

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И РАЗВЕДЕНИЯ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

**филиал федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства —  
ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»**

**XXII –я научная конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве и  
животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» 7-9 ноября**

**Клеточно-культуральные и молекулярно-генетические  
подходы для редактирования генома кур**

**м. н. с. лаб. молекулярной генетики ВНИИГРЖ, аспирант,**

**Пегливанян Григорий Карапетович**

**Проект выполнен при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-76-10006  
Реализация 07.2020-07.2023**



**Актуальность** заключается в необходимости повышения мясной продуктивности, устойчивости к заболеваниям и повышенной жизнеспособности отечественных линий кур путем оптимизации условий отбора примордиальных половых клеток, их культивирования и трансфекции

**Цель исследования** разработать и применить инновационные биотехнологические подходы для получения высокопродуктивных линий кур с конкретными заданными признаками

# Задачи

**Оптимизировать технологию отбора примордиальных половых клеток (PGC)**

➤ **Оптимизировать условия культивирования куриных PGC**

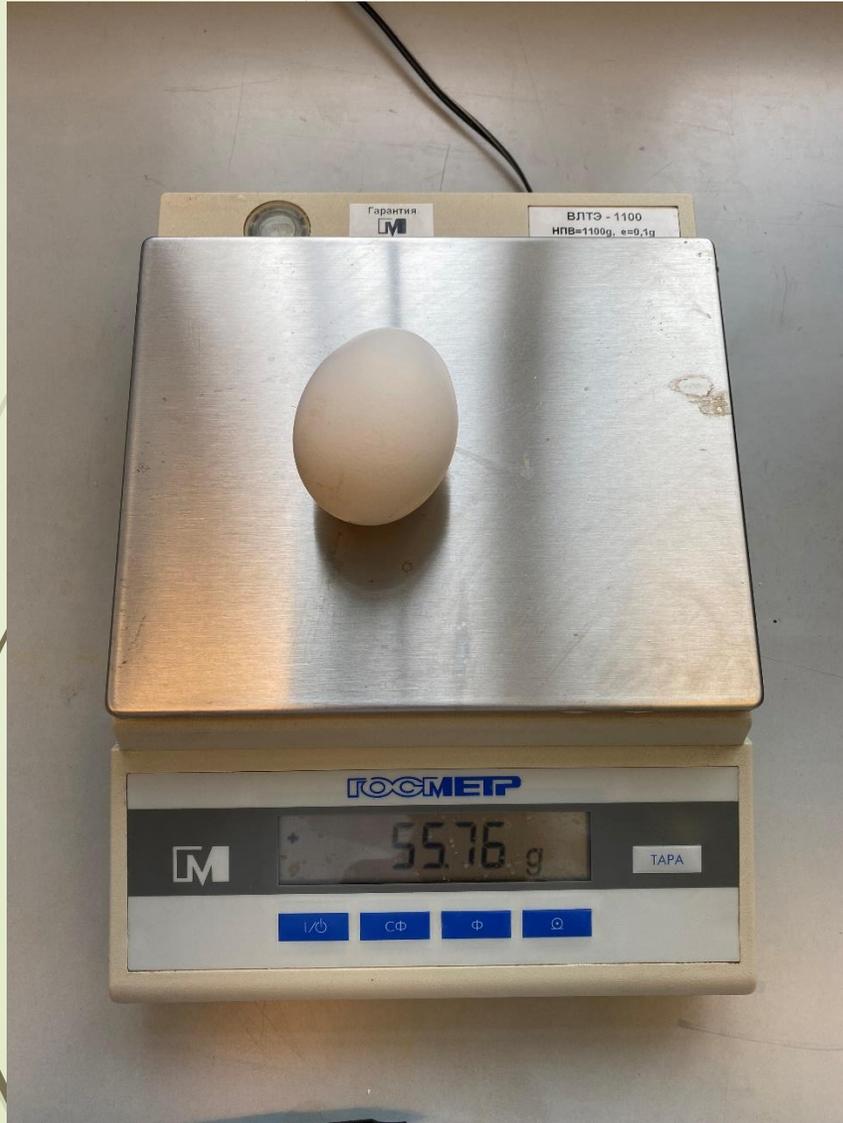
➤ **Создать генетические конструкции с системой редактирования CRISPR/Cas9 для закрепления целевой мутации в геноме**

➤ **Отработать методы и условия трансфекции**

➤ **Выявить экспрессию маркерных генов для подтверждения наличия PGC в культуре клеток**

