

Практическое руководство по редактированию геномов системой CRISPR/Cas9

А.Г. Мензоров^{1,2}, В.А. Лукьянчикова¹, А.Н. Кораблев¹, И.А. Серова¹, В.С. Фишман^{1,2} 

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Технология CRISPR/Cas за последние несколько лет совершила прорыв в области редактирования геномов. В силу высокой эффективности и простоты сборки отдельных компонент в условиях современной лаборатории, система CRISPR/Cas применяется огромным количеством исследователей в самых разных областях биологии. После появления первых сведений о редактировании генома млекопитающих системой CRISPR/Cas9 было разработано множество методов, предлагающих те или иные модификации белков семейства Cas или направляющих РНК. Целый ряд работ посвящен использованию технологий, основанных на системе CRISPR/Cas, для самых неожиданных целей – не только для редактирования геномов, но и для контроля экспрессии определенных генов, локализации и визуализации отдельных локусов ДНК в пространстве ядра, изменения статуса метилирования заданных сайтов в геноме млекопитающих и многое другое. Подробности работы системы CRISPR/Cas и способы ее применения детально рассмотрены нами ранее. Наиболее часто система CRISPR/Cas используется именно для редактирования геномов, однако, несмотря на кажущуюся простоту, существует ряд технических сложностей, с которыми можно столкнуться, применяя эту технологию впервые. В настоящей статье подробно описаны протоколы, связанные со сборкой, тестированием и использованием системы CRISPR/Cas9 для внесения мутаций в геном млекопитающих. Дано краткое пояснение теоретических аспектов процессов, связанных с внесением направленных модификаций в геном млекопитающих. Подробно описана методика клонирования и тестирования векторов для доставки компонент системы CRISPR/Cas9 в клетки. Приведены протоколы модификации генома клеток в культуре и создания трансгенных животных. В каждом из разделов упомянуты потенциальные сложности, связанные с использованием системы CRISPR/Cas9, и предложены способы их преодоления.

Ключевые слова: редактирование геномов; CRISPR/Cas9; эмбриональные стволовые клетки.

Genome editing using CRISPR/Cas9 system: a practical guide

A.G. Menzorov^{1,2}, V.A. Lukyanchikova¹,
A.N. Korablev¹, I.A. Serova¹, V.S. Fishman^{1,2} 

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Over the past few years, the CRISPR/Cas techniques have become a revolution in genome editing. Since the original paper on CRISPR/Cas9 genome editing, researchers have proposed numerous modifications of the key components of the CRISPR/Cas9 system to make it extremely efficient. Nowadays, CRISPR/Cas systems can be used not only to modify genomes, but also to control expression levels of defined genes, visualize loci of interest in the space of living cell nuclei, change methylation status of mammalian CpG sites, and to serve many other purposes. Due to an extremely high efficacy and ease of usage, the CRISPR/Cas system has been employed in a large number of studies in various areas of biology and biotechnology. We have recently published a review describing various CRISPR/Cas systems, mechanisms of their functioning, and applications of the techniques in details. Despite the broad range of potential applications of CRISPR/Cas systems, they are mostly used for genome editing. And, however simple the system may be, there is a number of potential pitfalls on the way towards its use in CRISPR/Cas-naïve laboratory settings. In this article, we describe protocols of CRISPR/Cas9 system generation. We start with a short description of theoretical aspects underlying Cas9-mediated genome editing. Next, we describe a step-by-step protocol of guide RNA vector design and assembly, and several ways of qualitative and quantitative evaluations of the system. Finally, we report protocols of genome editing for modification of embryonic stem cells and zygotes.

