTTC CCAGA TGTTTCTCTTCCGTCGGTCGACATAACTTCGTATAGC ATACA TTATACGAAGTTATCCTCGAGGTCACGAAGCTGCCTC CTTAT GTGGGCTGTGGTCTAAAGTGACCTTCCAGGTCTCAG GAGGT
5	оцДНК- 4 ssDNA- 4	TTCCGCCATGCGTTTGCTTCTACTAGGAGGTTTCAGA ACAG CTTTCCTGGTAACTTACGTCGACATAACTTCGTATAG CATA ATTATACGAAGTTATCCTCGAGGCAGAGGCAGCATT TGCTG CCATTGTCAGAGTTACCTGGTTTTCTTTGGTGCATAG ATGCA
6	F1	AGGGCTTATTGTGGGTGGTG
7	R1	ACCACTGTGTGTGCTGGA
8	LoxP-F	CATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATC
9	LoxP-R	CATGCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTT ATCCTAG

10	F2	ACTGCCACTGTATGTTTCCCA
11	R2	GGCTCATGTGAGCTGTTGAC
12	R3	TTGCCTCTAACAGGCTGGTG

Таблица 3. Данные по микроинъекции эмбрионов, выживаемости после инъекции, эмбриотрансфера и родившихся мышей.

Table 3. Data about of embryo microinjection, post-injection survival, embryo transfer and pups delivery.

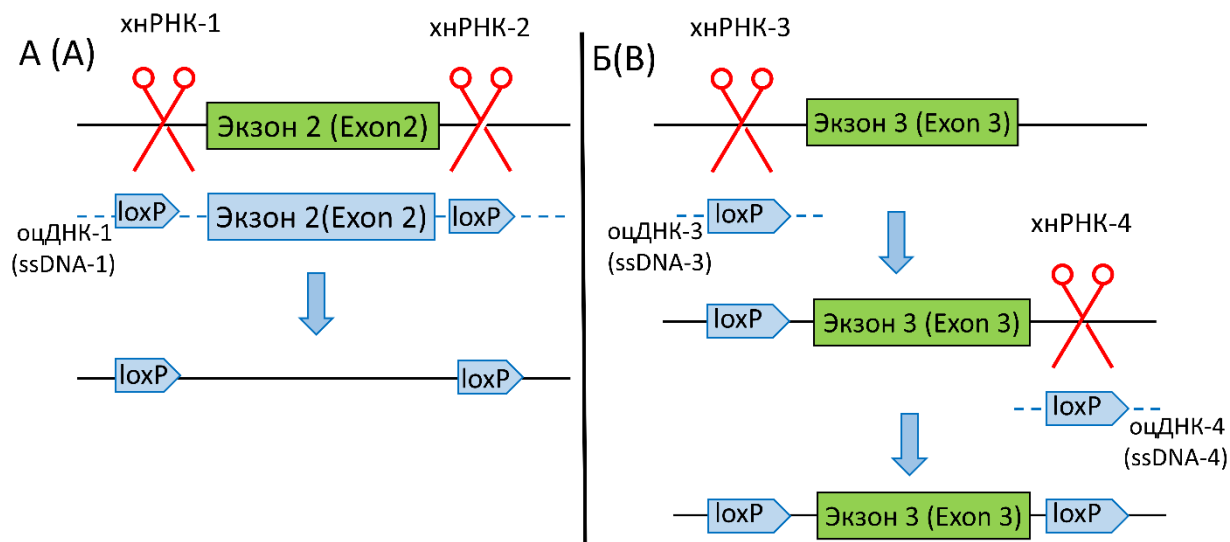
№ #	Подх од Meth od	Количе ство самок-доноров , линия Number of donor females, line	Колич ество зигот Number of zygotes	Эффектив ность суперовул яции (зигот/мыш ь) Superovula tion efficiency (zygotes/m ouse)	Зигот трансплантиро вано (выживаемость после инъекции) Zygotes transplanted (survival after injection)	Родилось мышей (эффективно сть эмбриотранс фера) Mice born (embryotransf er efficiency)
1	Перв ый подх од The first meth od	24, C57BL/ 6	345	14,37	263 (76,23%)	13 (5%)
2	Перв ый подх од The first meth od	9, C57BL/ 6	122	13,56	100 (81,97)	2 (2%)
		4, CD-1	135, из них 80 инъец ирова но 135, of which 80 were injecte d	33,75	55 (68,75)	8 (15%)
3	Втор ой подх од The secon d	6, C57BL/ 6	84	14	68 (83,33% после однократной инъекции) 68 (83.33% after a single injection)	4 (5%)

	Meth od	4, CD-1	122	30,5	79 (64,75%)	17 (22%)
--	------------	---------	-----	------	-------------	----------

РИСУНКИ

Рисунок 1. А – схема генетических модификаций, осуществляемых при применении первого подхода нокаута гена *Ifnar1* (одномоментная интеграция двух loxP-сайтов).