➤ **Оптимизировать методы заморозки и разморозки PGC кур**

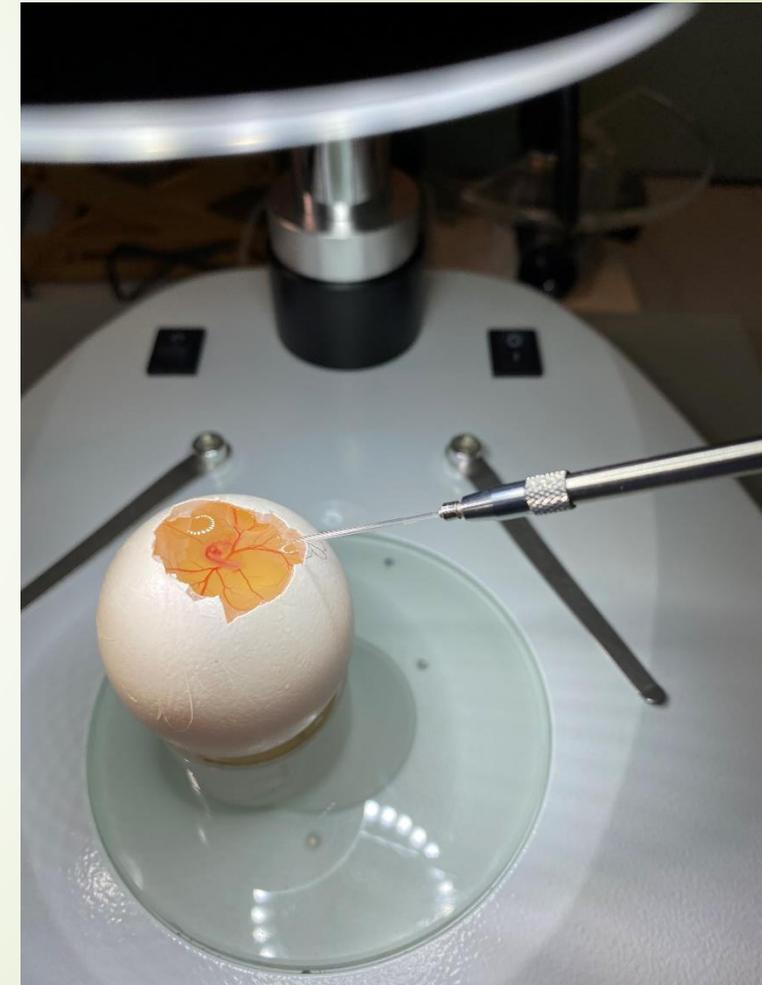
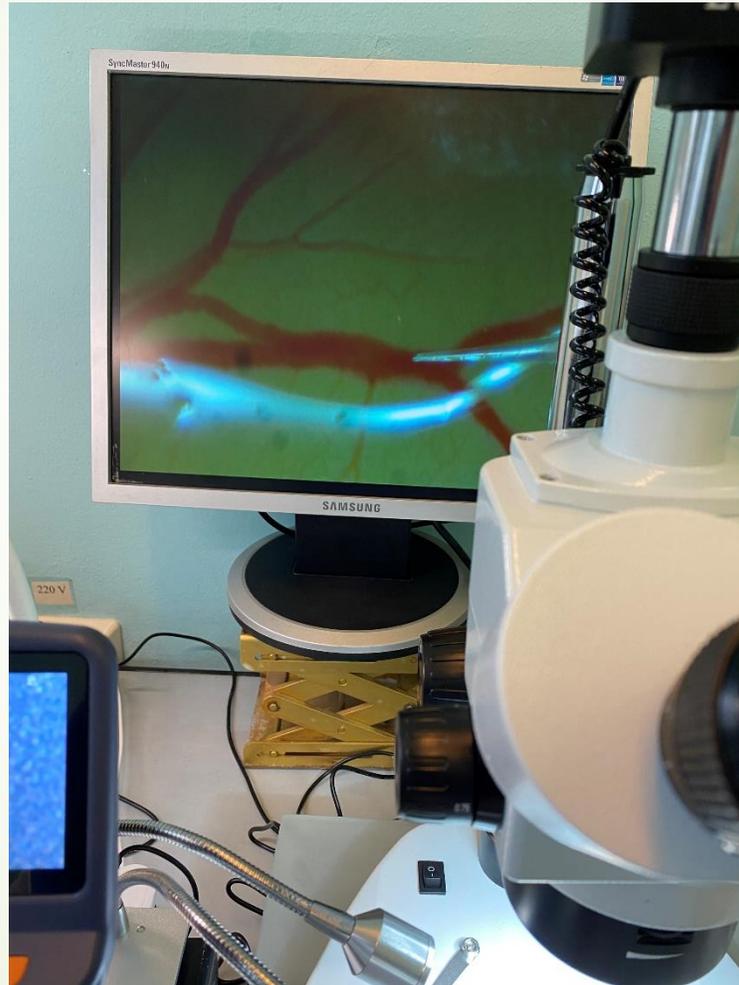
# Закладка яиц на инкубацию (инкубация 4 дня)



