

ВСЕРОССИЙСКАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ

КЛЕТОЧНЫЕ И ГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ
ДЛЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

22-24 ИЮНЯ 2022

Мероприятие проводится при финансовой поддержке
гранта Минобрнауки № 075-15-2021-1037



ПЕРВЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ
РОССИИ

Санкт-Петербург, 21-24 июня 2022 г.



Редактирование генома кур системой CRISPR/Cas9

Крутикова Анна Алексеевна

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории
молекулярной генетики ВНИИГРЖ

Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats

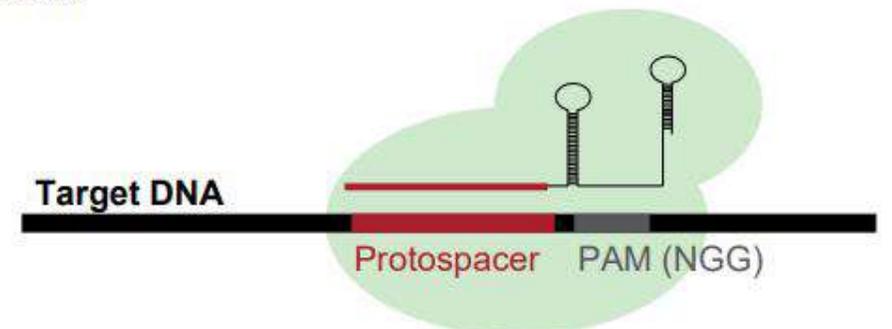
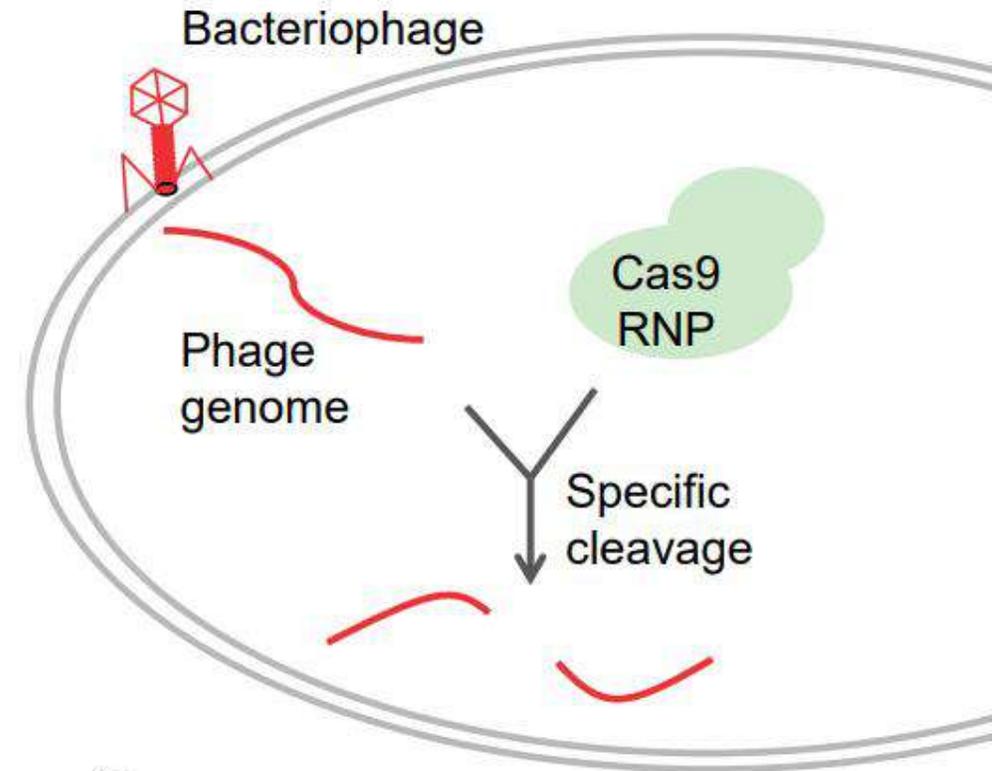
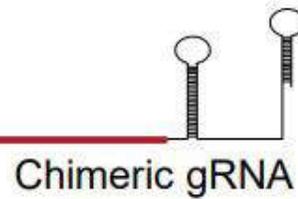
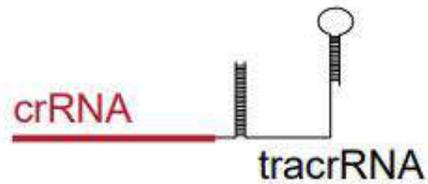
Что такое система CRISPR?

- Бактериальный адаптивный иммунный ответ Система, придающая устойчивость к экзогенным нуклеиновым кислотам (например, вирусная ДНК)

