



Влияние микроинъекции компонентов CRISPR/Cas9 в плазмидной форме на развитие эмбрионов кролика при культивировании *in vitro*

Колоскова Е.М., Езерский В.А., Трубицина Т.П.

*Всероссийский научно-исследовательский
институт физиологии, биохимии и питания животных
– филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр
животноводства – ВИЖ имени академика Л. К.
Эрнста».*

Зачем нужны трансгенные животные?

- Модели заболеваний и патологий в биомедицинских исследованиях;
- Изучение функций специфических генов на уровне всего организма (*подавляющее большинство используемых моделей - генетически модифицированные грызуны*);
- Создание и тестирование новых лекарственных препаратов (*в том числе, получение человеческих моноклональных антител для использования в качестве терапевтических средств*);
- Получение биологически активных белков для профилактики и лечения заболеваний человека (*технологии производства таких белков в реакторах на основе клеток млекопитающих очень дорогостоящи: животные биореакторы – самовоспроизводящиеся системы для получения белков фармакологического назначения в крупных масштабах*);
- Источник органов для трансплантации;
- Решение продовольственной проблемы (*ускоренное создание высокопродуктивных животных*);
- С целью эстетического удовольствия



Получение биологически активных белков человека **в молоке** трансгенных животных – актуальное направление современной биотехнологии:

- молоко, как сырье для выделения рекомбинантного белка;
- молоко с измененным составом - самостоятельный продукт с новыми характеристиками.

Кролики, не только лабораторные, но и домашние, сельскохозяйственные животные, занимают особенную нишу в исследованиях.

Трансгенные кролики перспективны в качестве биореакторов для продукции биологически активных белков с молоком или кровью, востребованы в биомедицине как биомодели заболеваний человека.

Трансгенный организм — живой организм, в геном которого искусственно введен ген, который не может быть приобретен при естественном скрещивании (*под трансгенными организмами подразумевались любые организмы, в геном которых были при помощи методов геной инженерии введены отсутствующие там гены*).

Классические технологии получения трансгенных животных:

- **пронуклеарная микроинъекция (МИ)**,
- использование вирусных конструкций,
- использование эмбриональных стволовых клеток (ESC),
- метод переноса ядер соматических клеток (SCNT)

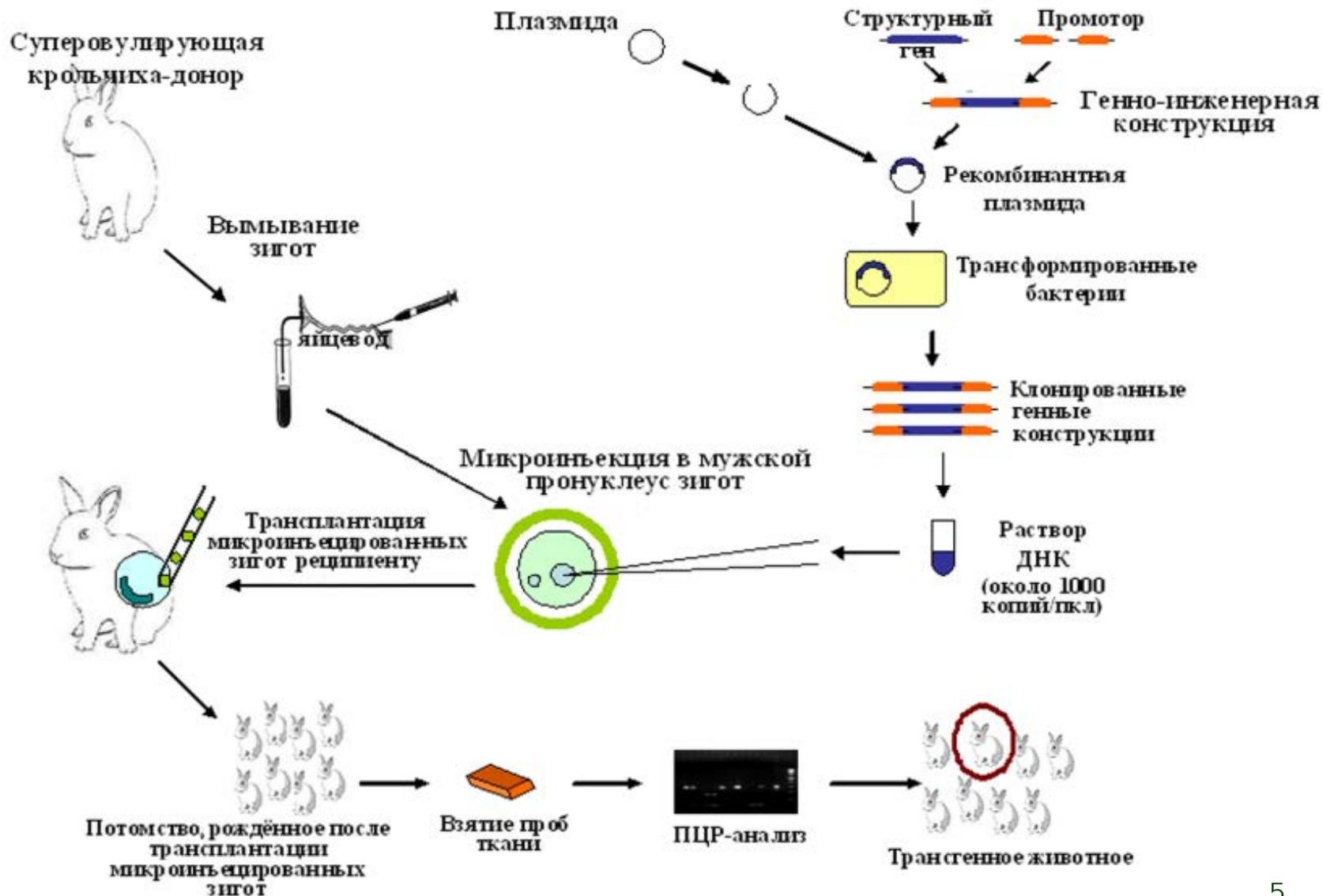
ПЛЮСЫ метода пронуклеарной микроинъекции рекомбинантной ДНК:

- ✓ возможность регулировать количество вводимой ДНК
- ✓ точность «доставки» (как правило – в мужской пронуклеус)
- ✓ можно работать с различными животными

МИНУСЫ метода

- процесс микроинъекции может привести к гибели эмбриона
- одна инъекция – одна клетка
- **трансген встраивается случайным образом**
- требует высокой квалификации
- **относительно низкий уровень трансформации**

Технология получения трансгенных кроликов методом микроинъекции ДНК в пронуклеус зиготы



**Вымывание
зигот**



**Введение раствора с генной
конструкцией в пронуклеус зиготы.**



В лаборатории клеточной и геной инженерии ВНИИФБиП животных на протяжении нескольких лет проводились работы по получению трансгенных кроликов-продуцентов биологически активных белков, в частности, лактоферрина человека (чЛФ) и гранулоцит-колониестимулирующего фактора человека (чГ-КСФ) в составе молока.

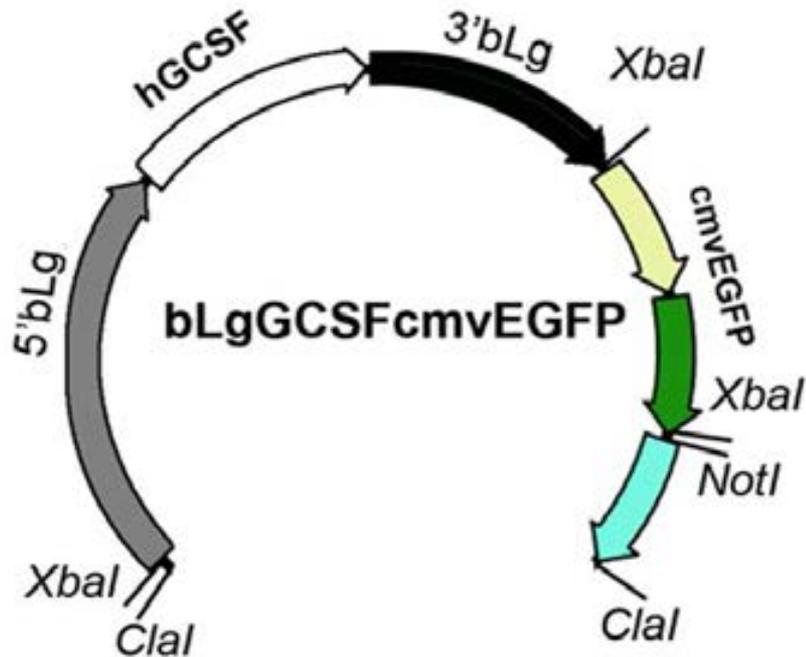


Были созданы генетические конструкции, содержащие кДНК чЛФ под регуляторными последовательностями генов белков молока КРС: альфа-S1-казеина и бета-лактоглобулина. С использованием конструкции, содержащей альфа-S1-казеиновый промотор и терминирующую последовательность полиА гормона роста быка, методом микроинъекции зигот была получена крольчиха, ставшая основательницей линии трансгенных кроликов с геном чЛФ

Получение трансгенных кроликов с геном GCSF и геном репортерного белка EGFP.

Для точного мечения определенных молекул и клеток часто используют экспрессию генов цветных флуоресцентных белков под контролем специфического промотора, в частности, как показатель эффективности трансгенеза.