Key words: genome editing; CRISPR/Cas9; embryonic stem cells.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Мензоров А.Г., Лукьянчикова В.А., Кораблев А.Н., Серова И.А., Фишман В.С. Практическое руководство по редактированию геномов системой CRISPR/Cas9. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(6):930-944. DOI 10.18699/VJ16.214

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Menzorov A.G., Lukyanchikova V.A., Korablev A.N., Serova I.A., Fishman V.S. Genome editing using CRISPR/Cas9 system: a practical guide. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(6):930-944. DOI 10.18699/VJ16.214

Модификация генома млекопитающих системой CRISPR/Cas9. Система CRISPR/Cas9 состоит из двух основных частей. Первой является белок, нуклеаза Cas9, которая способна вносить двуцепочечный разрыв в молекулу ДНК. Вторая представляет собой небольшую молекулу РНК размером около 120 нуклеотидов – химерную направляющую РНК (хнРНК). Далее будем использовать сокращение хнРНК; в английском языке распространена аббревиатура gRNA (от англ. guide RNA – направляющая РНК). Последовательность направляющей РНК можно условно разделить на две части. Около 100 нуклеотидов, расположенных на 3'-конце, являются одинаковыми для всех направляющих РНК и обеспечивают формирование специфической пространственной структуры, которая узнается белком Cas9. Около 20 нуклеотидов, расположенных на 5'-конце направляющей РНК, определяют последовательность ДНК, с которой свяжется белок Cas9. Белок Cas9 вносит двуцепочечный разрыв в молекулу ДНК в месте, которое комплементарно 5'-последовательности хнРНК при условии, что непосредственно за комплементарным хнРНК участком находится тринуклеотид NGG (здесь и далее N – любой из четырех нуклеотидов ДНК, A, T, G или C), который называется PAM (protospacer adjacent motif – мотив, прилегающий к протоспейсеру) (рис. 1, а). Разрыв в ДНК происходит на расстоянии 3–4 нуклеотидов от PAM. На этом работа системы CRISPR/Cas9 заканчивается, и дальнейшая модификация генома происходит при участии системы репарации ДНК клетки.

Двуцепочечные разрывы в клетках млекопитающих могут репарироваться разными путями. В случае репарации по механизму негомологичного соединения концов (non-homologous end joining – NHEJ) в месте разрыва могут возникать небольшие inserции или делеции. В случае репарации по механизму гомологичной рекомбинации для восстановления информации о последовательности ДНК используются сестринские хроматиды или искусственно введенная экспериментатором в клетку генетическая конструкция, имитирующая сестринскую хроматиду. Более подробно этот вопрос рассмотрен в обзоре (Смирнов и др., 2016).

Дизайн эксперимента, предполагающего использование системы CRISPR/Cas9, зависит от того, какую именно модификацию генома исследователь планирует получить. Можно выделить три типа таких модификаций.

Первый тип модификации – внесение небольших inserций и делеций (INDEL – INsertion or DELetion). Размер таких модификаций может варьировать от одной до нескольких десятков пар оснований, но, как правило, затрагивает от 1 до 10 нуклеотидов. Чаще всего внесение INDEL применяется для нокаутирования какого-либо гена, при этом INDEL может приводить к сдвигу рамки считывания или разрушению сайта сплайсинга. В первом случае (сдвиг рамки считывания) экспрессия гена и транскрибирующаяся мРНК меняются лишь незначительно, однако при трансляции образуется нефункциональный белок. Во втором случае (разрушение сайта сплайсинга) последовательность мРНК и уровень ее экспрессии могут существенно изменяться, и, кроме того, при трансляции тоже образуется нефункциональный белок. Для реализа-

ции такого эксперимента исследователю достаточно обеспечить экспрессию в клетке одной хнРНК (специфичной модифицируемому участку) и белка Cas9.

Второй тип модификации – введение целевой последовательности ДНК в определенный участок генома. Для этого системой CRISPR/Cas9 вносится разрыв в участок генома, который необходимо модифицировать. Одновременно в клетку доставляют фрагмент ДНК, содержащий встраиваемый участок, фланкированный гомологичными месту разрыва последовательностями (конструкцию для гомологичной рекомбинации). Конструкция для гомологичной рекомбинации имитирует сестринскую хроматиду, и информация из нее «копируется» в место разрыва. Таким образом, для реализации эксперимента исследователю требуется экспрессия в клетке хнРНК, Cas9 и наличие конструкции для гомологичной рекомбинации.