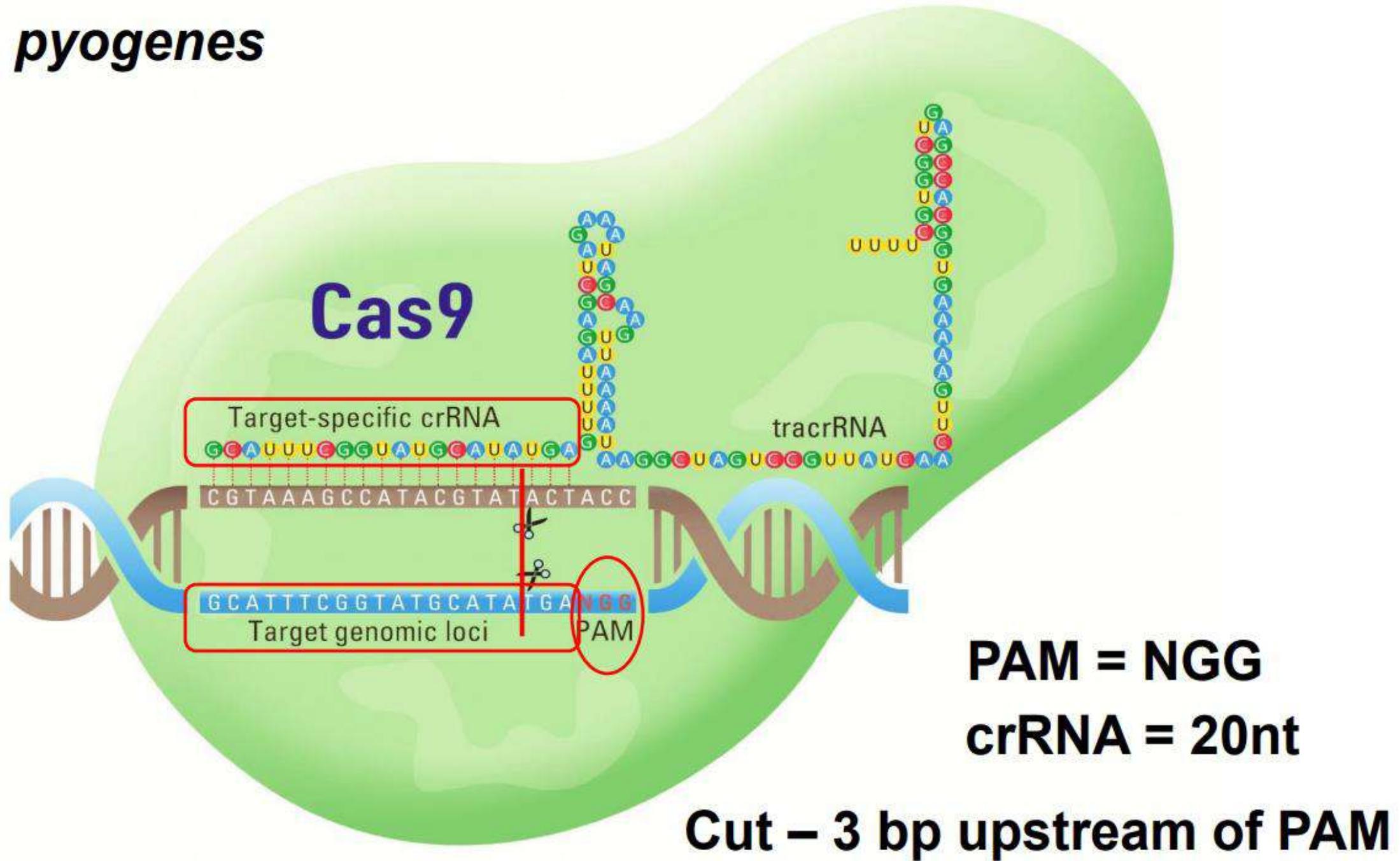
- ДНК-нуклеазная система, управляемая РНК RNP (рибонуклеопротеиновый) комплекс из:
 - Cas9 (*S. Pyogenes*)
 - Направляющая РНК

- Направляющая РНК (гРНК):
 - около 100 нуклеотидов (одинаковы для всех гРНК)
 - пространственная структура, узнаваемая белком Cas9
 - Целевая специфичность (20 нуклеотидов) на 5' конце (Распознает последовательность, комплементарную гРНК – Протоспейсер)

ВАЖНО! Смежный мотив протоспейсера (PAM, требуется для целевой последовательности)



Strep. pyogenes



non-homologous end-joining (NHEJ)

- Insertions/deletions (Indels)

5'-GCATTTTCGGTATGCATATGATGG-3'

↓ Cas9 RNP Cleavage

5'-GCATTTTCGGTATGCATA-3' 5'-TGATGG-3'

↓ NHEJ

5'-GCATTTTCGGTATGCATATGATGG-3'
Faithful repair

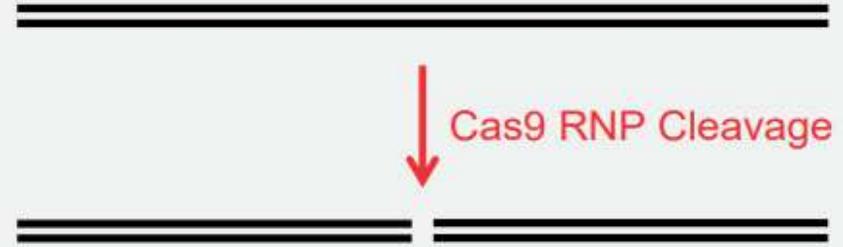
5'-GCATTTTCGGTATG - - - - TGATGG-3'
Deletion

5'-GCATTTTCGGTATGCTCGATATGATGG-3'
Insertion

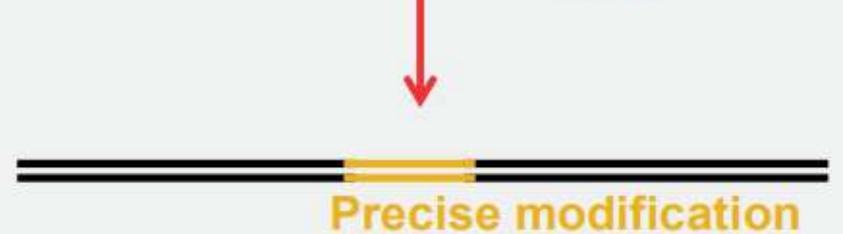
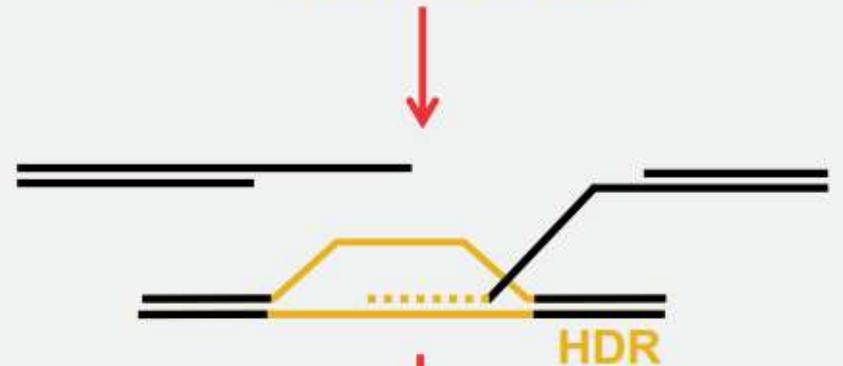


homology-directed repair (HDR)

