

**Всероссийский научно-исследовательский институт
Физиологии, Биохимии и Питания животных – филиал
Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «ФНЦ животноводства – ВИЖ имени Л.К. Эрнста»**

**ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЭМБРИОНОВ МЫШИ ПРИ
МИКРОИНЪЕКЦИИ В ПРОНУКЛЕУСЫ ЗИГОТ
ПЛАЗМИД, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ
КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9, И
ДНК-МАТРИЦЫ ДЛЯ ГОМОЛОГИЧНОЙ
РЕПАРАЦИИ**

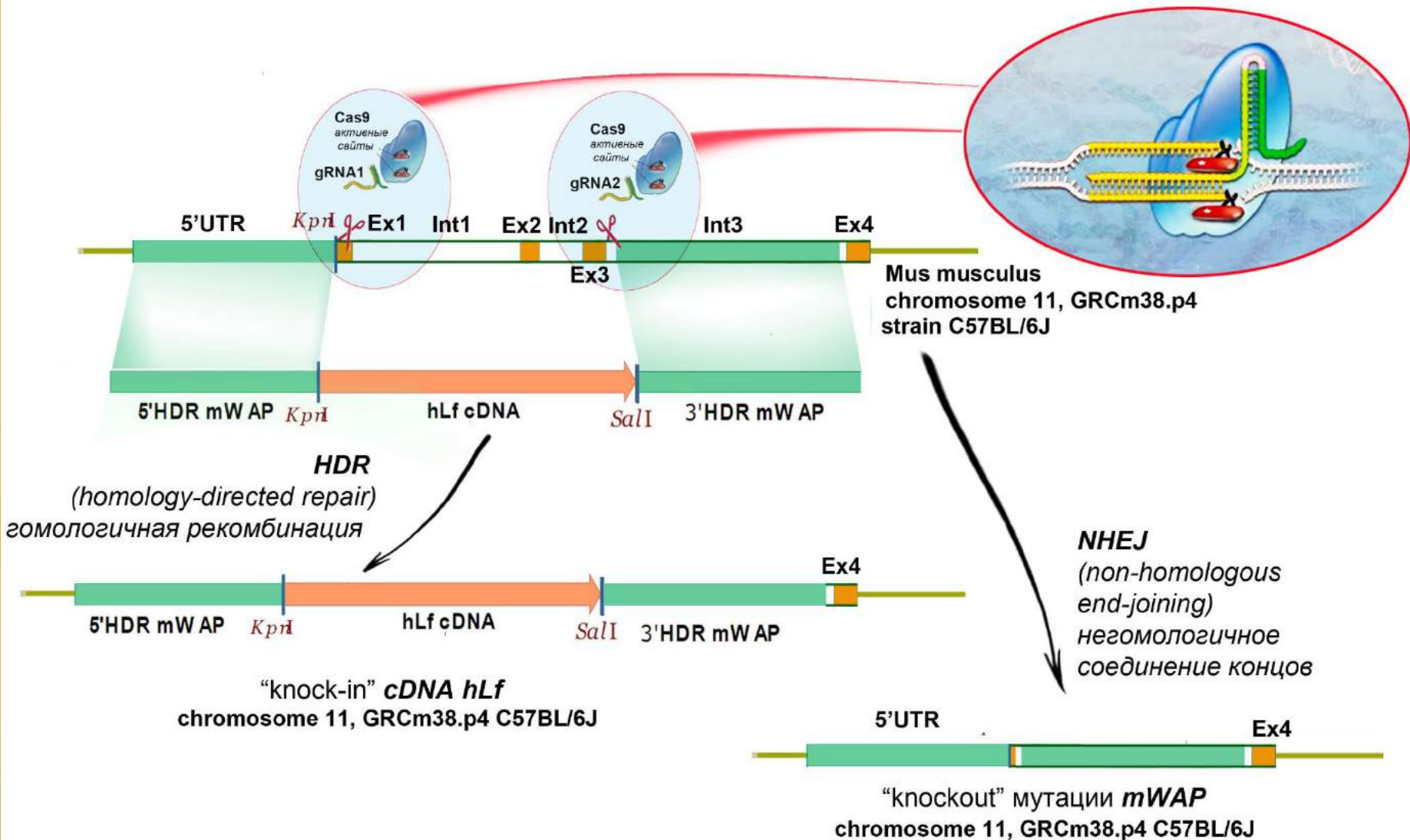
Кутьин И.В., Белова Н.В., Максименко С.В., Трубицина Т.П.

