

РЕАЛИИ СОЗДАНИЯ ГУМАНИЗИРОВАННЫХ ТРАНСГЕННЫХ ПЕРСониФИЦИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ: ПЕРЕХОД ОТ ПЛАЗМИДНОГО ВАРИАНТА К РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВОМУ КОМПЛЕКСУ CRISPR/Cas9

Н.Н. Каркищенко¹, Е.М. Колоскова^{2,*}, Н.В. Петрова¹

¹ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

² Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных —
филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»
249013, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, п. Институт

Одно из основных направлений деятельности НЦБМТ ФМБА России — создание гуманизированных генно-модифицированных животных для научных и биомедицинских исследований. С использованием классического трансгенеза и плазмидного варианта CRISPR/Cas9-технологии начиная с 2013 года в Центре было получено более 20 линий трансгенных, нокаутных и трансгенно-нокаутных животных — мышей-биомоделей. Основными «специализированными» линиями являются гуманизированные трансгенные мыши-биомодели, несущие аллели HLA класса I — HLA-B*, HLA-B**, HLA-B***, HLA-C*, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02, HLA-A*02:01, HLA-B*** KO, HLA-A** KO, HLA-B**** KO, HLA-C** KO, а также NAT1, NAT2, ACE2 hom, hACE2-Tom (HDR-KI), SMN2 (S2), PrPSc, ACE2 hom / HLA-C**, β 2m мыши KO, PrP KO, STE24 KO, SMN (S6) KO, SMN2 KO, PrP KO / PrPSc, NAT1 KO, NAT2 KO.

В статье анализируются генетические конструкции и методы, с помощью которых получены генно-модифицированные животные. Обобщен многолетний опыт применения плазмидного варианта и рассматривается необходимость перехода к рибонуклеопротеиновому комплексу CRISPR/Cas9: высокая эффективность и специфичность, высокая частота целевых модификаций; возможность использования нескольких гРНК; встраивание одной копии HDR-ДНК-матрицы (трансген). Рассматривается возможность замещения импортных реактивов и наборов реагентами отечественного производства.

Ключевые слова: трансгенез, CRISPR/Cas9, нокаут гена, pX330, гРНК, рибонуклеопротеиновый комплекс, HLA class I, линии мышей

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: государственное задание по теме «Получение новой линии гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген HLA-A*rX человека и нокаут комплекса H-2K мыши» (шифр: «Транснокаут-2024») ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Для цитирования: Каркищенко Н.Н., Колоскова Е.М., Петрова Н.В. Реалии создания гуманизированных трансгенных персонифицированных животных для биомедицинских исследований: переход от плазмидного варианта к рибонуклеопротеиновому комплексу CRISPR/Cas9. *Биомедицина*. 2025;21(3):12–24. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-3-12-24>

Поступила 07.04.2025

Принята после доработки 24.07.2025

Опубликована 10.09.2025

REALITIES IN THE CREATION OF HUMANIZED TRANSGENIC PERSONALIZED ANIMALS FOR BIOMEDICAL RESEARCH: TRANSITION FROM PLASMID TO CRISPR/Cas9 RIBONUCLEOPROTEIN COMPLEX

Nikolay N. Karkischenko¹, Elena M. Koloskova^{2,*}, Natalia V. Petrova¹

¹ Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye gory Village, 1

² All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition —
Branch of the Federal Scientific Center of Animal Husbandry — The All-Russian Institute
of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst
249013, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institut Village

Creation of humanized genetically modified animals for biomedical research is an important direction in the activity of the Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency (FMBA) of Russia. Since 2013, the Center has obtained more than 20 lines of transgenic, knockout, and transgenically-knockout mouse biomodels using classical transgenesis and the plasmid version of the CRISPR/Cas9 technology. The main specialized lines involve humanized transgenic mouse biomodels carrying alleles HLA class I — HLA-B*, HLA-B**, HLA-B***, HLA-C*, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02, HLA-A*02:01, HLA-B*** KO, HLA-A** KO, HLA-B**** KO, HLA-C** KO, as well as NAT1, NAT2, ACE2 hom, hACE2-Tom (HDR- KI), SMN2 (S2), PrPSc, ACE2 hom / HLA-C**, β 2m mus KO, PrP KO, STE24 KO, SMN (S6) KO, SMN2 KO, PrP KO / PrPSc, NAT1 KO, NAT2 KO. In this article, we review the genetic constructs and methods used to produce genetically modified animals. The article summarizes the long-term experience of using the plasmid variant and discusses the need to switch to the CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complex in the view of its high efficiency and specificity, high frequency of targeted modifications, the ability to use multiple gRNAs, and the insertion of a single copy of the HDR-DNA template (transgene). We also explore the possibility of replacing imported reagents and kits with domestic products.

Keywords: transgenesis, CRISPR/Cas9, gene knockout, pX330, ribonucleoprotein complex, gRNA, HLA class I, mouse lines

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the research was supported by the topic “Generation of a new line of humanized transgenic mice carrying the human HLA-A*pX gene and knockout of the mouse H-2K complex” (code: “Transknock-out-2024”) of state assignment of Scientific Center of Biomedical Technologies of FMBA of Russia.