Figure 1. A – Schematic diagram of the genetic modifications achieved using the first *Ifnar1* gene knockout method (simultaneous integration of two loxP sites).



Б - схема генетических модификаций, осуществляемых при применении второго подхода нокаута гена *Ifnar1* (поэтапная интеграция двух loxP-сайтов).

B – Schematic diagram of the genetic modifications achieved using the second *Ifnar1* gene knockout method (stepwise integration of two loxP sites).

Рисунок 2. Схема генотипирования ожидаемого аллеля с интеграцией loxP-сайтов и аллеля с делецией для первого (А) и второго (Б) подходов.

Figure 2. Scheme of genotyping of the expected allele with integration of loxP sites and the allele with a deletion for the first (A) and second (B) methods.

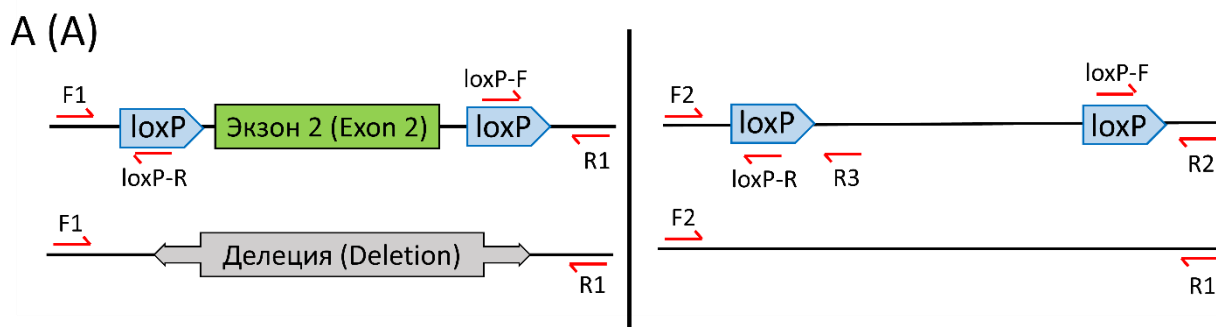


Рисунок 3. Результаты генотипирования мышей F0, полученных после применения первого (одномоментного) подхода нокаута гена *Ifnar1* (праймеры F1+R1).

Figure 3. Results of genotyping of F0 mice obtained after the first (one-stage) knockout method of the *Ifnar1* gene (primers F1+R1).

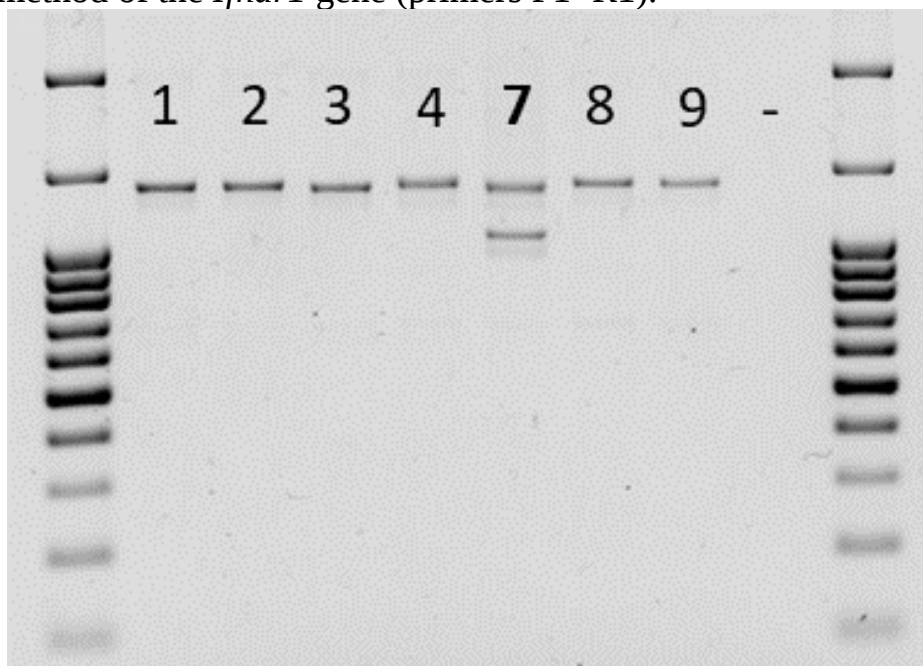
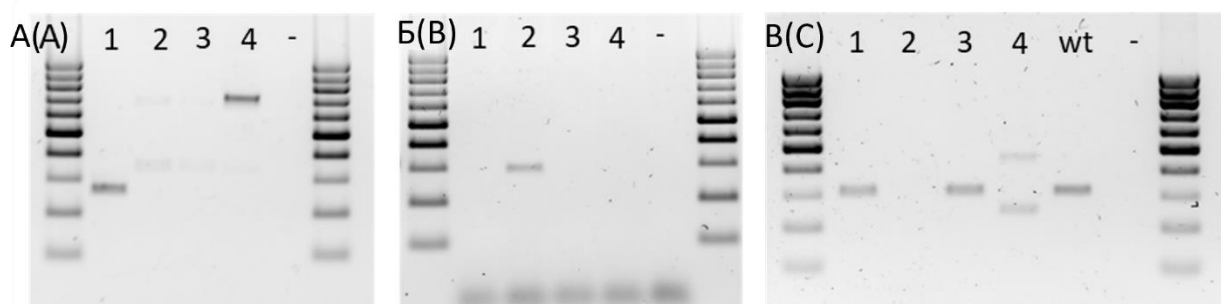