Третий тип модификации – создание крупных (от сотен до сотен тысяч пар оснований) делеций. Наиболее простой способ такой модификации – экспрессия в клетке белка Cas9 и двух хнРНК, каждая из которых будет нести на 5'-конце последовательность нуклеотидов, комплементарную одной из границ предполагаемой делеции. В результате в хромосоме возникнут два разрыва, концы которых могут быть соединены по механизму NHEJ, что и приведет к возникновению необходимой делеции.

Протокол внесения модификаций в геном млекопитающих при помощи системы CRISPR/Cas9

Этап 1. Выбор последовательностей хнРНК и дизайн эксперимента

Теоретически любая последовательность геномной ДНК, содержащая два подряд идущих гуанина, может быть использована как сайт для внесения разрывов системой CRISPR/Cas9. Например, в случае последовательности ДНК 5'-GTAGGCGACGAATTGACACATGG-3' (здесь и далее подчеркнут и выделен жирным шрифтом PAM) хнРНК должна на 5'-конце иметь 20 нуклеотидов, прилегающих к PAM-последовательности: GUAGGCGACGAAUUGACACA.

*Важно! Обратите внимание, что сама последовательность PAM **не входит** в состав хнРНК, но должна обязательно присутствовать в ДНК.*

Важным аспектом выбора хнРНК является анализ ее специфичности. Активация системы CRISPR/Cas9 и внесение разрывов могут происходить даже в случае неполной комплементарности хнРНК и ДНК. Наибольшую роль в специфическом связывании комплекса хнРНК-Cas9 с ДНК играют нуклеотиды хнРНК, располагающиеся ближе к 3'-концу, наименьшую – располагающиеся ближе к 5'-концу. Таким образом, внесение разрывов возможно даже при совпадении 12–16 из 20 нуклеотидов хнРНК, задающих специфичность, с последовательностью геномной ДНК (Jinek et al., 2012). Неспецифические сайты узнавания называют также off-target сайтами, и их наличие можно легко определить в геномах с известной нуклеотидной последовательностью для каждой конкретной хнРНК.

В ряде работ было показано, что нуклеотидный состав хнРНК может влиять на эффективность работы систе-

мы CRISPR/Cas9 (Chari et al., 2015). Поэтому следует оценивать нуклеотидный состав выбранной для таргетирования последовательности при помощи специального программного обеспечения.

Наконец, для эффективной транскрипции выбранной хнРНК *in vitro* или *in vivo* желательно, чтобы первым нуклеотидом, расположенным на 5'-конце хнРНК (с которого будет начинаться синтез молекулы РНК), был гуанин. (Это связано с использованием U6 промотора для транскрипции направляющей РНК. При использовании других промоторов такой необходимости нет.) Поэтому предпочтительно выбирать для таргетирования последовательности ДНК вида G(N)₁₉**NGG**. В случае, если это невозможно, первая буква выбранной последовательности должна быть заменена на гуанин, что в большинстве случаев не будет фатальным для узнавания таргетируемой последовательности, поскольку специфичность системы CRISPR/Cas9 в большей степени задается 12–16 буквами, расположенными ближе к 3'-концу специфической последовательности хнРНК.

Таким образом, для выбора последовательности хнРНК в определенном участке генома исследователю необходимо:

1. Найти все тринуклеотиды NGG (PAM-последовательности) в этом участке*
2. Для каждого тринуклеотида проанализировать нуклеотидную композицию двадцати нуклеотидов, расположенных на 5'-конце PAM
3. Выбрать последовательности с наименьшим числом неспецифических мест связывания в геноме (желательно вообще не имеющие таких мест связывания)
4. При необходимости заменить первый нуклеотид в выбранной последовательности на гуанин

* Кроме последовательностей вида «NGG» подходят и последовательности «CCN», в этом случае необходимо выполнять пункты 1–4 с комплементарной цепью ДНК.

** Данные о неспецифических сайтах и эффективности получены при помощи программы https://crispr.med.harvard.edu/sgRNA_Scorer для генома человека. Функционал программы обсуждается ниже.

