

**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**

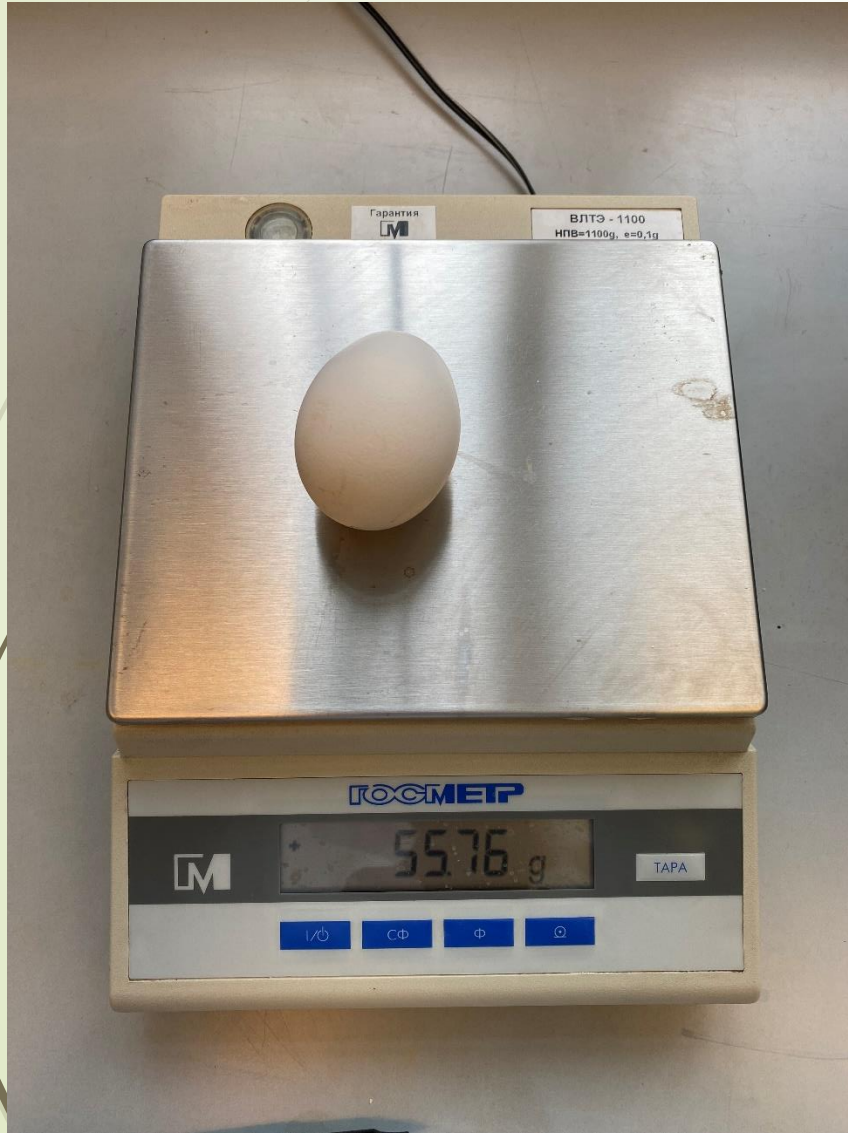
➤ **Создать генетические конструкции с системой редактирования CRISPR/Cas9 для закрепления целевой мутации в геноме**