Рисунок 4. Результат генотипирования четырех мышей, полученных после применения второго (двухэтапного) подхода нокаута гена *Ifnar1*.

Figure 4. Genotyping results for four mice obtained using the second (two-step) *Ifnar1* gene knockout method.



А – результат, направленный на поиск аллеля с делецией (праймеры F2 и R2).

Б – результат, направленный на поиск интеграции первого loxP-сайта

(праймеры LoxP-F и R2). В – результат, направленный на установление

целостности сайта хнРНК-3 (праймеры F2 и R3), wt – ДНК от мыши без

геномных модификаций.

A – result aimed at finding the allele with the deletion (primers F2 and R2). B –

result aimed at finding the integration of the first loxP site (primers LoxP-F and R2).

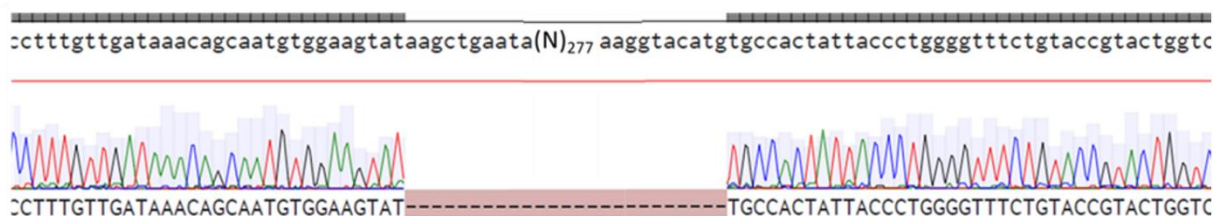
C – result aimed at establishing the integrity of the cgRNA-3 site (primers F2 and

R3), wt – DNA from mouse without genome modifications.

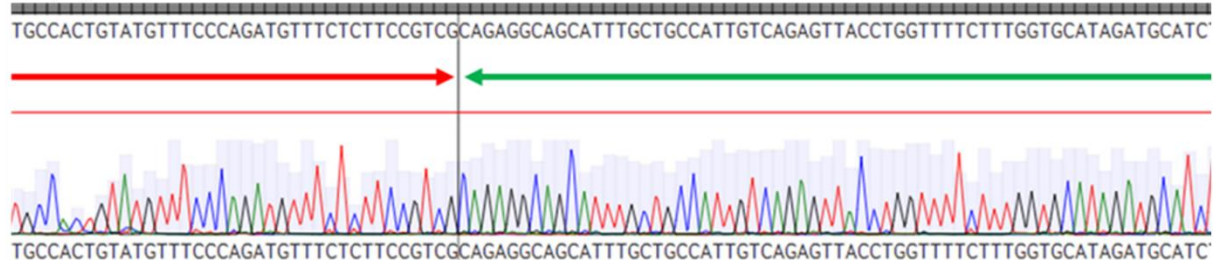
Рисунок 5. А – Результат секвенирования ПЦР-продукта, полученного из аллеля с делецией 297 п.н. (Chr16: 90504660-90504956, версия генома мыши GRCm38). Б - Результат секвенирования аллеля ПЦР-продукта, полученного из аллеля с делецией третьего экзона размером 2977 п.н. (Chr16: 90507401-90510377, версия генома мыши GRCm38). В - Результат секвенирования ПЦР-продукта, полученного из аллеля с делецией третьего экзона размером 2487 п.н. (Chr16: 90507401-90510377, версия генома мыши GRCm38).