E-mail: Kurookami@mail.ru

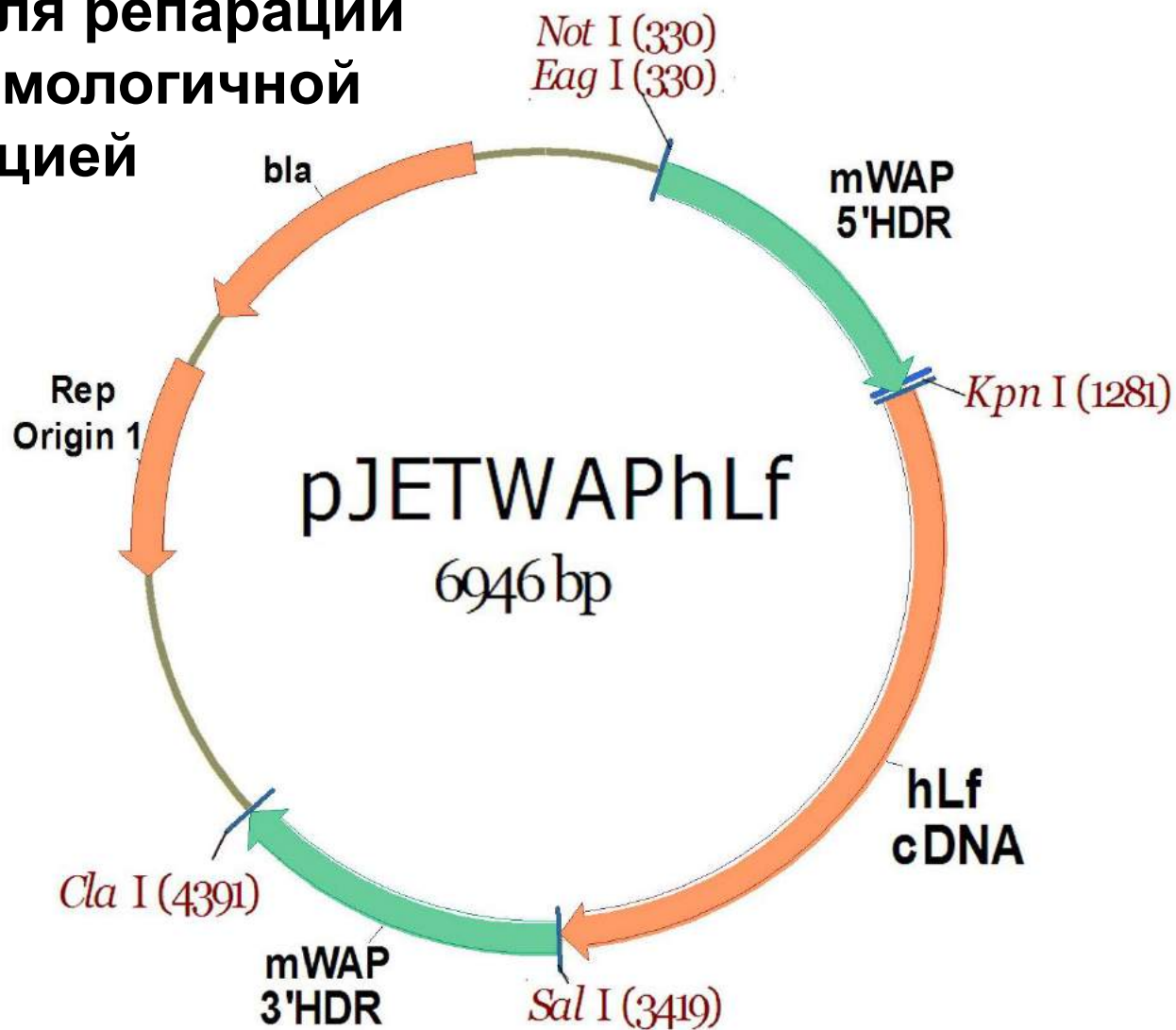
ЦЕЛЬ РАБОТЫ

- Изучение способности зигот к развитию до стадии бластоцисты при микроинъекции в пронуклеусы плазмид, экспрессирующих компоненты системы CRISPR/cas9, и ДНК-матрицы для гомологичной рекомбинации
- Определение оптимальной суммарной концентрации ДНК и ее влияние на развитие зигот
- Оценка влияния плазмидной формы компонентов CRISPR/Cas9 при микроинъектировании на дальнейшее развитие зигот *in vitro*

Схема получения нокаутных по *mWAP* и трансгенных по *чЛФ* мышей с использованием CRISPR/Cas9 технологии



**Схема плазмиды
pWAPhLf для репарации
делеции гомологичной
рекомбинацией**



Компоненты рабочих смесей для микроинъекций

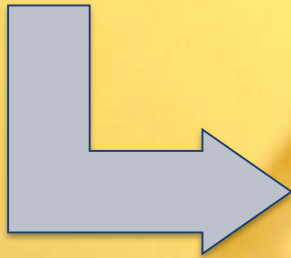
| № | Компоненты | Концентрация, нг/мкл | |
|---|------------|----------------------|----------|
| | | Смесь №1 | Смесь №2 |
| 1 | pWAPhLf** | 10 | 10 |
| 2 | pX330-g3* | 2,5 | 5 |
| 3 | pX330-g7* | 2,5 | 5 |
| | Итого ДНК | 15 | 20 |

*pX330-g3 и pX330-g7 -компоненты CRISPR/Cas9 системы на основе плазмиды pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene plasmid # 42230)

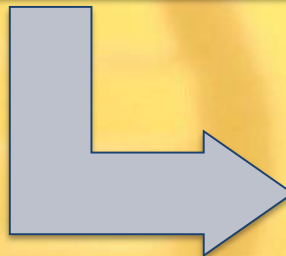
**Плаزمид-матрица для сайт-специфического гомологичного встраивания в локус гена кислого сывороточного белка.

