

DOI 10.33952/2542-0720-2020-5-9-10-131

УДК 575.224.46; 575.2.084

Колоскова Елена Михайловна, Езерский Вадим Аркадьевич, Трубицина Татьяна Петровна

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

Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; e-mail: heleko3@yandex.ru

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 (МИ) с очень высокой эффективностью. Для точного мечения определенных молекул и клеток часто используют экспрессию генов цветных флуоресцентных белков под контролем специфического промотора, в частности, как показатель эффективности трансгенеза [1]. На основе плазмиды pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (далее – pX330, Addgene plasmid # 42230), предназначенной для экспрессии в клетках млекопитающих [2], 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) [3].

Все работы были выполнены на базе ВНИИФБиП животных в рамках госзадания 2019 года по теме 0445-2019-0030. Генная конструкция (ГК) l-WAPcmvEGFP [3], созданная в рамках того же госзадания, включала в себя фрагмент cmvEGFP-bGHpolyA, фланкированный плечами гомологии к последовательностям гена WAP кролика (*Oryctolagus cuniculus*). Было проверено влияние МИ в пронуклеус зигот разных концентраций созданных нами плазмид без/с линейризованным фрагментом l-WAPcmvEGFP, и отдельно – ГК, на развитие эмбрионов кролика калифорнийской породы при культивировании *in vitro* до стадии бластоцисты (около 96 часов). МИ в мужской пронуклеус зиготы проводили в камере Фонбрюна на установке, включающей инвертированный микроскоп с оптикой Номарского (Nikon), комплект манипуляторов и микроинъекторов (Narishiga). Бластоцисты, развившиеся из зигот, МИ смесью, содержащей ГК (смеси №3, №4 - таблица 1), для определения ее интеграции в геном визуально оценивали под люминесцентным микроскопом при освещении синим светом (рисунок). Эмбрионы, развившиеся до стадии бластоцисты-морулы, отбирали и замораживали для последующего анализа возможных генных модификаций методом полимеразной цепной реакции на амплификаторе ДНК «Терцик» («ООО ДНК-Технология»).

Таблица 1 – Состав смесей для микроинъекций кроличьих зигот

№	Компоненты	Концентрация, нг/мкл			
		Смесь №1	Смесь №2	Смесь №3	Смесь №4
1	l-WAPcmvEGFP	-	-	10	10
2	pX330-51 ⁺	2,5	5	2,5	-
3	pX330-511	2,5	5	2,5	-
4	pX330-31	2,5	5	2,5	-
5	pX330-33	2,5	5	2,5	-
	Итого:	10	20	20	10

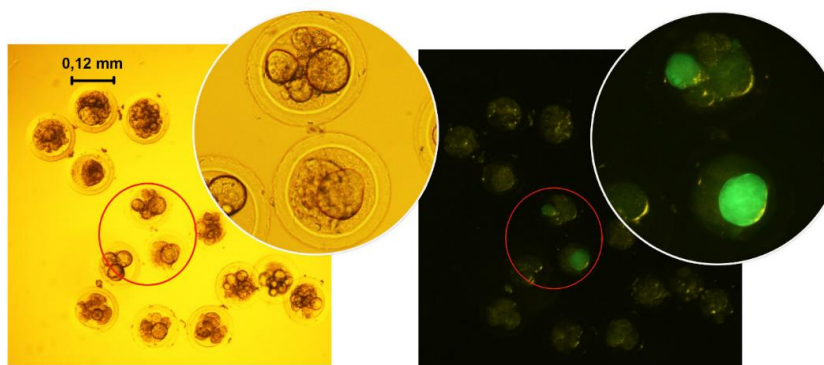


Рисунок – Эмбрионы кролика, культивированные *in vitro* на протяжении 5 суток после микроинъекции в пронуклеус смесью № 3

Примечание. Фотографии сделаны в видимом (слева) и в синем свете (справа). Несколько эмбрионов имеют зеленую флуоресценцию.

Была проведена оценка выживаемости эмбрионов, МИ различными комбинациями плазмид-компонентов CRISPR/Cas9 и/или линейной двухцепочечной ГК. Состав смесей для МИ кроличьих зигот представлен в таблице 1. Результаты культивирования представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Развитие *in vitro* кроличьих эмбрионов, микроинъекцированных разными комбинациями ДНК-компонентов

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

Примечание. *Общее время культивирования – около 96 часов.

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 [4]. Возможно, это объясняется тем, что ген WAP не является необходимым для развития эмбриона, не принадлежит генам «домашнего хозяйства». МИ 1-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.

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.

Литература

1. 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.
2. 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. DOI:10.1126/science.1231143 PubMed 23287718
3. 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.
4. 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.

UDC 575.224.46; 576.08

Koloskova E. M., Ezerskii V. A., Trubitshina T. P.

Effect of microinjection of CRISPR / Cas9 components in plasmid form on the development of rabbit embryos during *in vitro* culture

Summary. The survival rate of rabbit embryos microinjected by the plasmid form of CRISPR/Cas9 components specific to the sour whey protein gene was evaluated. At high concentrations of plasmid components, embryo survival decreased slightly, possibly because the WAP gene does not belong to the housekeeping genes. After microinjection of a genetic construct with a sequence of green fluorescent protein under a cytomegalovirus promoter, the embryo survival significantly decreased. This is most likely due to the superexpression of GFP at the 2-16 cell stage of development.

Keywords: microinjection, embryo, whey acidic protein, CRISPR/Cas9, EGFP, rabbit.

DOI 10.33952/2542-0720-2020-5-9-10-131-1

УДК 631.67

Кременской Владимир Иванович, Джапарова Айше Музафаровна Совершенствование внутрипочвенного и капельного орошения сельскохозяйственных культур

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»
e-mail: kv119497@rambler.ru

Разработка современных водосберегающих способов полива является важным условием в повышении продуктивности орошаемых сельскохозяйственных культур. Внутрипочвенное и капельное орошение являются разновидностями технологий, которые входят в состав микроорошения и локального увлажнения почвы. Цель исследований: провести анализ путей развития и совершенствования систем внутрипочвенного и капельного орошения в Крыму, выявить перспективы развития и эффективность данных способов полива.

Впервые изучение внутрипочвенного орошения (ВПО) в Крыму было организовано в 1934–1938 годах Корневым В. Г. на Сакском опорном пункте Крымской опытно-мелиоративной станции. Была построена открытая абсорбционная система подпочвенного орошения на площади 0,5 га. Начиная с 1952 г. наибольшее распространение получили трубчатые системы ВПО, увлажнители которой выполнялись из керамических и полиэтиленовых перфорированных трубок. Для увеличения контура увлажнения и уменьшения удельного впитывания может использоваться полиэтиленовый экран, уложенный сверху и снизу трубки [1].

В настоящее время в качестве увлажнителей используются: ленточные трубопроводы, микропористые шланги, трубки Agrodrip, поливные трубки с смонтированными капельницами, установленными на определенном расстоянии. Исследования по использованию поливных трубопроводов систем капельного орошения (КО) в качестве увлажнителей для ВПО проводились в степном регионе