- requires template



Donor Template





Design

Deliver

Detect

•
Определение целевых сайтов,
разработка и заказ рабочих
инструментов

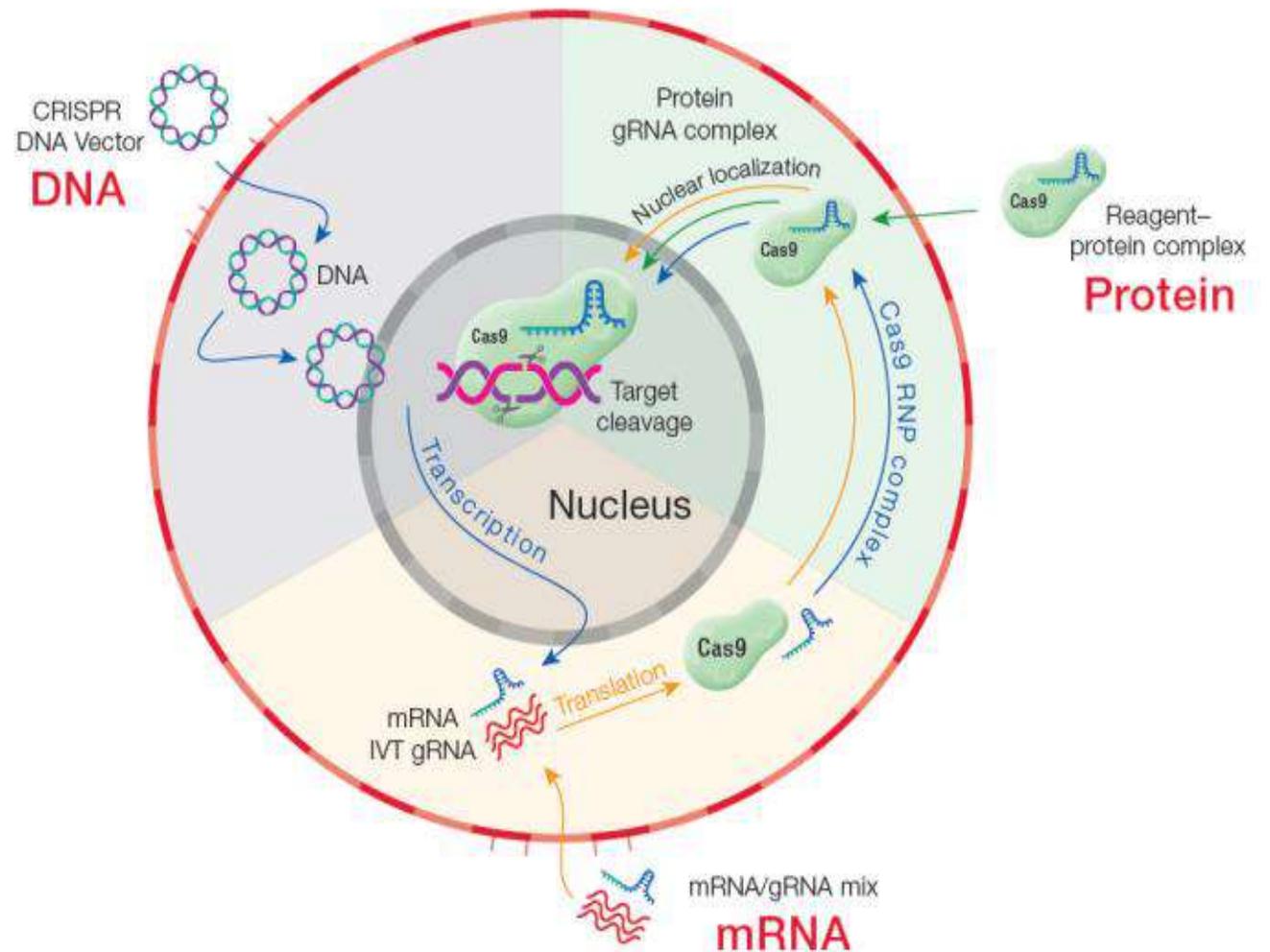
•
Доставка инструментов
редактирования здоровым
жизнеспособным клеткам
(необходима высокая
эффективность трансфекции)

•
Подтверждение эффективности
редактирования генов,
определение процента
модификации



Cas9 Delivery Format

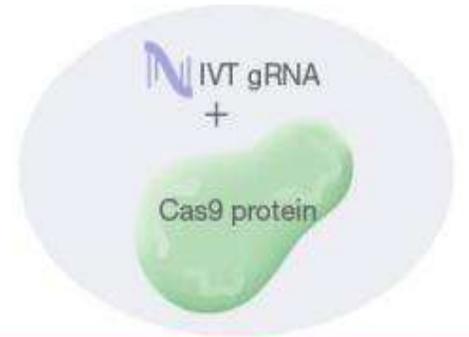
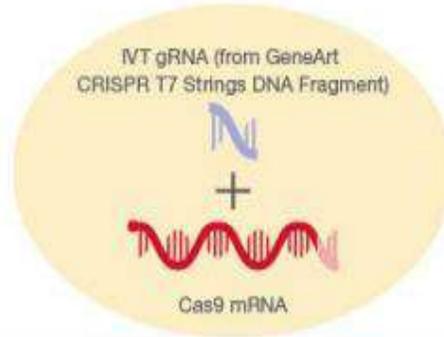
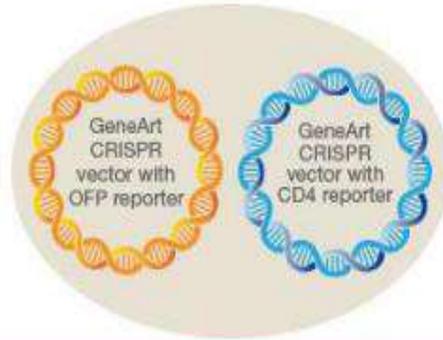
- Protein
- mRNA
- DNA
- Viral