Микроинъекция линейной генно-инженерной конструкции в пронуклеус зиготы

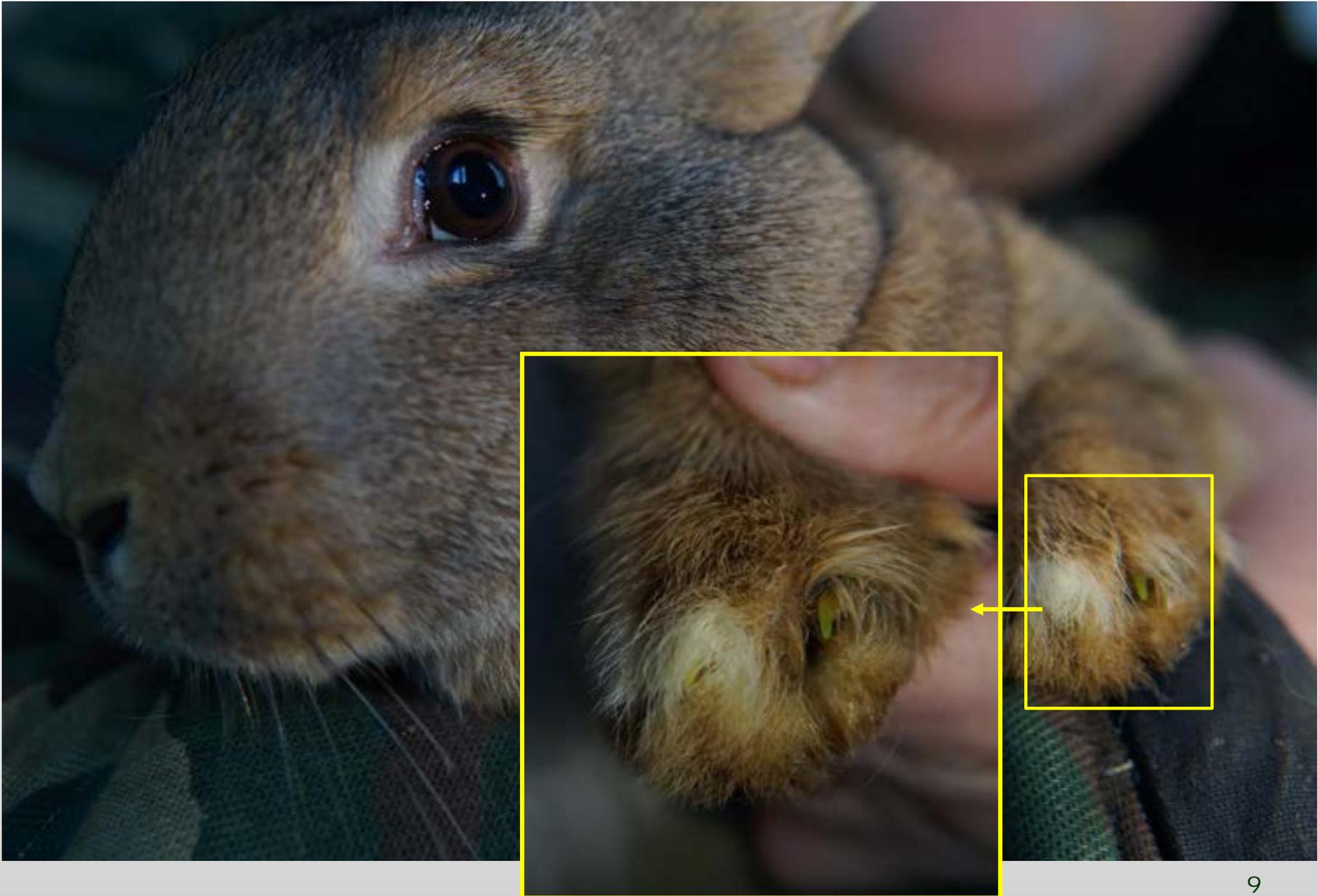


Отбор и трансплантация трансгенных эмбрионов

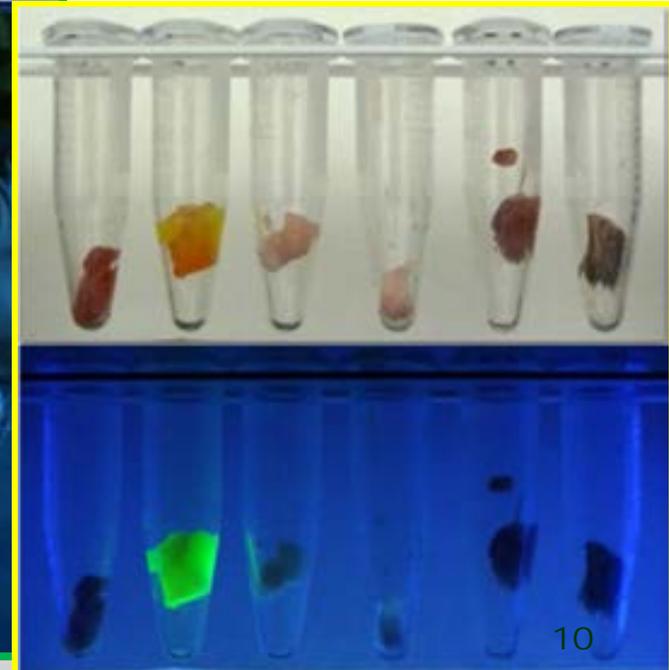


Трансгенное животное

Экспрессия зеленого флуоресцентного белка в органах и тканях трансгенных кроликов



Экспрессия зеленого флуоресцентного белка в органах и тканях трансгенных кроликов

