

# Эффективное получение химерных мышей с использованием новой линии эмбриональных стволовых клеток

Г.В. Концевая<sup>1</sup>, Н.А. Фефанова<sup>1,3</sup>, А.Г. Мензоров<sup>1,2</sup>, И.Е. Пристяжнюк<sup>1</sup>, А.В. Смирнов<sup>1</sup>, Н.Р. Баттулин<sup>1,2</sup>✉,  
Л.А. Герлинская<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Для получения трансгенных мышей широко используются эмбриональные стволовые клетки. При инъекции генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток в бластоцисту можно получить химерных животных, часть половых клеток которых будет содержать модифицированный участок генома или трансген. Такие мыши-основатели могут дать начало линиям с модификациями генома. В настоящее время запущено несколько проектов (KOMP Repository, EUCOMM, Lexicon Genetics) по созданию коллекций нокаутных по различным генам линий мышей. Тем не менее многие генно-инженерные задачи требуют сложных модификаций генома, таких как большие геномные делеции, встройка генов-репортеров в 3'-регуляторную область генов или сайт-специфичные мутации участков генома. Для этих целей требуется линия эмбриональных стволовых клеток мыши, клетки которой способны участвовать в формировании химерного животного даже после длительного культивирования. В лаборатории генетики развития Института цитологии и генетики СО РАН для проведения экспериментов по созданию трансгенных линий мышей было получено несколько линий эмбриональных стволовых клеток. Мы выбрали одну из них, DGE51 (нормальный кариотип  $2n = 40, XY$ , генотип 129S2/SvPasCrl), для получения химерных животных на базе Центра коллективного пользования «SPF-виварий» Института цитологии и генетики СО РАН. Эмбриональные стволовые клетки были введены в 136 бластоцист генотипа B6D2F1. Бластоцисты подсаживали мышам CD-1, всего родилось 66 мышат. Среди этих потомков 15 оказались химерами, 4 из них с химеризмом выше 80%. Все родившиеся химеры были самцами и не имели отклонений в развитии. 10 из 15 химерных животных были фертильны. Анализ аллелей микросателлитов потомков химерных самцов показал вклад эмбриональных стволовых клеток DGE51 в формирование гамет. Таким образом, линию эмбриональных стволовых клеток DGE51 можно эффективно использовать для создания трансгенных линий мышей с бластоцистами генотипа B6D2F1 и мышей-реципиентов линии CD-1.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки; химерные мыши; плюрипотентность; трансгенез.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Концевая Г.В., Фефанова Н.А., Мензоров А.Г., Пристяжнюк И.Е., Смирнов А.В., Баттулин Н.Р., Герлинская Л.А. Эффективное получение химерных мышей с использованием новой линии эмбриональных стволовых клеток. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(6):925-929. DOI 10.18699/VJ16.213

## HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kontsevaya G.V., Feofanova N.A., Menzorov A.G., Pristazhnyuk I.E., Smirnov A.V., Battulin N.R., Gerlinskaya L.A. Efficient chimeric mouse production using a novel embryonic stem cell line. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(6):925-929. DOI 10.18699/VJ16.213

УДК 575.164:602.9

Поступила в редакцию 03.11.2016 г.

Принята к публикации 16.12.2016 г.

© АВТОРЫ, 2016

✉ e-mail: battulin@bionet.nsc.ru

## Efficient chimeric mouse production using a novel embryonic stem cell line

G.V. Kontsevaya<sup>1</sup>, N.A. Feofanova<sup>1,3</sup>,  
A.G. Menzorov<sup>1,2</sup>, I.E. Pristazhnyuk<sup>1</sup>,  
A.V. Smirnov<sup>1</sup>, N.R. Battulin<sup>1,2</sup>✉, L.A. Gerlinskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