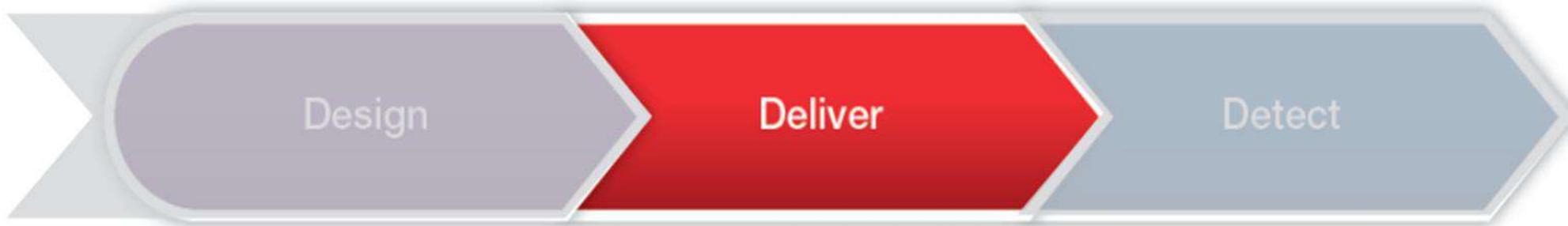


Основные советы для успешного эксперимента:

- Знай свою цель
- Секвенировать целевой локус, чтобы подтвердить соответствие эталонному геному.
- Выберите 3 гРНК для тестирования.
- Нокаут:** нацельтесь на раннее начало последовательности, чтобы нарушить рамку считывания.
- Вставка:** расщепление как можно ближе к месту изменения, ± 10 п.н.
- Проведите биоинформационный анализ, чтобы определить потенциальные нецелевые сайты.
- Максимальная эффективность HDR
 - Гомологические плечи



	DNA	RNA	Protein
Transfection Reagent	Lipofectamine™ 3000 reagent	Lipofectamine™ MessengerMAX™ reagent <i>(recommended)</i>	Lipofectamine™ CRISPRMAX™ reagent
Electroporation	Neon™ System	Neon™ System	Neon™ System <i>(recommended)</i>



Ключевые советы для успешного эксперимента по редактированию:

- Знай свои клетки
- Выберите формат в зависимости от эффективности трансфекции ваших клеток
 - Липид
 - Электропорация
 - Вирус или микроинъекция для некоторых типов клеток
- Оптимизируйте!

! Более высокая эффективность трансфекции = более высокая эффективность вставки/редактирования

! Должная осмотрительность на начальном этапе сэкономит работу на последующих этапах



- Оценить общую эффективность редактирования исходной смешанной популяции клеток.
 - Анализ обнаружения несовпадения расщеплений на основе ПЦР (наиболее распространенный)
 - Секвенирование с помощью специального программного обеспечения для анализа CRISPR (TIDE) и т. д.
- Подтверждение правки на изолированных клонах.
 - ПЦР + секвенирование по Сэнгеру, секвенирование следующего поколения
 - Проверка фенотипа
- Нецелевой анализ



Секреты успешного эксперимента по редактированию:

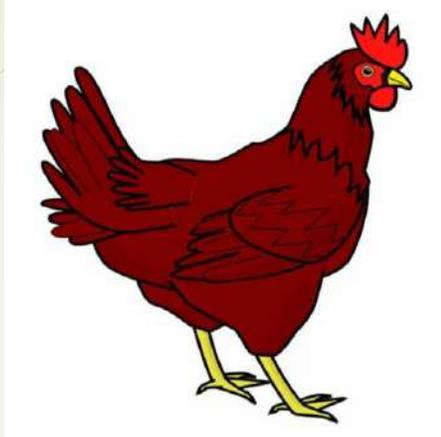
- **Найдите свои инструменты**

- Проверка эффективности расщепления для нескольких гРНК
- Выбирайте гРНК с максимальной эффективностью для последующих экспериментов.

- **Оптимизируйте!**

- Наиболее эффективная гРНК для создания вставок = наиболее эффективная гРНК для HDR
- Надлежащая осмотрительность при проектировании и условиях сэкономит усилия в дальнейшем