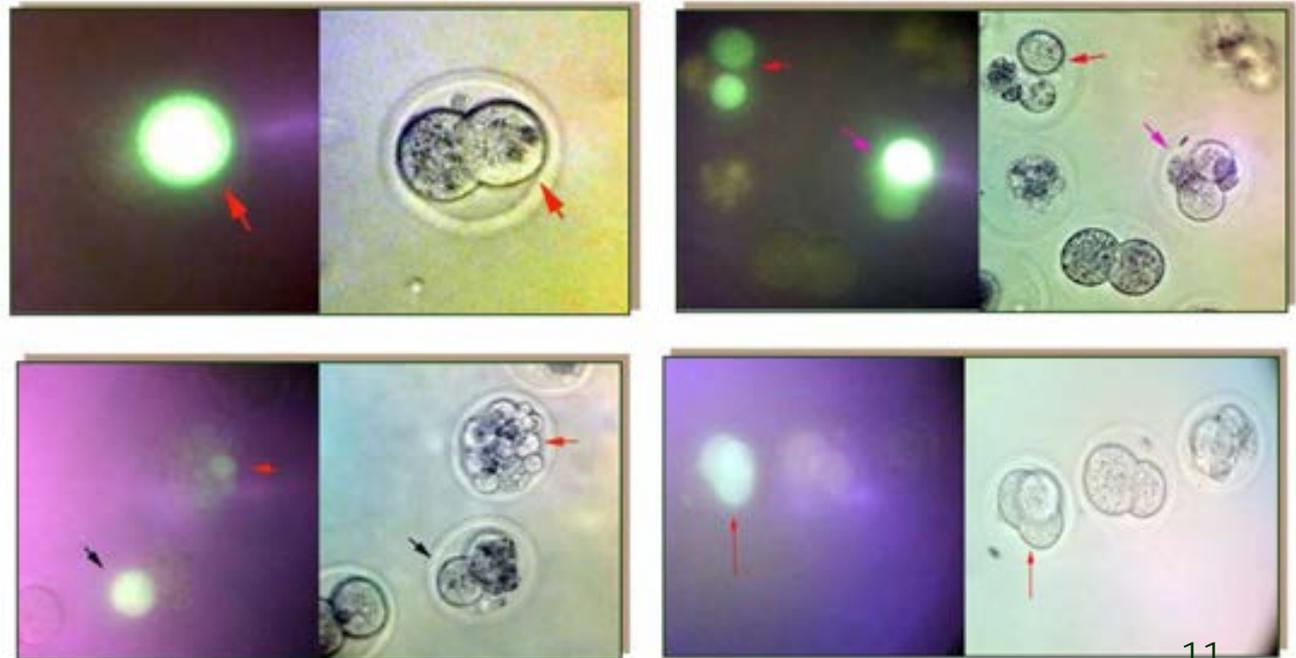


Развитие кроличьих зигот до стадии бластоцисты при микроинъекции конструкции aS1LfcmvEGFP*



* С этой конструкцией также была получена трансгенная F0-крольчиха, погибшая в возрасте 4 месяца

Слева – свечение эмбрионов при облучении 480 нм, справа – в видимом свете



С появлением методов геномного редактирования на основе новых эндонуклеазных технологий (ZFN, TALEN и **CRISPR/Cas9**) эффективность получения ГМ животных возросла, что сделало относительно простой метод микроинъектирования зигот приемлемым и для малоплодных животных. По сравнению с классическим трансгенезом современные технологии дают возможность получения животных с расширенным диапазоном модификаций (сайт-специфической вставки конкретной геномной последовательности, нокаутом одного или нескольких целевых генов одновременно) в применении к оплодотворенным яйцеклеткам методом микроинъекции с очень высокой эффективностью.

Цель работы: в геноме кролика, как модельного животного, нокаутировать ген кислого сывороточного белка (*rbWAP*) и заменить его на ген зеленого флуоресцентного белка под цитомегаловирусным промотором.

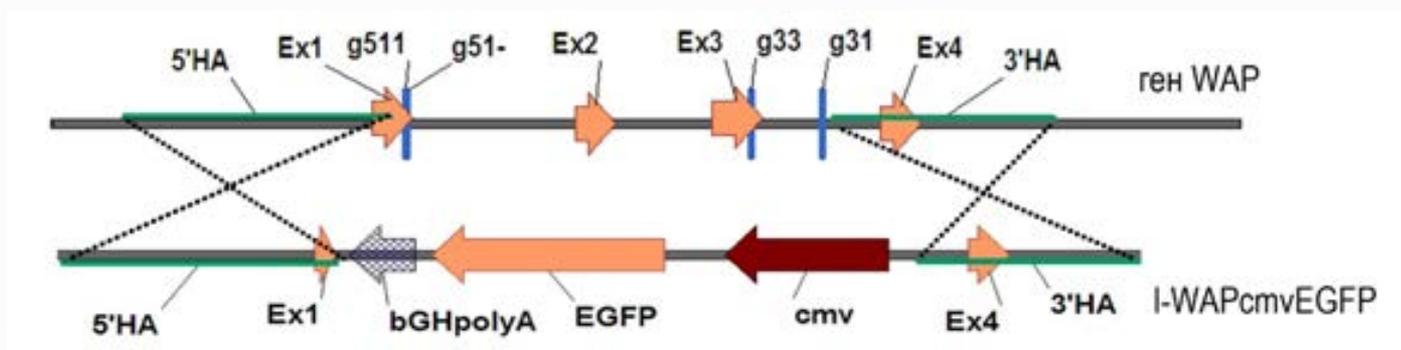


Схема гомологичной рекомбинации генной конструкции *WAPcmvEGFP* с геном *rbWAP*.
G511, g51-, g31, g33 – мишени нРНК; *5'HA* и *3'HA* - плечи гомологии.