➤ **Отработать методы и условия трансфекции**

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

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

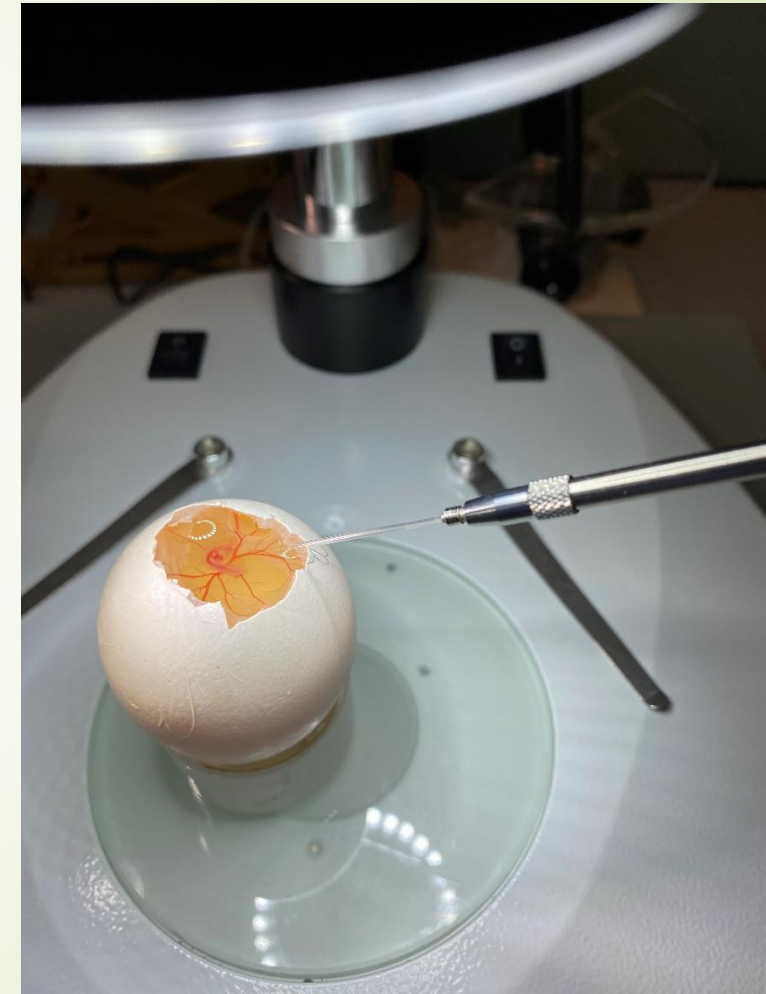
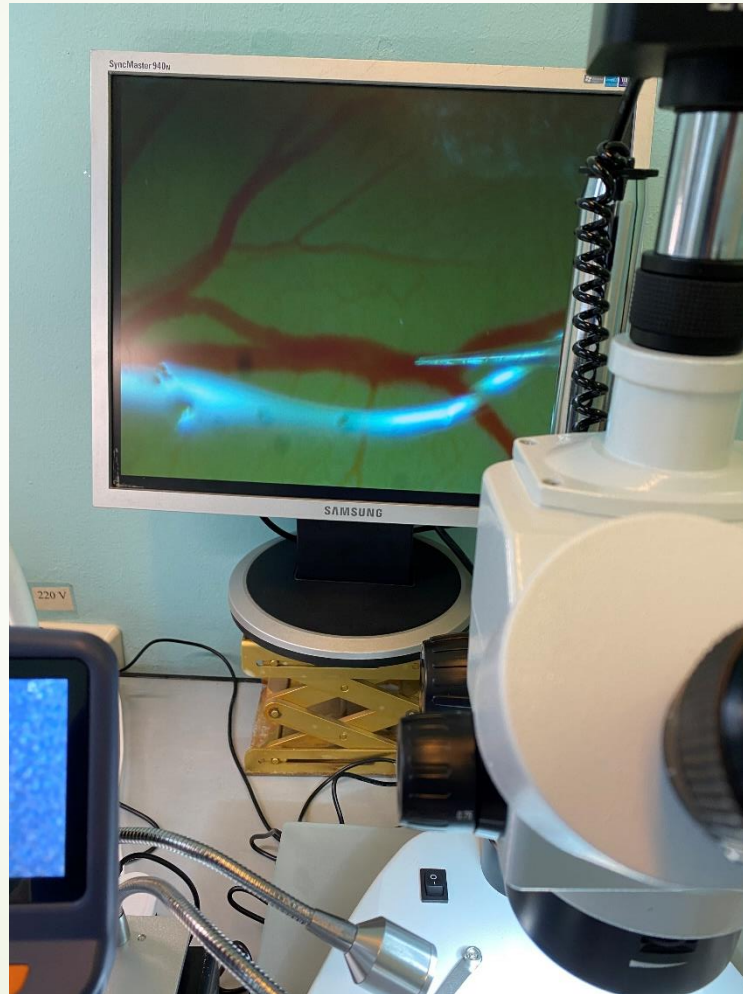
Закладка яиц на инкубацию (инкубация 4 дня)



