

АДАПТАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ
НА ОСНОВЕ *in utero* ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ© 2024 г. Ю. В. Попова^{a, b, *}, В. Д. Бец^c, Е. С. Омелина^a, Л. В. Болдырева^{a, d},
Е. Н. Кожевникова^{a, b, *}^aИнститут молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090^bНовосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, 630039^cНовосибирский государственный технический университет, Новосибирск, 630073^dНаучно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, 630117

*e-mail: kozhevnikova@mcb.nsc.ru

Поступила в редакцию 12.04.2024 г.

После доработки 08.07.2024 г.

Принята к публикации 25.07.2024 г.

Для получения трансгенных лабораторных мышей требуется дорогостоящее оборудование и высококвалифицированный персонал, имеющий навыки проведения манипуляций с зиготами. Ранее в литературе был описан ряд высокоэффективных методов электропорации зигот для доставки систем геномного редактирования. Один из них – метод, названный i-GONAD (improved Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery), который заключается в редактировании генома посредством доставки нуклеиновых кислот в зиготы за счет электропорации в яйцевом *in utero*. В данной работе эта технология применена для разработки простого в использовании и экономически выгодного способа, позволяющего редактировать геном мышей с нуля с минимальными требованиями к навыкам оператора и наименьшим количеством используемых животных. Мы выбрали систему CRISPR/Cas9 в качестве инструмента редактирования генома и i-GONAD в качестве метода доставки генов для получения мутаций в гене *Il10* у мышей линии C57BL/6. Три животных (23%) из 13 родившихся детенышей имели генетические нарушения в локусе *Il10*, что указывает на применимость предложенного подхода. Данный протокол содержит подробное описание используемых методов в сочетании с рекомендациями по устранению ошибок и может представлять интерес для тех, кто стремится самостоятельно адаптировать технологию получения трансгенных мышей с нуля с минимальными затратами.

Ключевые слова: i-GONAD, редактирование генома, CRISPR/Cas9, *in utero*, мышь, трансгенная лаборатория

DOI: 10.31857/S0026898424060142, **EDN:** IAETMS

ВВЕДЕНИЕ

Редактирование генома животных включает несколько методологических особенностей, таких как анестезия/аналгезия, эмбриологические процедуры, подбор молекулярных инструментов и доставка нуклеиновых кислот. Каждый из этих аспектов предполагает выбор технических подходов, которые различаются от лабораторий к лаборатории в зависимости от предпочтений и навыков исследователей.

Развитие технологий точного редактирования генома повышает доступность получения трансгенных лабораторных животных. Для многих исследовательских групп освоение доступного метода модификации генов приведет к повышению качества научных работ в области

молекулярной биологии, генетики, персонализированной медицины и многих других направлений. Лаборатории и учреждения, имеющие многолетний опыт получения трансгенных животных, обычно следуют классическим методам трансгенеза и могут избегать технических усовершенствований. Напротив, вновь созданные команды ищут оптимальные способы выполнения редактирования генома для того, чтобы минимизировать затраты на оборудование, реагенты и время, затрачиваемое на освоение классической технологии, при этом оптимизируя количество используемых животных в соответствии с принципом 3R.

Микроинъекция в зиготы и перенос эмбрионов – наиболее трудоемкая и требующая навыков технология в редактировании генов

животных. Стоимость оборудования, необходимого для этого технического этапа, вносит наибольший вклад в общую стоимость выполнения трансгенеза. Помимо опыта и навыка микроинъекции в зиготы у оператора, требуются большие затраты на оборудование: высокотехнологичный микроскоп, микроманипуляторы, специализированные приборы для изготовления стеклянных микрокапилляров и оборудование для культивирования клеток. В последние годы электропорация эмбрионов вызывает повышенный интерес и значительно упростила доставку систем редактирования генов в зиготы, хотя она имеет существенные ограничения по сравнению с микроинъекцией. В 2015 г. Takahashi и соавт. опубликовали работу, посвященную методу редактирования генов лабораторных мышей с помощью электропорации зигот *in utero* на ранней стадии, а позже и для лабораторных крыс и хомяков [1–5]. Этот метод, названный i-GONAD (improved Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery), сокращает время получения трансгенных животных за счет отсутствия шагов по сбору, культивированию и переносу эмбрионов псевдобеременным самкам, упрощая, таким образом, доставку генов и снижая стоимость трансгенеза [6–8]. Хотя до недавнего времени метод i-GONAD редко применялся другими научными группами, он представляется привлекательной альтернативой традиционной электропорации и переносу зигот при освоении технологии трансгенеза с нуля.

В этой работе мы преследовали две основные цели: (1) определить минимальный набор оборудования, реагентов и методов, необходимых для запуска технологии геномного редактирования на мышах; (2) оценить применимость метода i-GONAD и выявить его возможные недостатки при практическом использовании. Для работы использована линия мышей C57BL/6, несмотря на ее ограниченную пригодность для таких целей, поскольку мы стремились получить трансгенные линии на генетическом фоне C57BL/6 и избежать необходимости проведения возвратных скрещиваний трансгенного потомства. Система CRISPR/Cas9 (clusters of regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9) использовалась в качестве инструмента редактирования генома для внесения генных мутаций. Представленный здесь метод подразумевает, что персонал имеет опыт обращения с мышами, навыки проведения анестезии/аналгезии, хирургических манипуляций, которые выполняются под контролем ветеринарного врача.

Наши данные свидетельствуют о том, что редактирование генома с помощью CRISPR/Cas9 в сочетании с методом доставки i-GONAD подходит для получения нокаутных генов у мышей

C57BL/6 сотрудниками без навыков проведения манипуляций с зиготами. Описанный здесь подход может представлять собой самый простой и дешевый метод модификации генов мыши с нуля (рис. 1). Однако применение метода i-GONAD может сопровождаться высокой токсичностью для эмбрионов и смертностью новорожденных, что следует учитывать при его использовании.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. Эксперименты проводились в секторе экспериментальных животных Научно-исследовательского института нейронаук и медицины (НИИНМ, Новосибирск, Россия). Выживаемость зигот и эффективность электропорации оценивали с использованием аутбредной линии CD-1: самки (n = 20; возраст 8–14 недель) и самцы (n = 8; возраст 6–20 недель). Мы использовали самок мышей CD-1, поскольку для них характерно большее количество зигот по сравнению с самками линии C57BL/6. Исследование проводилось с использованием инбредной линии C57BL/6JNskrc (наша собственная субколлония C57BL/6J): самки (n = 40; возраст 8–14 недель) и самцы (n = 8; возраст 6–20 недель).