Figure 5. A – Sequencing result of the PCR product obtained from the allele with a 297 bp deletion (Chr16: 90504660-90504956, mouse genome version GRCm38). B – Sequencing result of the PCR product allele obtained from the allele with a 2977 bp deletion of the third exon (Chr16: 90507401-90510377, mouse genome version GRCm38). C – Sequencing result of the PCR product obtained from the allele with a 2487 bp deletion of the third exon (Chr16: 90507401-90510377, mouse genome version GRCm38).

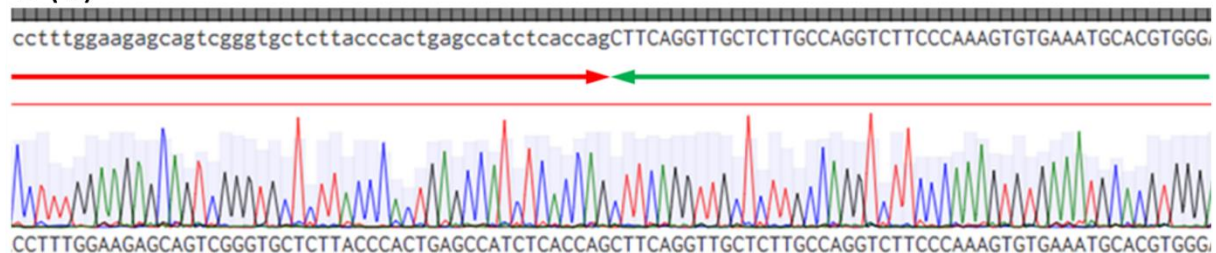
A (A)



Б (B)



В (C)



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Кораблев Алексей Николаевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией геномного редактирования (в составе отдела геномных исследований);

адрес: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, 630559, Россия;

телефон: +7 (383) 363-47-10 доб. 2208;

e-mail: korablev_an@vector.nsc.ru

e-mail: korablevalexeyn@gmail.com

Korablev Alexey Nikolayevich, Candidate of Biological Sciences, senior researcher, Head of the Laboratory of Genome Editing (part of the Department of Genomic Research);

address: FBRI SRC VB "Vector", Rospotrebnadzor, Koltsovo, 630559, Russia;

telephone: +7 (383) 363-47-10 доб. 2208;

e-mail: korablev_an@vector.nsc.ru

e-mail: korablevalexeyn@gmail.com

Блок 2. Информация об авторах

Сметанникова Наталья Анатольевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории геномного редактирования (в составе отдела геномных исследований);

Smetannikova Natalia Anatolyevna, senior researcher in the Laboratory of Genome Editing (part of the Department of Genomic Research);

Давлетшина Гузель Ильдаровна, научный сотрудник лаборатории геномного редактирования (в составе отдела геномных исследований);

Davletshina Guzel Ildarovna, researcher in the Laboratory of Genome Editing (part of the Department of Genomic Research).

Блок 3. Метаданные статьи

ПОЛУЧЕНИЕ ИММУНОДЕФИЦИТНОЙ ЛИНИИ НОКАУТНЫХ МЫШЕЙ
ПО ГЕНУ *IFNAR1* И ПРОБЛЕМЫ ПРОТОКОЛА ТРАНСГЕНЕЗА С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6

GENERATION OF AN IMMUNODEFICIENT *IFNAR1* KNOCKOUT MOUSE
LINE AND CHALLENGES OF THE TRANSGENESIS PROTOCOL USING THE
C57BL/6 STRAIN

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ПОЛУЧЕНИЕ НОКАУТНЫХ МЫШЕЙ *IFNAR1*
GENERATION OF *IFNAR1* KNOCKOUT MOUSE

Ключевые слова: CRISPR, редактирование генома, иммунодефицитные
линии мышей, дрейф генов, нокаут генов, *Ifnar1*.

Keywords: CRISPR, genome editing, immunodeficient mouse lines, genetic drift,
gene knockout, *Ifnar1*.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 9,

Количество таблиц – 3,

Количество рисунков – 5.