На этапе генно-инженерных работ:

- ✓ Создана генетическая конструкция, содержащая ген GFP под CMV промотором, фланкированная фрагментами 5'- и 3'-регуляторных областей гена *rbWAP*, предназначенная для интеграции гомологичной рекомбинацией в локус **гена *WAP* кролика** при совместной микроинъекции с сайт-специфичными компонентами системы CRISPR/Cas9.
- ✓ На основе плазмиды pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene plasmid # 42230), предназначенной для экспрессии в клетках млекопитающих, нами были получены плазмиды pX330-511, -51-, -33 и -31, кодирующие эндонуклеазу Cas9 и направляющие РНК к соответствующим сайтам гена кислого сывороточного протеина кролика (*WAP*).

На этапе трансгенеза:

- ✓ у крольчих-доноров вызывали суперовуляцию по применяемой нами ранее схеме;
- ✓ извлечение зигот проводили хирургическим методом через 15,17-19 ч после введения хорионического гормона. Собранные зиготы после промывания в каплях манипуляционной среды переносили в свежеприготовленные капли той же среды под минеральным маслом.
- ✓ Микроинъекцию в мужской пронуклеус зиготы проводили в камере Фонбрюна на установке, включающей инвертированный микроскоп с оптикой Номарского (фирмы Nikon) и комплект манипуляторов и микроинъекторов (фирмы Narishiga).
- ✓ Для длительного культивирования зигот *in vitro* до стадии бластоцисты использовали среду Ham's F-10 с добавлением 10% ФТС («Eurobio», Франция). Культивирование проводили в пластиковых чашках Петри 40 мм в каплях среды объемом 40 мкл под легким минеральным маслом («Sigma» embryo tested) в газовой фазе, 5% CO₂ в воздухе, при 37°C.

Все работы были выполнены на базе ВНИИФБиП животных в рамках госзадания 2019 года по теме 0445-2019-0030.

Были подготовлены смеси для микроинъекций: комбинации плазмид-компонентов CRISPR/Cas9 в двух концентрациях, комбинация плазмид рХ330 с линейной двухцепочечной геной конструкцией и отдельно - геной конструкцией (таблица 1).

Было проверено влияние МИ в пронуклеус подготовленных смесей ДНК на развитие эмбрионов кролика калифорнийской породы при культивировании *in vitro* до стадии бластоцисты (около 96 часов).

Таблица 1 - Состав смесей для микроинъекций кроличьих зигот

№	Компоненты	Концентрация ДНК , нг/мкл			
		Смесь №1	Смесь №2	Смесь №3	Смесь №4
1	I-WAPcmvEGFP	-	-	10	10
2	рХ330-51	2,5	5	2,5	-
3	рХ330-511	2,5	5	2,5	-
4	рХ330-31	2,5	5	2,5	-
5	рХ330-33	2,5	5	2,5	-
	Итого:	10	20	20	10

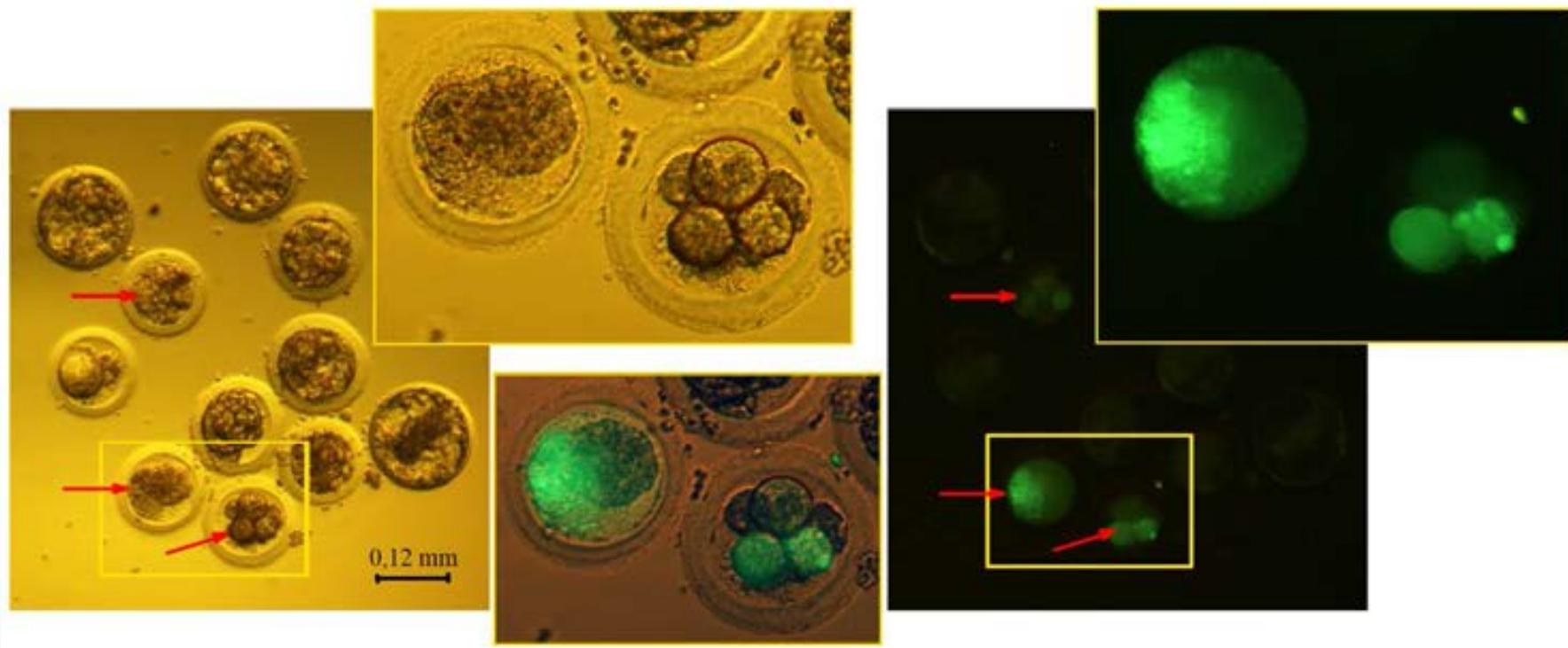
Эмбрионы, развившиеся до стадии бластоцисты-морулы отбирали и замораживали для последующего анализа возможных генных модификаций методом ПЦР.