For citation: Karkischenko N.N., Koloskova E.M., Petrova N.V. Realities in the Creation of Humanized Transgenic Personalized Animals for Biomedical Research: Transition from Plasmid to CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complex. *Journal Biomed.* 2025;21(3):12–24. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-3-12-24>

Submitted 07.04.2025

Revised 24.07.2025

Published 10.09.2025

Введение

Создание гуманизированных генно-модифицированных животных для научных исследований — одно из основных направлений деятельности НЦБМТ ФМБА России [1]. Начиная с 2013 года было получено более 20 линий генно-модифицированных

мышей (табл. 1). В наших исследованиях мы применяем классический трансгенез и CRISPR/Cas9-технологии (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR-Associated protein 9 — сгруппированные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными

Таблица 1. Основные линии созданных в НЦБМТ ФМБА России генно-модифицированных мышей: трансгенные, нокаутные и трансгенно-нокаутные
Table 1. Genetically modified mice created at the Scientific Center of Biomedical Technologies of the FMBA of Russia: transgenic, knockout, and transgenic-knockout lines

Год	Линия	Генная конструкция	Метод	Ген-мишень	Ссылка
2013	NAT1	NAT1	трансгенез	-	[2, 3]
2013	NAT2	NAT2	трансгенез	-	[2, 3]
2014	HLA-B*	«нативная»	трансгенез	-	
2015	HLA-B**	«гибридная»	трансгенез	-	
2018	HLA-B***	«химерная»	трансгенез	-	
2019	HLA-C*	«химерная»	трансгенез	-	
2020	HLA-B*07:02	«химерная»	трансгенез	-	[4]
2020	ACE2 hom	генетическая конструкция	трансгенез	-	
2021	HLA-C*07:02	«химерная»	трансгенез		[4, 5]
2021	HLA-A*02:01	«химерная»	трансгенез	-	[4, 6–8]
2021	hACE2-Tom (HDR- KI)	px330, генетическая конструкция	CRISPR/Cas9	ACE2	
2022	SMN2 (S2)	SMN2	трансгенез	-	
2022	PrP ^{Sc}	PrP ^{Sc}	трансгенез	-	
2021	ACE2 hom / HLA-C**	-	скрещивание линий	-	-
2021	HLA-B*** KO	px330	CRISPR/Cas9	$\beta 2m$	
2022	HLA-A** KO	px330	CRISPR/Cas9	$\beta 2m$	
2022	HLA-B****KO	px330	CRISPR/Cas9	$\beta 2m$	
2022	HLA-C** KO	px330	CRISPR/Cas9	$\beta 2m$	
2023	$\beta 2m$ мыши KO	px330	CRISPR/Cas9	$\beta 2m$	
2023	PrP KO	px330	CRISPR/Cas9	Prnp	
2023	STE24 KO	px330	CRISPR/Cas9	Zmpste24	
2024	SMN (S6) KO	px330	CRISPR/Cas9	SMN1	
2024	SMN2 KO	px330	CRISPR/Cas9	SMN1	
2024	PrP KO / PrP ^{Sc}		скрещивание линий	Prnp	
2024	NAT1 KO	px330	CRISPR/Cas9	NAT1	
2025	NAT2 KO	px330	CRISPR/Cas9	NAT2	

промежутками / CRISPR-ассоциированный белок-9) (табл. 2), с помощью которых получаем трансгенных, нокаутных и трансгенно-нокаутных животных — мышей-биомоделей для биомедицинских задач. Основной используемый нами способ интеграции генетических конструкций (ГК) — микроинъекция (МИ) ДНК в пронуклеус зиготы.

В настоящее время большое внимание уделяется различным аспектам специфичности системы CRISPR/Cas9, которая дает возможность точного редактирова-

ния генома — внесения специфичных замен путем гомологичной рекомбинации (Homology Directed Repair — HDR) с низким фоном негомологичного соединения концов (Non-Homologous End Joining — NHEJ), использование NHEJ репарации для нокаута генов (knock out — KO). Технологию CRISPR/Cas9 активно используют для создания клеточных линий, животных-биомоделей, имитирующих заболевания, рассматривают потенциал ее применения для терапевтического вмешательства в геном человека.

Таблица 2. Методы, применяемые для получения генно-модифицированных животных
Table 2. Methods used to produce genetically modified animals

Параметр	Классический трансгенез	CRISPR/Cas9-технологии
Дизайн метода	Создание генетической конструкции, системы верификации интеграции трансгена	Компьютерный подбор сайта-мишени, системы верификации целевых и нецелевых событий
Рабочие компоненты	Рекombинантная ДНК (генетическая конструкция, содержащая регуляторные элементы и кодирующую белок последовательность)	Рабочие компоненты — белок Cas9 и гРНК — для нокаута гена (+ HDR-ДНК-матрица для целевой интеграции трансгена или модификации гена)
Способ введения	Интъекция трансгена в пронуклеус зиготы	Интъекция трансгена в пронуклеус/цитоплазму зиготы
Плюсы	Получение трансгенного животного с полезной модификацией, обусловленной работой трансгена	Высокая частота целевых модификаций; возможность использования нескольких гРНК; встраивается одна копия HDR-ДНК-матрицы (трансген)
Минусы	Случайное встраивание трансгена; разная копияность; низкий уровень трансгенеза — до 3%	Разная частота (иногда высокая) нецелевых событий

Трансгенные мыши

Основными «специализированными» линиями нашего Центра являются гуманизированные трансгенные мыши-биомодели, несущие разные аллели главного комплекса гистосовместимости человека — класса I (HLA class I), предназначенные для исследований в области биомедицины и фармакогенетики, разработки вакцин и таргетных иммунобиологических препаратов. Первые трансгенные мыши этого типа получены с использованием «нативных» генетических конструкций (ГК), представляющих собой полноразмерный ген *HLA* с собственными регуляторными последовательностями. В «гибридных» конструкциях «человеческий» фрагмент был представ-

лен 5'-регуляторной последовательностью и 1-3-экзон-интронным фрагментом, вторая часть была заменена на мышиную. Наиболее перспективными оказались «химерные» ДНК-конструкции, кодирующие β2-микроглобулин человека, антиген-представляющие домены *HLA class I* и структурные домены главного комплекса гистосовместимости мыши (H-2K) (рис. 1).

Конструкции отличаются друг от друга *HLA*-последовательностью (540 п.н.), продуктом интегрированного в геном мыши трансгена является химерный белок (рис. 2).