07.10.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядков ый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Кораблев А. Н., Серова И. А., Скрябин Б. В. Манипуляции с ранними эмбрионами мыши для создания генетически модифицированных животных // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т.21, № 7. – С. 758–763.	Korablev A.N., Serova I.A., Skryabin B.V. Manipulations with early mouse embryos for generation of genetically modified animals. Vavilov Journal of Genetics and Breeding., 2017, Vol.21, no. 7, pp. 758-763.	doi: 10.18699/VJ17.291.
2	Мензоров А. Г., Лукьянчикова В. А., Кораблев А. Н., Серова И. А., Фишман В. С. Практическое руководство по редактированию геномов системой CRISPR/Cas9 // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т.20, № 6. – С. 930–944.	Menzorov A.G., Lukyanchikova V.A., Korablev A.N., Serova I.A., Fishman V.S. Genome editing using CRISPR/Cas9 system: a practical guide. Vavilov Journal of Genetics and Breeding., 2016, Vol. 20, no. 6. pp. 930-944.	doi: 10.18699/VJ16.214.
3	Abe T., Inoue K., Kiyonari H. Efficient CRISPR/Cas9-Assisted knockin of large DNA donors by pronuclear microinjection during S- Phase in mouse zygotes. Methods in Molecular Biology., 2023, Vol. 2637, pp. 181–194.	-	doi: 10.1007/978-1-0716- 3016-7_14.

4	Abeynaike S., Paust S. Humanized mice for the evaluation of novel HIV-1 therapies. <i>Frontiers in Immunology.</i> , 2021, Vol. 12, no. 636775.	-	doi: 10.3389/fimmu.2021.636775.
5	Barham W., Hsu M., Liu X., Harrington S.M., Hirdler J.B., Gicobi J.K., Zhu X., Zeng H., Pavelko K.D., Yan Y., Mansfield A.S., Dong H. A novel humanized PD-1/PD-L1 mouse model permits direct comparison of antitumor immunity generated by food and drug administration–approved PD-1 and PD-L1 inhibitors. <i>Immunohorizons.</i> , 2023, Vol. 7, no. 1, pp. 125–139.	-	doi: 10.4049/immunohorizons.2200054.
6	Battulin N., Kovalzon V.M., Korablev A., Serova I., Kiryukhina O.O., Pechkova M.G., Bogotskoy K.A., Tarasova O.S., Panchin Y. Pannexin 1 transgenic mice: human diseases and sleep-wake function revision. <i>International Journal of Molecular Sciences.</i> , 2021, Vol. 22, no. 10, p. 5269.	-	doi: 10.3390/ijms22105269.
7	Behringer R., Gertsenstein M., Nagy K.V., Nagy A. <i>Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual.</i> Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014, 814 p.	-	https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/ManipMouse4/MME4FM.pdf?TB_iframe=true
8	Benavides F., Rüllicke T., Prins J.B., Bussell J., Scavizzi F., Cinelli P., Herault Y., Wedekind D. Genetic quality assurance and genetic monitoring of laboratory mice and rats:	-	doi: 10.1177/0023677219867719.

	FELASA Working Group Report. Laboratory Animals., 2020, Vol. 54, no. 2, pp. 135–148.		
9	Browning J., Horner J.W., Pettoello-Mantovani M., Raker C., Yurasov S., DePinho R.A., Goldstein H. Mice transgenic for human CD4 and CCR5 are susceptible to HIV infection. Proc Natl Acad Sci U S A., 1997, Vol. 94, no. 26, pp. 14637-14641.	-	doi: 10.1073/pnas.94.26.14637.
10	Bruter A.V., Korshunova D.S., Kubekina M.V., Sergiev P.V., Kalinina A.A., Ilchuk L.A., Silaeva Y.Y., Korshunov E.N., Soldatov V.O., Deykin A.V. Novel transgenic mice with Cre-dependent co-expression of GFP and human ACE2: a safe tool for study of COVID-19 pathogenesis. Transgenic research., 2021, Vol. 30, no. 3, pp. 289–301.	-	doi: 10.1007/s11248-021-00249-8.
11	Chang T.K., Ho P., Liang C.T., Yu C.K. Effects of vaginal septa on the reproductive performance of BALB/cByJNarl mice. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS., 2013, Vol. 52, no. 5, pp. 520–523.	-	https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3784654/
12	Chen Z. Monkey Models and HIV Vaccine Research. Advances in experimental medicine and biology., 2018, Vol. 1075, pp. 97–124.	-	doi: 10.1007/978-981-13-0484-2_5.