Выполнение пунктов 1–3 достаточно трудоемкий процесс, для оптимизации которого были созданы специальные онлайн-сервисы. Мы рекомендуем использовать такие сервисы, а не проводить «ручной» подбор хнРНК.

Достаточно простой по функциональности сервис расположен на

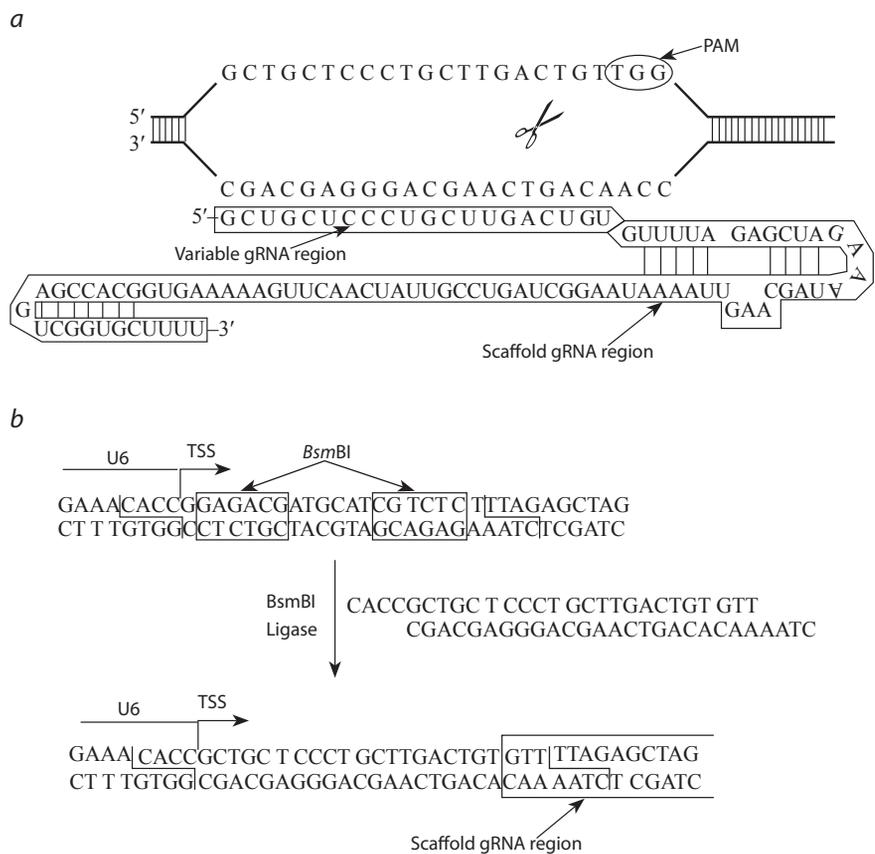


Fig. 1. Generation of a gRNA-carrying vector. (a) Schematic representation of gRNA and a targeting locus. (b) A strategy of gRNA vector cloning.

Ligase, T4 DNA ligase; U6, promoter of the U6 gene; TSS, position of the transcription start site.

AAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGT**TTGG**
ATCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTATAAAAAAA**AGG**CTTGACCGA
CAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGTTACGTTTTGCGCT
TCTGCTCCCTGCTTGTGTGT – низкая эффективность**
AAATTTAAATTATAAAAAAA – высокая эффективность

TCTGCTCCCTGCTTGTGTGT – 7 неспецифических сайтов
AAATTTAAGCTATAAAAAAA – более 40 неспецифических сайтов

GCTGCTCCCTGCTTGACTGT
GAAATTTAAGCTATAAAAAAA

сайте <http://crispr.mit.edu/>. Он позволяет определять в последовательности ДНК все потенциальные сайты модификации системой CRISPR/Cas9 и находить для каждого из них неспецифические сайты связывания в выбранном геноме (off-target сайты). Для каждой хнРНК программа вычисляет рейтинг (score), показывающий количество потенциальных неспецифических сайтов. Чем ближе рейтинг к 100, тем меньше неспецифических сайтов найдено.