Взрослых самок содержали группами по 4–5 животных в клетке, взрослых самцов — индивидуально. Всех животных содержали в открытых клетках с фотопериодом 12 ч/12 ч свет/темнота (00:00–12:00–00:00) в стандартных условиях. Корм для грызунов (“Биопро”, Новосибирск, Россия) и воду давали вволю в соответствии с “5010” рационом грызунов (LabDiet, 13.1% ккал жиров, 58.2% ккал углеводов, 28.7% ккал белков) [9]. Клетки беременных самок не меняли в течение двух недель, начиная за 7 дней до родов. Беременным и кормящим самкам, помимо обычного корма, давали кормовые гранулы, богатые белками и жирами (сухой корм для взрослых собак мелких пород “Опти Баланс” с курицей, “Purina Pro Plan”, США).

Реагенты, оборудование. Все реагенты и оборудование подробно описаны в Дополнительных материалах в формате протокола (дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи и на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/6/supp_Popova_rus.zip).

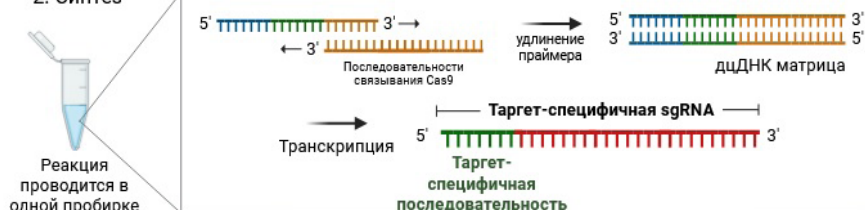
Электропоратор. В нашей работе мы используем электропоратор с прямоугольными импульсами (BEX CO LTD, кат. № CUY21EDIT2) в соответствии с [2]. Перед запуском устанавливаются следующие параметры: PdA — 100 mA; Pd on — 5.00 ms; Pd off — 50.00 ms; Pd cycle — 3; Pd V — 60 V; Decay — 10%; Decay Type: Log; mode — Square (mA) (+/–) в соответствии с [10]. Подробное описание режимов приведено в электронном приложении.

а синтез sgRNA

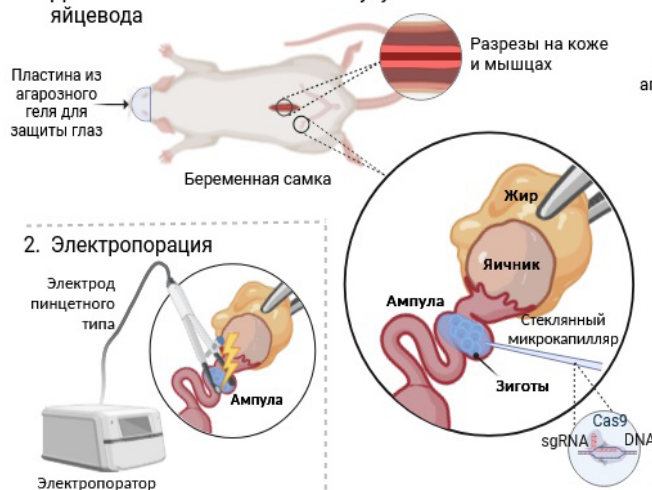
1. Дизайн таргет-специфичных праймеров



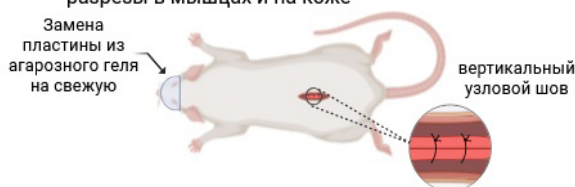
2. Синтез

**б i-GONAD**

1. Доставка комплекса RNP в ампулу яйцевода

**в Наложение швов и****послеоперационный уход**

1. Наложение вертикального узлового шва на разрезы в мышцах и на коже



2. Снижение болевого синдрома и уменьшение воспалительного процесса

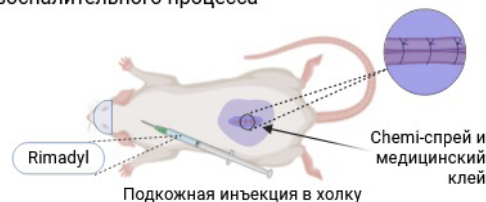


Рис. 1. Схема CRISPR/Cas9 редактирования генома в сочетании с методом i-GONAD. *а* – Синтез sgRNA (single guide RNA). *б* – Метод i-GONAD (improved Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery). *в* – Наложение швов и послеоперационные процедуры. Рисунок создан на сайте biorender.com.

Программное обеспечение. Для анализа данных секвенирования ДНК по Сэнгеру (Geospiza Inc., США) использовали программу FinchTV. Веб-инструмент CHOPCHOP использовался для разработки целевых последовательностей направляющей РНК (gRNA, guide RNA) (chopchop.cbu.uib.no). Программное обеспечение STATISTICA12 использовалось для расчета статистической значимости.

Подготовка смеси для редактирования генома. Направляющие РНК (sgРНК, single guide RNA) для гена *Il10* синтезированы с использованием олигонуклеотидов, разработанных с помощью EnGen sgRNA Synthesis Kit (“NEB”, кат. № E3322S) в соответствии с протоколом производителя (neb.com/en/protocols/2016/05/11/engen-sgrna-synthesis-kit-s-pyogenes-protocol-e3322). В результате для синтеза sgРНК использовали следующие праймеры: *Il10_ex1_sg* (для экзона 1 гена *Il10*) и *Il10_ex2_sg* (для экзона 2 гена *Il10*) (последовательности праймеров приведены в Дополнительных материалах). Синтезированные sgРНК очищали с использованием

набора Monarch RNA Cleanup Kit (“NEB”, кат. № T2040S) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию очищенных sgРНК определяли с помощью прибора NanoDrop.

