

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 НА ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНАХ МЫШИ

Т. В. Димитриева¹✉, Д. А. Решетов¹, В. Е. Жерновков¹, Д. В. Влодавец³, Е. Д. Зотова¹, Т. Г. Ермолкевич^{1,2}, А. В. Дейкин^{1,2}

¹ Marlin Biotech, Москва

² Центр коллективного пользования, Институт биологии гена Российской академии наук, Москва

³ Кафедра неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики, педиатрический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Генно-модифицированные животные — важный инструмент биомедицинских исследований. Для их получения все чаще используют систему редактирования генома CRISPR/Cas9. С помощью микроинъекции комплекс РНК-гида и белка Cas9 доставляется в оплодотворенную яйцеклетку, из которой впоследствии развивается животное с модификацией в геноме. Как правило, анализ специфичности и эффективности системы в каждом случае проводят после получения потомства с вероятной мутацией. Однако анализ на предимплантационной стадии позволил бы сократить время эксперимента, а также понять причину рождения малого числа или даже отсутствия трансгенных особей в потомстве. В статье предложена модификация метода подготовки тотальной ДНК из бластоцист мыши, позволяющая проще и быстрее детектировать результаты микроинъекций комплекса CRISPR/Cas9 в зиготу. Применив описанный в статье метод, мы успешно идентифицировали короткие делеции в интроне 34 гена дистрофина (*DMD*) в 12 из 13 обработанных эмбрионов и вставку по месту разрыва в интроне 8 гена *DMD* в 11 из 21 проанализированных образцов. Используя приготовленную предложенным способом тотальную ДНК, можно анализировать до 20 различных сайтов в геноме мышинного эмбриона на стадии бластоцисты, не прибегая к полногеномной амплификации.

Ключевые слова: редактирование генома, CRISPR/Cas9, короткие вставки нуклеотидов, делеции нуклеотидов, эмбрионы мыши, миодистрофия Дюшенна

Благодарности: авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования Института биологии гена РАН за предоставленное для экспериментов оборудование.

✉ **Для корреспонденции:** Димитриева Татьяна Владимировна
119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5; dimitrieva.ta@gmail.com

Статья поступила: 16.06.2016 **Статья принята к печати:** 21.06.2016

MODIFICATION OF THE METHOD FOR ANALYSIS OF GENOME EDITING RESULTS USING CRISPR/CAS9 SYSTEM ON PREIMPLANTATION MOUSE EMBRYOS

Dimitrieva TV¹✉, Reshetov DA¹, Zhernovkov VE¹, Vlodavets DV³, Zotova ED¹, Ermolkevich TG^{1,2}, Deykin AV^{1,2}

¹ Marlin Biotech, Moscow, Russia

² Shared Resource Center, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Department of Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics, Faculty of Pediatrics, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Genetically modified animals are an important tool for biomedical research. The CRISPR/Cas9 editing genome system is increasingly being used for production of such animals. Through microinjection, complex with guide RNA and Cas9 protein is delivered in fertilized eggs from which the animal subsequently develops with a modification in the genome. Generally, analysis of the specificity and efficiency of the system in each case is carried out after obtaining a progeny with the likely mutation. However, analysis at the preimplantation stage would allow reducing the time of the experiment, as well as understanding the reason for the birth of a small number of transgenic animals, or even lack of them in the offsprings. The paper proposes a modification of the method of preparation of total DNA from mouse blastocysts. The modification allows to easier and faster detect the results of microinjection of the CRISPR/Cas9 complex in the zygote. Having applied the method described in this paper, we successfully identified short deletions in intron 34 of dystrophin gene (*DMD*) in 12 out of 13 treated embryos and insertion in the break site in intron 8 of the *DMD* gene in 11 out of 21 samples analyzed. Using for analysis the total DNA prepared by the method proposed, you can analyze up to 20 different sites in the mouse embryo genome at the blastocyst stage without the need for full genomic amplification.

Keywords: genome editing, CRISPR/Cas9, short nucleotide insertions, nucleotide deletions, mouse embryos, Duchenne muscular dystrophy

Acknowledgement: authors thank the Shared Resource Center of the Institute of Gene Biology of Russian Academy of Sciences for the equipment provided for this research.