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



Взятие РГС через полученное отверстие под бинокуляром из дорсальной вены

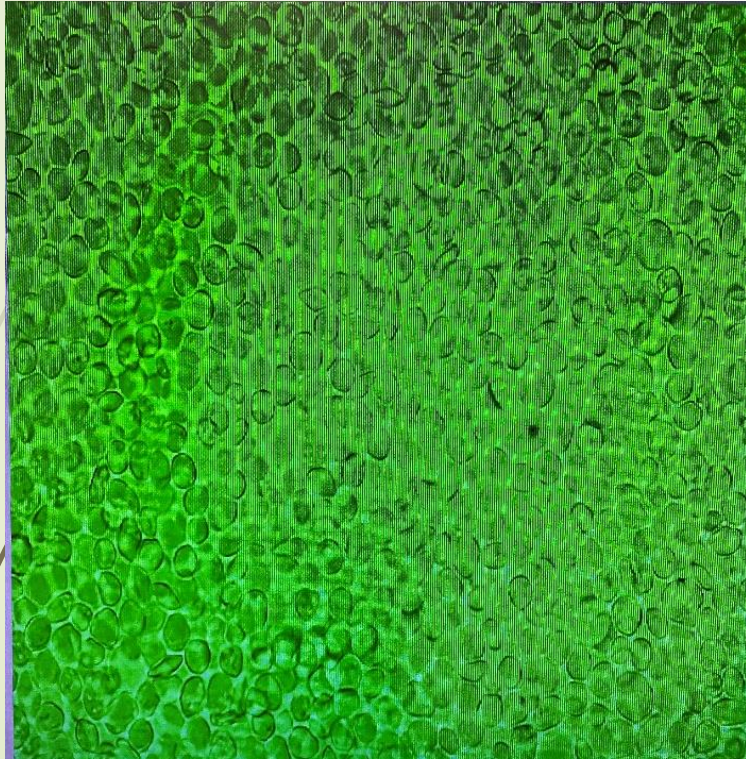




Пролиферация и жизнеспособность PGCS в разных средах

Обозначение	Базовая среда (расчет на 500 мл среды)	Дополнительные компоненты среды	Общее количество PGC (средние значения \pm стандартная ошибка)	Количество живых PGC (средние значения \pm стандартная ошибка) (%) –живых PGC
К	Базовая среда Opti-MEM (Reduced Serum Medium, GlutaMAX Supplement) (Gibco, Thermo Fisher)	-	$1,28 \times 10^6 \pm 0,03 \times 10^6$ к	$0,36 \times 10^6 \pm 0,01 \times 10^6$ к (28%)
А	Базовая среда Opti-MEM (Reduced Serum Medium, GlutaMAX Supplement) (Gibco, Thermo Fisher)	натрия пируват 1M (Applichem), нуклеозиды Embryo Max Nucleosides 100X (Millipore) - 2,5 мл, Chicken Serum (Gibco, Thermo Fisher) – 2%, 2-меркаптоэтанол (NF, VWR) - 3,9 мкл	$1,32 \times 10^6 \pm 0,04 \times 10^6$ а	$0,34 \times 10^6 \pm 0,04 \times 10^6$ а (26%)
Б	Базовая среда Opti-MEM (Reduced Serum Medium, GlutaMAX Supplement) (Gibco, Thermo Fisher)	натрия пируват 1M (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	$1,47 \times 10^6 \pm 0,03 \times 10^6$ б	$0,47 \times 10^6 \pm 0,07 \times 10^6$ б (32%)
В	Базовая среда KnockOut DMEM/F-12, без L-глутамина (Gibco, Thermo Fisher)	натрия пируват 1M (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	$2,21 \times 10^6 \pm 0,05 \times 10^6$ с	$0,84 \times 10^6 \pm 0,06 \times 10^6$ с (38%)