13	Doench J.G., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E.W., Donovan K.F., Smith I., Tothova Z., Wilen C., Orchard R., Virgin H.W., Listgarten J., Root D.E. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. <i>Nature biotechnology.</i> , 2016, Vol. 34, no. 2, pp. 184–191.	-	doi: 10.1038/nbt.3437.
14	Doetschman T. Influence of genetic background on genetically engineered mouse phenotypes. <i>Methods in molecular biology.</i> , 2009, Vol. 530, pp. 423–433.	-	doi: 10.1007/978-1-59745-471-1_23.
15	Dong W., Mead H., Tian L., Park J.G., Garcia J.I., Jaramillo S., Barr T., Kollath D.S., Coyne V.K., Stone N.E., Jones A., Zhang J., Li A., Wang L.S., Milanes-Yearsley M., Torrelles J.B., Martinez-Sobrido L., Keim P.S., Barker B.M., Caligiuri, M.A., Yu J. The K18-Human ACE2 transgenic mouse model recapitulates non-severe and severe COVID-19 in response to an infectious dose of the SARS-CoV-2 virus. <i>Journal of virology.</i> , 2022, Vol. 96, no. 1.	-	doi: 10.1128/JVI.00964-21.
16	Escaffre O, Juelich T.L., Neef N., Massey S., Smith J., Brasel T., Smith J.K., Kalveram B., Zhang L., Perez D., Ikegami T., Freiberg A.N., Comer J.E. STAT-1 knockout mice as a model	-	doi: 10.3390/v13071388.

	for wild-type Sudan virus (SUDV). <i>Viruses.</i> , 2021, Vol. 13, no. 7, p. 1388.		
17	Estes J. D., Wong S. W., Brenchley J. M. Nonhuman primate models of human viral infections. <i>Nature Reviews Immunology.</i> , 2018, Vol. 18, no. 6, pp. 390–404.	-	doi: 10.1038/s41577-018-0005-7.
18	Fletcher P., Feldmann F., Takada A., Crossland N.A., Hume A.J., Albariño C., Kemenesi G., Feldmann H., Mühlberger E., Marzi A. Pathogenicity of Lloviu and Bombali viruses in type I interferon receptor knockout mice. <i>The Journal of Infectious Diseases.</i> , 2023, Vol. 228, no. Supplement 7, pp. S548–S553.	-	doi: 10.1093/infdis/jiad226.
19	Flier J. S. The problem of irreproducible bioscience research. <i>Perspectives in Biology and Medicine.</i> , 2022, Vol. 65, no 3, pp. 373–395.	-	doi: 10.1353/pbm.2022.0032.
20	Fujii H., Fukushi S., Yoshikawa T., Nagata N., Taniguchi S., Shimojima M., Yamada S., Tani H., Uda A., Maeki T., Harada S., Kurosu T., Lim C.K., Nakayama E., Takayama-Ito M., Watanabe S., Ebihara H., Morikawa S., Saijo M. Pathological and virological findings of type I interferon receptor knockout mice upon experimental infection with Heartland virus. <i>Virus Research.</i> , -2024, Vol. 340, pp. 199301.	-	doi: 10.1016/j.virusres.2023.199301.

21	Gearhart S., Kalishman J., Melikyan H., Mason C., Kohn D.F. Increased incidence of vaginal septum in C57BL/6J mice since 1976. Comparative medicine., 2004, Vol. 54, no. 4, pp. 418–421.	-	https://aalas.kglmeridian.com/meridian/aalas/published/rest/pdf-watermark/v1/journals/72010023/54/4/article-p418.pdf/watermark-pdf/
22	Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., Ruddle F.H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences., 1980, Vol. 77, no. 12, pp. 7380–7384.	-	doi: 10.1073/pnas.77.12.7380.
23	Hogan B., Costantini F., Lacy E. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1986, 332 p.	-	https://web.mit.edu/7.31/restricted/pdfs/lab_man_all.pdf
24	Horii T., Morita S., Kimura M., Terawaki N., Shibutani M., Hatada I. Efficient generation of conditional knockout mice via sequential introduction of lox sites. Scientific Reports., 2017, Vol. 7, no. 1, p. 7891.	-	doi: 10.1038/s41598-017-08496-8.
25	Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G., Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nature Biotechnology., 2013, Vol. 31, no. 9, pp. 827–832.	-	doi: 10.1038/nbt.2647.

26	Jaric I., Voelkl B., Amrein I., Wolfer D.P., Novak J., Detotto C., Weber-Stadlbauer U., Meyer U., Manuella F., Mansuy I.M., Würbel H. Using mice from different breeding sites fails to improve replicability of results from single-laboratory studies. Lab Animal., 2024, Vol. 53, no. 1, pp 18–22.	-	doi: 10.1038/s41684-023-01307-w.
27	Koller B.H., Marrack P., Kappler J.W., Smithies O. Normal Development of Mice Deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. Science., 1990, Vol. 248, no. 4960, pp. 1227–1230.	-	doi: 10.1126/science.2112266.
28	Lambertz R.L.O., Gerhauser I., Nehlmeier I., Gärtner S., Winkler M., Leist S.R., Kollmus H., Pöhlmann S., Schughart K. H2 influenza A virus is not pathogenic in Tmprss2 knock-out mice. Virology Journal., 2020, Vol. 17, no. 1 p. 56.	-	doi: 10.1186/s12985-020-01323-z.
29	Lee E.C., Liang Q., Ali H., Bayliss L., Beasley A., Bloomfield-Gerdes T., Bonoli L., Brown R., Campbell J., Carpenter A., Chalk S., Davis A., England N., Fane-Dremucheva A., Franz B., Germaschewski V., Holmes H., Holmes S., Kirby I., Kosmac M., Legent A., Lui H., Manin A., O'Leary S., Paterson J., Sciarrillo R., Speak A., Spensberger D., Tuffery L., Waddell N., Wang W., Wells S., Wong V., Wood A., Owen M.J., Friedrich G.A., Bradley A. Complete	-	doi: 10.1038/nbt.2825.