Для приготовления раствора для редактирования генома 30 мкМ каждой sgРНК и 1 мг/мл белка Cas9-NLS (“NEB”, кат. № M0646T) разводили в среде Opti-MEM I Reduced Serum Medium (“ThermoFisher Scientific”, кат. № 31985062) и использовали в количестве 1,5 мкл/яйцевод для электропорации *in utero*.

Клонирование плазмид и тестирование sgРНК *in vitro*. Целевые локусы гена *Il10* были клонированы в плазмидный вектор для проверки эффективности разработанных sgРНК *in vitro*. Наборы локус-специфичных праймеров *Il10_ex1_gDNA_F/Il10_ex1_gDNA_R* и *Il10_ex2_F/Il10_ex2_gDNA_R* (последовательности праймеров приведены в Дополнительных материалах) использовали для ПЦР-амплификации геномной ДНК в 25 мкл объеме реакции. Продукты ПЦР очищали с использованием набора для вы-

деления ДНК и РНК из агарозного геля (“Биолабмикс”, кат. № N-Gel-250) и лигировали в вектор pBlueScript SK (+) при +4°C в течение ночи с использованием ДНК-лигазы T4 (“Evrogen”, кат. № LK001). Вектор предварительно расщепляли при 37°C в течение 1 ч эндонуклеазой EcoRV (“SibEnzyme”, кат. № SE-E059). 1 мкл лигирующей смеси использовали для трансформации электрокомпетентных клеток *E. coli* TOP 10. Полученные плазмидные конструкции, содержащие фрагменты экзона 1 и экзона 2 гена *Il10*, были проверены с помощью секвенирования по Сэнгеру. Плазмиды дополнительно линеаризовали эндонуклеазой ScaI (“New England Biolabs Inc.”, кат. № R3122) при 37°C в течение 1 ч перед использованием для расщепления Cas9. Реакции расщепления *in vitro* проводили в соотношении 20 : 120 : 1 (Cas9-NLS: sgРНК: линеаризованная ДНК-конструкция) в общем объеме 30 мкл при 37°C в течение 1 ч согласно инструкциям производителя (“NEB”, кат. № M0646). Каждую реакционную смесь смешивали с красителем и разделяли в 1%-ном агарозном геле, приготовленном на буфере TAE (Tris base/Acetic acid/EDTA).

Подготовка беременных самок мышей (гормональная стимуляция). Мы используем гормональную стимуляцию для суперовуляции у самок мышей линии C57BL/6, поскольку ранее было показано, что генетическая модификация в инбредных линиях мышей, представляющих интерес, таких как C57BL/6, по-прежнему является сложной задачей из-за их низкой фертильности и выживаемости эмбрионов [9]. Процедуру i-GONAD следует проводить на 0.7 день после оплодотворения (d.p.c., days post coitum) согласно [2]. Мы использовали следующий протокол, адаптированный к световому режиму нашего вивария (фотопериод 12 ч/12 ч свет/темнота, [00:00–12:00–00:00]). День 1 (11:00): внутрибрюшинно ввести PMSG (5 ME) (Prospec, кат. № HOR-272) в количестве 100 мкл/мышь. День 2 – пауза. День 3 (11:00): внутрибрюшинно ввести ХГЧ (5 ME) (Prospec, кат. № HOR-250) в количестве 100 мкл/мышь. После инъекции ХГЧ подсадить самок в клетку к самцу (1–2 самки к одному самцу). День 4 (10:00): проверить самок на наличие вагинальных пробок (признак успешного спаривания). Дальнейшие манипуляции с самками следует проводить, начиная с 12:30. По нашему опыту, самцы мышей спариваются с самками через несколько часов после подсадки в клетку, поэтому итоговое время спаривания составило примерно 0.7 d.p.c.

Для самок мышей линии CD-1 гормональная стимуляция не применялась, поскольку для них характерно большее количество зигот по сравнению с самками мышей линии C57BL/6. Для спаривания CD-1 самок помещают в клетку

к самцу (1–2 самки на одного самца). На следующий день (10:00) проверяют самок на наличие вагинальных пробок, дальнейшие манипуляции с самками производят, начиная с 12:30 (примерно 0.7 d.p.c.).

Эксперимент по электропорации *in utero* (i-GONAD). Пошаговая процедура редактирования генома CRISPR/Cas9 с инъекцией в яйцевод (анестезия и аналгезия, *in utero* инъекция и электропорация, хирургия и послеоперационный уход) подробно описана в Дополнительных материалах (см. http://www.molecbio.ru/downloads/2024/6/supp_Popova_rus.zip).

Тестирование процедуры электропорации на эмбрионах. Чтобы оценить ущерб от процедуры электропорации и потенциальную эмбриотоксичность конструкции к гену *Il10*, мы оценили выживаемость зигот *in vitro*. Животных линии CD-1 подвергали электропорации *in utero* с использованием sgРНК к гену *Il10* и Cas9 в среде Opti-MEM I Reduced Serum Medium (“ThermoFisher Scientific”, кат. № 31985062), а контрольных мышей линии CD1 подвергали электропорации с введенным раствором 1× PBS (вместо sgРНК и Cas9) в среде Opti-MEM I Reduced Serum Medium. Все манипуляции проводились на анестезированных беременных самках линии CD-1 (0.7 d.p.c.) без гормональной стимуляции. В обеих экспериментальных группах раствор вводили в ампулу яйцевода, а затем проводили процедуру электропорации (подробная процедура описана в Дополнительных материалах). Сразу после электропорации зиготы вымывали из ампулы с использованием среды EmbryoMax M2 Medium (“Sigma-Aldrich”, кат. № MR-015-D) с гиалуронидазой (“Roanal”, кат. № 08091, 10 мг/мл в среде M2). Затем зиготы помещали в среду KSOM Embryo Medium (“Sigma”, кат. № MR-101 D) на чашку Петри, покрытую минеральным маслом (“Sigma-Aldrich”, кат. № M8410–100ML). Далее зиготы инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 24 ч, после чего подсчитывали количество поделившихся клеток.