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana Dimitrieva
ul. Vavilova, d.34/5, Moscow, Russia, 119334; dimitrieva.ta@gmail.com

Received: 16.06.2016 **Accepted:** 21.06.2016

Генно-модифицированные организмы — незаменимый инструмент для исследования функций генов и некодирующих последовательностей, взаимодействия регуляторных последовательностей в геноме и экспрессии рекомбинантных белков, а также для моделирования заболеваний человека. До недавнего времени получение генно-модифицированных животных являлось очень длительным и дорогостоящим и потому практически недоступным для многих групп ученых, однако все изменилось с появлением новых систем редактирования генома. В 2013 г. была опубликована первая статья о применении системы CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9) — методики, позволяющей в один прием инактивировать несколько генов [1]. Система включает РНК, содержащую регулярные кластеры коротких палиндромных повторов (CRISPR), транс-активирующую РНК и белок Cas9 (нуклеазу). Этот комплекс, который в природе выполняет роль иммунитета бактерий против паразитирующих на них фагов [2], был приспособлен для редактирования ДНК как *in vitro*, так и в клетках млекопитающих [3]. Белок Cas9 эффективно вносит двуцепочечный разрыв в трех нуклеотидах от PAM-сайта (protospacer adjacent motif) — NGG, который расположен сразу за последовательностью, комплементарной РНК-гиду длиной 19 нуклеотидов [4]. На место разрыва клеточная система репарации генома вносит короткие делеции или вставки. При одновременном добавлении конструкций, содержащих последовательности, гомологичные области вокруг разрыва, происходит гомологичная репарация и возможна вставка желаемого фрагмента в геном по определенному сайту [5]. Данный подход используется для вставки экспрессионной кассеты по месту внесения разрыва (knock-in). Открытие системы редактирования генома CRISPR/Cas9 произвело настоящую революцию в получении генно-модифицированных животных, сократив продолжительность экспериментов с нескольких лет до нескольких месяцев. С помощью микроинъекций в пронуклеус зиготы комплекса РНК-гида с белком Cas9 уже были получены генно-модифицированные мыши [6, 7], крысы [7], обезьяны [8] и др.

Система CRISPR/Cas9 была неоднократно успешно применена для моделирования заболеваний человека на мышах [9–11]. При создании таких моделей важно провести модификацию в строго определенном сайте, не нарушив работу остальных генов. Проблема неспецифической модификации очень актуальна, и, несмотря на существование множества биоинформатических программ, позволяющих подбирать РНК-гиды к заданным сайтам и оценивать их эффективность и специфичность, остается вероятность внесения нежелательных мутаций по нецелевым (off target, OT) сайтам [6]. Предсказанные OT-сайты, как правило, анализируют на наличие мутаций и делают это уже после рождения трансгенного потомства, т. е. минимум через три недели после проведения микроинъекций, в то время как анализ на стадии бластоцисты позволил бы оценить специфичность вносимых модификаций заранее.

Однако методы, чаще всего используемые для амплификации ДНК предимплантационных эмбрионов, не позволяют проанализировать несколько участков генома [12]. Сейчас для анализа нескольких сайтов в геноме мышинных эмбрионов применяют полногеномную амплификацию перед постановкой полимеразной цепной реакции (ПЦР) или проводят два раунда ПЦР [13]. Такой подход приводит к появлению как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов ввиду низкого содержания ДНК в исходном образце [14], а высокая стоимость реактивов для полногеномной амплификации вынуждает исследователей анализировать меньшее число эмбрионов.

В статье мы описываем метод приготовления тотальной ДНК из одного эмбриона мыши на стадии бластоцисты, который упрощает, ускоряет и удешевляет процесс получения генно-модифицированных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На первом этапе исследования оценивали эффективность нескольких методов лизиса бластоцист. Эксперименты проводили в трех повторностях с момента получения оплодотворенных яйцеклеток, при этом для каждого метода использовали не менее 20 бластоцист. Параллельно изучали влияние метода подготовки бластоцист к лизису и определяли минимальное количество лизата для амплификации (три эксперимента). Затем проводили эксперименты по анализу эффективности редактирования генома комплексом CRISPR/Cas9 (детекция коротких вставок и делеций, выявление целевой вставки в геном) с использованием метода лизиса, показавшего в предыдущих экспериментах лучший результат. РНК-гиды подбирали для интронов 8 и 34 гена дистрофина (*DMD*), мутации в котором вызывают развитие миодистрофии Дюшенна.

Подбор и синтез РНК-гидов

Подбор РНК-гидов проводили с помощью онлайн-ресурса CHOPCHOP [15]. Для синтеза РНК-гида использовали два частично комплементарных олигонуклеотида — SgR (содержит T7-промотор) и Sg31 (кодирует сайт g31 в геноме) или SgR и Sg34 (кодирует сайт g34 в геноме). Праймеры были синтезированы компанией «Евроген» (Россия), их последовательности представлены в таблице.