Нокаутные и трансгенно-нокаутные линии мышей

Целевое редактирование генома — мощный инструмент изучения свойств генов

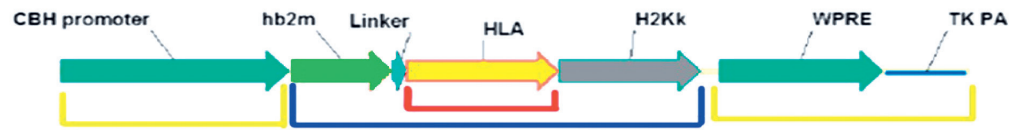


Рис. 1. Схема генных конструкций (тип *HLA* класса I). ГК содержит: регуляторные области рекомбинантного гена (CBH-промотор, посттрансляционный регуляторный элемент WPRE, сигнал полиадеилирования ТКРА); последовательность, кодирующую «химерный» белок (β2-микроглобулин человека; глицин-сериновый линкер; переменная часть — антигенпрезентирующие домены α1 и α2 *HLA* класса I; α3-домен, трансмембранная и эндоплазматическая части молекулы H2K).

Fig. 1. Scheme of gene constructs (type *HLA* class I). GC contains regulatory regions of the recombinant gene (CBH-promoter, posttranslational regulatory element WPRE, TKPA polyadenylation signal); sequence encoding a "chimeric" protein (human β2-microglobulin glycine-serine linker; variable part — antigen-presenting domains α1 an α2 of *HLA* class I; α3-domain, transmembrane and enpseudoplasmic parts of the H2K molecule).

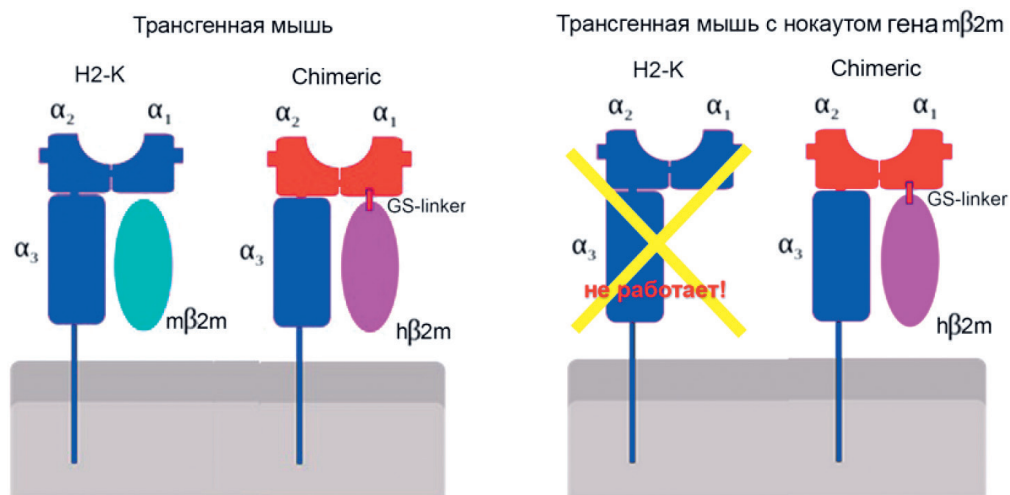


Рис. 2. Молекулы основного комплекса гистосовместимости класса I, представленные на поверхности клеток. Слева: HLA трансгенные мыши. Справа: HLA трансгенные мыши с нокаутом гена $\beta 2$ -микроглобулина мыши.
Fig. 2. Molecules of the major histocompatibility complex of class I, represented on the cell surface. On the left: HLA transgenic mice. On the right: HLA transgenic mice and knockout of the mouse $\beta 2$ -microglobulin gene.

и изменения их нуклеотидной последовательности. Технология геномного редактирования CRISPR/Cas9, позволяющая вносить двухцепочечный разрыв (ДЦР) в ген-мишень, стала наиболее эффективной и применяемой в практике [14]. Основные пути репарации молекулы ДНК, в которой возник ДЦР, — NHEJ и HDR [17]. При NHEJ репарированная ДНК часто содержит мутации — делеции и инсерции [9], используемые для направленного нокаута генов. HDR менее ошибочна, но требуются введения ДНК-донора, с которого должна произойти рекомбинация для репарации ДЦР. Эффективность HDR при редактировании генома клеток животных ниже, чем NHEJ, и обусловлена несколькими факторами: HDR прямо конкурирует с путем репарации NHEJ, активным на протяжении всего клеточного цикла, тогда как HDR ограничена поздней фазой G2 и S клеточного цикла, когда происходит репликация ДНК перед делением клетки [12].

Подбор направляющих РНК. Несмотря на относительную простоту метода CRISPR, специфичность расщепления и эффектив-

ность зависят в первую очередь от выбора сиквенса гидовой (направляющей) РНК (гРНК — gRNA), направляющих эндонуклеазу Cas9 к мишени, последовательность которой имеет минимальное сходство с другими участками генома, а похожие на нее участки не находятся рядом с нуклеотидным мотивом, прилежащим к протоспейсеру (Protospacer Adjacent Motif — PAM), или отличаются от мишени в ближней к PAM части. Использование компьютерных алгоритмов для выбора гРНК позволяет предсказать наиболее удачные последовательности, что резко повысило специфичность редактирования [13]. К настоящему времени создано несколько десятков программ для вычисления наиболее выгодных направляющих последовательностей (мишени, таргеты). Это такие онлайн программы, как SynthegoDesign Tool; Broad Institute GPP sgRNA Designer; CHOPCHOP [16]; CRISPOR [10]; Off-Spotter; Cas-OFFinder; CRISPR-Era; BenchlingCRISPR Guide RNA Design tool и др.

В нашей работе мы использовали программу CRISPOR. Она находит гРНК в за-

данной ДНК-последовательности и ранжирует их по различным показателям, которые оценивают потенциальные побочные эффекты в интересующем геноме и прогнозируют активность в целевой области. Помимо поддержки множества геномов, отличительной особенностью CRISPOR является то, что она помогает в клонировании, экспрессии и проверке направляющих последовательностей. Отображаются перекрывающиеся олигонуклеотиды, праймеры для проверки мишени и нецелевых мутаций, ферменты рестрикции, которые можно скачать в виде таблиц. CRISPOR доступна по адресу <http://crispor.org> [10].