Для подтверждения эффективности процедуры электропорации в ампулу яйцевода вводили флуоресцентный краситель 4 кДа FITC-декстран (fluorescein isothiocyanate-dextran, “Sigma-Aldrich”, кат. № FD4 1G, 10 мкг/мкл, разведен в среде Opti-MEM I Reduced Serum Medium) в объеме 1.5 мкл/яйцевод с последующей электропорацией. Зиготы вымывали и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

Генотипирование потомства. При отъеме потомства (возраст 4–5 недель) от матерей брали пробы ткани ушей, и эти образцы использовали для выделения геномной ДНК

и ПЦР-генотипирования. Подробная процедура подготовки ДНК описана в Дополнительных материалах. Вкратце, образцы ушей лизировали, и ДНК очищали с использованием фракционирования хлороформом и осаждения этанолом. Для генотипирования использовали пары праймеров *I110_ex1_gDNA_F/I110_ex1_gDNA_R* и *I110_ex2_F/I110_ex2_gDNA_R* (последовательности праймеров приведены в Дополнительных материалах). Образцы геномной ДНК амплифицировали с использованием BioMaster HS-Taq PCR-Color (2×) (“Биолабмикс”, кат. № МНС010–200) в соответствии с рекомендациями производителя. Образцы ДНК интактных животных линии C57BL/6 использовали в качестве положительного контроля, а $mQ\ H_2O$ – в качестве отрицательного. Образцы ПЦР далее анализировали в 2% агарозном геле в $0.5 \times$ буфере TBE (Tris/Borate/EDTA) и выделяли из геля с использованием набора для выделения ДНК и РНК из агарозного геля (“Биолабмикс”, кат. № N-Gel-250). Полученные образцы ДНК использовали для секвенирования по Сэнгеру с использованием набора для циклического секвенирования BigDye Terminator v3.1 (“ThermoScientific”, кат. № 4337455).

Для точной идентификации геномных модификаций продукты ПЦР обрабатывали полимеразой Pfu (“SibEnzyme”, кат. № B310) при 37°C в течение 30 мин для получения тупых концов, далее очищали из геля с использованием набора для выделения ДНК и РНК из агарозного геля (“Биолабмикс”, кат. № N-Gel-250) и лигировали в вектор pBlueScript SK (+) при +4°C в течение ночи с использованием ДНК-лигазы T4 (“Evrogen”, кат. № LK001). Вектор предварительно расщепляли при 37°C в течение 1 ч эндонуклеазой EcoRV (“SibEnzyme”, кат. № SE-E059). 1 мкл лигирующей смеси использовали для трансформации электрокомпетентных клеток *E. coli* TOP 10. Полученные конструкции, содержащие фрагменты экзона 1 и экзона 2 гена *I110*, были проверены с помощью секвенирования по Сэнгеру.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ эффективности sgPНК/Cas9 in vitro

Для оценки эффективности синтезированных sgPНК проведен анализ гидролиза нуклеазой Cas9 *in vitro*. Плазмиды, содержащие локусы-мишени гена *I110*, расщеплялись эндонуклеазой ScaI, что линеаризовало векторы. После этого рибонуклеарный (RNP, ribonuclear) комплекс Cas9 расщепил векторы, в результате чего образовались два линейных фрагмента. Мы предполагаем, что эффективность ScaI близка к 100%, таким обра-

зом, негидролизированные фрагменты возникают в результате неполного расщепления комплексом RNP. Эффективность расщепления была выше для экзона 1, нацеленного на *I110_ex1_sg*, по сравнению с экзоном 2, нацеленным на *I110_ex2_sg*. Мы использовали обе sgPНК в одной смеси RNP для дальнейших процедур (рис. 2а).

Выживаемость эмбрионов после электропорации

В первую очередь было проверено влияние электропорации на развитие зигот. Для этого беременным самкам CD-1 (0.7 d.p.c.) с вагинальными пробками провели процедуры введения в ампулу яйцевода раствора, состоящего из физиологического раствора и красителя (0.4% трипановый синий), с последующей электропорацией. У контрольной группы самок данные манипуляции не проводились. После этого была проведена процедура вымывания зигот из ампулы в среду EmbryoMax Advanced KSOM Embryo Medium (“Sigma”, кат. № MR-101-D) и перенос в 6-луночный планшет для культивирования. Далее зиготы инкубировали при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч, после чего подсчитывали количество двухклеточных эмбрионов. Показано, что в контрольной группе (без электропорации) из примерно 100 живых зигот количество двухклеточных эмбрионов составляло 25–30%. В экспериментальных группах (введение раствора и электропорация или только введение раствора) процент делящихся клеток был сопоставим с контролем. Таким образом, показано, что введение раствора и электропорация не влияют на процесс деления зиготы, но сама электропорация приводила к гибели зигот примерно в 70% случаев (рис. 2б).

Затем мы проверили потенциальный токсичный эффект синтезированной нами sgPНК. Мы электропорировали яйцеводы беременных самок CD-1 (0.7 d.p.c.), в которые предварительно были введены растворы с обеими sgPНК в одной смеси RNP в среде Opti-MEM I Reduced Serum Medium либо PBS (контрольная группа), вымыли эмбрионы из ампулы яйцевода и оставили их в условиях клеточной культуры на ночь в EmbryoMax Advanced KSOM Embryo Medium. На следующий день мы обнаружили, что из примерно 100 живых зигот 22.76% делились в контрольной группе и 28.74% – в группе RNP, что указывает на то, что комплексы RNP не оказывали дополнительного токсического воздействия на эмбрионы (рис. 2б).

Далее с использованием FITC-декстрана в качестве флуоресцентного маркера-заместителя нуклеиновых кислот протестировали, подходят ли условия электропорации, опубликованные ранее, для доставки генов к эмбрионам [10].