Другая, более функциональная программа sgRNA Scorer 1.0 доступна по адресу <https://crispr.med.harvard.edu/>. В случае применения этой программы пользователю высылается на адрес электронной почты отчет, основной

файл которого (под названием CasFinderOutput.input.FinalOutput) содержит все потенциальные сайты модификации системой CRISPR/Cas9 в целевой последовательности ДНК, предполагаемую эффективность модификации в зависимости от нуклеотидного состава хнРНК, количество и позиции off-target сайтов в выбранном геноме. Предсказанная эффективность модификации (столбец score) варьирует от 0 до 100, большее значение score соответствует большей эффективности. Мы рекомендуем использовать хнРНК, имеющие score более 90.

Внимание! Программа sgRNA Scorer 1.0 требует ввода данных в формате FASTA. Это означает, что перед каждой из анализируемых последовательностей ДНК, вводимой в окно «Paste Sequence», должна располагаться строка с названием этой последовательности, начинающаяся с символа «>». Пример:

>Test_DNA_1

```
AATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCT  
CCCTGCTTGTGTGTTGGATCGCTGAGTAGTGCGCGAGC  
AAAAATTAAGCTATAAAAAAAGGCTTGACCGACAATTGC  
ATGAAGAATCTGCTTAGTTACGTTTTGCGCT
```

Наконец, следует обратить внимание на то, что выбранная последовательность хнРНК не должна содержать сайтов узнавания для фермента BsmBI (см. этап 2 «Создание вектора для экспрессии хнРНК»).

Особенности выбора последовательностей хнРНК и дизайна эксперимента для определенных типов модификаций. При выборе последовательности хнРНК важно учесть некоторые особенности, связанные с дизайном планируемого эксперимента. Например, если предполагается тестирование ДНК при помощи рестриционного анализа (см. этап 3), необходимо при выборе последовательности убедиться, что на расстоянии 3–4 нуклеотидов от PAM (в месте внесения двуцепочечного разрыва системой CRISPR/Cas9) содержится сайт узнавания какой-либо эндонуклеазы рестрикции.

В случае внесения INDEL и их последующей идентификации при помощи ПЦР (см. этап 4) необходимо одновременно с выбором хнРНК подобрать соответствующие праймеры для ПЦР-анализа. После того как праймеры, фланкирующие место посадки комплекса хнРНК-Cas9, подобраны, мы рекомендуем провести подбор условий ПЦР и только после этого начинать эксперимент по модификации генома. Чаще всего при выборе последовательности хнРНК используются данные из официальных версий сборки генома. Мы рекомендуем провести секвенирование полученных ПЦР-продуктов, чтобы удостовериться что геном организмов (или клеток), которые предполагается использовать в эксперименте, совпадает с референсным геномом в таргетируемой области.

Если предполагается, что INDEL должен привести к нокауту какого-либо гена, необходимо тщательно проанализировать варианты альтернативного сплайсинга этого гена, наличие альтернативных промоторов и стартокодонов, доменную организацию белка. В противном случае существует вероятность того, что внесенная мутация не приведет к полной утрате биологической функции.

Если планируется использование конструкций для гомологичной рекомбинации для внесения последовательностей ДНК в определенный участок генома, обратите

внимание на то, что сайт узнавания хнРНК должен отсутствовать в этой конструкции. В рамках данной статьи мы не останавливаемся подробно на протоколах создания такой конструкции, отсылая читателя к классическим руководствам по молекулярной биологии и геной инженерии (Щелкунов, 2004). Отметим только, что, исходя из нашего опыта, размер плечей гомологии должен быть не менее 500 нуклеотидов. Литературные данные свидетельствуют о том, что увеличение размера плечей гомологии до нескольких тысяч пар оснований приводит к увеличению эффективности модификации генома, в том числе и при использовании системы CRISPR/Cas9 (Li et al., 2014).

Наконец, эффективность разных хнРНК может существенно различаться. Мы рекомендуем выбирать и клонировать несколько разных хнРНК и определять эффективность для каждой из них в эксперименте (см. этап 3 «Тестирование хнРНК»).