Embryonic stem cells are commonly used for generation of transgenic mice. Embryonic stem cells could participate in the development of chimeric animals after injection into a blastocyst. Injection of genetically modified embryonic stem cells could lead to germ line transmission of a transgene or genomic modification in chimeric mice. Such founders are used to produce transgenic lines of mice. There are several projects dedicated to production of knock-out mouse lines (KOMP Repository, EUCOMM, Lexicon Genetics). Nevertheless, there is a need for complex genome modifications, such as large deletions, reporter genes insertion into the 3' gene regulatory sequence, or site-specific modifications of the genome. To do that, researchers need an embryonic stem cell line that is able to participate in chimeric animal formation even after prolonged culture *in vitro*. Several lines of mouse embryonic stem cells were produced in the Laboratory of Developmental Genetics of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS. We tested DGE51 cell line ( $2n = 40, XY$ ) (129S2/SvPasCrl genetic background) for chimeric mice production at the Center for Genetic Resources of Laboratory Animals at ICG SB RAS. Embryonic stem cells were injected into 136 blastocysts (B6D2F1 genetic background), which were transplanted into CD-1 mice. Among 66 progeny, 15 were chimeric, 4 of which were more than 80% chimeric judged by coat color. All chimeras were males without developmental abnormalities. 10 of 15 males were fertile. Microsatellite analysis of the progeny of chimeric mice revealed embryonic stem cell line DGE51 contribution to the gamete formation. Thus, a novel DGE51 embryonic stem cell line could be efficiently used for transgenic mouse production using B6D2F1 blastocysts and CD-1 recipients.

Key words: embryonic stem cells; chimeric mice; pluripotency; transgenesis.

Впервые эмбриональные стволовые (ЭС) клетки мыши были получены M.J. Evans и M.H. Kaufman (1981) путем изоляции клеток внутренней клеточной массы бластоцисты. ЭС клетки способны к самообновлению и дифференцировке *in vitro* в производные трех зародышевых листков (включая гаметы). При введении ЭС клеток в бластоцисту можно получить химерное животное, часть клеток которого будет иметь генотип ЭС клеток и, в том числе, формировать гаметы. Более того, при инъекции ЭС клеток в тетраплоидную бластоцисту возможно образование эмбриона, полностью сформированного из введенных ЭС клеток, так как тетраплоидные клетки не способны формировать эмбрион, но дифференцируются во внезародышевые ткани. Проведение генетических манипуляций с ЭС клетками с последующим субклонированием позволяет получать трансгенных мышей с желаемыми свойствами. С развитием новых методов генной инженерии, таких как аденоассоциированные вирусы, транспозоны и сайт-направленные нуклеазы (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9), трансгенез обрел «новое дыхание». Стало возможным эффективное получение линий ЭС клеток с направленной встройкой интересующего исследователя гена, большими хромосомными перестройками или генами-репортерами развития (Wijshake et al., 2014).

Нужно отметить, что свойства линий ЭС клеток, полученных в разных лабораториях, индивидуальны. Основные параметры, по которым оценивают потенциал линий клеток, следующие: способность давать вклад в половые клетки при получении химерных животных; стабильность хромосомного состава при длительном культивировании *in vitro*; условия культивирования (питающие клетки (фидер)), компоненты среды для культивирования). Успех эксперимента по получению трансгенной линии мышей во многом зависит именно от свойств модифицируемых ЭС клеток (Kraus et al., 2010). Помимо линий ЭС клеток для получения химерных мышей необходима технологическая база, обеспечивающая возможность проведения инъекции ЭС клеток в бластоцисты, пересадку бластоцист реципиентным самкам и другие вспомогательные операции. Процедура создания химерных мышей требует тщательного планирования и координации, так как инъекцию ЭС клеток в бластоцисту необходимо проводить на определенной стадии эмбрионального развития (Longenecker, Kulkarni, 2009). В данной работе мы исследовали потенциал новой линии ЭС клеток, DGES1, полученной в лаборатории генетики развития ИЦиГ СО РАН. Использование линии DGES1 в сочетании со специфическими генотипами реципиентных бластоцист и приемных матерей привело к эффективному получению фертильных химерных мышей.