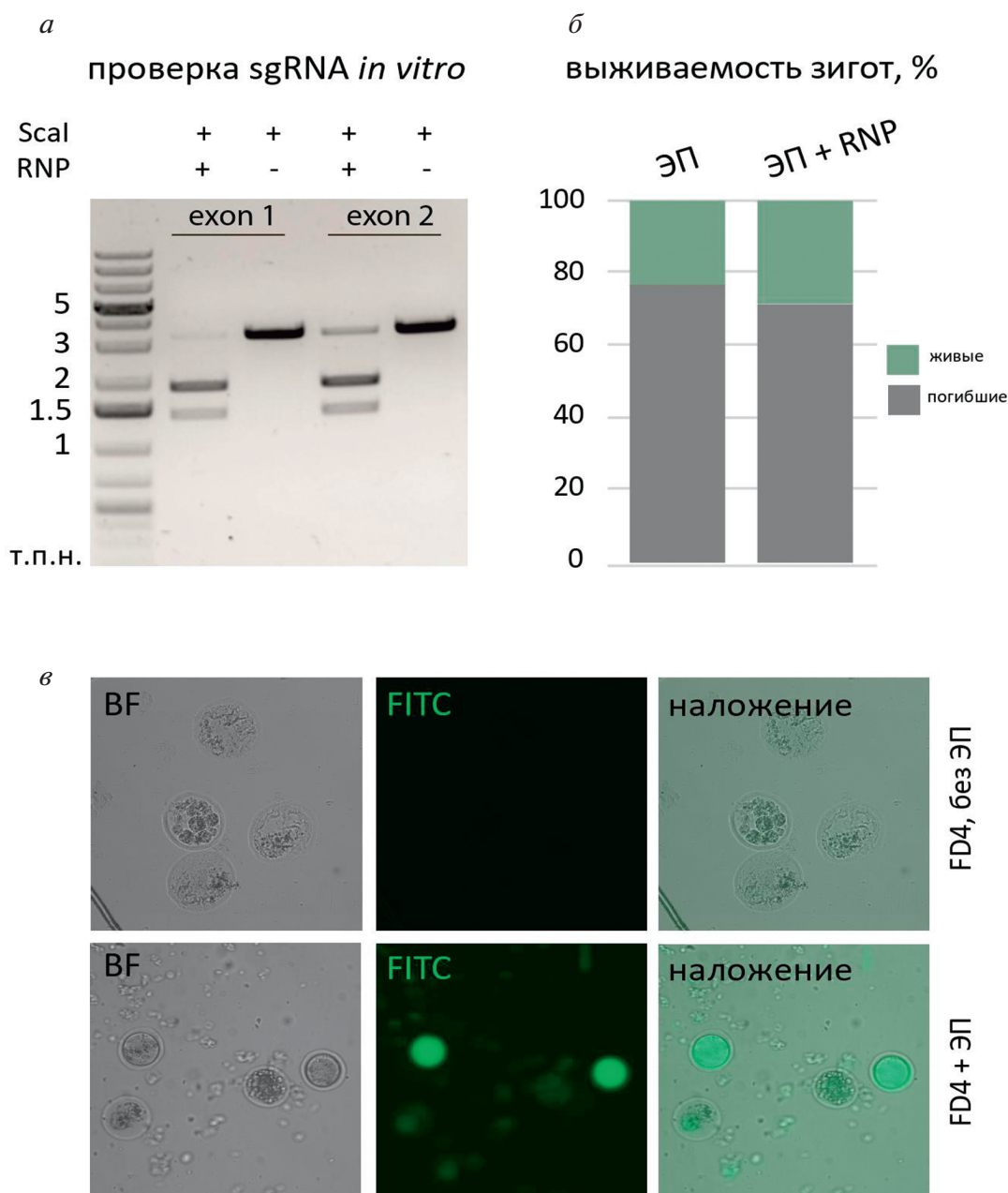


Рис. 2. Адаптация и тестирование метода i-GONAD. *а* – Тестирование sgPHK *in vitro*. Электрофорез в агарозном геле Scal-линеаризованного вектора pBlueScript SK (+), несущего фрагмент геномной области экзона 1 или экзона 2 гена *I110*. RNP – рибонуклеарные комплексы sgPHK и белка Cas9. *б* – Выживаемость зигот *in vitro* после электропорации *in utero*. ЭП – электропорация. *в* – Тест на эффективность электропорации *in utero* с использованием 4кДа FITC-декстран (FD4).

Как видно из рис. 2, электропорация приводила к накоплению сигнала FITC примерно у 40% электропорированных зигот, тогда как в контроле без электропорации сигнал не наблюдался (рис. 2в). Этот результат согласуется с ранее опубликованными данными о том, что доставка генов посредством электропорации внутриутробно не эффективна на 100% [11, 12].

Редактирование генома с использованием метода i-GONAD

Смесями RNP к гену *I110* нами были электропорированы зиготы мышей C57BL/6 *in utero*. Всего в 7 опытах использовано 40 самок в возрасте 8–14 недель и 8 самцов возрастом 6–20 недель, с половым опытом. Для всех са-

Таблица 1. Количество рожденных и выживших детенышей и эффективность трансгенеза

Эксперимент, номер	Количество использованных самок	Родившие самки	Количество родившихся детенышей	Выжившие детеныши	Детеныши с нарушениями в области гена <i>II10</i>
1	5	0	0	0	
2	5	0	0	0	
3	5	1	3	3	
4	5	3	22	0	
5	10	5	26	7	2 (в экзоне 2)
6	7	2	4	0	
7	3	1	3	3	1 (в экзоне 1)
Всего	40	12 (30%)	58	13 (22.4%)	3 (23% от выживших детенышей)

мок C57BL/6 выполнена процедура гормональной суперовуляции перед спариванием. Из 40 самок только 12 особей (30%) дали потомство, что отражает высокий уровень смертности эмбрионов после электропорации, как мы наблюдали в приведенном выше тестировании *in vitro*. Самки родили 58 детенышей, из которых выжили только 13 (22.4%), а прочие погибли в результате каннибализма со стороны матерей (табл. 1).

Из выживших 13 детенышей у 3 (23%) была нарушена область гена *II10*, соответствующая сайту связывания sgPНК и ниже него. У одного детеныша (#58) отмечены нарушения в экзоне 1 гена *II10*, а у двух других (#27 и #32) обнаружены нарушения в экзоне 2 (рис. 3), однако геномных делеций между экзоном 1 и экзоном 2 не произошло.