Пример 1. Нокаут гена $\beta 2$ -микроглобулина мыши. Принцип: репарация ДЦР по механизму NHEJ. Сайт для внесения ДЦР искали в 1-м и 2-м экзонах гена

$\beta 2$ -микроглобулина мыши (NC_000068, GeneBank). В качестве исходных данных нуклеотидную последовательность одного из экзонов вносили в активное окно программы CRISPOR, в другой строке выбирали организм хозяина — *Mus Musculus*. Третьим шагом был выбор типа PAM и эндонуклеазы, осуществляющей ДЦР (20bp-NGG — SpCas9). Результаты работы программы представлены на рис. 3.

Для нокаута гена $\beta 2$ -микроглобулина мыши (рис. 2) применяли плазмидный вариант метода CRISPR/Cas9 — pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene #42230), предназначенный для экспрессии SpCas9 и химерной направляющей РНК в клетках млекопитающих (рис. 4) [11]. После выбора в активной строке этой плазмиды (далее — pX330) программа

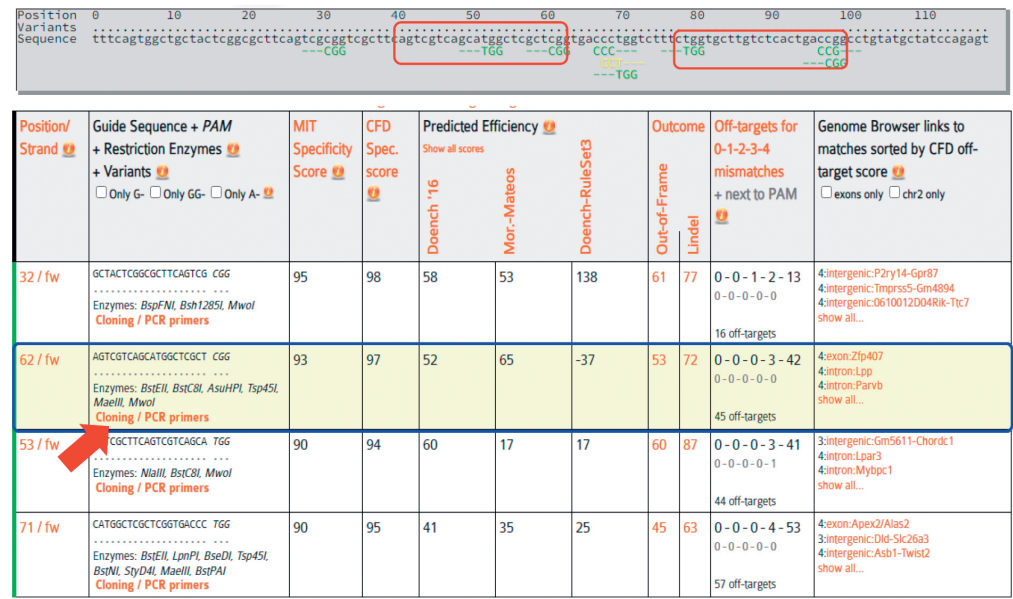


Рис. 3. Результат работы CRISPR. В верхней части — графическое представление входной последовательности с вариантами мишеней CRISPR в первом экзоне. Ниже — фрагмент таблицы с направляющими, с указанием прогностических показателей, номеров и местоположений нецелевых нуклеотидов, ссылками на конструктор праймеров для ПЦР. Выделена последовательность выбранной гРНК.

Fig. 3. Results of CRISPR operation. The upper part gives a graphical representation of the input sequence with variants of CRISPR targets in the first exon. Below is a fragment of a table with guides, indicating prognostic indicators, numbers and locations of non-target nucleotides, and links to a PCR primer constructor. The sequence of the selected gRNA is boxed.

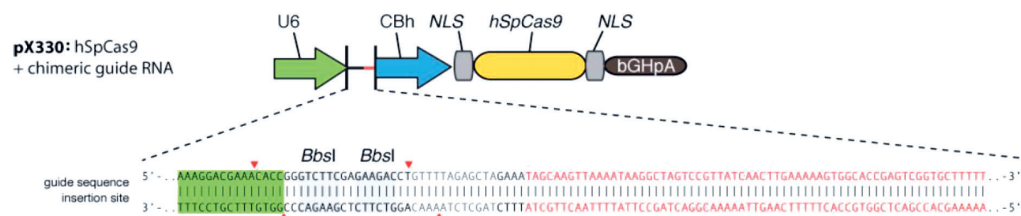


Рис. 4. Основные элементы плазмиды pX330-U6-Chimeric_BB-CBH-hSpCas9, кодирующей эндонуклеазу Cas9 и gРНК (после вставки дуплекса олигонуклеотидов по сайту BbsI).

Fig. 4. Main elements of the plasmid pX330-U6-Chimeric_BB-CBH-hSpCas9 encoding Cas9 endonuclease and gRNA (after insertion of an oligonucleotide duplex at the BbsI site).

вычисляет олигонуклеотиды для клонирования и всю необходимую информацию для дальнейшей верификации мутаций: праймеры для получения ПЦР-ампликонов заданного размера, содержащих мишень (электрофорез в АГ, ПААГ и сиквенс). При необходимости можно получить информацию о сайтах рестрикции для валидации ПЦР-продукта, ПЦР-праймеры для амплификации возможных нецелевых участков.