Направления исследований



**Повышение
продуктивности
(мясная, яичная)**

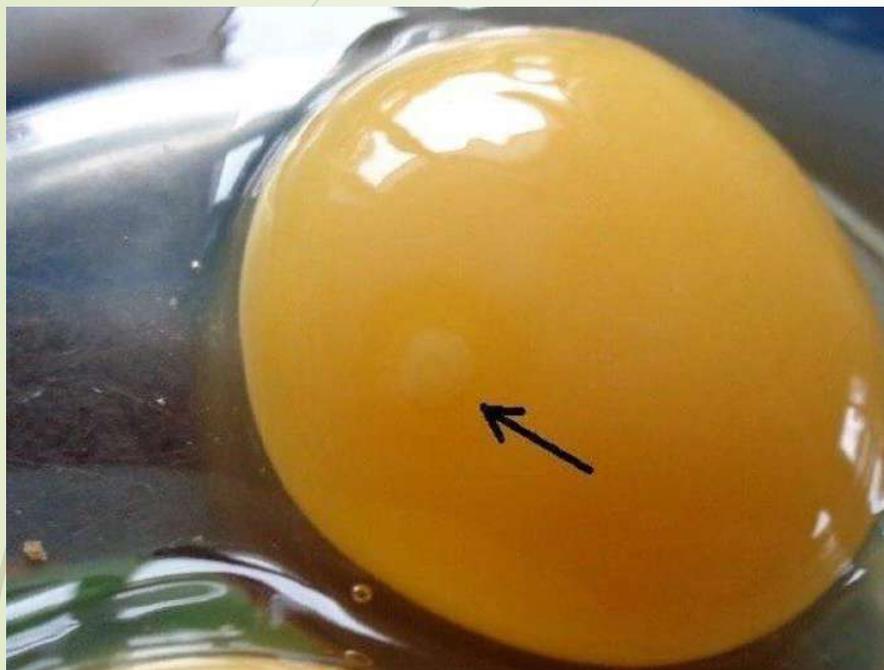
**Устойчивость к
инфекционным
заболеваниям**

**Источник
гипоаллергенного
белка**

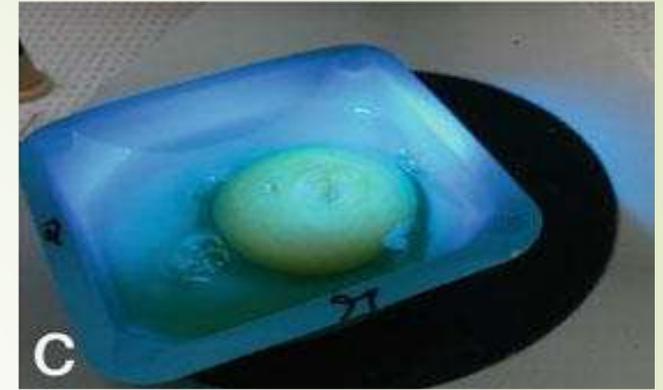
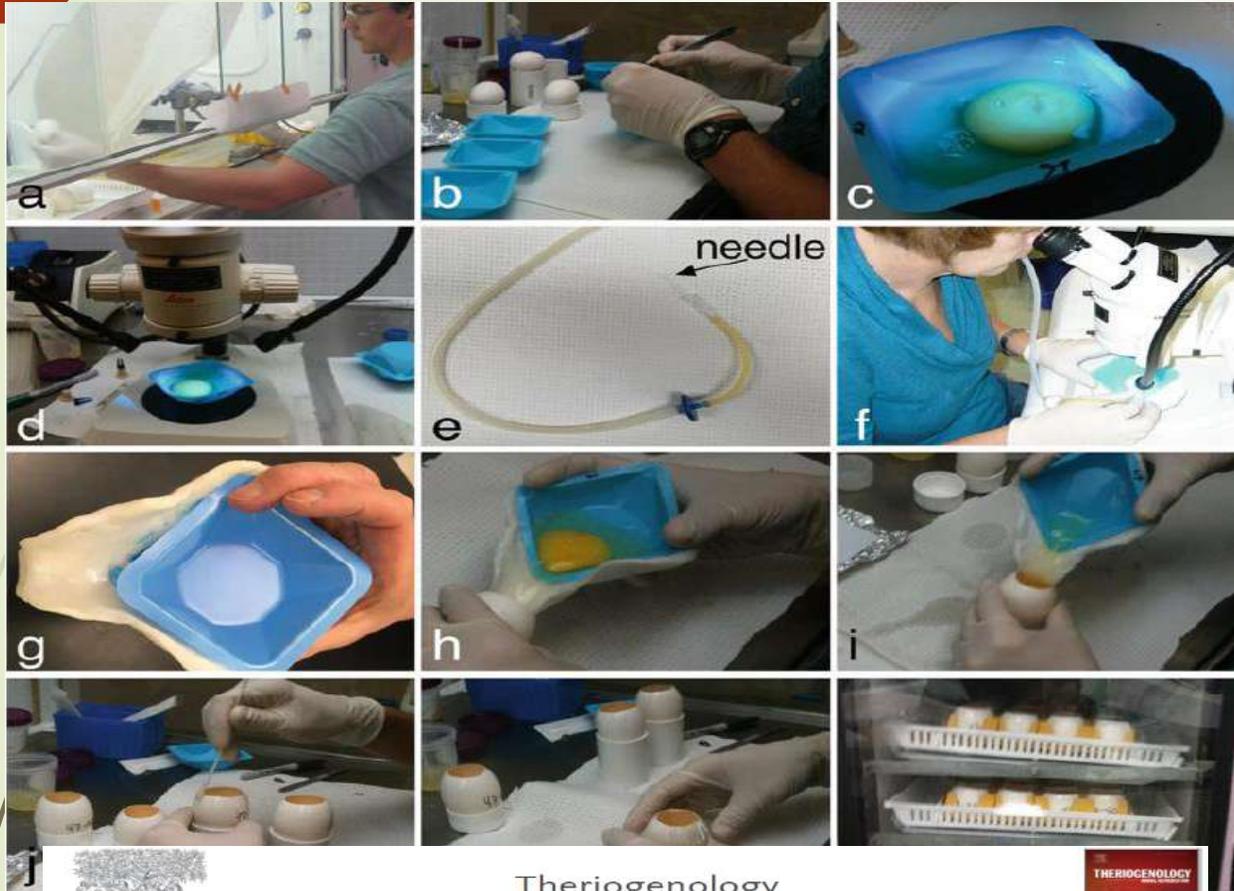
**Био-производители
неспецифических
активных веществ**