# Вскрытие яйца в области воздушной камеры (диаметр 10-15 мм)



# Взятие РГС через полученное отверстие под бинокуляром из дорсальной вены

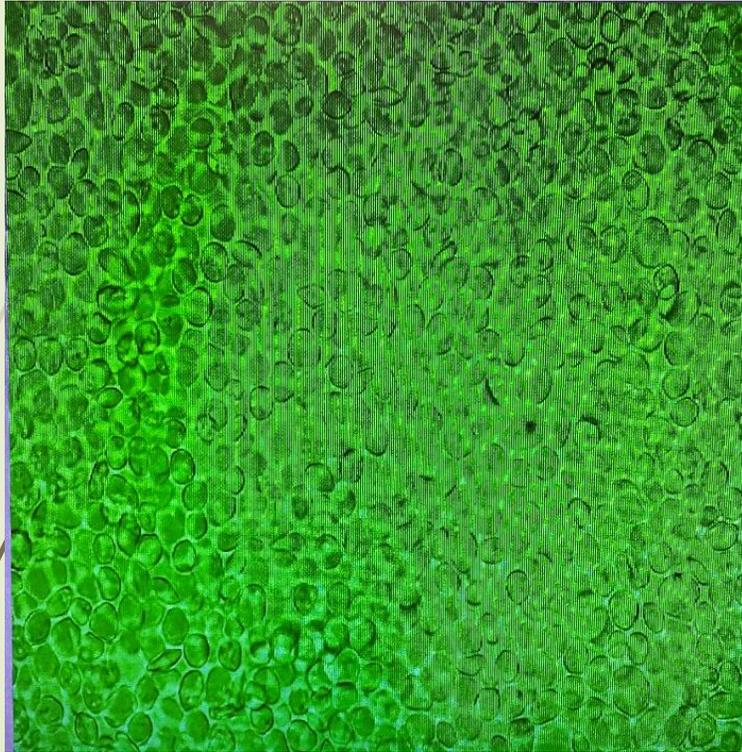




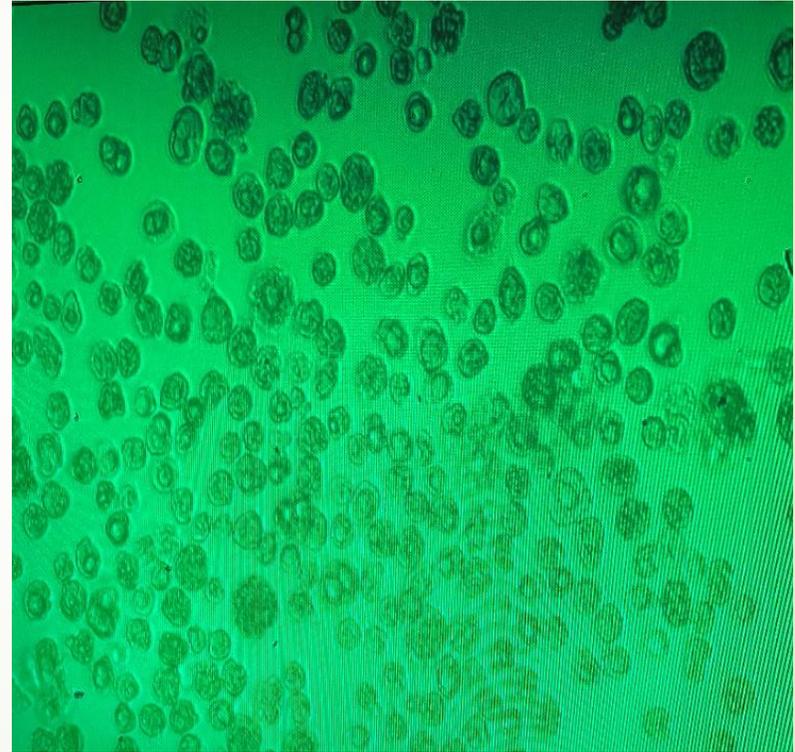
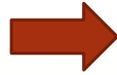
# **Пролиферация и жизнеспособность PGCS в разных средах**