## Материалы и методы

**Культивирование клеток.** Линию ЭС клеток DGES1 получили из 3.5D бластоцисты мышей *Mus musculus* линии 129S2/SvPasCrl (ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН) по следующему протоколу (Brüja et al., 2006). Число хромосом линии DGES1 составляло  $2n = 40$ , XY. Дальнейшее культивирование проводили в среде для ЭС клеток на инактивированных митомицином С эмбриональных фибробластах мыши (фидере) на пластике, покрытом 0.1 % желатином. Для пересева ЭС клеток использовали

0.05 % трипсин-ЭДТА. Среда для ЭС клеток включала DMEM с 4.6 г/мл глюкозы (Thermo Fisher Scientific, США), 7.5 % FBS для ЭС клеток (Thermo Fisher Scientific, США), 7.5 % KSR (Thermo Fisher Scientific, США), 1X GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, США), 1X NEAA (Thermo Fisher Scientific, США), 1X пенициллин-стрептомицин (Thermo Fisher Scientific, США) и 1000 ед./мл LIF (PolyGene, США). Для инъекций в бластоцисту клетки культивировали без фидера на желатине, при этом в среду дополнительно добавляли 2i ингибиторы: 1 мкМ PD0325901 (Sigma-Aldrich, США) и 3 мкМ CHIR99021 (Sigma-Aldrich, США) (Gertsenstein et al., 2010). Культуры клеток содержались при 37 °С в 5 % CO<sub>2</sub> инкубаторе. Клетки пассировали каждые два дня. В данном исследовании для микроинъекции в бластоцисты использовали клетки DGES1 на 34-м пассаже.

**Животные и условия содержания.** Исследование выполнено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010). Использовали самцов инбредной линии мышей C57BL/6J, самок гибридов B6D2F1, полученных при скрещивании самок линии C57BL/6J и самцов DBA/2JRCcHsd, а также самок и самцов аутбредной линии CD-1. Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках (Optimice, США), самцов по одному, а самок по пять в клетке при температуре 24 °С, фотопериоде 14С:10Т, влажности 40–50 % и свободном доступе к воде и корму. Для кормления использовали брикетированный корм SNIFF (Германия), деионизированную воду обогащенную солями в соответствии с требованиями к воде, используемой для поения SPF-мышей. Подстилочным материалом служили обеспыленная березовая крошка (Альбион, Новосибирск). Все подопытные животные были свободны от видоспецифических патогенов (specific pathogen free – SPF).

**Получение вазэктомированных самцов.** Процедуру вазэктомии проводили не менее чем за две недели до начала эксперимента. Самцов наркотизировали внутрибрюшинным последовательным введением препаратов Домитор (15 мкг/100 г массы тела) и Золетил (3 мг/100 г массы тела). После наркотизации самцов помещали на подогреваемый столик, обрабатывали операционное поле 70 % этиловым спиртом. Семьявыносящие протоки отделяли от сопряженных тканей и пережигали пинцетом, раскаленным на спиртовой горелке, и закрывали надрезы наложением двух-трех швов.

**Получение бластоцист.** В качестве доноров бластоцист использовали самок мышей B6D2F1 в возрасте 8–12 нед. Для синхронизации эстрального цикла и получения большого числа бластоцист индуцировали суперовуляцию. За два часа до отключения света в комнате содержания животных самкам внутрибрюшинно вводили 7.5 у.е. гонадотропина из сыворотки жеребых кобыл (Фоллигон, MSD Animal Health, Нидерланды). Через 46–48 ч внутрибрюшинно вводили 7.5 у.е. хорионического гонадотропина человека (Хоруллон, MSD Animal Health, Нидерланды). Сразу после инъекции хорионического гонадотропина человека самок подсаживали по одной к фертильным самцам линии C57BL/6J. На следующее утро после подсадки к самцу у самок проверяли наличие

вагинальных пробок и при обнаружении таковых отсаживали мышей в отдельные клетки. День обнаружения вагинальной пробки считали 0.5 днем беременности. Блastoцисты вымывали из матки самок-доноров через три дня после обнаружения вагинальной пробки (срок беременности – 3.5 дня). У самок, подвергнутых кранио-цервикальной дислокации, извлекали матку и освобождали от жировой ткани. Каждый рог матки через апикальный надрез промывали подогретой до 37 °С эмбриональной средой M2 (Sigma-Aldrich, США). Собранные бластоцисты переносили в 50 мкл среды KSOM (CosmoBio, Япония), покрывали минеральным маслом (Sigma-Aldrich, США) и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор.