Как правило, получают несколько плазмид с разными гРНК и в условиях *in vitro* проверяют их эффективность. Для этой цели использовали плазмиду pCAG-EgxxFP, несущую рекомбинантный ген под контролем промотора CAG, кодирующий: 5'- и 3'-фрагменты EGFP с перекрывающимися областями для гомологичной рекомбинации, разделенными сайтом мультиклонирования. Целевой фрагмент гена $\beta 2m$ мыши, содержащий мишени для гРНК, клонируют в плазмиду pCAG-EgxxFP, и клетки HEK293 котрансфицируют плазмидой-мишенью pCAG-EGxxFP и pX330-n. После ДЦР целевой ДНК запускается система репарации, в результате чего восстанавливается ген EGFP и начинается синтез флуоресцентного белка [15].

Таким образом нами получена линия мышей, нокаутная по гену $\beta 2$ -микроглобулина, и несколько линий трансгенно-нокаутных линий мышей HLA class I KO (табл. 1).

Пример 2. Нокаут гена ACE2 мыши. Гомологичная рекомбинация с использо-

ванием генной конструкции ACE2-Tom. Принцип: репарации ДЦР по механизму HDR с использованием ДНК-донора. Трансгенные мыши линии hACE2 получены в результате микроинъекции генетической конструкции donor-hACE2 и pX330-mAce2, кодирующей эндонуклеазу Cas9 и gRNA, специфичную к фрагменту первого экзона гена ACE2 мыши. Мыши этой линии экспрессируют ангиотензин-превращающий фермент 2 человека (ACE2) и флуоресцентный маркерный белок (tdTomato) в эквивалентных количествах. Фланкирование ГК плечами гомологии позволяет ей прицельно встраиваться (knock in — KI — встраивание гена в определенный локус) в ген ACE2, который нокаутируется (рис. 5).

Точность встраивания ГК (реализация HDR, KI) была подтверждена ПЦР-реакциями с использованием пар, содержащих ГК- и ген-специфичный праймер (ампликоны A2 и A4, рис. 5).

От теории к практике: возможности и перспективы

Все созданные нами линии нокаутных и трансгенно-нокаутных мышей получены методом микроинъекции в пронуклеус зиготы модифицированной плазмиды pX330-U6-Chimeric_BB-CBH-hSpCas9 (Addgene #42230), кодирующей и экспрессирующей сайтспецифичную гРНК и эндонуклеазу Cas9. Необходимо отметить, что ДЦР сайта-мишени ДНК достигается совместной работой двух компонентов, образующих рибонуклеопротеиновый (РНП) комплекс:

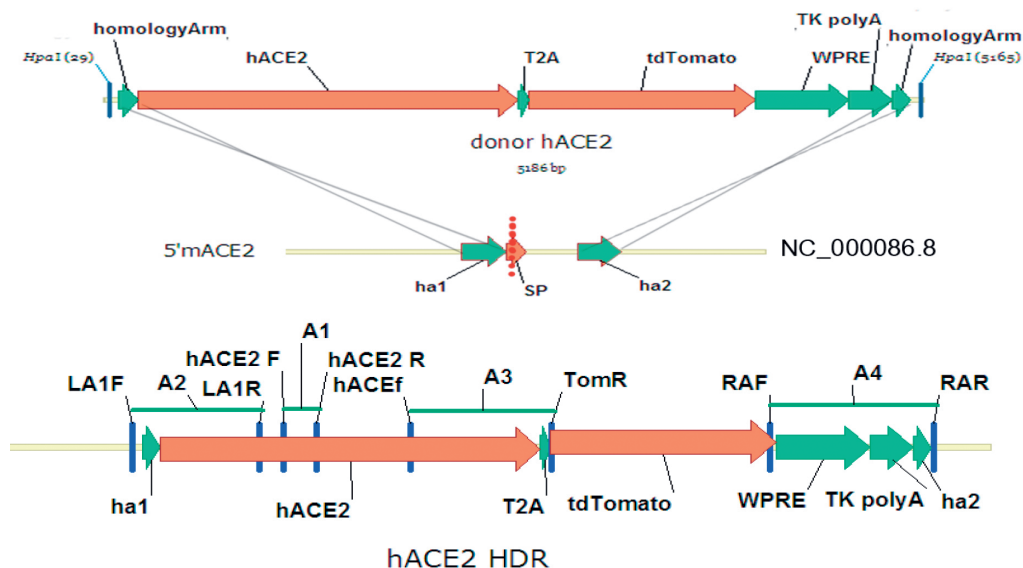


Рис. 5. Схема направленной гомологичной рекомбинации генной конструкции ACE2-Tom и рестриктированного гена-мишени Ace2 мыши (NC_000086.8). Внизу — ген ACE2 со встроенным трансгеном ACE2-Tom. Указаны праймеры для детекции трансгена, HDR встраивания и секвенса основных фрагментов. ПЦР-ампликоны обозначены как A1–A4.

Fig. 5. Scheme of homologous directed recombination of the ACE2-Tom gene construct and the restricted mouse ACE2 target gene (NC_000086.8). At the bottom, there is the ACE2 gene with the integrated ACE2-Tom transgene. Primers for transgene detection, HDR embedding, and sequence of the main fragments are indicated. PCR amplicons are designated as A1–A4.

гРНК + белок Cas9. РНП комплекс может быть получен тремя способами: 1) микроинъекцией экспрессирующей плазмиды типа рХ330; 2) гРНК + мРНК Cas9; 3) гРНК + белок Cas9. Особенности и характеристики каждого способа приведены в табл. 3. Белок Cas9, полученный в результате реализации любого из трех вариантов, образует стабильный РНП комплекс, а включение в состав белка концевых сигналов ядерной локализации (NLS) способствует доставке в ядро, увеличивая скорость расщепления геномной ДНК.

Использованный нами *плазмидный вариант*, несмотря на привлекательную стоимость и статус «два в одном», проходит самый длинный по биологической реализации путь. Плазмида непрерывно нарабатывает большое количество нуклеазы, в клетке значительно повышается риск по-

явления неспецифических мутаций. Кроме того, существует возможность интеграции плазмидной ДНК в геном хозяина, что однажды было обнаружено в нашей практике.