Культура клеток на момент взятия и через 21 день культивирования



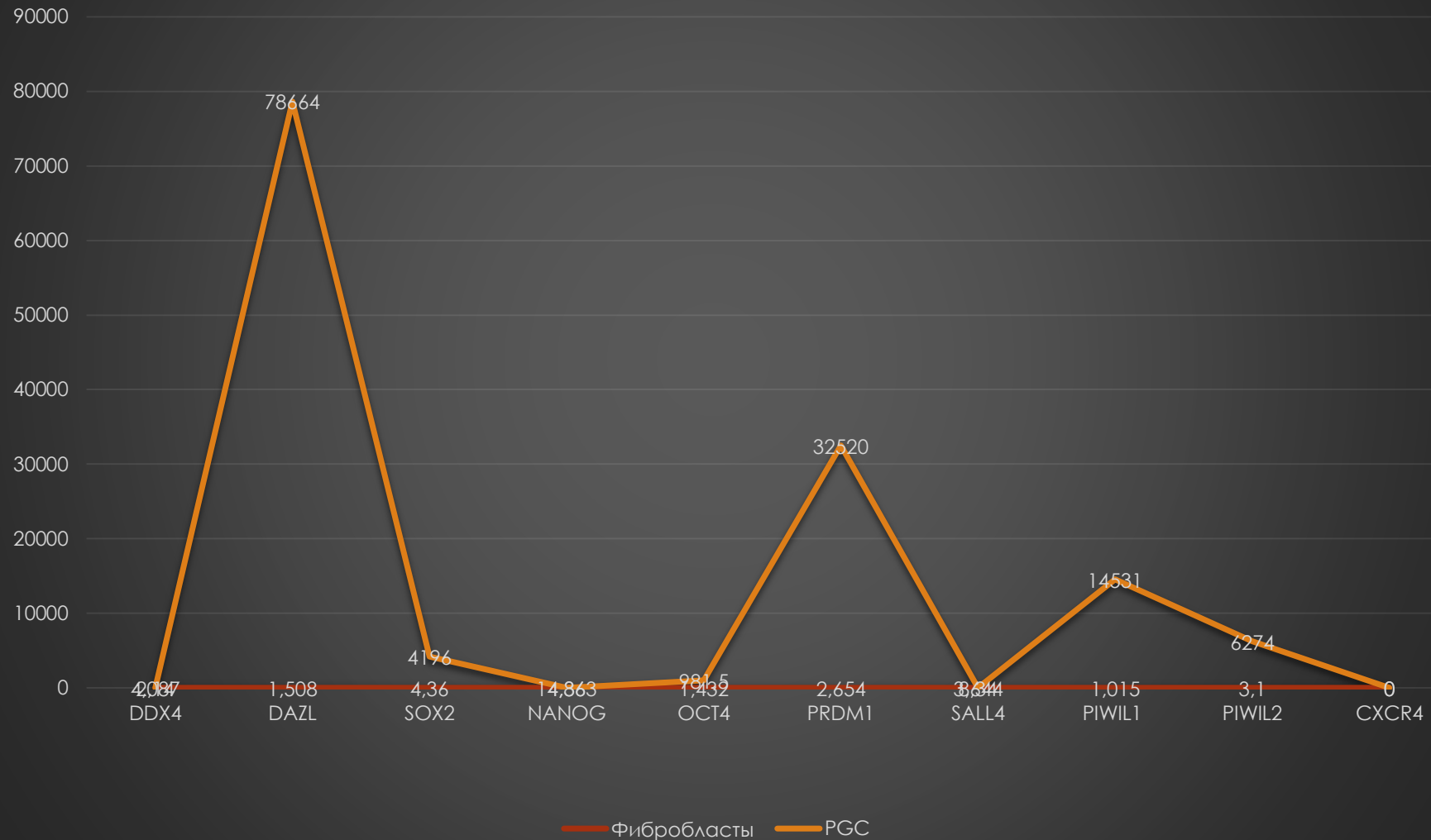
1 день



21 день

Анализ экспрессии маркерных генов

Уровни экспрессии PGC-специфичных генов