**Получение химер.** Микроинъекции проводили под инвертированным микроскопом Axio Observer (Carl Zeiss, Германия), оснащенным системой микроманипуляторов и микроинъекторов (Narishige, Япония) и охлаждающим столиком (+6 °С), соединенным с водяной помпой. Суспензию ЭС клеток (50–100 мкл) и 15–20 бластоцист вносили в инъекционную камеру, содержащую среду, используемую для культивирования ЭС клеток DGE51. ЭС клетки собирали в инъекционный капилляр (TransferTip, Eppendorf, Германия) и, удерживая бластоцисту холдинговой пипеткой, вводили в бластоцель 12–15 клеток (рис. 1).

Бластоцисты с инъекрованными ЭС клетками и не имеющие признаков лизиса клеток переносили в чашку со средой KSOM и инкубировали 1–2 ч в при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Псевдобеременным самкам (2.5-й день беременности) CD-1, покрытым вазэктомированными самцами линии CD-1, хирургическим путем трансплантировали 12–13 здоровых бластоцист в левый рог матки. Операции проводили под газовым наркозом (Aerrane, Baxter Healthcare Corp., США).

**ПЦР-анализ микросателлитов.** ДНК из хвостов мышей и из культур ЭС клеток выделяли лизированием в буфере (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 0.5 % SDS) с добавлением протеиназы К (конечная концентрация – 1 мкг/мл). Пробирки инкубировали при темпе-

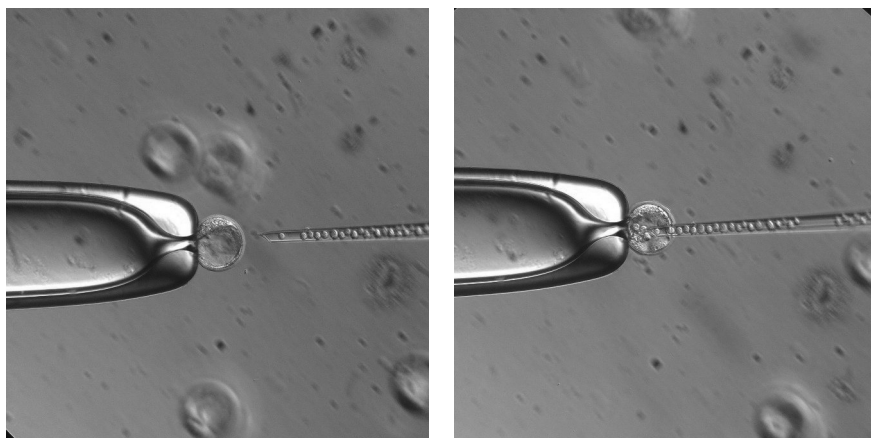


Рис. 1. Инъекция ЭС клеток DGE51 в бластоцисту.

ратуре 56 °С в течение 12–16 ч с последующей инактивацией протеиназы К (95 °С, 10 мин). Затем проводили очистку ДНК фенол-хлороформом. Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 1× AS буфер (67 mM Tris-HCl (pH 8.8 при 25 °С); 16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.01 % Tween 20), 0.2 mM каждого дезоксинуклеотида (дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ), 0.4 мкМ каждого из праймеров, 0.5 ед. Taq полимеразы, 100 нг геномной ДНК. ПЦР проводили на автоматическом амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Для ПЦР использовали следующие условия амплификации: 95 °С в течение 3 мин, затем 35 циклов амплификации (95 °С – 30 с, 58 °С – 30 с, 72 °С – 20 с), заключительная элонгация 72 °С – 3 мин. Продукты амплификации визуализировали с помощью электрофореза в 3 % агарозном геле. Использовали праймеры для амплификации микросателлита D6Mit102: 5'-CCATGTGGATATCTTCCCTTG-3' (F) и 5'-GTATACCCAGTTGTAATCTTGTGTG-3' (R) (Lamacchia et al., 2007).