Тем не менее вопрос приобретения плазмид типа рХ330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 может быть актуален и в настоящее время. Несколько лет назад единственным вариантом (кроме «из рук-в-руки») был депозитарий <https://www.addgene.org/42230>, где за небольшую плату можно приобрести любую из описанных в литературе плазмид. Относительно недавно появился китайский вариант — <http://www.youbio.cn/>, который, возможно, станет альтернативой Addgene.

Из вариантов РНК-комплекс (гРНК + Cas9 мРНК) или РНП-комплекс (гРНК + Cas9 мРНК) наибольший практический интерес для нас представляет второй. Синтез Cas9 мРНК требует соблюдения ряда

Таблица 3. Варианты работы/доставки комплекса gРНК + эндонуклеаза Cas9
Table 3. Options for operation/delivery of the gRNA + Cas9 endonuclease complex

Параметр	Плазмидный	РНК-комплекс	РНП-комплекс
Компоненты	CRISPR ДНК-вектор	гРНК + мРНК Cas9	гРНК + белок Cas9
Эффективность	Низкая	Средняя	Высокая
Специфичность	Низкая	Высокая	Высокая
Стоимость	Низкая	Высокая	Высокая
Микроинъекция	Пронуклеус	Цитоплазма	Цитоплазма или пронуклеус
Путь биологической реализации	Ядро (синтез мРНК Cas9) → цитоплазма (синтез белка Cas9, образование РНП комплекса) → ядро (РНП комплекс, ДЦР)	Цитоплазма (синтез белка Cas9, образование РНП комплекса) → ядро (РНП комплекс, ДЦР)	Цитоплазма (РНП комплекс) или ядро (РНП комплекс, ДЦР)
Проверка эффективности	Сложная: котрансформация клеточной культуры, культивирование, флуоресценция	Сложная: котрансформация клеточной культуры, культивирование, флуоресценция	Простая: рестрикция клонированной в плазмиду ДНК-мишени, электрофорез в агарозном геле

требований: наличие матрицы — плазмиды с последовательностью Cas9 под промото-ром Т7, набора реагентов для транскрип-ции, условий проведения реакции, очист-ки полученной мРНК, условий хранения мРНК. Для нас наиболее предпочтитель-ным является использование готового *Cas9 протеина*, способного образовывать РНП комплексы с гРНК.

Высокоэффективный рекомбинантный белок SpCas9 (TrueCut Cas9 Protein v2, про-изводитель — Thermo Fisher Scientific) мож-но приобрести на отечественных сайтах <https://www.dia-m.ru/>, <https://www.laborato-rii.com/>. Несмотря на высокую стоимость, объем раствора с рабочей дозой 100 нг/мкл для микроинъекций составит 1000 мкл, что способно обеспечить большой объем работы. Альтернатива — белок-нуклеа-за Cas9 от новосибирского произведе-ля («Биолабмикс») — доступен на сайте <https://shop.helicon.ru/> и сайте произведе-ля <https://biolabmix.ru/>.

Направляющая РНК — обязательный элемент CRISPR/Cas системы в любом ее варианте. *In vitro* транскрипция гРНК при возможности использования готовой Cas9 становится основной операцией, ко-торую нам предстоит освоить для перехода на новый уровень эффективности получе-ния генно-модифицированных животных.

Основные этапы:

Создание ДНК-матрицы

1. Подбор направляющих последователь-ностей с использованием онлайн-программ (описано выше по тексту).

2. Разработка ДНК-матрицы, содержа-щей направляющую последовательность (мишень) и промотор Т7 РНК-полимеразы перед последовательностью гРНК.

2.1. Использование синтетических «длин-ных» праймеров (предпочтительный)

Прямой (вариабельный): 64 нуклеотида. N — направляющая последовательность из 20 нуклеотидов (мишень на геномной ДНК).

GAAATTAATACGACTCACTATAGGNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTGTAGAGC
TAGAAATAGC

Обратный праймер (стандартный, уни-версальный): 80 нуклеотидов.

GCACCGACTCGGTGCCACTTTTTC AAG
TTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACT
TGCTATTTCTAGCTCTAAAAC

Достоинства: универсальность обрат-ного праймера; простота получения ДНК-матрицы; хранение праймеров и ДНК-матрицы не требует специальных условий.

2.2. Вариант получения ПЦР-продукта ДНК-матрицы с готовой рХ330-х, в кото-рой гРНК находится под U6-промотором.



Рис. 6. ПЦР-синтез ДНК-матрицы для транскрипции гРНК *in vitro*.

Fig. 6. PCR synthesis of a DNA template for RNA transcription *in vitro*.

Используют прямой праймер с Т7-про-
мотором.

Минусы: необходимость подготовки
рХ330-х (заказ олигонуклеотидов, рестрик-
ция плазмиды, отжиг праймеров, клони-
рование, лигирование, трансформация
штамма *E. coli*, проверка клонов, наработка
положительного клона, выделение и очистка
рХ330-х). Длительный и трудоемкий вариант.

3. Очистка ДНК-матрицы выделением
из полосы после электрофореза из агароз-
ного геля с использованием стандартного
набора или с помощью набора для выделе-
ния ДНК и РНК из реакционных смесей.

4. Проверка качества и количества очи-
щенной ДНК-матрицы электрофорезом
в ПААГ или агарозном геле. ДНК можно
хранить при температуре -20°C в течение
длительного времени.

Синтез гРНК осуществляется Т7 РНК-
полимеразой на полученной ДНК-матрице:
распознавание Т7-промотора, инициация
транскрипции и образование гРНК, ком-
плементарной ДНК-шаблону. Самый тру-
доемкий и затратный этап подготовки РНП
комплекса. Обычно применяют импортные
наборы:

– «MEGAscript™ T7 Transcription
Kit» (Ambion, AM1354) <https://www.fishersci.com>;

– GeneArt Precision gRNA Synthesis Kit,
A29377 (Thermo Fisher Scientific)
<https://www.dia-m.ru>.