Бластоцисты, развившиеся из зигот, микроинъецированных смесью, содержащей ГК (смеси №3, №4) визуально оценивали под люминесцентным микроскопом при освещении синим светом.

Развитие in vitro кроличьих эмбрионов, микроинъецированных разными комбинациями ДНК-компонентов

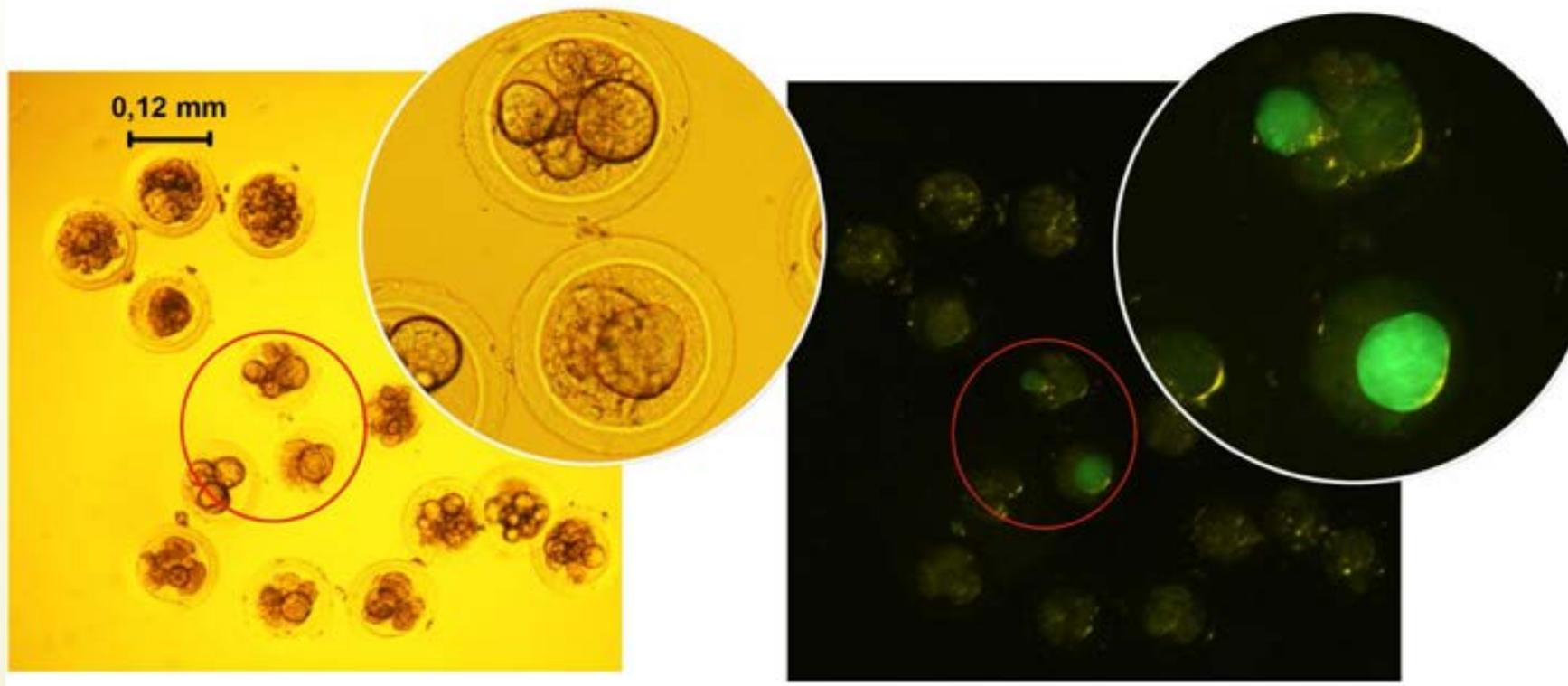
Группы / ДНК нг/мкл	Инъеци ровано зигот	Культиви ровано*	Развилось до стадии				Светились в УФ			
			2-16 клеток		Бластоцисты- морулы		2-16 клеток		Бластоцисты- морулы	
			п	%	п	%	п	%	п	%
Контроль, без МИ	-	70	2	3	67	96	-	-	-	-
Смесь №1 / 10	52	43	5	12	38	88	-	-	-	-
Смесь №2 / 20	33	32	5	16	27	84	-	-	-	-
Смесь №3 / 20	105	100	22	22	58	58	14	63	4	7
Смесь №4 / 10	137	133	45	34	83	62	24	53	15	18