Обозначение	Базовая среда (расчет на 500 мл среды)	Дополнительные компоненты среды	Общее количество PGC (средние значения ± стандартная ошибка)	Количество живых PGC (средние значения ± стандартная ошибка) (%) –живых PGC
<b>К</b>	Базовая среда Opti-MEM (Reduced Serum Medium, GlutaMAX Supplement) (Gibco, Thermo Fisher)	-	$1,28 \times 10^6 \pm 0,03 \times 10^6$ <sup>k</sup>	$0,36 \times 10^6 \pm 0,01 \times 10^6$ <sup>k</sup> (28%)
<b>А</b>	Базовая среда Opti-MEM (Reduced Serum Medium, GlutaMAX Supplement) (Gibco, Thermo Fisher)	натрия пируват 1М (Applichem), нуклеозиды Embryo Max Nucleosides 100X (Millipore) - 2,5 мл, Chicken Serum (Gibco, Thermo Fisher) – 2%, 2-меркаптоэтанол (NF, VWR) - 3,9 мкл	$1,32 \times 10^6 \pm 0,04 \times 10^6$ <sup>a</sup>	$0,34 \times 10^6 \pm 0,04 \times 10^6$ <sup>a</sup> (26%)
<b>Б</b>	Базовая среда Opti-MEM (Reduced Serum Medium, GlutaMAX Supplement) (Gibco, Thermo Fisher)	натрия пируват 1М (Applichem), нуклеозиды Embryo Max Nucleosides 100X (Millipore) - 2,5 мл, Chicken Serum (Gibco, ThermoFisher) – 20%, 2-меркаптоэтанол (NF, VWR) - 3,9 мкл), антибиотик-антимикотик (Thermo Fisher) до 1X	$1,47 \times 10^6 \pm 0,03 \times 10^6$ <sup>b</sup>	$0,47 \times 10^6 \pm 0,07 \times 10^6$ <sup>b</sup> (32%)
<b>В</b>	Базовая среда KnockOut DMEM/F-12, без L-глутамина (Gibco, Thermo Fisher)	натрия пируват 1М (Applichem), нуклеозиды Embryo Max Nucleosides 100X (Millipore) - 2,5 мл, Human Activin A Recombinant Protein (Gibco, Thermo Fisher) - 25 нг/мкл, Human FGF-basic (FGF-2/bFGF) Recombinant Protein (Gibco, Thermo Fisher) – 10 нг/мкл, Chicken Serum(Gibco, Thermo Fisher) – 2%, 2-меркаптоэтанол (NF, VWR) - 3,9 мкл), антибиотик-антимикотик (Thermo Fisher) до 1X	$2,21 \times 10^6 \pm 0,05 \times 10^6$ <sup>c</sup>	$0,84 \times 10^6 \pm 0,06 \times 10^6$ <sup>c</sup> (38%)