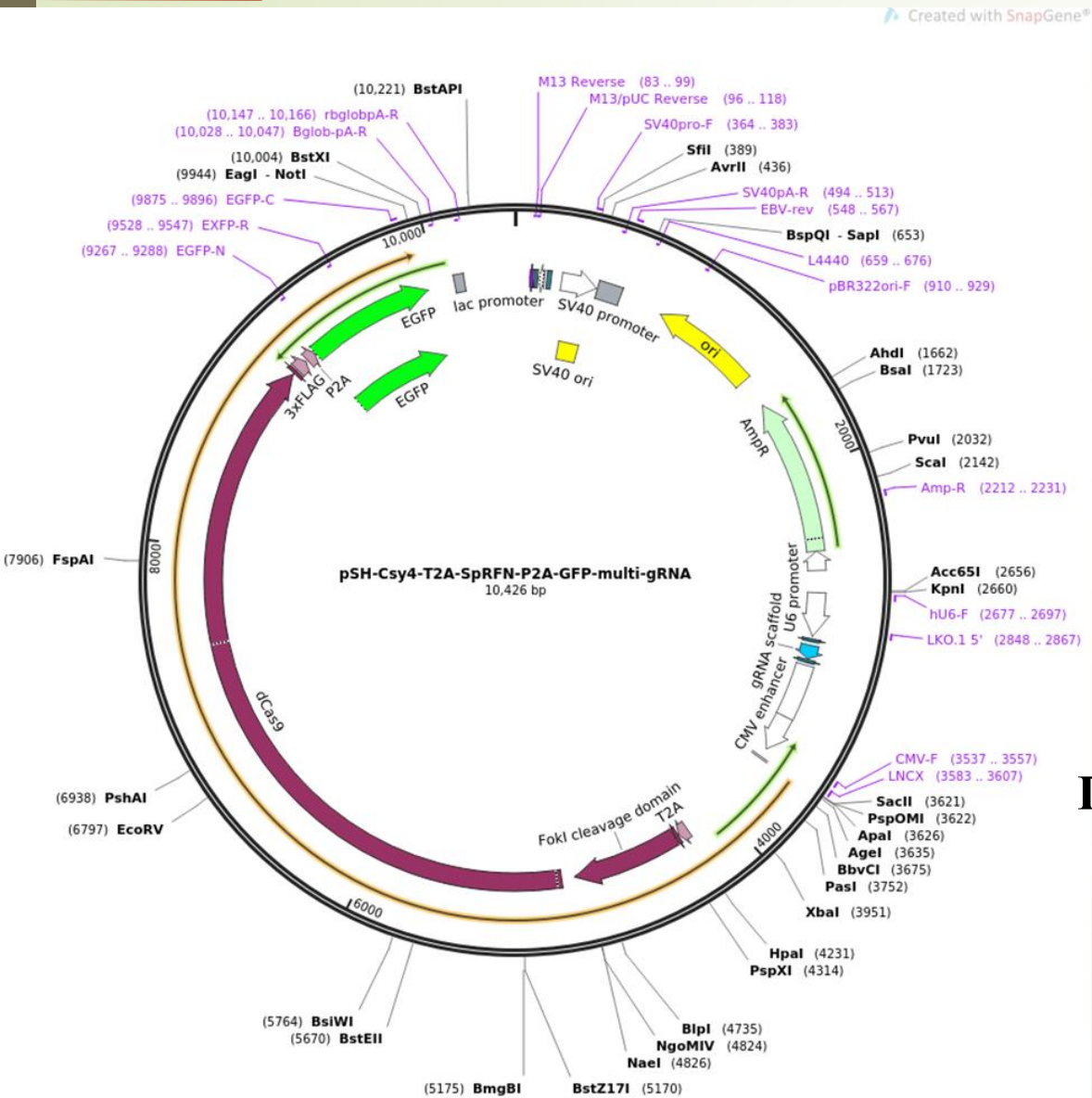
Количественные показатели культивируемых клеток перед криоконсервацией

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)