*Общее время культивирования около 96 часов; %¹ - от количества культивированных зигот; %² – от количества развившихся до соответствующей стадии эмбрионов.

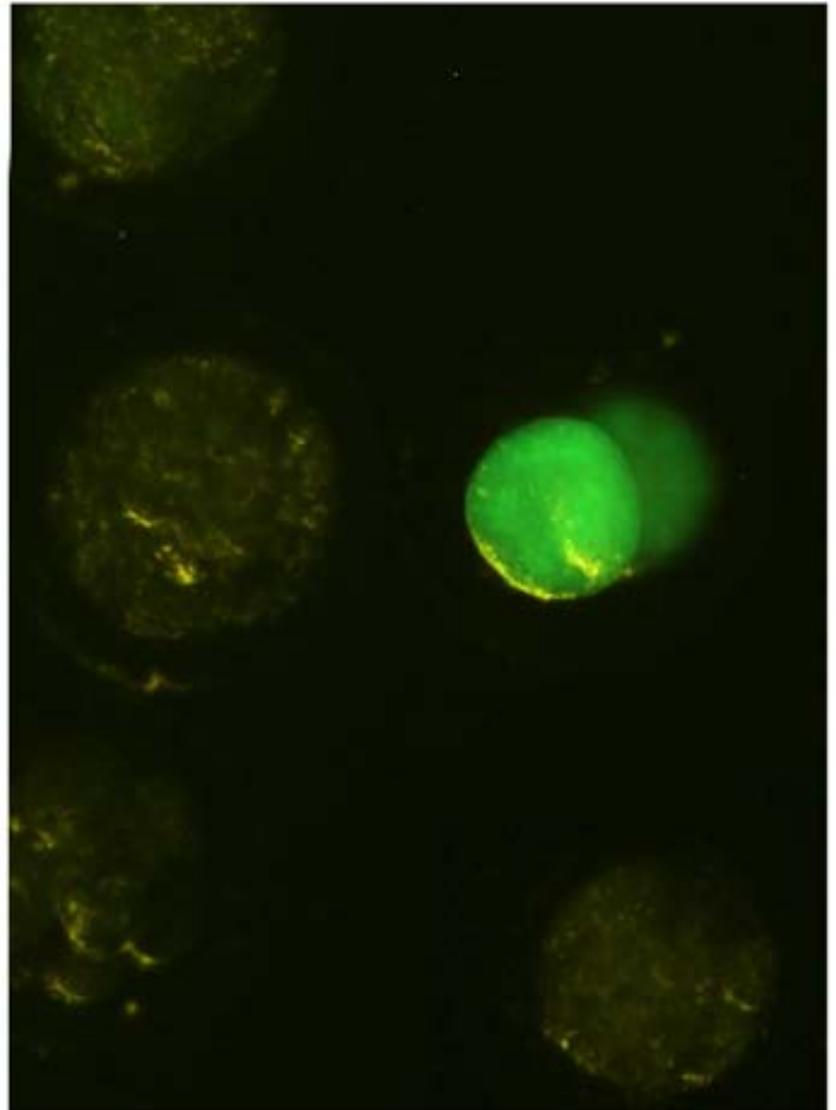
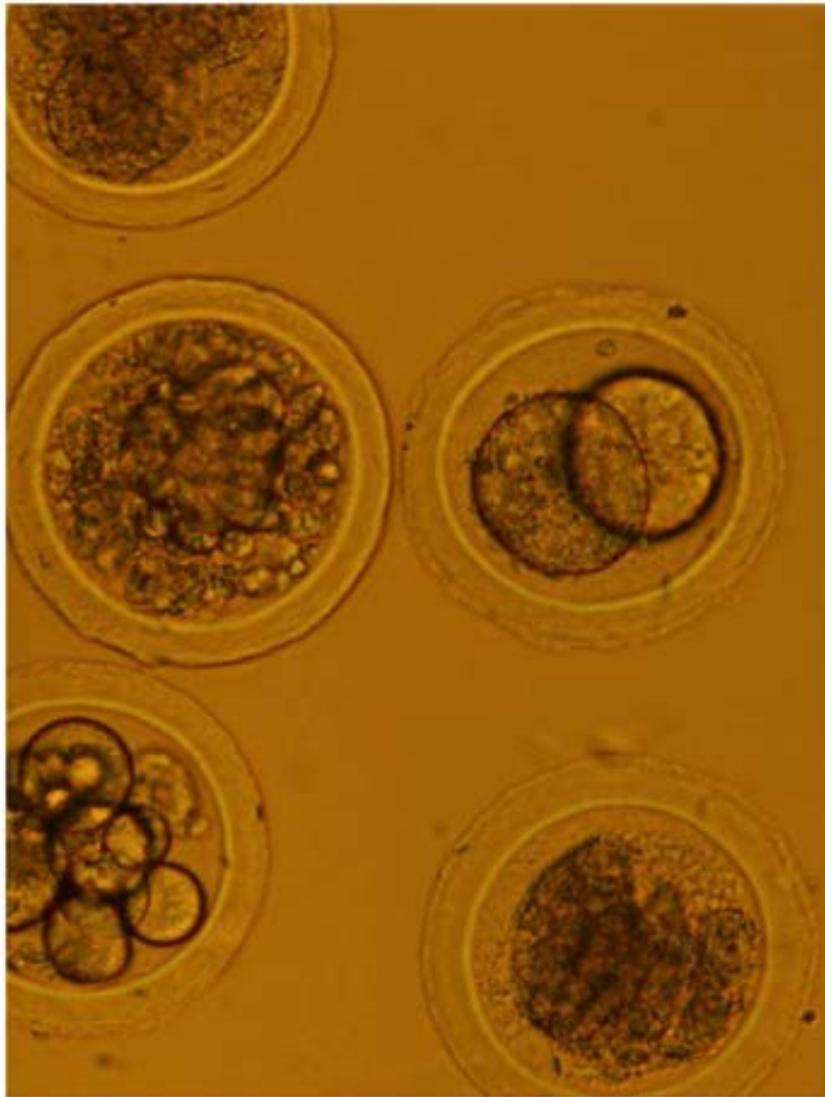