Для получения ДНК-матрицы олигонуклеотиды смешивали в эквимольном соотношении и амплифицировали в термоциклере T100 (BioRad, США) по программе: 95 °C — 1 мин; 30 циклов 95 °C — 30 с, 65 °C — 30 с, 72 °C — 30 с; 72 °C — 5 мин, используя набор реагентов GenPack PCR-core kit («Изоген», Россия). Матрицу очищали от продуктов реакции с помощью набора реагентов CleanUp Kit («Евроген», Россия) по протоколу производителя, РНК-гид синтезировали с помощью набора реагентов RiboMax express (Promega, США) и выделяли из реакционной смеси фенол-хлороформной экстракцией с последующим

Последовательности олигонуклеотидов

Название	Последовательность 5'-3'
g31	GTGGCAGACTAGTAGTTTG
g34	GTAAGACTCGGCAGTTAAG
SgR	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTCTAGCTCTAAAAC
sg31-HDRt	GTAGATAGAATAGTTTATTGGTGATCTCAACCATGGATCCACTACTAGTCTGCCACTGAGAAAAGAGAAG

осаждением в изопропанол [16]. РНК-гид растворяли в воде, свободной от нуклеаз, измеряли концентрацию на приборе NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, США) и хранили при -70°C .

Для экспериментов по обнаружению вставки в месте разрыва синтезировали матрицу для репарации — одноцепочечный олигонуклеотид длиной 70 нт, состоящий из двух перекрывающихся сайтов рестрикции для ферментов NcoI и BamHI, окруженных плечами гомологии протяженностью 30 нт с каждой стороны. В PAM-сайт были внесены замены, чтобы предотвратить связывание РНК-гида с матрицей для репарации (sg31-HDRt, последовательность представлена в таблице). Синтез был выполнен компанией «Евроген».

Микроинъекции в пронуклеус зиготы и культивирование эмбрионов

У неполовозрелых самок мышей гибридной линии C57BL6 x CBA весом 12–13 г вызывали суперовуляцию введением сначала 5 ед. гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСКЖ) и затем через 46–48 ч — 5 ед. хорионического гонадотропина человека (ХГЧ). После инъекции самку сразу подсаживали в клетку к самцу-производителю для спаривания. Овуляция происходила через 11–14 ч после инъекции ХГЧ. Оплодотворенные яйцеклетки вымывали хирургически через 12–13 ч после копуляции (середина темного периода освещения), т. е. через 25–27 ч после инъекции ХГЧ.

Комплекс редактирования генома микроинъекцировали преимущественно в мужской пронуклеус зигот мыши на стадии двух пронуклеусов. Зиготы помещали в камеру, состоящую из двух покровных стёкол, закрепленных одно над другим так, что верхний и нижний край капли среды M2 (MTI-GlobalStem, США) были плоскими и параллельными. Визуализировали пронуклеусы с помощью дифференциального интерференционно-контрастного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия). Иглы для микроинъекции готовили из стеклянных капилляров G100 (Narishige, Япония) на пуллере P97 (Shutter Instruments, США), капилляры-держатели — из капилляров GD1 (Narishige) на пуллере PC-10 (Narishige) и микрокузнице MF-900 (Narishige).

Для микроинъекций РНК-гид (50 нг/мкл) смешивали с белком Cas9 (0,1 пМ; NEB, Великобритания) в буфере TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,1 mM EDTA) и в зависимости от эксперимента — с матрицей для репарации (3 пМ; «Евроген», Россия). Компоненты смешивали непосредственно перед проведением микроинъекций и инкубировали 5 мин при 37°C для образования комплекса.

После микроинъекции зиготы культивировали в течение 2–3 ч в CO_2 -инкубаторе IGO 150 (Thermo Electron Corporation, Франция) при содержании углекислого газа в воздухе 5 % и 100%-й влажности, затем оценивали их визуально и те из них, что находились в удовлетворительном состоянии, оставляли на 3 дня в KSOM-буфере (MTI-GlobalStem, США) для формирования бластоцист. Культивирование проходило в чашках Петри диаметром 35 мм в каплях объемом 50–60 мкл. Сверху капли покрывали легким минеральным маслом категории embryo tested. Все подготовительные процедуры осуществляли в ламинарном боксе.

Подготовка препарата тотальной ДНК бластоцисты и ПЦР-амплификация целевого фрагмента

Под микроскопом каждый эмбрион в объеме 1 мкл последовательно переносили через 3 капли воды для ПЦР

(«Евроген») с помощью автоматической пипетки и наконечников с фильтрами и помещали в объеме 1 мкл на стенку пробирки объемом 0,2 мл. 1 мкл воды из последней капли использовали в качестве отрицательного контроля для ПЦР. При необходимости на этой стадии образцы замораживали до дальнейшего анализа и хранили при -20°C . Либо использовали неотмытые бластоцисты, для чего переносили эмбрионы в небольшом объеме среды для инкубации (менее 1 мкл) с помощью стеклянного капилляра на стенку пробирки для анализа.