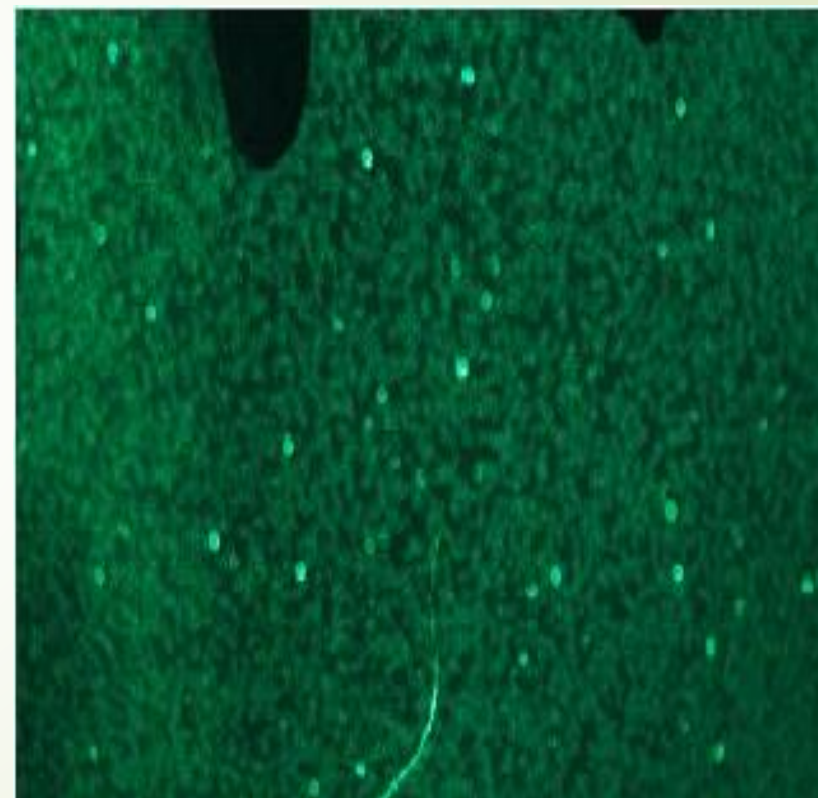
Характеристики :

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

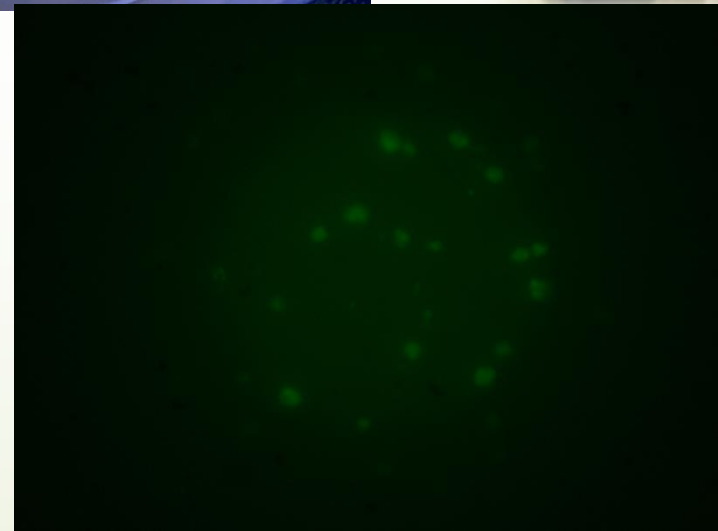
Гайдовые РНК подбирались для двух генов *MSTN* и *G0S2*

Методы трансфекции РГС

Химический (Липофектамин 3000)



Физический (Электропорация (NEON))