Материалы и методы

*Гормональная стимуляция
(суперовуляция)*

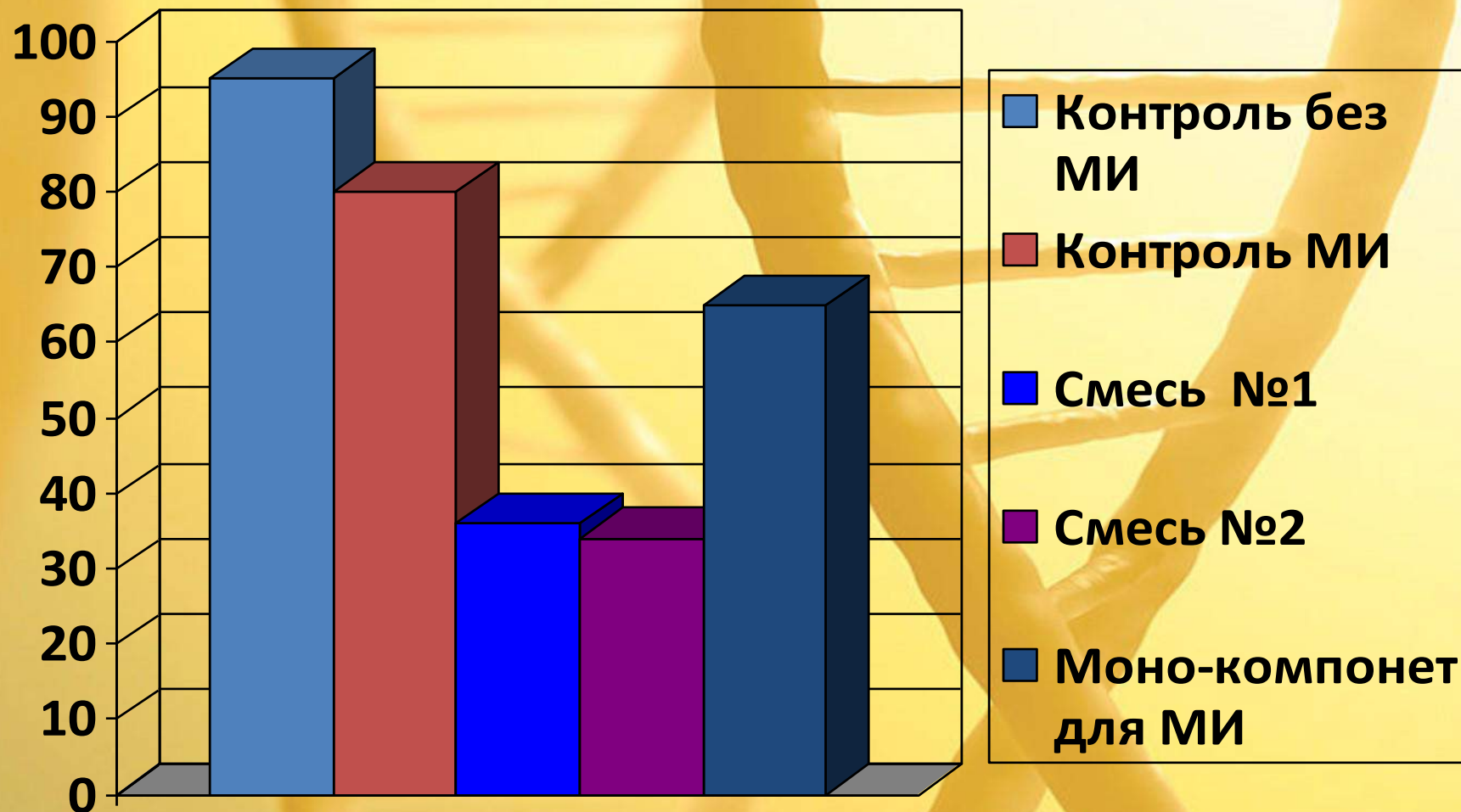


*Извлечение эмбрионов и
микроинъекция ГИК*



Культивирование
эмбрионов

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ



Дальнейшее направление исследования

- Зиготы, проколотые Смесью №1 и №2 , были трансплантированы самкам самкам-реципиентам.

Получены 18 живых животных и 3 мертвых.

- Использовать другие подготовленные смеси

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Снижения уровня выживаемости эмбрионов при использовании CRISPR/Cas9 системы и ее компонентов предположительно связано:

С токсичностью компонентов из-за их потенциальных off-target эффектов

С токсичностью Смесей из-за высокой суммарной концентрации ДНК