Для лизиса бластоцист использовали несколько методов: непосредственное добавление бластоцисты в маленьком объеме в реакционную смесь, щелочной лизис (200 mM NaOH, 50 mM DTT) [17]; повторное замораживание и размораживание в воде для ПЦР, лизис с лаурилсаркозилем [18]; обработку протеиназой K с детергентом по методике, описанной Sakurai и соавт. [19]. Последний метод модифицировали, исключив из состава буфера дрожжевую tРНК и увеличив объем буфера на образец до 20 мкл. В пробирку добавляли 20 мкл буфера для лизиса, состоящего из протеиназы K (125 мкг/мл), Tris-HCl (100 mM, pH 8,3), KCl (100 mM), желатин 0,02 %, Tween-20 0,45 %. Пробирку инкубировали 10 мин при 56°C , затем — в течение 10 мин при 95°C для инактивации протеиназы. ПЦР-анализ проводили сразу после приготовления образцов или хранили лизат при -20°C .

Целевой регион вокруг сайта узнавания РНК-гида sg31 амплифицировали с помощью праймеров g31-434F (5'-TCAAACAAAAGGCAGAAGAGTAAG-3') и g31-434R (5'GGTCCAAAAGTAGGCCTCGTA-3'), РНК-гида sg34 — с помощью праймеров g34-505F (5'-CAGTGCCCCACACATACA-3') и g34-505R (5'-AGCAAAGTTATTTTAGGCATACT-3'). В реакцию добавляли от 1 до 10 мкл лизата бластоцист или соответствующего контроля. Для проведения ПЦР использовали набор реагентов GenePack PCR core kit («Изоген», Россия). Программа амплификации: 95°C — 1 мин; 40 циклов 95°C — 30 с, 60°C — 30 с, 72°C — 30 с; 72°C — 5 мин. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле с интеркалирующим красителем.

Анализ мутаций с помощью эндонуклеазы I фага T7

Короткие делеции и вставки, образующиеся после репарации двуцепочечных разрывов, детектировали с помощью эндонуклеазы I фага T7 (T7E1; NEB, Великобритания). Для этого смешивали ПЦР-продукт с контрольной матрицей, амплифицированной при тех же условиях (по 5 мкл реакционной смеси для каждого фрагмента), и буфером NEB2 (NEB). В конечном объеме 9 мкл проводили отжиг олигонуклеотидов при температуре от 95°C до 25°C со скоростью $0,1^{\circ}\text{C}/\text{сек}$. Далее в каждую пробирку добавляли 0,1 ед. активности фермента. Реакцию проводили 1 ч при 37°C . Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле с интеркалирующим красителем. Границы делеций и размеры вставок определяли секвенированием ПЦР-продуктов по Сэнгеру (Центр коллективного пользования «Геном», Россия).

Проверка наличия вставки в геном рестрикцией по сайту BamHI

Одноцепочечный фрагмент ДНК, использованный в качестве матрицы для репарации, кодировал сайты узнавания для двух эндонуклеаз: NcoI и BamHI. ПЦР-продукты,

полученные амплификацией участка 8 интрона инъекцированных и контрольных эмбрионов, смешивали с буфером FastDigest Green Buffer 10X и добавляли 0,1 ед. активности фермента BamHI (Thermo Fisher Scientific, США). Реакции проводили 1 ч при 37 °С. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле с интеркалирующим красителем. Наличие вставки подтверждали секвенированием ПЦР-продуктов по Сэнгеру (ЦКП «Геном»).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор методики проведения ПЦР на бластоцистах

В серии экспериментов с использованием различных методов лизиса ПЦР-продукт получили в наибольшем количестве образцов при приготовлении лизата методом, описанным Sakurai и соавт. [19] с модификациями, указанными в методах (результаты не приведены).

Далее было выяснено, что большое значение для воспроизводимости результатов ПЦР имеет подготовка бластоцист к лизису, т. к. компоненты среды могут ингибировать как лизис, так и полимеразу в дальнейшем. В параллельных экспериментах было показано, что при прочих равных условиях перенесение эмбриона в среде для инкубации ухудшает воспроизводимость результатов ПЦР (в среднем 11 успешных реакций на 20 образцов) по сравнению с использованием эмбрионов, отмытых от компонентов среды (20 успешных реакций на 20 образцов). В этом и последующих экспериментах лизис проводили методом Sakurai и соавт. с модификациями.

Чтобы выяснить минимальный объем лизата, который может быть использован в качестве матрицы для амплификации, была проведена соответствующая серия экспериментов. За 40 циклов ПЦР был успешно амплифицирован участок ДНК длиной 434 п. н. с использованием в качестве матрицы от 1 до 10 мкл лизата (рис. 1).

Таким образом, предложенный метод позволяет проанализировать до 20 разных сайтов в геноме мышиногго эмбриона на стадии бластоцисты.