Альтернатива — «Набор для проведения
Т7-транскрипции *in vitro*» <https://biolabmix.ru>.

Ферментативный синтез РНК на ДНК-
матрице ДНК-зависимой РНК-полимеразой

бактериофага Т7. РНК может быть исполь-
зована для систем геномного редактирова-
ния в качестве направляющей РНК и дру-
гих целей.

Очистку гРНК производят на колонках —
например, «MEGAclean™ Transcription
Clean-Up Kit» (Ambion, AM1908) (<https://www.fishersci.com>) или «набора mini
для выделения ДНК и РНК из реакционных
смесей» (<https://biolabmix.ru>). Хранение вы-
деленной РНК при -80°C .

Проведенный анализ методических под-
ходов к реализации высокоэффективного
РНП комплекса CRISPR/Cas показал воз-
можность его применения в условиях обык-
новенной ПЦР-лаборатории с использованием
реактивов отечественного производителя,
например, «Биолабмикс» (Новосибирск),
в качестве альтернативы импортным ре-
активам. Несомненно, развитие и модер-
низация применяемых методов повысят
эффективность получения генно-модифи-
цированных животных-биомodelей.

Закключение

В НЦБМТ ФМБА России получены более
20 линий генно-модифицированных мы-
шей. В процессе получения ряда мышей-
биомodelей применены методы классиче-
ского трансгенеза: создание и интеграция
в пронуклеус генетических конструкций,
содержащих структурные элементы генов
человека, использование CRISPR/Cas9-
технологии позволило получить линии мы-
шей с нокаутом собственных генов.

Для каждой линии разработаны методы
верификации трансгена, идентификации

нокаута. Выборочным секвенированием ДНК целевых нуклеотидных последовательностей в поколениях мышей отслеживали устойчивость приобретенных генетических модификаций. Наличие функционально активного трансгена подтверждали не только на уровне транскрипции (мРНК), но и на уровне целевого белка.

Получены полигибридные линии мышей-биомоделей с наличием нескольких трансгенов, а также трансгенно-нокаутные линии мышей. Суть и новизна нашего подхода заключаются в конструировании ГИК для конкретного человека со всеми нюансами генетических особенностей, учитываемая полиморфизм гена-мишени, с дальнейшим изучением на этой мышинной модели средств коррекции и лечения патологии в аспекте персонализированной медицины.

В нашем арсенале также имеется удачный опыт нокаута собственного гена мыши с его заменой геном человека гомологичной рекомбинацией (HDR). Использование CRISPR/Cas9-технологии по сравнению с классическим трансгенозом позволило резко повысить эффективность получения генно-модифицированных мышей. Практически все линии в первых поколениях представлены несколькими сублини-

ями, что позволило нам проводить более эффективную селекцию. Наш опыт показал, что применение ГИК с плазмидной реализацией имеет ряд ограничений — случайное встраивание трансгена; разная копияность; низкий уровень трансгенеза — до 3%, тогда как использование CRISPR/Cas9-метода в виде рибонуклеопротеиновых комплексов существенно повысит эффективность и специфичность встраивания, повысит уровень частоты целевых модификаций; даст возможность использовать несколько гРНК; возможность интеграции одной копии HDR-ДНК-матрицы (трансген). Высокая эффективность РНП комплексов CRISPR/Cas9 позволит нам получать не только мышей-биомоделей, но и естественным образом подойти к созданию востребованных для биомедицинских исследований генно-модифицированных кроликов, крыс и других животных.

Многолетний опыт показал, что весь комплекс генетических исследований для получения новых трансгенных линий мы можем осуществлять с помощью реактивов и наборов отечественного производителя, что дает возможность совершенствовать нашу методическую базу для воплощения планов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М. Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы). *Биомедицина*. 2014;1(3):4–22. [Karkischenko N.N., Ryabykh V.P., Karkischenko V.N., Koloskova E.M. Sozdanie gumanizirovannykh myshey dlya farmakotoksikologicheskikh issledovaniy (uspekhi, neudachi i perspektivy) [Creation of humanized mice for pharmacotoxicological research (successes, failures and prospects)]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2014;1(3):4–22. (In Russian)].
2. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С., Езерский В.А., Колоскова Е.М., Лазарев В.Н., Максименко С.В., Петрова Н.В., Столярова В.Н., Трубицына Т.П. Молекулярно-генетические аспекты технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами
3. N-ацетилтрансферазы (NAT1 и NAT2) человека. *Биомедицина*. 2016;1:4–17. [Karkischenko V.N., Ryabykh V.P., Karkischenko N.N., Dulya M.S., Ezerskiy V.A., Koloskova E.M., Lazarev V.N., Maksimenko S.V., Petrova N.V., Stolyarova V.N., Trubitsyna T.P. Molekulyarno-geneticheskie aspekty tekhnologii polucheniya transgennykh myshey s integrirovannymi genami N-atsetiltransferazy (NAT1 i NAT2) cheloveka [Molecular and genetic aspects of the technology for producing transgenic mice with integrated genes of human N-acetyltransferase (NAT1 and NAT2)]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2016;1:4–17. (In Russian)].
3. Каркищенко В.Н., Болотских Л.А., Капанадзе Г.Д., Каркищенко Н.Н., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Матвеев Е.Л., Петрова Н.В., Рябых В.П., Ревякин А.О., Станкова Н.В., Семенов Х.Х. Создание линий трансгенных животных-моделей

