

**Всероссийский научно-исследовательский институт
Физиологии, Биохимии и Питания животных – филиал
Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «ФНЦ животноводства – ВИЖ имени Л.К. Эрнста»**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕСТРИКТНОГО АНАЛИЗА
В ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ
КОМПОНЕНТОВ CRISPR/Cas СИСТЕМЫ ДЛЯ
МОДИФИКАЦИИ ГЕНА WAP.**

Кутьин И.В., Белова Н.В., Езерский В.А., Колоскова Е.М.

E-mail: Kurookami@mail.ru

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработать методику оценки эффективности работы компонентов CRISPR/Cas9 на выбранных таргетных последовательностях для анализа биоматериала.

Схема получения нокаутных по *mWAP* и трансгенных по *чЛФ* мышей с использованием CRISPR/Cas9 технологии

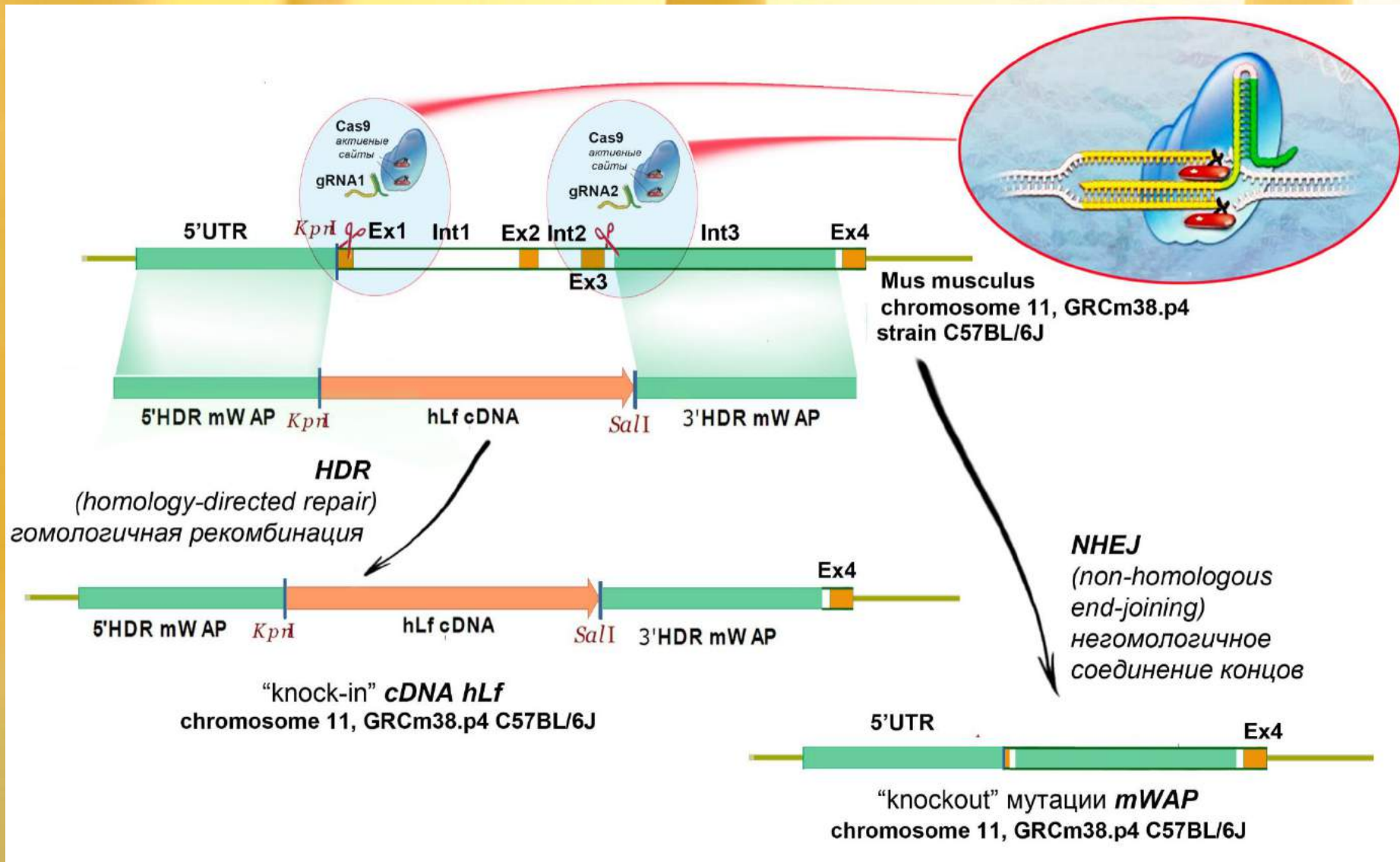
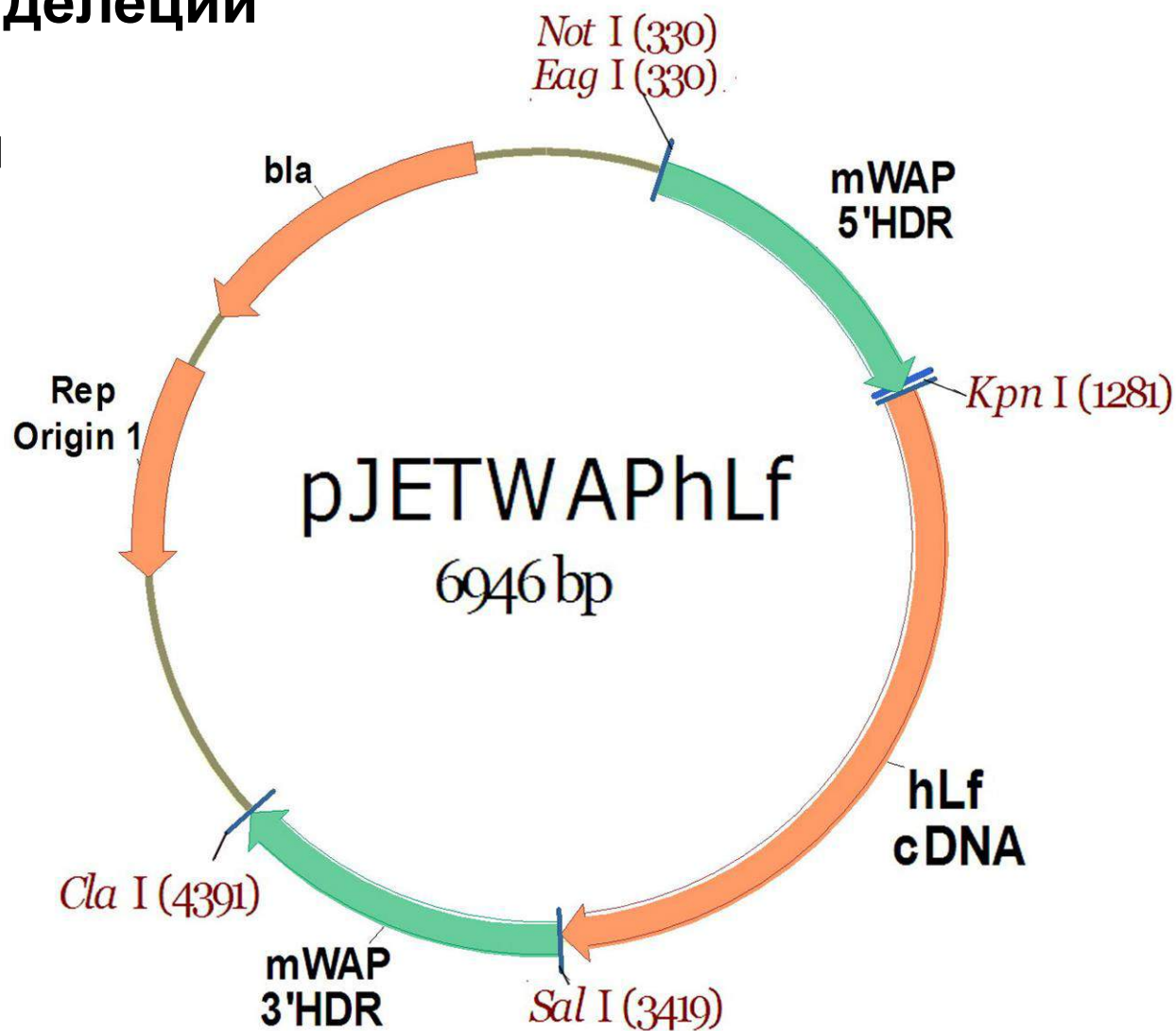
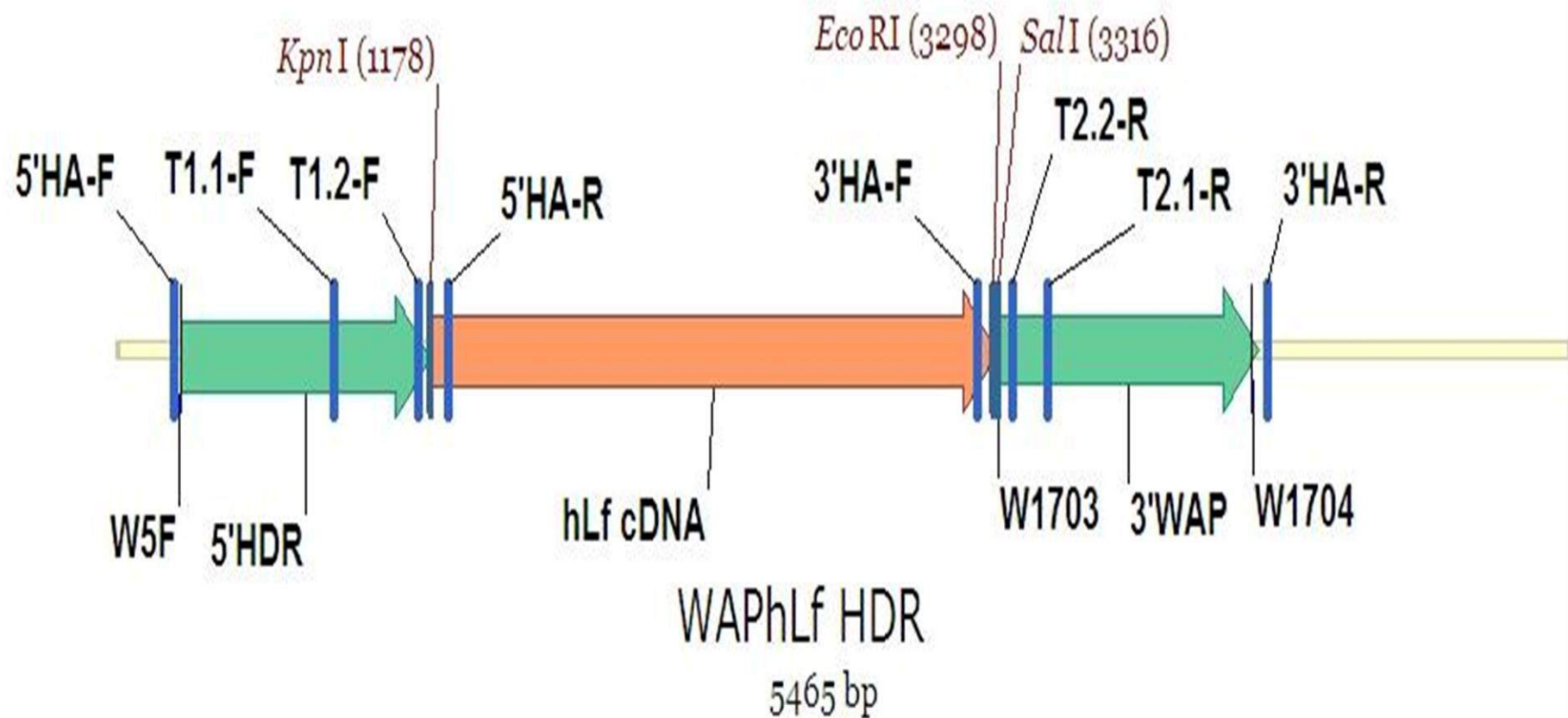