# Культура клеток на момент взятия и через 21 день культивирования



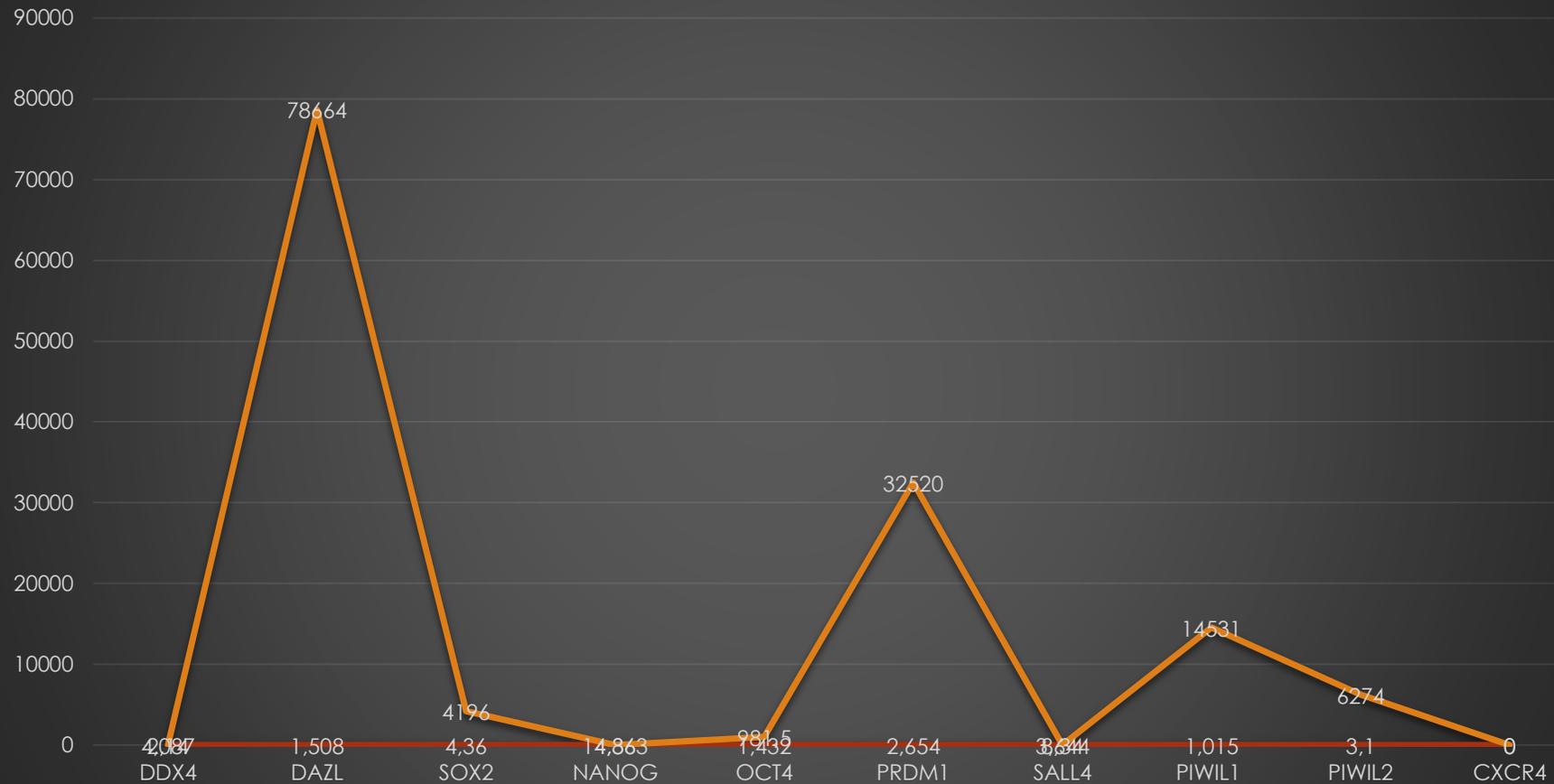
**1 день**



**21 день**

# Анализ экспрессии маркерных генов

Уровни экспрессии PGC-специфичных генов



Фибробласты PGC

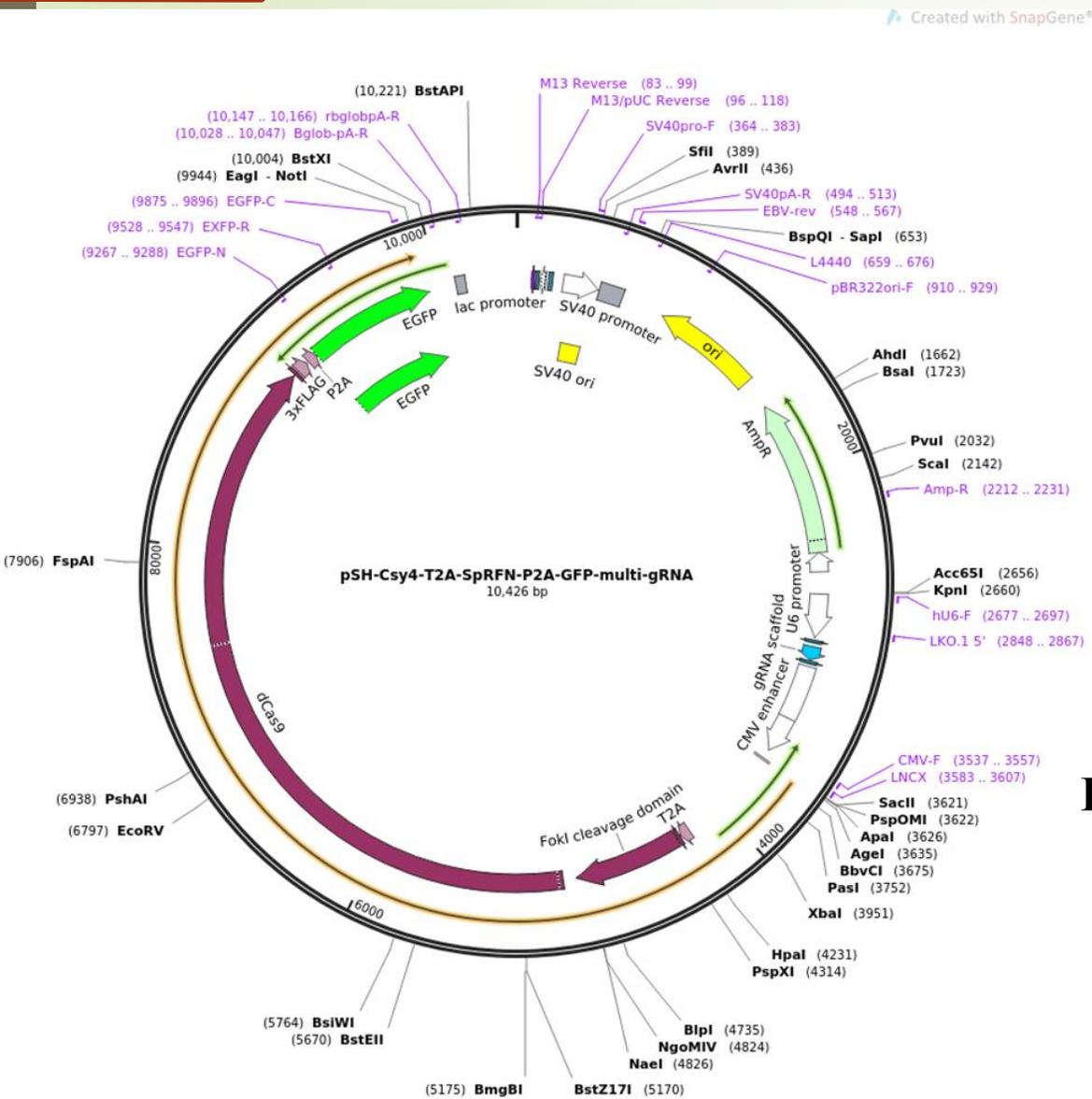
# Количественные показатели культивируемых клеток перед криоконсервацией

Тип клеток	Живые клетки млн/мл	Мертвые клетки млн/мл	Выживаемость, %
PGC Пушкинская	0,016	0,002	89
	0,012	0,002	86
	0,016	0,012	57
PGC Русская белая	0,236	0,028	89