Решение проблем

В первом эксперименте процедура i-GONAD проведена согласно [2], но вместо изофлурановой анестезии использовали схему анестезии “Домитор + Золетил” (“Orion Pharma”, Финляндия; “Virbac”, Франция), подробно приведенную в методах (см. Дополнительные протоколы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/6/supp_Popova_rus.zip). Однако в пилотном эксперименте не удалось получить беременных самок. Мы не связываем эту неудачу с анестезией, поскольку она успешно использовалась многими научными группами [13–15]. По результатам первого эксперимента был отмечен ряд проблем: 1) шерсть мыши попадала в рану; 2) прооперированные мыши быстро снимали швы; 3) роговица глаз мышей высыхает во время операции, несмотря на использование крема для глаз, как предложено в опубликованных протоколах.

Таким образом, ко второму эксперименту, были оптимизированы следующие процедуры.

1. Сбривалась шерсть на месте проведения операции, чтобы избежать ее попадания в рану как при разрезе кожи, так и при наложении швов. Отмечено, что сбривание шерсти вокруг места разреза положительно влияет на заживление ран.

2. Для снижения риска снятия швов мышами в первые часы после операции для защиты шва наносили медицинский клей “БФ-6” (“Вертекс”, Россия). Для улучшения заживления ран использовали “Chemi” спрей – противовоспалительный и антибактериальный препарат (“Industrial Veterinaria S.A. Invesa”, Испания). Поскольку мыши могут снимать швы из-за болевого синдрома, для уменьшения боли мы использовали обезболивающий и противовоспалительный препарат “Rimadyl” (“Zoetis”, Бразилия).

3. Для снижения риска высыхания роговицы глаза во время операции и наркоза использовали пластины из агарозного геля, чтобы защитить глаза животных от повреждений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Собственное производство трансгенных животных может быть полезным для научных групп, специализирующихся на генетике и физиологии животных, а также для тех, кто стремится получить уникальные линии, например персонализированные модели животных. Однако это возможно только в том случае, если технология редактирования генома будет достаточно простой, чтобы ее можно было внедрить в повседневную жизнь лаборатории, работающей на животных. Кроме того, доступный трансгенез мышей не должен требовать длинного списка дополнительного дорогостоящего оборудования и соответствовать бюджету лаборатории.

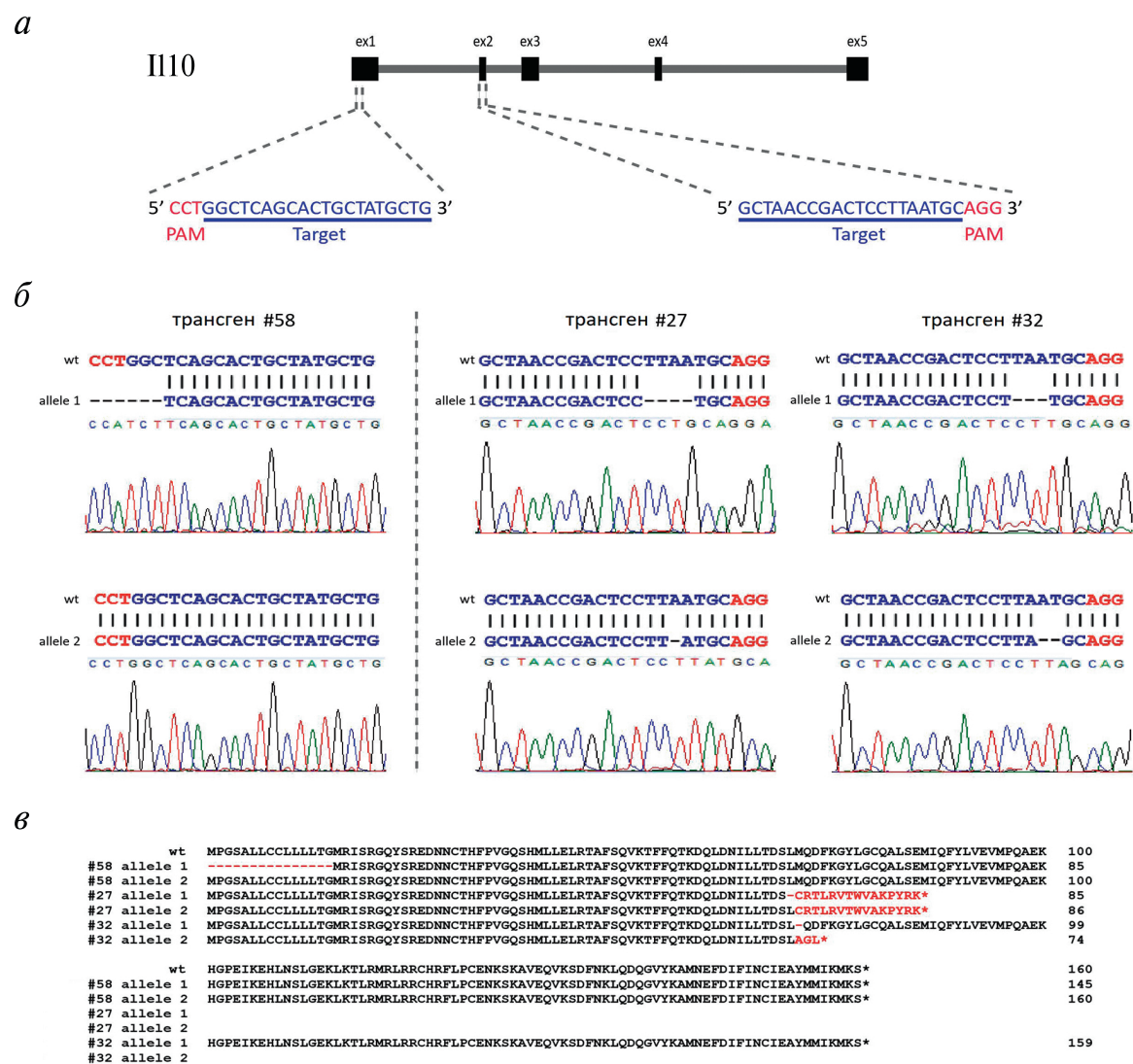


Рис. 3. Генотипирование потомства. *a* – Схематическая иллюстрация локуса *I110* дикого типа. Экзоны (от *ex1* до *ex5*) и интроны обозначены черными прямоугольниками и серой линией соответственно. Две целевые последовательности (*ex1* и *ex2*) подчеркнуты и показаны синим цветом. Последовательности мотива, примыкающего к протоспейсеру (PAM), показаны красным. Прямое секвенирование по Сэнгеру геномных регионов гена *I110* в потомстве F1. Трансген #58 имеет нарушения в Экзоне 1, два других (#27 и #32) – в экзоне 2 гена *I110*. *б* – Сравнение аминокислотных последовательностей гена *I110* дикого типа и потомства после i-GONAD. Контрольная аминокислотная последовательность белка *I110* дикого типа показана сверху. Аминокислотные последовательности мутированных белков *I110* (полученных из трансгенов #58, #27 и #32) показаны ниже. Прогнозируемые последствия мутации аминокислотных последовательностей выделены красным. Стоп-кодоны обозначены *.