Поиск коротких вставок и делеций в сайте g34 гена DMD мышинных эмбрионов после микроинъекций РНК-гида с белком Cas9

В пронуклеус зигот с помощью микроинъекций доставляли РНК-гид sg34 к гену *DMD* с белком Cas9. 13 эмбрионов на стадии бластоцисты лизировали методом Sakurai и соавт. с модификациями. Фрагмент гена *DMD* длиной 505 п. н. амплифицировали, используя в качестве матрицы лизаты инъекцированных и контрольных эмбрионов. ПЦР-фрагменты были успешно амплифицированы во всех образцах (результаты не приведены).

Далее ПЦР-фрагменты гибридизовали с контрольным образцом и обрабатывали эндонуклеазой I. В 12 из 13 образцах произошло расщепление на 2 фрагмента длиной 300 п. н. и 250 п. н. (рис. 2, А). Четыре ПЦР-фрагмента были выбраны для проверки наличия мутаций в районе связывания РНК-гида секвенированием по Сэнгеру. Результаты представлены на рис. 2, Б. В образце 1 была обнаружена делеция протяженностью 12 нт (с -5 по +7, где за положение +1 был принят нуклеотид N в триplete NGG PAM-сайта). В образцах 2 и 3 размер делеции составил 17 нт (с -11 по +6), а в образце 4 — 38 нт (с -7 по +31).

Обнаружение вставки после гомологичной рекомбинации по месту разрыва

Одноцепочечный олигонуклеотид sg31-HDRt инъекцировали вместе с комплексом РНК-гид sg31/белок Cas9 в пронуклеус зигот. 21 эмбрион на стадии бластоцисты использовали для анализа. Участок интрона 8 гена *DMD* длиной 434 п. н. амплифицировали с инъекцированных и контрольных эмбрионов, предварительно лизированных по выбранной методике. ПЦР-продукты обрабатывали рестриктазой BamHI. Результаты представлены на рис. 3. В 11 из 21 обработанных образцов детектировали частичное или полное расщепление на 2 фрагмента. Образец 2 был короче остальных примерно на 50 нуклеотидов, что свидетельствовало о наличии достаточно большой делеции. Образец 5 был потерян в процессе рестриктного анализа (рис. 3, А). Пять образцов (6, 12, 15, 19 и 20) были выбраны для подтверждения наличия вставки в сайте узнавания sg31 секвенированием по Сэнгеру. Вставка была обнаружена во всех последовательностях. В образцах 6, 15 и 19 помимо копии гена со вставкой также была идентифицирована нормальная копия (рис. 3, Б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Чаще всего для определения успешности проведенных манипуляций при получении генно-модифицированных организмов используют ДНК новорожденных потомков [12]. Однако такой подход требует подсадки оплодотворенных эмбрионов после проведения микроинъекций реципиентам и полного или частичного вынашивания потомства, что отнимает большую часть времени, отведенного на эксперимент. Анализ эмбрионов на стадии бластоцисты, описанный нами, позволяет быстро определить, возможно ли получение генно-модифицированных организмов с использованием подобранного РНК-гида. При этом за счет быстрого получения результатов отпадает необходимость в предварительном тестировании РНК-гидов на культурах клеток, а также возможен статистический анализ. В случаях, когда подсадка оплодотворенных яйцеклеток после проведения микроинъекций не приводит к рождению генно-модифицированных потомков, предложенный метод может помочь определить причины эмбриональной гибели путем анализа неспецифических сайтов

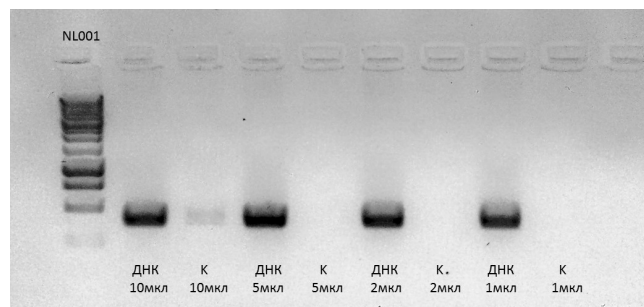


Рис. 1. Амплификация участка интрона 8 гена дистрофина *DMD* с использованием разного количества матрицы

Бластоцисты были лизированы по методу Sakurai и соавт. [19] с модификациями в конечном объеме 20 мкл. Для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали от 1 до 10 мкл раствора тотальной ДНК. В качестве контроля к каждому образцу использовали соответствующий объем воды из последней промывки, обработанной аналогичным образом. Продукты ПЦР разделяли в 2 % агарозном геле с интеркалирующим красителем. Маркер длин фрагментов ДНК — NL001 («Евроген», Россия).