Схема плазмиды pWAPhLf для репарации делеции гомологичной рекомбинацией



Компоненты рабочих смесей для микроинъекций

№	Компоненты	Концентрация, нг/мкл		
		Смесь №1	Смесь №2	Смесь №3
1	pWAPhLf	10	10	10
2	pX330-g3	2,5	5	-
3	pX330-g7	2,5	5	-
4	pX330-g4	-	-	5
5	pX330-g16	-	-	5
	Итого ДНК	15	20	20

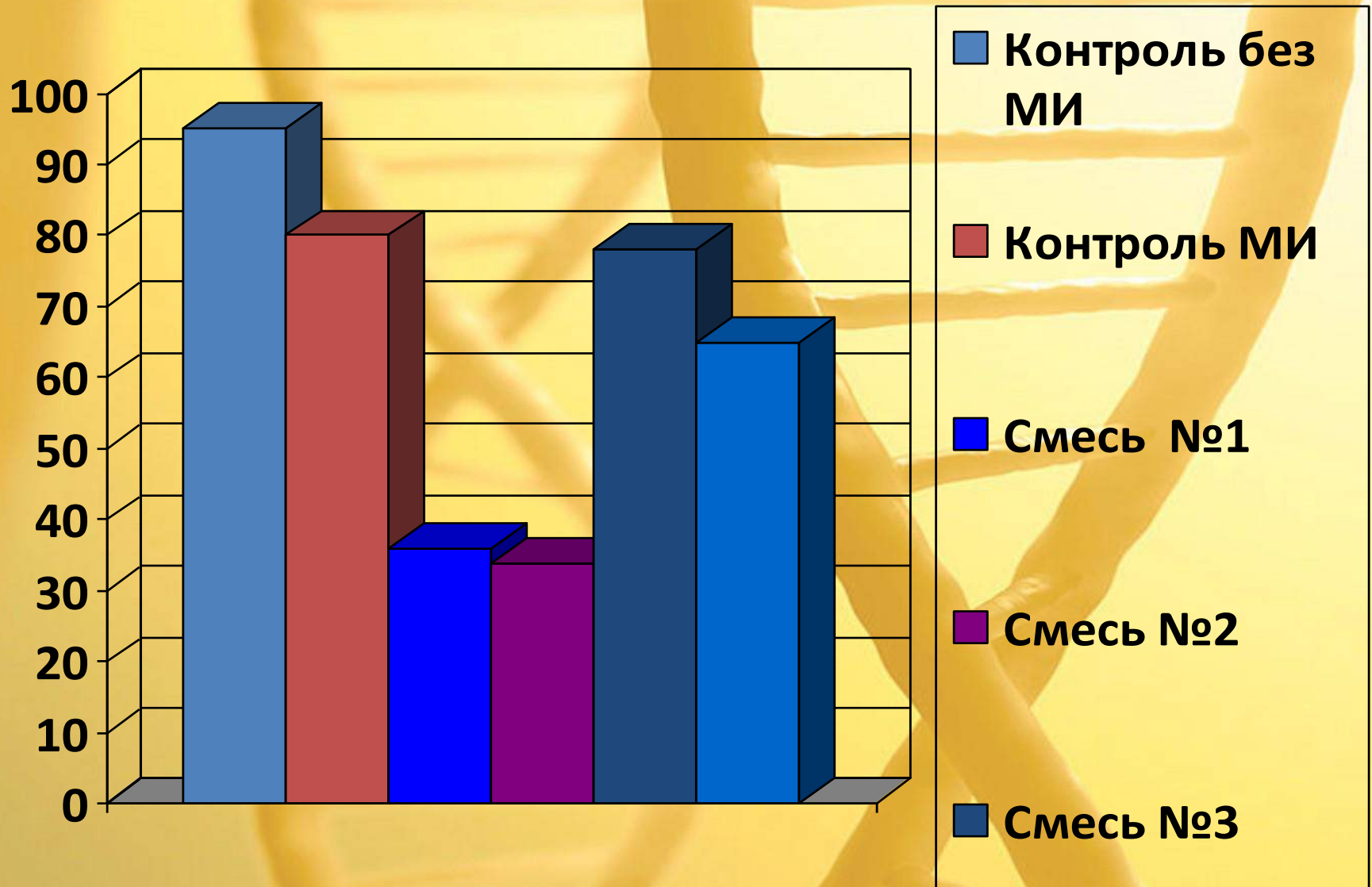


Расположение таргетных праймеров и гнездовых праймеров для детекции интеграции трансгена в локус гена WAP мыши механизмом гомологичной рекомбинации.

Пары праймеров для анализа мышей на модификации гена WAP

Пара праймеров	Мишень, анализ	Размер амплификата WT (ГМ), п.н.	Рейтинг	ЭФ, отжиг
T1.1-F / T1.2-R	, KpnI	465=368+97	171	0,8-1% АГ
T1.1-F / T1.1-R	, KpnI	586= 368+218	171	0,8-1% АГ
T1.2-F / T1.2-R		144	171	8-12% ПААГ
T1.3-F / T1.2-R		139	171	8-12% ПААГ
T2.1-F / T2.1-R	, BglII	569=345+ 224.	171	0,8-1% АГ
T2.2-F / T2.1-R	, BglII	510=286+ 224.	171	0,8-1% АГ
T2.2-F / T2.2-R		380		
T2.3-F / T2.2-R		138	171	8-12% ПААГ
T1.1-F / T2.1-R	Делеция	2546 (587)	171	≈ 54°C Tm
T1.2-F / T2.1-R	Делеция	2225 (265)	171	≈ 55°C Tm
T1.2-F / T2.2-R	Делеция	2095 (135)	171	≈ 55°C Tm
T1.1-F / T2.2-R	Делеция	2416 (456)	171	≈ 56°C Tm

РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫЖИВАЙМОСТИ ЭМБРИОНОВ



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рестриктивный анализ соответствующих ПЦР-амплификатов гена mWAP с KpnI и BglII может быть достаточно быстрым тестом эффективности работы компонентов CRISPR/Cas9 на выбранных таргетных последовательностях.