Технология CRISPR/Cas9 значительно упростила производство трансгенных животных, поскольку повысила точность редактирования генов и устранила необходимость в эмбриональных стволовых клетках [16]. В то же время в основе трансгенеза лежит трудоемкий этап введения молекулярных смесей в пронуклеус, требующий высокой квалификации сотрудников и дорогостоящего оборудования. В настоящий момент этот метод доставки ак-

тивно заменяется электропорацией зигот, что существенно упрощает метод трансгенеза [17]. Тем не менее, этот подход по-прежнему требует эвтаназии самок-доноров зигот, требует дополнительной группы вазэктомизированных самцов для получения псевдобеременных самок-реципиентов и требует культивирования эмбрионов *in vitro*. Эти аспекты приводят к дополнительным затратам и усилиям, кото-

рые ограничивают широкое распространение редактирования генома мыши.

Используемый здесь метод i-GONAD преодолевает вышеуказанные ограничения и делает трансгенез доступным практически для любой лаборатории, которая уже работает с мышами. Эффективность этого метода доказана на нескольких видах животных и различных линиях мышей [1–4]. На наш взгляд, некоторые стандартные опубликованные параметры электропорации оказались токсичными для эмбрионов [2]. Imai и его коллеги предлагают использовать 3 импульса переноса вместо 6, предложенных первоначально, для увеличения выживаемости эмбрионов у разных линий мышей, однако этот подход не был адаптирован для модификации генома мышей наиболее востребованной линии C57BL/6 [18].

Высокий уровень каннибализма самок по отношению к новорожденным детенышам — еще одна техническая проблема, с которой мы столкнулись в этом исследовании. Каннибализм распространен среди широко используемых инбредных штаммов, таких как C57BL/6 и BALB/c (около 32%), тогда как для некоторых генетически модифицированных штаммов этот риск еще выше (50%) [19, 20]. В нашей виварии самки демонстрируют схожий уровень каннибализма (около 30%). В i-GONAD экспериментах мы наблюдали необычно высокий уровень каннибализма среди подопытных самок, так что около 75% детенышей не выжили в первые дни жизни, что согласуется с опубликованными ранее данными [20]. Пока готовилась к публикации эта работа, Melo-Silva и соавт. опубликовали свои результаты по адаптации метода i-GONAD для линии C57BL/6, где они описывают аналогичные проблемы [9]. Авторы предлагают совместное содержание синхронизированных беременных мышей C57BL/6 с беременными самками-компаньонами линии FVB/NJ, чтобы последние способствовали выживанию детенышей [9]. Это может стать отличным дополнением к представленному здесь описанию метода, поскольку может значительно повысить эффективность i-GONAD.

Важно отметить, что между двумя сайтами-мишенями для Cas9 (экзон 1 и экзон 2 гена *Il10*) геномных делеций не произошло несмотря на то, что были использованы обе sgРНК одновременно. Это предполагает низкую частоту двуцепочечных разрывов после расщепления Cas9. Факторы доступности ДНК, а также несовершенный дизайн sgРНК могут быть причиной того, что мы не наблюдали двуцепочечных разрывов и геномных делеций. Также важно учитывать факторы, которые максимизируют расщепление желаемой целевой последователь-

ности или целевой активности. Например, sgРНК с нуклеотидом G на 1 п.н. выше РАМ могут быть более эффективными, чем sgРНК с C в том же положении, даже если оба они идеально соответствуют целевой последовательности. Таким образом, улучшение выбора sgРНК может повысить эффективность и удобство использования описанных параметров.

В целом, предложенный здесь подход может обеспечить эффективный и относительно простой старт для лаборатории, у которой не было предыдущего опыта проведения эмбриологических процедур на мышах или опыта получения трансгенных животных.

Мы благодарим организаторов и докладчиков практического курса ЕМВО 2019 по геномной инженерии мышей, проводимого в Институте молекулярно-клеточной биологии и генетики Макса Планка (Дрезден, Германия), за то, что они поделились своим опытом в области электропорации зигот и редактирования генома мышей.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-26-20045).

Все процедуры проводились в соответствии с российским законодательством и со стандартами надлежащей лабораторной практики (директива Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 г.), рекомендациями биоэтического комитета и Европейской конвенции по защите позвоночных животных. Все процедуры одобрены Биоэтическим комитетом НИИМ, протокол № 5 от 16.02.2023 г. Все результаты публикуются в соответствии с рекомендациями ARRIVE [21].

Авторы подтверждают, что не имеют конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takahashi G., Gurumurthy C.B., Wada K., Miura H., Sato M., Ohtsuka M. (2015) GONAD: Genome-editing via oviductal nucleic acids delivery system: a novel microinjection independent genome engineering method in mice. *Sci. Rep.* **5**, 11406. <https://doi.org/10.1038/srep11406>
2. Ohtsuka M., Sato M., Miura H., Takabayashi S., Matsuyama M., Koyano T., Arifin N., Nakamura S., Wada K., Gurumurthy C.B. (2018) I-GONAD: A robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases. *Genome Biol.* **19**, 25. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1400-x>
3. Sato M., Nakamura S., Inada E., Takabayashi S. (2022) Recent advances in the production of genome-edited rats. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(5), 2548. <https://doi.org/10.3390/ijms23052548>