**Биологические
модели для
медицины**

Особенности репродуктивной системы кур



Технология получения PGC



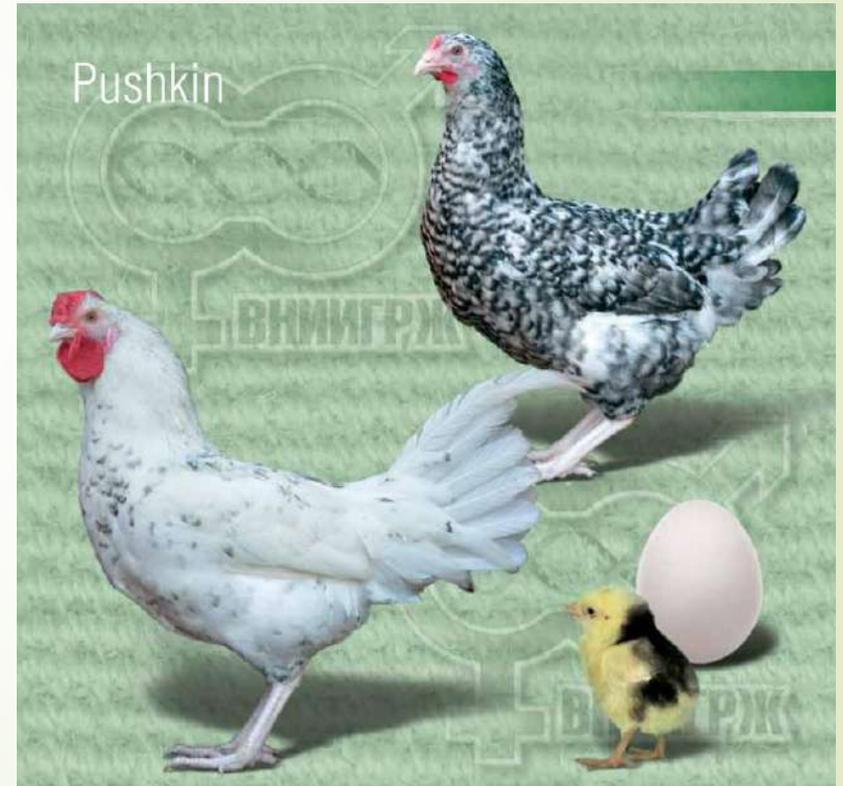
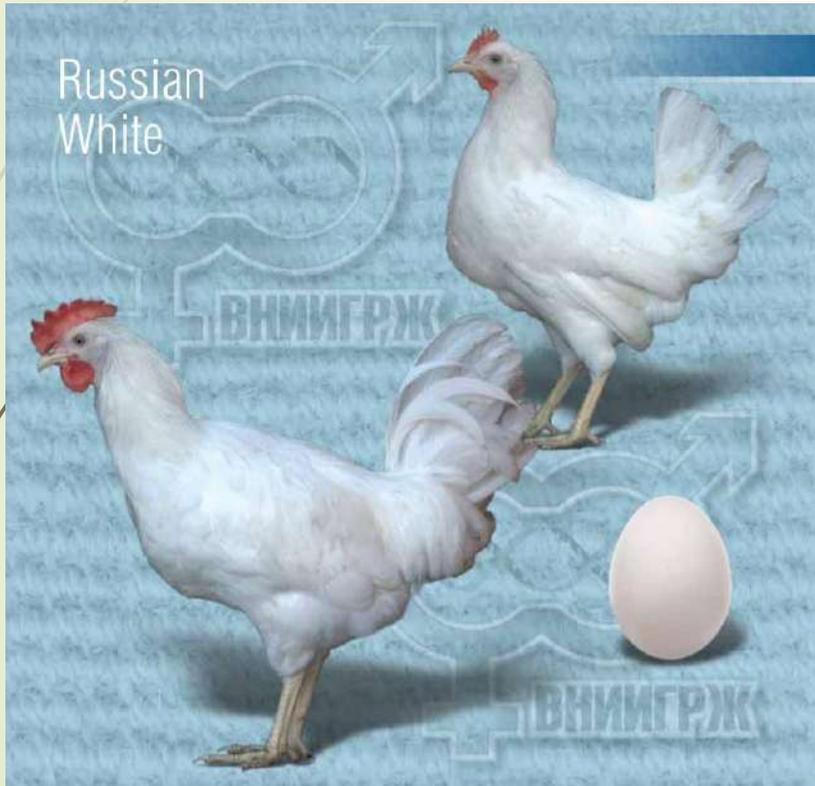
Theriogenology
Volume 58, Issue 8, November 2002, Pages 1531-1539



Production of germline chimeras by transfer of chicken gonadal primordial germ cells maintained in vitro for an extended period