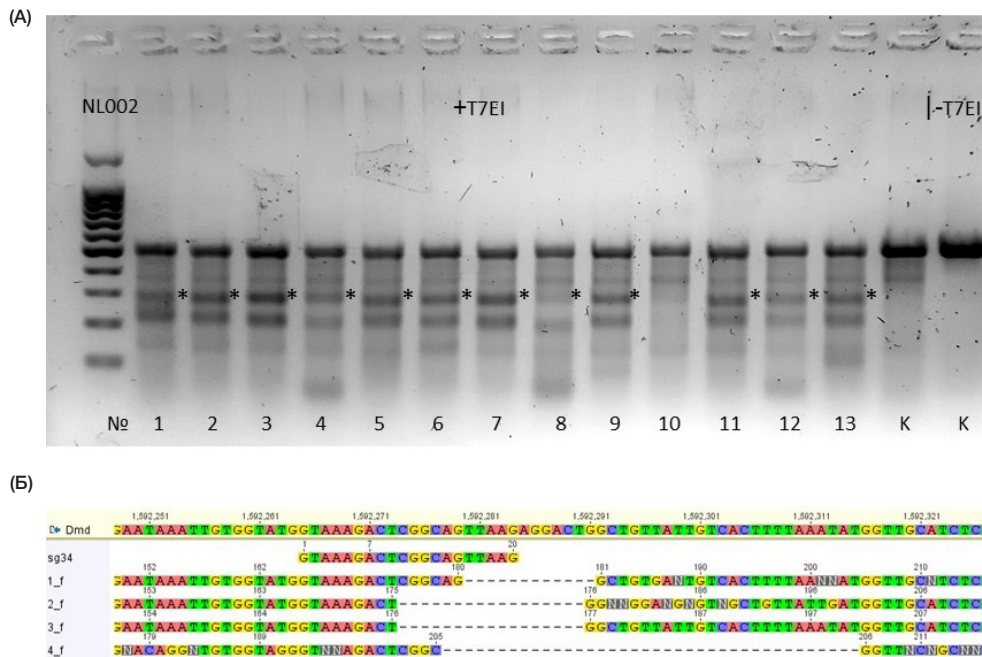


Рис. 2. Детекция вставок и делеций в интроне 34 гена дистрофина DMD после микроинъекций комплекса sg34 с белком Cas9. Фрагмент интрона вокруг сайта узнавания sg34 амплифицировали с инъектированных и контрольных эмбрионов. Продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) отжидали на контрольный ампликон и обрабатывали эндонуклеазой I фага T7. В образцах, содержащих вставки и делеции, произошло расщепление на 2 фрагмента. Такие образцы отмечены на рисунке символом * (A). Границы вставок и делеций в выборочных образцах были определены секвенированием по Сэнгеру (B). Продукты ПЦР разделяли в 2 % агарозном геле с интеркалирующим красителем. Маркер длин фрагментов ДНК — NL002 («Евроген», Россия).

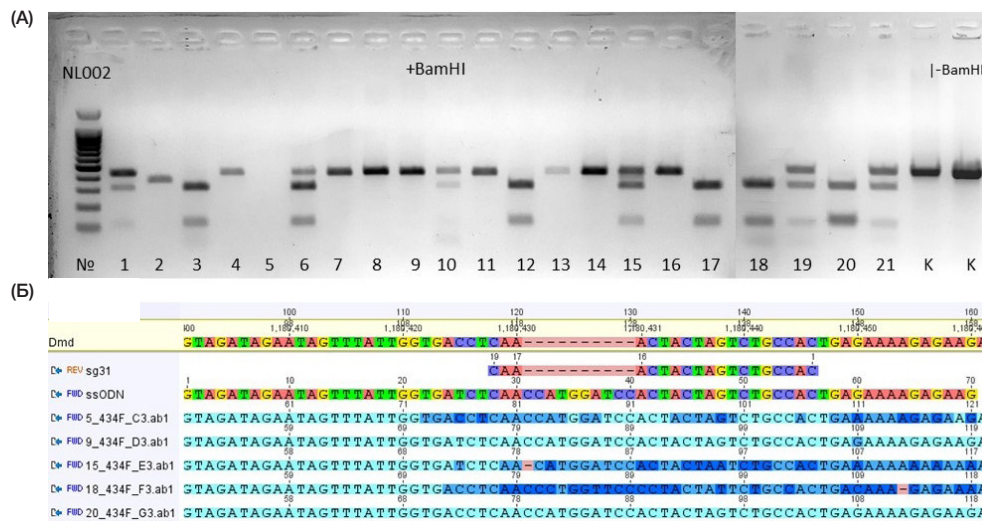


Рис. 3. Детекция вставки по месту разрыва в интроне 8 гена дистрофина DMD после микроинъекций комплекса sg31 с белком Cas9 и матрицей для репарации. Фрагмент интрона вокруг сайта узнавания sg31 амплифицировали с инъектированных и контрольных эмбрионов. Продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) обрабатывали эндонуклеазой BamHI, сайт узнавания которой был закодирован в матрице для репарации. В образцах, содержащих вставку, произошло расщепление на 2 фрагмента. Такие образцы отмечены на рисунке символом * (A). Наличие вставки в выборочных образцах было подтверждено секвенированием по Сэнгеру (B). Продукты ПЦР разделяли в 2 % агарозном геле с интеркалирующим красителем. Маркер длин фрагментов ДНК — NL002 («Евроген», Россия).