4. Hirose M., Tomishima T., Ogura A. (2023) Editing the genome of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Meth. Mol. Biol.* **2637**, 247–254. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3016-7_19
5. Namba M., Kobayashi T., Koyano T., Kohno M., Ohtsuka M., Matsuyama M. (2021) GONAD: A new method for germline genome editing in mice and rats. *Dev. Growth. Differ.* **63**(8), 439–447. <https://doi.org/10.1111/dgd.12746>
6. Kobayashi Y., Aoshima T., Ito R., Shinmura R., Ohtsuka M., Akasaka E., Sato M., Takabayashi S. (2020) Modification of i-GONAD suitable for production of genome-edited C57BL/6 inbred mouse strain. *Cells*. **9**(4), 957. <https://doi.org/10.3390/cells9040957>
7. Shang R., Zhang H., Bi P. (2021) Generation of mouse conditional knockout alleles in one step using the i-GONAD method. *Gen. Res.* **31**(1), 121–130. <https://doi.org/10.1101/gr.265439.120>
8. Sato M., Nakamura A., Sekiguchi M., Matsuwaki T., Miura H., Gurumurthy C.B., Kakuta S., Ohtsuka M. (2023) Improved genome editing via oviductal nucleic acids delivery (i-GONAD): Protocol steps and additional notes. *Meth. Mol. Biol.* **2631**, 325–340. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2990-1_14
9. Melo-Silva C.R., Knudson C.J., Tang L., Kafle S., Springer L.E., Choi J., Snyder C.M., Wang Y., Kim S.V., Sigal L.J. (2023) Multiple and consecutive genome editing using i-GONAD and breeding enrichment facilitates the production of genetically modified mice. *Cells*. **12**(9), 1343. <https://doi.org/10.3390/cells12091343>
10. Gurumurthy C.B., Sato M., Nakamura A., Inui M., Kawano N., Islam M.A., Ogiwara S., Takabayashi S., Matsuyama M., Nakagawa S., Miura H., Ohtsuka M. (2019) Creation of CRISPR-based germline-genome-engineered mice without ex vivo handling of zygotes by i-GONAD. *Nat. Protoc.* **14**(8), 2452–2482. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0187-x>
11. Garcia-Frigola C., Carreres M.I., Vegar C., Herrera E. (2007) Gene delivery into mouse retinal ganglion cells by in utero electroporation. *BMC Dev. Biol.* **7**, 103. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-103>
12. Shinmyo Y., Tanaka S., Tsunoda S., Hosomichi K., Tajima A., Kawasaki H. (2016) CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using in utero electroporation. *Sci. Rep.* **6**, 20611. <https://doi.org/10.1038/srep20611>
13. Book Reviews. (2002) *J. Vet. Med. Educ.* **29**, 245–246. <https://doi.org/10.3138/jvme.29.4.245>
14. Cagle L.A., Franzi L.M., Epstein S.E., Kass P.H., Last J.A., Kenyon N.J. (2017) Injectable anesthesia for mice: combined effects of dexmedetomidine, tiletamine-zolazepam, and butorphanol. *Anesthesiol. Res. Pract.* **2017**, 9161040. <https://doi.org/10.1155/2017/9161040>
15. Limprasutr V., Sharp P., Jampachaisri K., Pacharinsak C., Durongphongtorn S. (2021) Tiletamine/zolazepam and dexmedetomidine with tramadol provide effective general anesthesia in rats. *Animal Model Exp. Med.* **4**(1), 40–46. <https://doi.org/10.1002/ame2.12143>
16. Cohen J. (2016) “Any idiot can do it.” Genome editor CRISPR could put mutant mice in everyone’s reach. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aal0334>
17. Modzelewski A.J., Chen S., Willis B.J., Lloyd K.C.K., Wood J.A., He L. (2018) Efficient mouse genome engineering by CRISPR-EZ technology. *Nat. Protoc.* **13**(6), 1253–1274. <https://doi.org/10.1038/nprot.2018.012>
18. Imai Y., Tanave A., Matsuyama M., Koide T. (2022) Efficient genome editing in wild strains of mice using the i-GONAD method. *Sci. Rep.* **12**(1), 13821. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17776-x>
19. Weber E.M., Algers B., Würbel H., Hultgren J., Olsson I.A.S. (2013) Influence of strain and parity on the risk of litter loss in laboratory mice. *Reprod. Domest Anim.* **48**(2), 292–296. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02147.x>
20. Carter D.B., Kennett M.J., Franklin C.L. (2002) Use of perphenazine to control cannibalism in DBA/1 mice. *Comp. Med.* **52**(5), 452–455.
21. Du Sert N.P., Hurst V., Ahluwalia A., Alam S., Avey M.T., Baker M., Browne W.J., Clark A., Cuthill I.C., Dirnagl U., Emerson M., Garner P., Holgate S.T., Howells D.W., Karp N.A., Lazic S.E., Lidster K., MacCallum C.J., Macleod M., Pearl E.J., Petersen O.H., Rawle F., Reynolds P., Rooney K., Sena E.S., Silberberg S.D., Steckler T., Würbel H. (2020) The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* **18**(7), e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>

Adapting Mouse Genome Editing Technique from Scratch Using *in utero* Electroporation

J. V. Popova^{1,2}, V. D. Bets³, E. S. Omelina¹, L. V. Boldyreva^{1,4}, E. N. Kozhevnikova^{1, 2, *}

¹*Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch,
Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, 630039 Russia*

³*Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, 630073 Russia*

⁴*Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, 630117 Russia*

**e-mail: kozhevnikova@mcb.nsc.ru*

Mouse genome modification requires costly equipment and highly skilled personnel to manipulate zygotes. A number of zygote electroporation techniques were reported to be highly efficient in gene delivery. One of these methods called i-GONAD (improved Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery) describes electroporation-based gene transfer to zygotes *in utero*. Here we adopted this technology to develop an easy-to-use and cost-effective pipeline enabling mouse genome-editing from scratch with minimal requirements to operator skills and animal use. We chose the CRISPR/Cas9 system as a genome editing tool and i-GONAD as a gene delivery method to produce *Il10* knockout in C57BL/6 mice. Three animals out of 13 delivered pups (23%) were genetically compromised at *Il10* locus suggesting the feasibility of the approach. This protocol provides detailed description of the used technical settings paired with troubleshooting tips and could be of interest to those who aim at establishing in-house mouse transgenesis pipeline at minimal equipment cost from scratch.

Keywords: i-GONAD, genome editing, CRISPR/Cas9, *in utero*, mouse, transgenic laboratory