## Результаты

**Получение химер и их потомков.** В ходе эксперимента в 136 бластоцист микроинъектировали ЭС клетки DGE51 (таблица). Бластоцисты, не имеющие признаков повреждений после микроинъекций, были подсажены 10 реципиентным самкам, все они успешно выносили беременность и родили мышат. Количество детенышей в пометах варьировало от двух до девяти. Всего родилось 66 мышат, 15 из них оказались химерными (рис. 2). Оценка химеризма по окраске шерсти выявила долю агути около 80 % у четырех мышей, от 30 до 80 % у восьми и менее 30 % у трех. Для проверки фертильности и способности химер передавать потомству геном ЭС клеток химер, достигших возраста половой зрелости, ссаживали с самками C57BL/6J. Из 15 химерных самцов 10 были фертильны. От каждого из них получили не менее четырех пометов. Всего было получено 270 потомков, среди которых 20.7 % имели окраску агути (вклад генома ЭС клеток DGE51). Мышата с окраской агути родились в пометах от четырех из десяти химерных самцов. В пометах, полученных от самок, покрытых двумя самцами с выраженностью химеризма ~90 %, встречаемость агути среди потомков составила 100 и 54.7 % соответственно. У потомков двух самцов с выраженностью химеризма 50 и 30 % доля носителей агути составила 8 и 2.6 % соответственно.

**ПЦР-анализ вклада ЭС клеток DGE51 в зародышевый путь.** Для того чтобы подтвердить вклад ЭС клеток в половые клетки химерных животных, мы использовали полиморфный микросателлит D6Mit102 (Lamacchia et al., 2007), позволяющий различать родительское происхождение хромосомы 6 в линиях мышей C57BL/6J и 129S2/SvPasCrl. Анализ показал, что потомки от скрещивания химерных самцов, имеющих вклад из ЭС клеток DGE51 (генотип 129S2/SvPasCrl), и самок мышей линии C57BL/6J несут два аллеля,



Эффективность получения химер и их потомков с помощью микроинъекции ЭС клеток DGE51 в бластоцисты

Успешно инъецированные бластоцисты	Реципиентные самки	Рожденные мыши	Рожденные химерные мыши	Рожденные химерные самцы	Фертильные химерные самцы
124 из 136 (91.2 %)	10	66 (53.3 %)	15 (22.7 %)	15 (100 %)	10 (66.7 %)



**Рис. 2.** Химерные самцы, полученные методом микроинъекции ЭС клеток DGE51 в бластоцисту.

Светло-коричневый цвет шерсти (агути) является индикатором вклада клеток DGE51 с доминантным аллелем агути в ткани химерного животного.

характерных для линий C57BL/6J и 129S2/SvPasCrl, так же, как и их химерные родители (рис. 3). В некоторых пометах от скрещивания химер на C57BL/6J рождались животные с черным цветом шерсти. Это объясняется тем, что у химерных животных сперматозоиды могут образовываться как из потомков клеток линии DGE51, так и из клеток бластоцисты-реципиента. Мы проводили ПЦР-анализ микросателлитов только для потомков с цветом

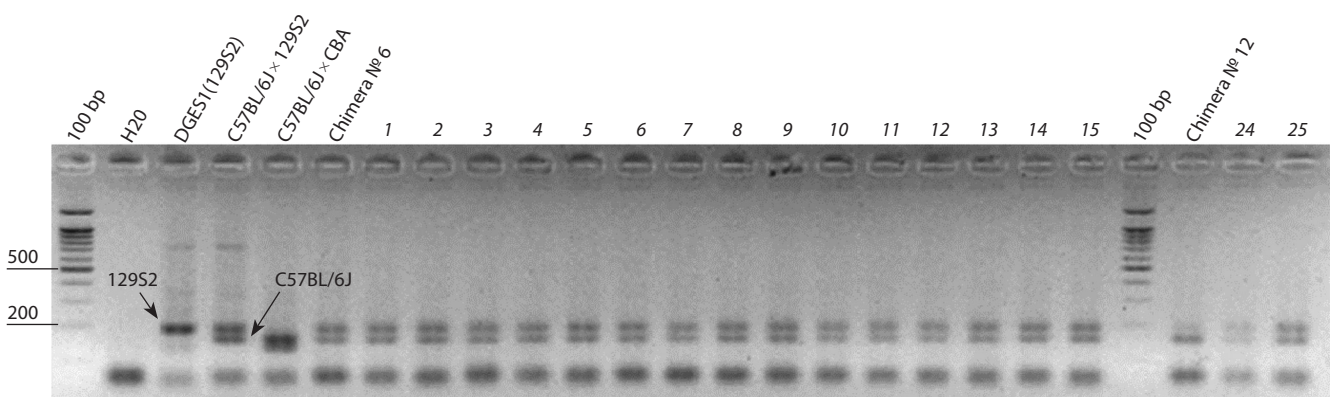
шерсти агути. Результаты ПЦР-анализа демонстрируют, что химерные самцы, родившиеся в результате инъекции клеток линии DGE51, действительно передают свой генетический материал потомкам (germline transmission). Таким образом, ЭС клетки линии DGE51 подходят для получения трансгенных линий мышей.