связывания РНК-гида или проверить эффективность комплекса РНК-гида с белком Cas9.

Для клональной селекции характерна проблема недостаточного количества ДНК в исходном материале после трансфекции первичных культур клеток, иммортализованных клеточных линий или стволовых клеток плазмидой, кодирующей нуклеазный комплекс. В этом случае выделение геномной ДНК с помощью коммерческих наборов реагентов дорого и низкоэффективно, в то время как предложенный метод получения тотальной ДНК может

помочь проанализировать большее количество клонов. Это особенно актуально при проведении вставки в геном с помощью матрицы для гомологичной рекомбинации, т. к. эффективность этого процесса значительно ниже в сравнении с образованием коротких делеций или вставок нуклеотидов.

С применением модифицированного метода получения тотальной ДНК из мышинных эмбрионов отпадает необходимость в полногеномной амплификации, использовании большого количества циклов или проведении нескольких

раундов ПЦР. Анализ эмбрионов на стадии бластоцисты не только экономит время и средства исследователя, но также представляется более гуманным в сравнении с постнатальным анализом потомства, поскольку сокращается число животных, вовлекаемых в эксперимент.

Тотальная ДНК, приготовленная предложенным способом из мышинных эмбрионов на стадии бластоцисты, пригодна для анализа коротких делеций или вставок нуклеотидов в сайте разрезания белком Cas9 с помощью эндонуклеазы I из фага T7 и других аналогичных ферментов, а также специфического гидролиза эндонуклеазами рестрикции при наличии соответствующего сайта. Эндонуклеаза I из фага T7 узнает и расщепляет одноцепочечные участки в составе гетеродуплекса. С ее помощью можно детектировать наличие коротких делеций и вставок по месту двуцепочечного разрыва после гибридизации анализируемого фрагмента с контрольным ампликоном. В некоторых работах ставится под сомнение применимость эндонуклеазы I из фага T7 для идентификации коротких делеций или вставок нуклеотидов в мышинных эмбрионах [7, 12]. Используя описанный метод подготовки проб, T7EI и секвенирование по Сэнгеру, мы обнаружили высокую эффективность внесения модификаций системой CRISPR/Cas9 в геном мыши с помощью одного РНК-гида, что согласуется с ранее полученными результатами [1]. Таким образом, было установлено, что амплификация целевого фрагмента с одной бластоцисты с последующей обработкой эндонуклеазой I из фага T7 — надежный метод обнаружения мутаций после микроинъекций РНК-гида с белком Cas9 в оплодотворенную яйцеклетку. Было показано, что метод

подготовки образцов тотальной ДНК из одной бластоцисты пригоден для обнаружения вставок по месту разрыва с помощью рестрикционного анализа. Также мы увидели, что гомологичная рекомбинация по сайту узнавания РНК-гида происходит с меньшей эффективностью, чем негомологичное соединение концов при двуцепочечном разрыве (11/21 против 12/13).

Выводы

В статье описана модификация метода получения тотальной ДНК из мышинных эмбрионов на ранней стадии развития и показано, что большое значение имеет не только правильно подобранная методика лизиса, но и процесс пробоподготовки. Предложенный метод отличается от применяемых в настоящее время простотой и отсутствием необходимости в редких и дорогостоящих реагентах. Используя в качестве матрицы лизат эмбриона на стадии бластоцисты, можно амплифицировать необходимый фрагмент ДНК в один раунд ПЦР, существенно снижая риск искажения результатов и контаминации. При этом компоненты смеси не ингибируют ПЦР и ферментативные реакции, и метод позволяет проанализировать независимо друг от друга до 20 различных фрагментов мышинного генома.

Предложенная модификация метода анализа может быть полезна для амплификации участков ДНК после использования других систем редактирования генома, таких как TAL-эффektorные нуклеазы или нуклеазы по типу цинковых пальцев.

