

# Влияние замораживания на сохранность культур клеток, полученных из эмбрионов мышей, несущих ген улучшенного зеленого флуоресцирующего белка

И.В. САВИНЦЕВА, А.А. СМОРНОВ, Н.Ю. САХАРОВА, Б.К. ГАВРИЛЮК

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пушкино*

## Freezing Effect on Integrity of Cell Cultures, Derived from Murine Embryos with Enhanced Green Fluorescent Protein Gene

I.V. SAVINTSEVA, A.A. SMIRNOV, N.YU. SAKHAROVA, B.K. GAVRILYUK

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

Клетки животных, содержащих в геноме трансген улучшенного зеленого флуоресцирующего белка (EGFP), являются перспективным материалом для получения клеточных и тканевых культур. EGFP – клеточный маркер, который позволяет длительно наблюдать за конкретными клетками при культивировании. Для серийных экспериментов клетки желательнее сохранять в криобанке. В связи с этим необходимо исследовать влияние низких температур на состояние EGFP и способность клеток, перенесших процедуры замораживания-размораживания, и экспрессировать этот белок. Мы изучали экспрессию EGFP в эмбриональных клетках после их замораживания по стандартной методике и хранения при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ .

В первой серии экспериментов использовали культуру клеток, полученных из кожно-мышечной ткани 14-дневных эмбрионов гемизиготных самок линии C57BL/6-Tgn(АСТbEGFP)10sb-J после их скрещивания с самцами исходной линии C57BL/6, не несущими гена EGFP (–/–). Эмбриональные фибробластоподобные клетки, прошедшие 2-3 пассажа, помещали в криобирки объемом 1,8 мл. Замораживание проводили в специальной камере для криоконсервации до  $-40\dots-50^{\circ}\text{C}$ , затем объекты переносили в сосуд Дьюара. Образцы хранили в жидком азоте от 24 часов до 10 месяцев. После оттаивания жизнеспособность клеток оценивали под микроскопом по состоянию их морфологической целостности, степени адгезии и расплывания, а также по пролиферативной активности. Показано, что хранение в жидком азоте не отражалось на способности мышечных фибробластоподобных клеток экспрессировать EGFP. Интенсивно светящиеся клетки были характерны для культур как непосредственно после оттаивания, так и после нескольких пассажей при дальнейшем культивировании. Полученные после размораживания клетки могли быть использованы в различных экспериментах вплоть до 9-10 пассажа.

Во второй серии проводили замораживание 2-клеточных эмбрионов, полученных от самок –/EGFP после спаривания с самцами –/–. Такие эмбрионы содержат EGFP, синтезированный ещё в ооцитах гемизиготной самки. Экспрессия же собственного гена EGFP начинается на стадии 8 бластомеров во время компактизации. Таким образом, в этих опытах мы изучали действие криоконсервации на белок материнского происхождения. После размораживания в 2-клеточных зародышах не было обнаружено свечения EGFP, что, по-видимому, свидетельствует о его денатурации.

Сравнение этих данных, которые носят предварительный характер, с данными, полученными в опытах по замораживанию клеток 14-дневных эмбрионов, показывает, что материнский “зеленый” белок, содержащийся в клетках ранних эмбрионов, может быть менее устойчивым в условиях криоконсервации, чем белок, экспрессированный на собственных матрицах.

Animal cells, having transgene of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in genome, are the perspective material to obtain cell and tissue cultures. EGFP is a cell marker, enabling a long-term observation for particular cells during culturing. For experimental sessions cells are advisable to be stored in cryobank. Due to this fact of necessary is to investigate the way of low temperature influence on EGFP state and the capability of cells, underwent the freeze-thawing procedure, to express this protein. We have studied the EGFP expression in embryonic cells after their freezing according to the standard technique and storage at  $-196^{\circ}\text{C}$ .

In the first experimental session we have used the cell culture, derived from skin-muscle tissue of 14 days' embryos of C57BL/6-Tgn(АСТbEGFP)10sb-J hemizygous females after their crossing with males of C57BL/6 initial line without EGFP gene (–/–). Embryonic fibroblast-like cells, underwent 2-3 passages, were placed into 1.8 ml cryovials. Freezing was carried-out in a special chamber for cryopreservation down to  $-40\dots-50^{\circ}\text{C}$  with following object transfer into Dewar vessel. Samples were stored in liquid nitrogen from 24 hrs to 10 months. After thawing we have microscopically assessed the cell viability by the state of morphological integrity, adhesion and flattening degrees, proliferative activity as well. Storage in liquid nitrogen was shown as not reflecting on the capability of murine fibroblast-like cells to express EGFP. Cells with an intensive luminescence were typical for cultures both right after thawing and after some passages during following culturing. Cells, procured after freeze-thawing might be used in different experiments up to 9-10 passages.

The 2-cell embryos, procured in females –/EGFP after coupling with males –/–, were frozen in the second session. Such embryos contain EGFP, synthesized even in oocytes of hemizygous female. Expression of the own EGFP gene begins at 8 blastomeres' stage during compactisation. Thus, in these experiments we have studied the cryopreservation effect on protein of maternal origin. No EGFP fluorescence was revealed in 2-cell embryos after thawed, that apparently testified to its denaturation.

The comparison of these data of preliminary character with those, obtained in experiments on freezing cells of 14 days' embryos demonstrates the mother “green” protein, containing in cells of early embryos, as less resistant under cryopreservation condition, than the protein, expressed on the own matrixes.