	humanization of the mouse immunoglobulin loci enables efficient therapeutic antibody discovery. Nat Biotechnol., 2014, Vol. 32, no. 4, pp. 356-363.		
30	Li A., Coffey L.L., Mohr E.L., Raper J., Chahroudi A., Ausderau K.K., Aliota M.T., Friedrich T.C., Mitzey A.M., Koenig M.R., Golos T.G., Jaeger H.K., Roberts V.H.J., Lo J.O., Smith J.L., Hirsch A.J., Streblow D.N., Newman C.M., O'Connor D.H., Lackritz E.M., Van Rompay K.K.A., Adams Waldorf K.M. Role of non-human primate models in accelerating research and developing countermeasures against Zika virus infection. Lancet Microbe., 2025, Vol. 6, no. 6, p. 101030..	-	doi: 10.1016/j.lanmic.2024.101030.
31	Liu C., Xie W., Gui C., Du Y. Pronuclear microinjection and oviduct transfer procedures for transgenic mouse production. Methods Mol Biol., 2013, Vol. 1027, pp. 217-232.	-	doi: 10.1007/978-1-60327-369-5_10.
32	Longenecker G., Kulkarni A. B. Generation of gene knockout mice by ES cell microinjection. Current Protocols in Cell Biology., 2009, Vol. 44, no. 1, pp. 1-36.	-	doi: 10.1002/0471143030.cb1914s44.

33	Lupiáñez D.G., Kraft K., Heinrich V., Krawitz P., Brancati F., Klopocki E., Horn D., Kayserili H., Opitz J.M., Laxova R., Santos-Simarro F., Gilbert-Dussardier B., Wittler L., Borschiwer M., Haas S.A., Osterwalder M., Franke M., Timmermann B., Hecht J., Spielmann M., Visel A., Mundlos S. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. <i>Cell.</i> , 2015, Vol. 161, no. 5, pp. 1012-1025.	-	doi: 10.1016/j.cell.2015.04.004.
34	Marino M.W., Dunn A., Grail D., Inglese M., Noguchi Y., Richards E., Jungbluth A., Wada H., Moore M., Williamson B., Basu S., Old L.J. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences.</i> , 1997, Vol. 94, no. 15, pp. 8093–8098.	-	doi: 10.1073/pnas.94.15.8093.
35	Masemann D., Ludwig S., Boergeling Y. Advances in transgenic mouse models to study infections by human pathogenic viruses. <i>International Journal of Molecular Sciences.</i> , 2020, Vol. 21, no. 23, p. 9289.	-	doi: 10.3390/ijms21239289.
36	Miura H., Quadros R.M., Gurumurthy C.B., Ohtsuka M. Easi-CRISPR for creating knock-in and conditional knockout mouse models using long ssDNA donors. <i>Nature Protocols.</i> , 2017, Vol. 13, no. 1, pp. 195-215.	-	doi: 10.1038/nprot.2017.153.

37	Miyasaka Y., Uno Y., Yoshimi K., Kunihiro Y., Yoshimura T., Tanaka T., Ishikubo H., Hiraoka Y., Takemoto N., Tanaka T., Ooguchi Y., Skehel P., Aida T., Takeda J., Mashimo T. CLICK: one-step generation of conditional knockout mice. BMC Genomics., 2018, Vol. 19, no. 1, p. 318.	-	doi: 10.1186/s12864-018-4713-y.
38	Monticelli S.R., Kuehne A.I., Bakken R.R., Coyne S.R., Lewis K.D., Raymond J.L.W., Zeng X., Richardson J.B., Lapoint Z., Williams J.L., Stefan C.P., Kugelman J.R., Koehler J.W., Herbert A.S. Characterization of a STAT-1 Knockout Mouse Model for Machupo Virus Infection and Pathogenesis. Viruses., 2025, Vol. 17, no. 7, p. 996.	-	doi: 10.3390/v17070996.
39	Moreau G.B., Burgess S.L., Sturek J.M., Donlan A.N., Petri W.A., Mann B.J. Evaluation of K18-hACE2 Mice as a Model of SARS-CoV-2 Infection. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene., 2020, Vol. 103, no. 3, pp. 1215–1219.	-	doi: 10.4269/ajtmh.20-0762.
40	Pincus S. H. Models of HIV infection utilizing transgenic and reconstituted immunodeficient mice. Drug Discovery Today: Disease Models., 2004, Vol. 1, no. 1, pp. 49–56.	-	doi: 10.1016/j.ddmod.2004.08.001 .
41	Ruiz S. I., Zumbrun E. E., Nalca A. Animal Models of Human Viral Diseases. Animal	-	doi: 10.1016/B978-0-12-809468-6.00033-4.