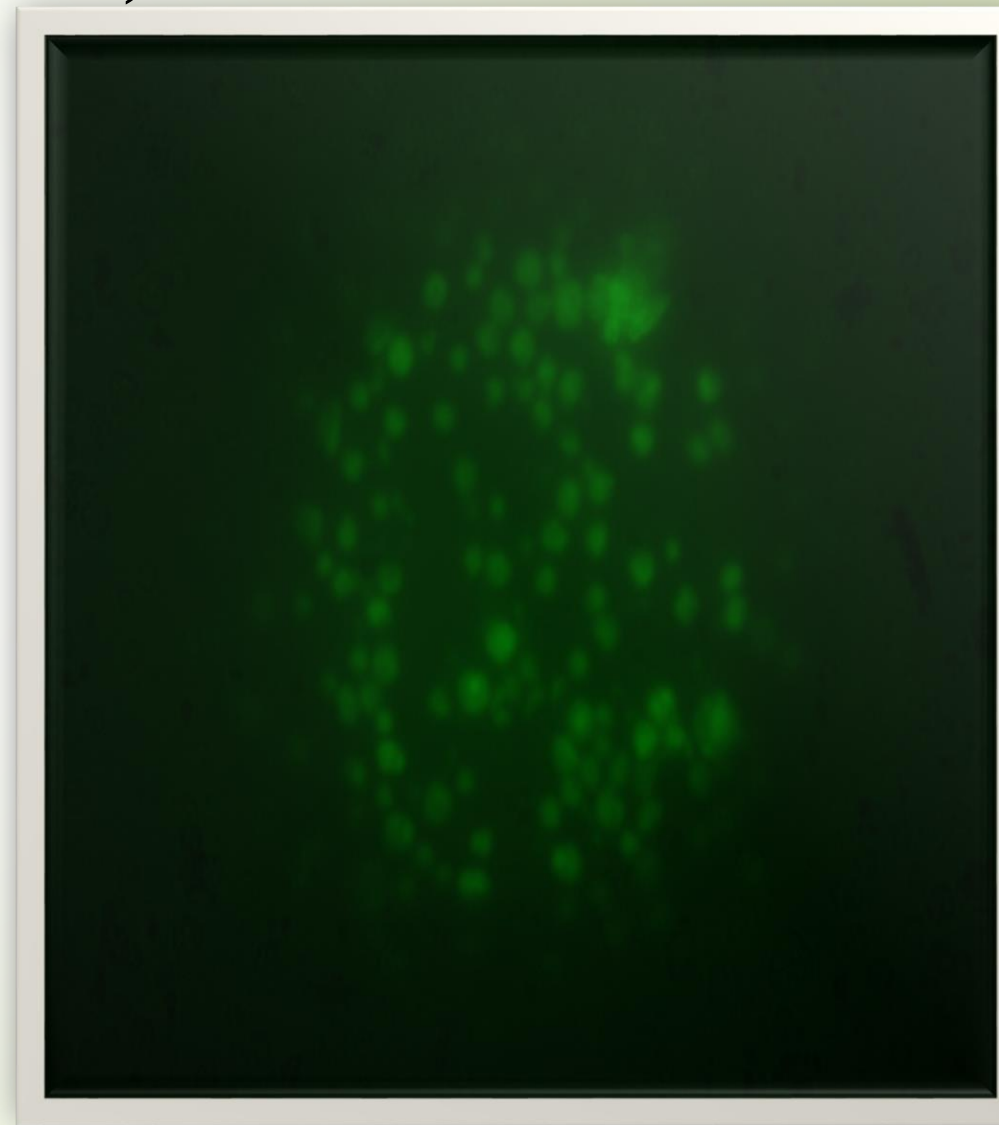
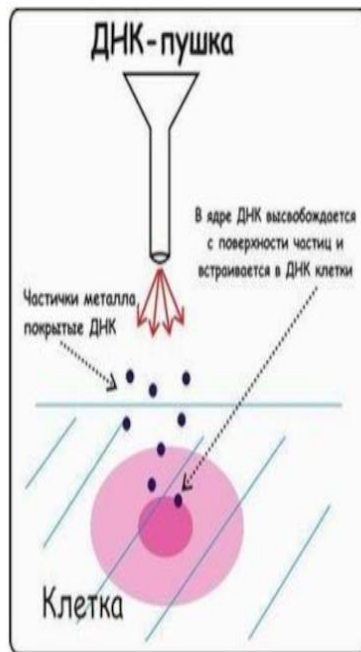


Биобаллистический метод трансфекции (Генная пушка)



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