Литература

- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013; 153 (4): 910–8.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012; 337 (6096): 816–21.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013; 339 (6121): 819–23.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013; 339 (6121): 823–6.
- Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013; 154 (6): 1370–9.
- Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep*. 2013; 3: 3355.
- Li D, Qiu Z, Shao Y, Chen Y, Guan Y, Liu M, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*. 2013; 31 (8): 681–3.
- Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*. 2014; 156 (4): 836–43.
- Mou H, Kennedy Z, Anderson DG, Yin H, Xue W. Precision cancer mouse models through genome editing with CRISPR-Cas9. *Genome Med*. 2015; 7 (1): 53.
- Carroll KJ, Makarewich CA, McAnally J, Anderson DM, Zentilin L, Liu N, et al. A mouse model for adult cardiac-specific gene deletion with CRISPR/Cas9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113 (2): 338–43.
- Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, Belzair R, Puram RV, McConkey ME, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol*. 2014; 32 (9): 941–6. doi: 10.1038/nbt.2951.
- Fujii W, Kawasaki K, Sugiura K, Naito K. Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41 (20): e187. doi: 10.1093/nar/gkt772. Epub 2013 Aug 30.
- Sakurai T, Watanabe S, Kamiyoshi A, Sato M, Shindo T. A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice. *BMC Biotechnol*. 2014; 14: 69. doi: 10.1186/1472-6750-14-69.
- Hou Y, Wu K, Shi X, Li F, Song L, Wu H, Dean M, et al. Comparison of variations detection between whole-genome amplification methods used in single-cell resequencing. *Gigascience*. 2015; 4: 37. doi: 10.1186/s13742-015-0068-3.
- Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM, Valen E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42 (Web server issue): W401–7.
- Green MR, Sambrook J. Extraction, Purification, and Analysis of RNA from Eukaryotic Cells. In: Green MR, Sambrook J, editors. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
- Peciña A, Lozano Arana MD, García-Lozano JC, Borrego S, Antiñolo G. One-step multiplex polymerase chain reaction for preimplantation genetic diagnosis of Huntington disease. *Fertil Steril*. 2010; 93 (7): 2411–2.
- Tsuchiya S, Sueoka K, Matsuda N, Tanigaki R, Asada H, Hashiba T, et al. The “Spanning Protocol”: A new DNA extraction method for efficient single-cell genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet*. 2005; 22 (11–12): 407–14.
- Sakurai T, Kamiyoshi A, Watanabe S, Sato M, Shindo T. Rapid zygosity determination in mice by SYBR green real-time genomic PCR of a crude DNA solution. *Transgenic Res*. 2008; 17 (1): 149–55. Epub 2007 Sep 13.

References

1. Wang H, Yang H, Shivalilla CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013; 153 (4): 910–8.
2. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012; 337 (6096): 816–21.
3. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013; 339 (6121): 819–23.
4. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013; 339 (6121): 823–6.
5. Yang H, Wang H, Shivalilla CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013; 154 (6): 1370–9.
6. Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep*. 2013; 3: 3355.
7. Li D, Qiu Z, Shao Y, Chen Y, Guan Y, Liu M, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*. 2013; 31 (8): 681–3.
8. Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*. 2014; 156 (4): 836–43.
9. Mou H, Kennedy Z, Anderson DG, Yin H, Xue W. Precision cancer mouse models through genome editing with CRISPR-Cas9. *Genome Med*. 2015; 7 (1): 53.
10. Carroll KJ, Makarewich CA, McAnally J, Anderson DM, Zentilin L, Liu N, et al. A mouse model for adult cardiac-specific gene deletion with CRISPR/Cas9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113 (2): 338–43.
11. Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, Belizaire R, Puram RV, McConkey ME, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol*. 2014; 32 (9): 941–6. doi: 10.1038/nbt.2951.
12. Fujii W, Kawasaki K, Sugiura K, Naito K. Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41 (20): e187. doi: 10.1093/nar/gkt772. Epub 2013 Aug 30.
13. Sakurai T, Watanabe S, Kamiyoshi A, Sato M, Shindo T. A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice. *BMC Biotechnol*. 2014; 14: 69. doi: 10.1186/1472-6750-14-69.
14. Hou Y, Wu K, Shi X, Li F, Song L, Wu H, Dean M, et al. Comparison of variations detection between whole-genome amplification methods used in single-cell resequencing. *Gigascience*. 2015; 4: 37. doi: 10.1186/s13742-015-0068-3.
15. Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM, Valen E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42 (Web server issue): W401–7.
16. Green MR, Sambrook J. Extraction, Purification, and Analysis of RNA from Eukaryotic Cells. In: Green MR, Sambrook J, editors. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
17. Peciña A, Lozano Arana MD, García-Lozano JC, Borrego S, Antiñolo G. One-step multiplex polymerase chain reaction for preimplantation genetic diagnosis of Huntington disease. *Fertil Steril*. 2010; 93 (7): 2411–2.
18. Tsuchiya S, Sueoka K, Matsuda N, Tanigaki R, Asada H, Hashiba T, et al. The “Spanning Protocol”: A new DNA extraction method for efficient single-cell genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet*. 2005; 22 (11–12): 407–14.
19. Sakurai T, Kamiyoshi A, Watanabe S, Sato M, Shindo T. Rapid zygosity determination in mice by SYBR green real-time genomic PCR of a crude DNA solution. *Transgenic Res*. 2008; 17 (1): 149–55. Epub 2007 Sep 13.