**Обсуждение**

Получение трансгенных мышей с помощью инъекции ЭС клеток в эмбрионы мыши крайне востребовано, когда необходимо внести сложные модификации генома. Была создана новая линия ЭС клеток мыши, DGE51, пригодная для эффективного получения трансгенных животных. Кроме того, мы показали, что линия ЭС клеток DGE51 сохраняет плюрипотентность и способность формировать ткани и органы химерных мышей, в том числе гонады, на 34-м пассаже культивирования. Это означает, что накопление пассажей при проведении генетических модификаций клеток этой линии не будет ограничивать ее потенциал. Таким образом, новые ЭС клетки линии DGE51 можно эффективно использовать для генетической модификации и получения трансгенных мышей.

Не менее важную роль для рождения большого числа фертильных химерных животных играет сочетание генотипов ЭС клеток, бластоцист и приемных матерей, поэтому постоянно ведутся поиски оптимальных комбинаций этих факторов (Seong et al., 2004; Fielder et al., 2012; Alcantar et al., 2016).

Для повышения эффективности при создании химер мы использовали 2i ингибиторы (Gertsenstein et al., 2010) и сочетание генотипов: ЭС клетки 129S2/SvPasCrl, бластоцисты B6D2F1 и реципиенты CD-1. Сравнение пока-



**Рис. 3.** Результаты ПЦР-анализа микросателлитов из образцов ЭС клеток DGE51 и хвостов потомков химерных самцов. Для ПЦР-анализа были выбраны только потомки с цветом шерсти агути.

100 bp – маркер длины; H20 – отрицательный контроль; DGE51(129S2) – ДНК ЭС клеток линии DGE51 (генотип 129S2/SvPasCrl); C57BL/6J x 129S2 и C57BL/6J x CBA – ДНК гибридов, содержащих аллель C57BL/6J; Chimera № 6 и Chimera № 12 – химерные самцы, полученные после инъекции ЭС клеток линии DGE51, а образцы под номерами 1–15 и 24–25 – потомки соответствующих химерных самцов от скрещивания с самками C57BL/6J.

зателей эффективности получения химер после инъекций ЭС клеток в бластоцисты, наблюдаемых в нашей работе, с результатами, представленными М. Ну с коллегами (2013), показало, что используемая нами комбинация H-2 гаплотипов ЭС клеток, бластоцист и приемных матерей повышает выход химер. В нашей работе доля химер, полученных из общего числа инъецированных бластоцист, составила 12.1 %, из них химерных самцов было 100 %, эти показатели превышают результативность получения химер 7 и 66.7 % соответственно, достигнутую в одной из последних работ (Ну et al., 2013). Наблюдаемое увеличение выхода химер может быть обусловлено иммуногенетическими различиями по главному локусу гистосовместимости (H-2) ЭС клеток, бластоцист и приемной матери. Показано, что особенности иммуногенетических взаимоотношений мать–плод, складывающихся на стадии формирования бластоцисты, оказывают существенное влияние на эндокринное обеспечение беременности и, как следствие, на жизнеспособность эмбрионов в периоды доимплантационного и постимплантационного развития (Gerlinskaya, Evsikov, 2001). Это обстоятельство может объяснять меньший выход химер (Ну et al., 2013) тем, что в данной работе для микроинъекций ЭС клеток использовали бластоцисты аутбредных самок линии CD-1 и в качестве реципиентов – самок этой же CD-1 линии. Наш подход отличался тем, что для микроинъекций ЭС клеток применялись гибридные бластоцисты B6D2F1, несущие H-2<sup>d</sup> и H-2<sup>b</sup> локусы, которые подсаживали аутбредным самкам CD-1. Проблеме влияния комбинации H-2 гаплотипов химерных бластоцист и организма приемной матери на выживаемость химер в организме приемной матери и жизнеспособность не уделяется должного внимания, хотя Р. Двогак с коллегами (1995) показали, что определенные комбинации H-2 химерных бластоцист и приемных матерей оказывают существенное влияние на успешность имплантации. Наши результаты, в свою очередь, указывают на влияние комбинации H-2 гаплотипа химерных бластоцист и приемной матери на выживаемость в период беременности и фертильную способность взрослых химерных самцов. Таким образом, сочетание новой линии ЭС клеток DGES1 и комбинации H-2 гаплотипов бластоцист, используемых для инъекций ЭС клеток и приемных матерей, позволяет создавать новые трансгенные линии мышей с высокой эффективностью.