Эмбрионы кролика, культивированные 5 суток после микроинъекции в пронуклеус генной конструкции, содержащей плечи гомологии к гену WAP кролика и ген зеленого флуоресцентного белка (смесь №4).

Фотографии сделаны в видимом (слева) и в синем свете (справа). По центру – выделенный фрагмент в смешанном свете. Стрелками отмечены флуоресцирующие эмбрионы.



Эмбрионы кролика, культивированные 5 суток после микроинъекции в пронуклеус компонентов CRISPR/Cas9 системы – плазмид рХ330 и генной конструкции, содержащей плечи гомологии к гену WAP кролика и ген зеленого флуоресцентного белка, при использовании CRISPR/Cas9 технологии (Смесь №3). Фотографии сделаны в видимом (слева) и в синем свете (справа).



Было выявлено:

- смеси №1 и №2 (плазмиды pX330-511,-51-, -33 и -31, компоненты CRISPR/Cas9, подобранные к гену-мишени WAP) не оказывали существенного угнетения развития эмбрионов даже в концентрации 20 нг/мкл (*как правило, при использовании CRISPR/Cas9 в плазмидной форме придерживаются концентрации около 5 нг/мкл*). Возможно, это объясняется тем, что ген WAP не является необходимым для развития эмбриона, не принадлежит генам «домашнего хозяйства».
- МИ I-WAPcmvEGFP (смеси №3, №4) приводила к резкому снижению жизнеспособности эмбрионов, что скорее всего связано с суперэкспрессией зеленого флуоресцентного белка на 2-16 клеточной стадии развития.

Заключение. Вероятно, на раннем этапе развития, неинтегрированная в геном ГК, обладающая собственным сильным промотором, становится объектом транскрипции до ее лизиса эндонуклеазами. Даже в случае гомологичной рекомбинации ГК с геном WAP, суперэкспрессия GFP могла привести к гибели эмбрионов на ранней стадии. Добавление к ГК компонентов CRISPR/Cas9 (смесь №3) снижало выживаемость. Свечение GFP в поле зрения люминесцентного микроскопа наблюдали на каждой стадии развития эмбрионов: на ранних стадиях оно было интенсивнее, чем на более поздних стадиях развития.

- Chrenek P., Makarevich A.V. Analysis of transgenic rabbit vitrified embryos carrying EGFP gene // Slovak J. Anim. Sci. 2011. Vol.44. No.1. P.1-5.
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems // Science. 2013. Jan 3. 10.1126/science.1231143 PubMed 23287718
- Езерский В.А., Колоскова Е.М. Генетическая конструкция для замещения гена кислого сывороточного протеина кролика при использовании CRISPR/Cas9 метода. // Проблемы биологии продуктивных животных. 2019. №4. С.22-35.
- Honda A., Hirose M., Sankai T., Yasmin L., Yuzawa K., Honsho K., Izu H., Iguchi A., Ikawa M., Ogura A. Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of the tyrosinase gene using CRISPR/Cas9 // Exp. Anim. 2015. Vol.64. P. 31–37.



*Спасибо за
внимание!*