- с генами человека NAT1 и NAT2. *Биомедицина*. 2016;1:74–84. [Karkischenko V.N., Bolotskikh L.A., Kapanadze G.D., Karkischenko N.N., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Matveyenko E.L., Petrova N.V., Ryabykh V.P., Revyakin A.O., Stankova N.V., Semenov Kh.Kh. Sozdaniye liniy transgennykh zhi-votnykh-modeley s genami cheloveka NAT1 i NAT2 [Creation of lines of transgenic animal models with human genes NAT1 and NAT2]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2016;1:74–84. (In Russian)].
4. Каркищенко В.Н., Берзина А.Г., Петрова Н.В., Помыткин И.А., Глотова Е.С., Петров Д.В., Таболякова Л.А., Болотских Л.А., Ларюшина Н.А. Доказательство наличия целевых белков — β 2m hom и HLA u гуманизированных трансгенных мышей линий HLA-A*02:01, HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02. *Биомедицина*. 2024;20(2):32–44. [Karkischenko V.N., Berzina A.G., Petrova N.V., Pomytkin I.A., Glotova E.S., Petrov D.V., Taboyakova L.A., Bolotskikh L.A., Laryushina N.A. Dokazatel'stvo nalichiya celevykh belkov — β 2m hom i HLA u gumanizirovannykh transgennykh myshej liniy HLA-A*02:01, HLA-B*07:02 i HLA-C*07:02 [Evidence for the Presence of β 2m hom Target Proteins and HLA in Humanized Transgenic Mice of HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, and HLA-C*07:02 Lines]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2024;20(2):32–44. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-20-2-32-44.
5. Каркищенко Н.Н., Лазарев В.Н., Манувера В.А., Бобровский П.А., Петрова Н.В., Колоскова Е.М., Глотова Е.С. Принципы создания генно-инженерной конструкции для получения гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген HLA-C*07:02:01:01, как прообраз инновационных трансгенно-нокаутных биомоделей. *Биомедицина*. 2024;20(1):8–20. [Karkischenko N.N., Lazarev V.N., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Petrova N.V., Koloskova E.M., Glotova E.S. Principy sozdaniya genno-inzhenernoj konstrukcii dlya polucheniya gumanizirovannykh transgennykh myshej, nesushchih gen HLA-C*07:02:01:01, kak proobraz innovacionnykh transgenno-nokautnykh biomodelej [Principles of Creation of a Genetic Engineering Construction for Obtaining Humanized Transgenic Mice with HLA-C*07:02:01:01, as a Promote of Innovative Transgenic and Knockout Biomodels]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2024;20(1):8–20. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-20-1-8-20.
6. Каркищенко В.Н., Петрова Н.В., Савченко Е.С., Огнева Н.С., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Манувера В.А., Бобровский П.А., Лазарев В.Н. Создание полных гибридных ДНК-конструкций с геном человека HLA-A*02:01:01:01. *Биомедицина*. 2021;17(1):10–23. [Karkischenko V.N., Petrova N.V., Savchenko E.S., Ogneva N.S., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Lazarev V.N. Sozdanie polnih gibridnih DNK-konstrukcij s genom cheloveka HLA-A*02:01:01:01 [Chimeric Construct Engineering with Human Variant HLA-A*02:01:01:01]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;17(1):10–23. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-17-1-10-23.
7. Каркищенко Н.Н., Глотова Е.С., Петрова Н.В., Слободенюк В.В., Ларюшина Н.А., Петров Д.В., Васильева И.А., Дерябин К.Е. Генетический скрининг новой трансгенной гуманизированной по HLA-A*02:01:01:01 и h β 2m линии мышей. *Биомедицина*. 2023;19(3E):10–24. [Karkischenko N.N., Glotova E.S., Petrova N.V., Slobodenyuk V.V., Laryushina N.A., Petrov D.V., Vasil'eva I.A., Deryabin K.E. Geneticheskij skринing novoj transgennoj gumanizirovannoj po HLA-A*02:01:01:01 i h β 2m linii myshej [Genetic Screening of a New Transgenic Mouse Line Humanized for HLA-A*02:01:01:01 and h β 2m]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2023;19(3E):10–24. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-19-3E-10-24.
8. Савченко Е.С., Огнева Н.С., Каркищенко Н.Н. Эмбриологические аспекты создания новой гуманизированной трансгенной линии мышей с интегрированным геном человека HLA-A*02:01:01:01. *Биомедицина*. 2022;18(4):10–23. [Savchenko E.S., Ogneva N.S., Karkischenko N.N. Embriologicheskie aspekty sozdaniya novoj gumanizirovannoj transgennoj linii myshej s integrirovannym genom cheloveka HLA-A*02:01:01:01 [Embryological Aspects of Creating a New Humanized Transgenic Mouse Line with an Integrated Human Gene HLA-A*02:01:01:01]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2022;18(4):10–23. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-4-10-23.
9. Chang H., Pannunzio N.R., Adachi N., Lieber M.R. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017;18(8):495–506. DOI: 10.1038/nrm.2017.48.
10. Concordet J.P., Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W242–W245. DOI: 10.1093/nar/gky354.
11. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819–823. DOI: 10.1126/science.1231143.
12. Heyer W.D., Ehmsen K.T., Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 2010;44:113–139. DOI: 10.1146/annurev-genet-051710-150955.
13. Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G., Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(9):827–832. DOI: 10.1038/nbt.2647.
14. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816–821. DOI: 10.1126/science.1225829.

15. 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. DOI: 10.1038/srep03355.
16. Montague T.G., Cruz J.M., Gagnon J.A., Church G.M., Valen E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Web Server issue):W401–W407. DOI: 10.1093/nar/gku410.
17. Symington L.S., Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu. Rev. Genet.* 2011;45:247–271. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132435.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Николай Николаевич, акад. РАРАН, чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: niknik2808@yandex.ru

Nikolay N. Karkischenko, Academician of the Russian Academy of Rocket and Artillery Sciences, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: niknik2808@yandex.ru

Колоскова Елена Михайловна*, к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»;

e-mail: heleko3@yandex.ru

Elena M. Koloskova*, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Center of Animal Husbandry — The All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst;

e-mail: heleko3@yandex.ru

Петрова Наталья Владимировна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: m-sklad@yandex.ru

Natalia V. Petrova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: m-sklad@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author