### Благодарности

Экспериментальная часть исследования и анализ результатов выполнены при поддержке Российского научного фонда – проект № 16-14-00095. Приобретение лабора-

торных животных и использование инструментальных ресурсов было обеспечено средствами государственного задания по проекту № 0324-2015-0004.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

- Alcantar T.M., Wiler R., Rairdan X.Y. Comparison of BALB/c and B6-albino mouse strain blastocysts as hosts for the injection of C57BL/6/N-derived C2 embryonic stem cells. *Transgenic Res.* 2016;25(4):527-531. DOI 10.1007/s11248-016-9937-5.
- Bryja V., Bonilla S., Arenas E. Derivation of mouse embryonic stem cells. *Nat. Protoc.* 2006;1(4):2082-2087. DOI 10.1038/nprot.2006.355.
- Dvorak P., Yoshiki A., Dvorakova D., Flechon J.E., Kusakabe M. Cell mixing during the early development of mouse aggregation chimera. *Int. J. Dev. Biol.* 1995;39(4):645-652.
- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292(5819):154-156.
- Fielder T.J., Yi C.S., Masumi J., Waymire K.G., Chen H.W., Wang S., Shi K.X., Wallace D.C., MacGregor G.R. Comparison of male chimeric mice generated from microinjection of JM8.N4 embryonic stem cells into C57BL/6J and C57BL/6NTac blastocysts. *Transgenic Res.* 2012;21(6):1149-1158. DOI 10.1007/s11248-012-9605-3.
- Gerlinskaya L.A., Evsikov V.I. Influence of genetic dissimilarity of mother and fetus on progesterone concentrations in pregnant mice and adaptive features of offspring. *Reproduction.* 2001;121(3):409-417.
- Gertsenstein M., Nutter L.M., Reid T., Pereira M., Stanford W.L., Rosant J., Nagy A. Efficient generation of germ line transmitting chimeras from C57BL/6N ES cells by aggregation with outbred host embryos. *PLoS ONE.* 2010;5(6):e11260. DOI 10.1371/journal.pone.0011260.
- Hu M., Wei H., Zhang J., Bai Y., Gao F., Li L., Zhang S. Efficient production of chimeric mice from embryonic stem cells injected into 4- to 8-cell and blastocyst embryos. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2013;4(1):12. DOI 10.1186/2049-1891-4-12.
- Kraus P., Leong G., Tan V., Xing X., Goh J.W., Yap S.P., Lufkin T. A more cost effective and rapid high percentage germ-line transmitting chimeric mouse generation procedure via microinjection of 2-cell, 4-cell, and 8-cell embryos with ES and iPS cells. *Genesis.* 2010;48(6):394-399. DOI 10.1002/dvg.20627.
- Lamacchia C., Palmer G., Gabay C. Discrimination of C57BL/6J Rj and 129S2/SvPasCrl inbred mouse strains by use of simple sequence length polymorphisms. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2007;46(2):21-24.
- Longenecker G., Kulkarni A.B. Generation of gene knockout mice by ES cell microinjection. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 2009;19(14):1-36. DOI 10.1002/0471143030.cb1914s44.
- Seong E., Saunders T.L., Stewart C.L., Burmeister M. To knockout in 129 or in C57BL/6: that is the question. *Trends Genet.* 2004;20(2):59-62. DOI 10.1016/j.tig.2003.12.006.
- Wijshake T., Baker D.J., van de Sluis B. Endonucleases: new tools to edit the mouse genome. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014;1842(10):1942-1950. DOI 10.1016/j.bbadis.2014.04.020.