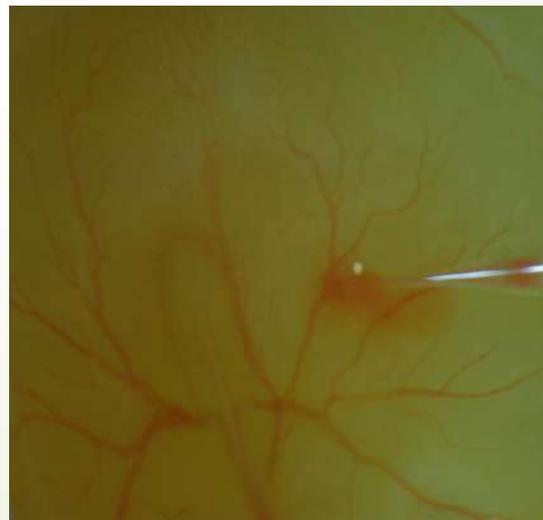
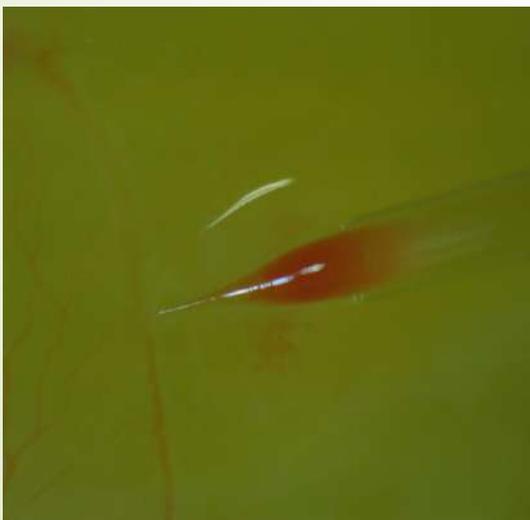
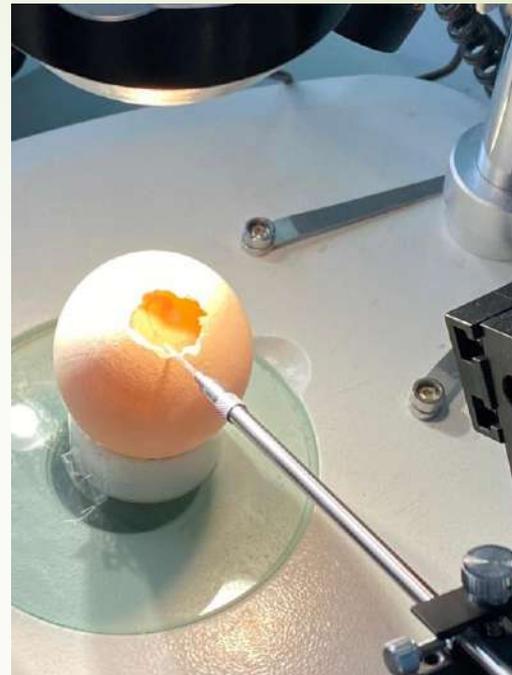
Jae Yong Han^a, Tae Sub Park^{a,c}, Yeong Ho Hong^b, Dong Kee Jeong^a, Jin Nam Kim^a, Ki Dong Kim^a, Jeong Mook Lim^a

Объект исследований

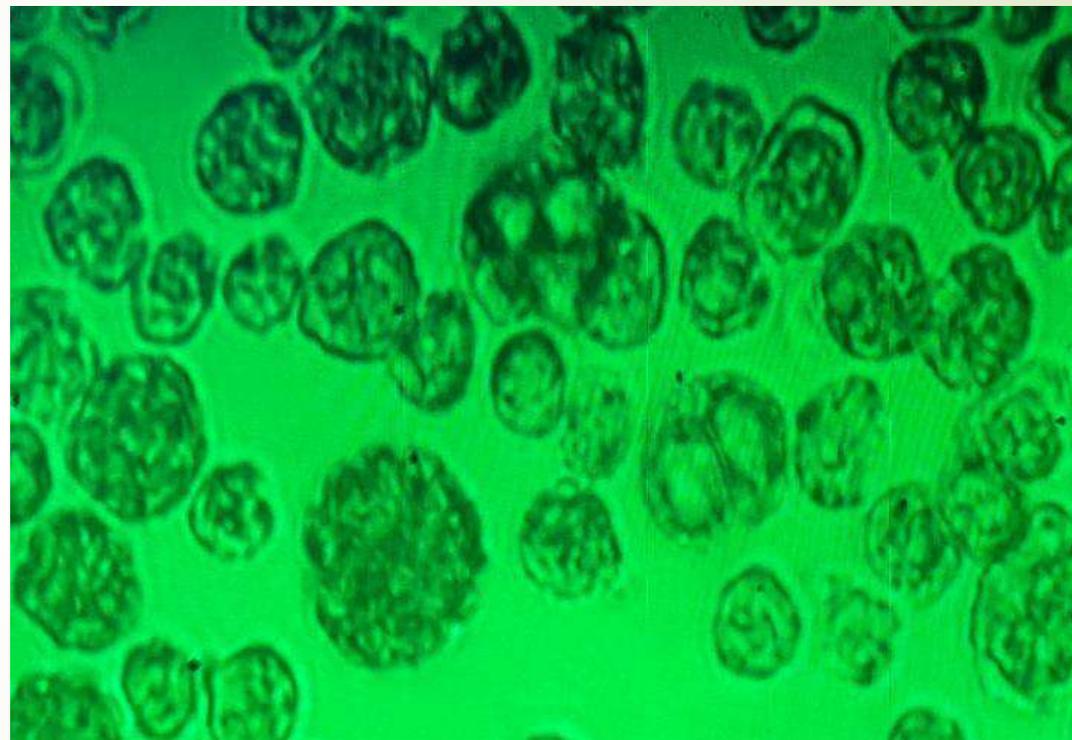


ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур»