	0,246	0,038	87
Фибробласты	1,73	0,008	99

# Количественные показатели культивируемых клеток после разморозки

Тип клеток	Живые клетки млн/мл	Мертвые клетки млн/мл	Выживаемость, %
PGC Пушкинская	0,026	0	100
	0,006	0,004	60
	0,012	0,004	75
PGC Русская белая	0,037	0,008	82
	0,037	0,006	86
Фибробласты	0,636	0,054	92

# Создание генетических конструкций с системой редактирования CRISPR/Cas9



Карта плазмиды AddGene #85756 (pSH-Csy4-T2A-SpRFN-P2A-GFP-multi-gRNA)

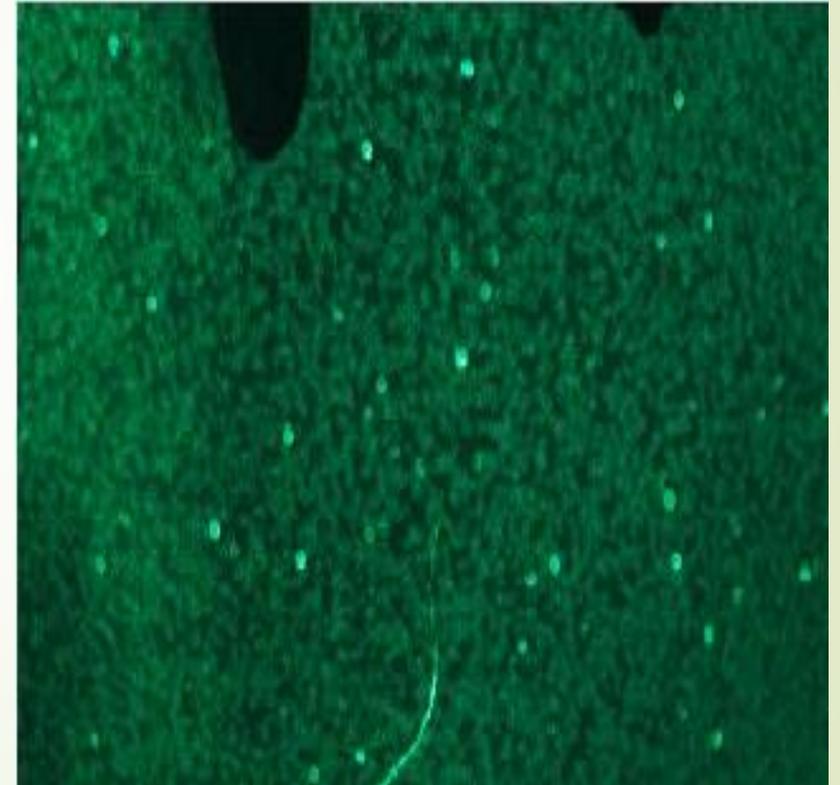
## Характеристики :