	Models of Human Viral Diseases., 2017, pp. 853–901.		
42	Sarsani V.K., Raghupathy N., Fiddes I.T., Armstrong J., Thibaud-Nissen F., Zinder O., Bolisetty M., Howe K., Hinerfeld D., Ruan X., Rowe L., Barter M., Ananda G., Paten B., Weinstock G.M., Churchill G.A., Wiles M.V., Schneider V.A., Srivastava A., Reinholdt L.G. The Genome of C57BL/6J "Eve", the Mother of the Laboratory Mouse Genome Reference Strain. G3 (Bethesda)., 2019, Vol. 9, no. 6, pp. 1795–1805.	-	doi: 10.1534/g3.119.400071.
43	Savenkova D.A., Gudymo A.S., Korablev A.N., Taranov O.S., Bazovkina D.V., Danilchenko N.V., Perfilyeva O.N., Ivleva E.K., Moiseeva A.A., Bulanovich Y.A., Roshchina E.V., Serova I.A., Battulin N.R., Kulikova E.A., Yudkin D.V. Knockout of the Tnfa Gene Decreases Influenza Virus-Induced Histological Reactions in Laboratory Mice. International Journal of Molecular Sciences., 2024, Vol. 25, no. 2, p. 1156.	-	doi: 10.3390/ijms25021156.
44	Smirnov A., Fishman V., Yunusova A., Korablev A., Serova I., Skryabin B.V., Rozhdestvensky T.S., Battulin N. DNA barcoding reveals that injected transgenes are predominantly processed by homologous	-	doi: 10.1093/nar/gkz1085.

	recombination in mouse zygote. Nucleic Acids Research., 2019, Vol. 48, no. 2, pp. 719-735.		
45	Suzuki J., Inada H., Han C., Kim M.J., Kimura R., Takata Y., Honkura Y., Owada Y., Kawase T., Katori Y., Someya S., Osumi N. "Passenger gene" problem in transgenic C57BL/6 mice used in hearing research. Neuroscience Research., 2020, Vol. 158, pp. 6–15.	-	doi: 10.1016/j.neures.2019.10.007.
46	Taft R. In Vitro Fertilization in Mice. Cold Spring Harbor Protocols., 2017., no. 11.	-	doi: 10.1101/pdb.prot094508.
47	Taft R.A., Davisson M., Wiles M.V. Know thy mouse. Trends in Genetics., 2006, Vol. 22, no. 12, pp. 649-653.	-	doi: 10.1016/j.tig.2006.09.010.
48	Wang H., Yang H., Shivalila C.S., Dawlaty M.M., Cheng A.W., Zhang F., Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Cell., 2013, Vol. 153, no. 4, pp. 910-918.	-	doi: 10.1016/j.cell.2013.04.025.
49	Wu H., Haist V., Baumgärtner W., Schughart K. Sustained viral load and late death in Rag2-/- mice after influenza A virus infection. Virology Journal., 2010, Vol. 7, no. 1, p. 172.	-	doi: 10.1186/1743-422X-7-172.

50	Zeldovich L. Genetic drift: the ghost in the genome. Lab Animal., 2017, Vol. 46, no. 6, pp. 255–257.	-	doi: 10.1038/labani.1275.
51	Zhang C., Zaman L.A., Poluektova L.Y., Gorantla S., Gendelman H.E., Dash P.K. Humanized Mice for Studies of HIV-1 Persistence and Elimination. Pathogens., 2023, Vol. 12, no. 7, p. 879.	-	doi: 10.3390/pathogens12070879.
52	Zijlstra M., Bix M., Simister N.E., Loring J.M., Raulet D.H., Jaenisch R. Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. Nature., 1990, Vol. 344, no. 6268, pp. 742–746.	-	doi: 10.1038/344742a0.