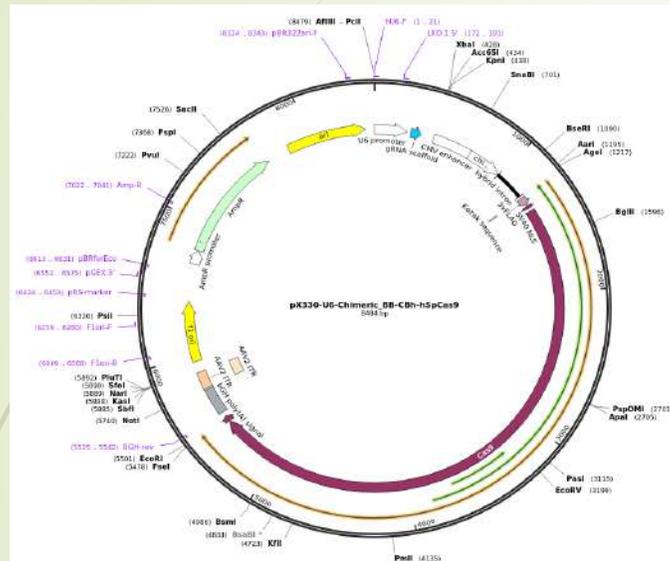
Технология получения PGC



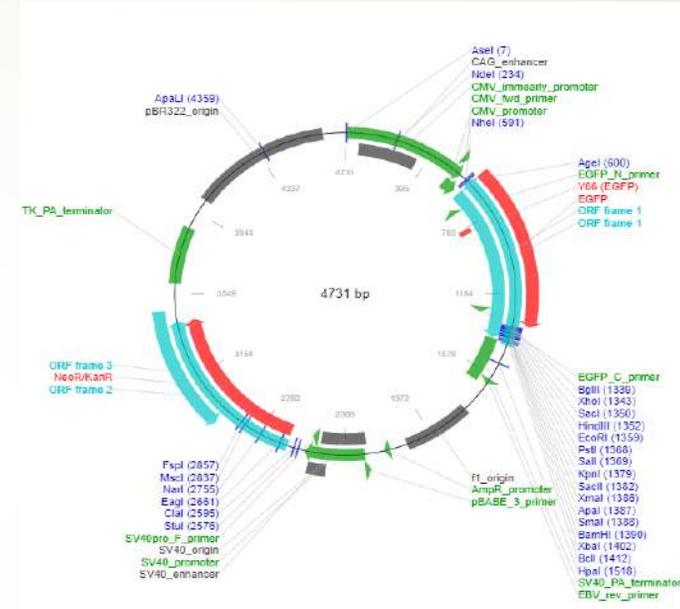
Культивирование PGC



Трансформация клеток



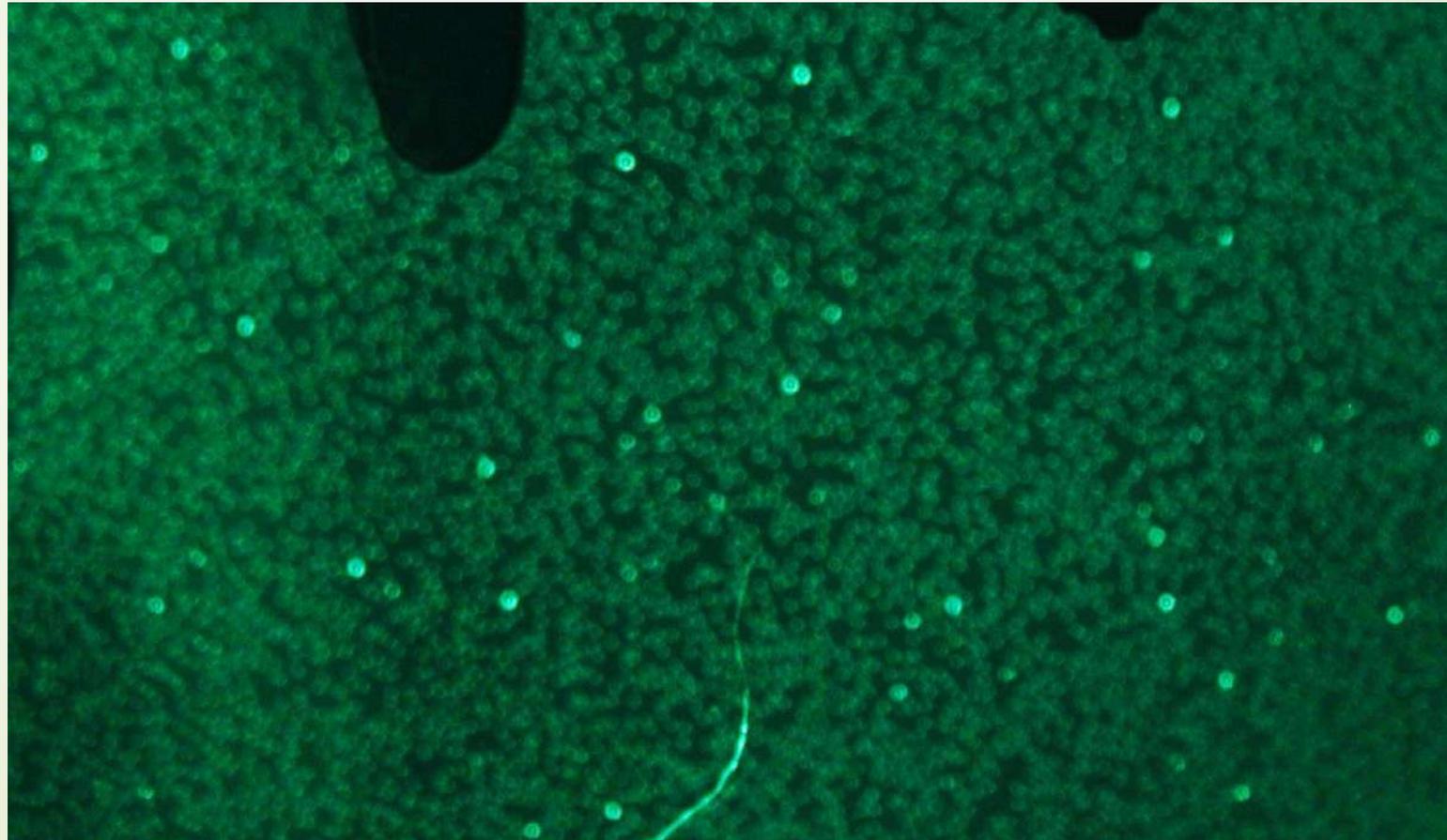
pX330



pEGFP-C1



Флуоресценция трансформированных клеток



Спасибо за внимание!