1. Репортерный ген EGFP
2. Селективный ген устойчивости к ампициллину
3. Возможность встраивания двух гайд-РНК

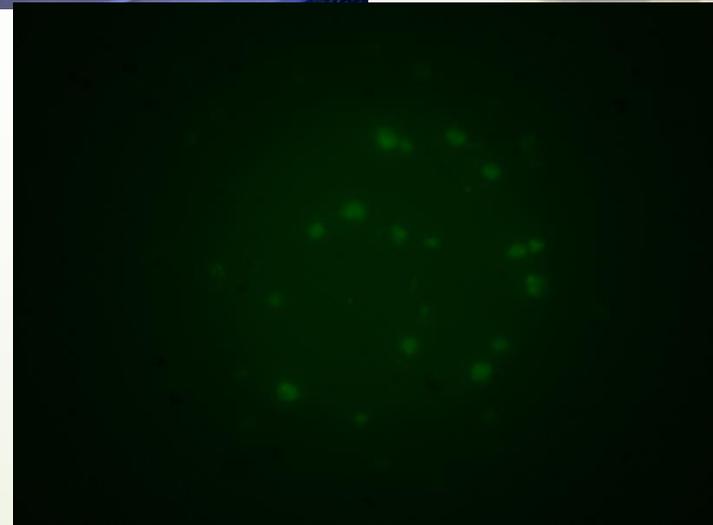
Гайдовые РНК подбирались для двух генов *MSTN* и *G0S2*

# Методы трансфекции РГС

## Химический (Липофектамин 3000)



# Физический (Электропорация (NEON))

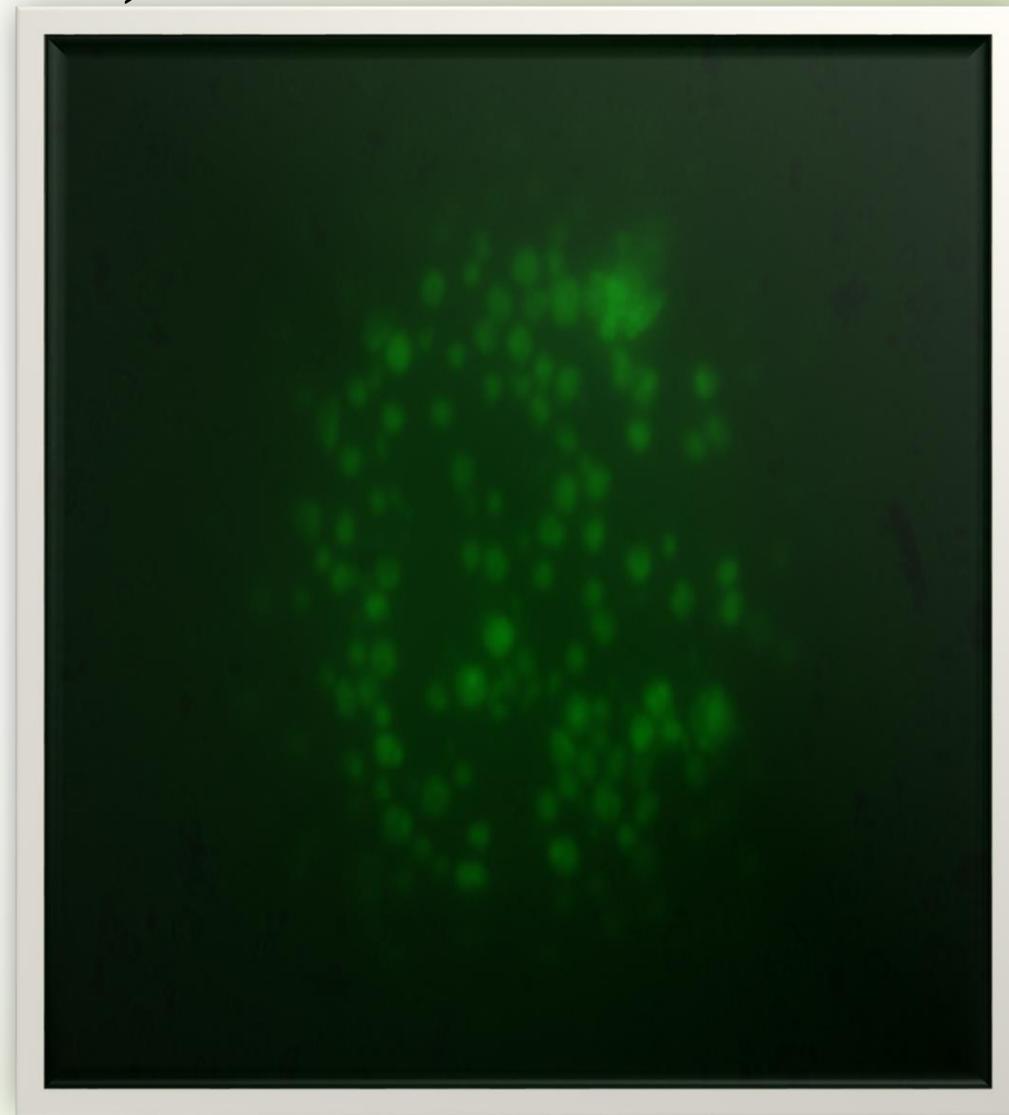
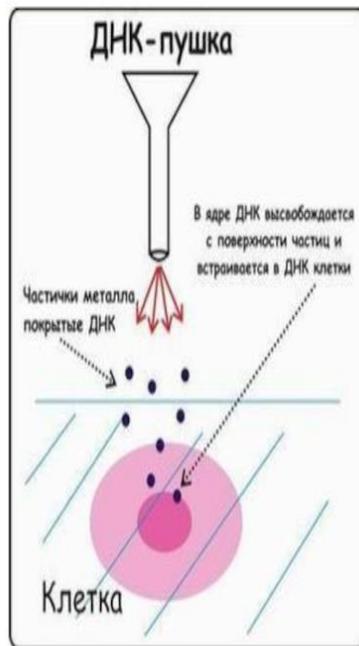


# Биобаллистический метод трансфекции (Генная пушка)



Генная пушка BIO-RAD

## Баллистическая трансфекция клеток



# Сравнение эффективности методов трансфекции РГС

Порода	Липофектами			Электропоратор (Neon)			Генная пушка		
	Всего, млн/мл	Трансф. млн/мл	%	Всего, млн/мл	Трансф. млн/мл	%	Всего, млн/мл	Трансф. млн/мл	%
Пушкинская	1,40	0,01	0,9	1,72	0,07	4,5	1,54	0,81	66,5
Русская белая	1,80	0,02	1,2	2,31	0,12	5,1	2,62	2,08	79,1

# Сравнение выживаемости трансформированных РСС до и после криоконсервации

Порода	№ Культуры	До заморозки			После разморозки		
		Всего клеток млн/мл	Живые клетки млн/мл	Выживаемость, %	Всего клеток млн/мл	Живые клетки млн/мл	Выживаемость, %
Пушкинская	1	0,95	0,44	46,0	0,28	0,21	75,0
	2	1,83	0,01	54,6	1,00	0,91	91,0
	3	0,55	0,11	20,0	0,34	0,25	73,5
Русская белая	4	1,78	1,54	86,5	0,51	0,46	90,1

# Выводы

- **Оптимизированы технологии:**
- **Отбора PGC;**
- **Культивирования;**
- **Трансфекции.**
- **Разработаны и созданы генетические конструкции с системой редактирования CRISPR/Cas9 для нокаутирования гена**
- **Изучена экспрессия маркерных генов, которые характеризуют наличие PGC кур в культуре клеток**
- **Оптимизированы подходы к криоконсервации и декриоконсервации PGC**



**Спасибо за внимание!**

**Проект выполнен при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-76-10006**