Этап 2. Создание вектора для экспрессии хнРНК

Вектор для экспрессии хнРНК должен содержать следующие элементы: бактериальный ориджин репликации (для наработки вектора в бактериях); бактериальный селективный маркер (для селекции трансформированных бактерий, несущих вектор, например, ген устойчивости к канамицину); эукариотический промотор, обеспечивающий эффективную транскрипцию в клетках млекопитающих (традиционно используются промоторы, процессируемые РНК-полимеразой III, поскольку хнРНК относится к некодирующим РНК; например, промотор гена U6); последовательность хнРНК (начиная с 5'-гуанина); сигнал терминации транскрипции.

Как говорилось ранее, хнРНК состоит из специфической части, представленной 20 нуклеотидами на 5'-конце, и конститутивной части, одинаковой для всех экспериментов (около 100 нуклеотидов). Это означает, что векторы для экспрессии различных хнРНК будут различаться только 20 буквами на 5'-конце последовательности хнРНК. Поэтому были предложены эффективные системы клонирования, позволяющие заменять только небольшой фрагмент вектора на специфическую последовательность, содержащую 20 нуклеотидов необходимой хнРНК.

Мы предлагаем протокол клонирования хнРНК, основанный на использовании вектора gRNA_Cloning_Vector_BsmBI. Вектор gRNA_Cloning_Vector_BsmBI содержит бактериальный ориджин репликации, ген устойчивости к канамицину, промотор U6, два сайта рестрикции BsmBI и терминатор транскрипции. При обработке рестриктазой BsmBI из вектора удаляется небольшой фрагмент, расположенный между промотором U6 и конститутивной частью хнРНК (см. рис. 1, б). Поскольку фермент BsmBI относится к типу ферментов II, он узнает асимметричный сайт (CGTCTC) и вносит двуцепочечный разрыв на некотором расстоянии от него. В результате гидролиза вектора gRNA_Cloning_Vector_BsmBI из него удаляются сайты узнавания фермента BsmBI и образуются липкие концы для лигирования фрагмента ДНК, кодирующего специфическую последовательность хнРНК. Таким образом, обработку ферментом BsmBI и лигирование можно проводить в одной реакции.

Протокол клонирования вектора для экспрессии хнРНК

Материалы

- Вода. Здесь и далее в протоколах используется деионизованная вода (ddH₂O) с удельным сопротивлением более 18 МОм·см, например Sigma 7732-18-5.
- Плазмидный вектор gRNA_Cloning_Vector_BsmBI, концентрация 300 нг/мкл. Вектор был клонирован в лаборатории генетики развития на основе плазмиды Addgene #41824. Вектор и его полная нуклеотидная последовательность доступны по запросу в лаборатории генетики развития ИЦиГ СО РАН.
- Олигонуклеотиды. Для выбранной последовательности хнРНК вида G(N)₁₉**NGG** и комплементарной ей последовательности **CCX(X)**₁₉C (где азотистые основания X комплементарны соответствующим основаниям N) необходимо заказать химический синтез двух олигонуклеотидов: gRNA_F 5'-CACCG(N)₁₉GTT-3' и gRNA_R 5'-CTAAAC(X)₁₉C-3'.

*Пример: для таргетируемой последовательности GCTGCTCCCTGCTTACTGT**TGG** закажите олигонуклеотиды 5'-CACCGCTGCTCCCTGCTTACTGTGTT-3' и 5'-CTAAACACAGTCAAGCAGGGAGCAGC-3'.*

Для секвенирования полученных векторов необходимо заказать олигонуклеотид M13F: 5'-TGTAACAGC ACGGCCAGT-3'. Полученные олигонуклеотиды должны быть разведены до концентрации 100 мкМ в ddH₂O.

- Полинуклеотидкиназа фага T4 (T4 PNK, NEB M0201S) и соответствующий буфер (10X T4 PNK Buffer, поставляется вместе с ферментом).
- Лигаза фага T4 (T4 DNA ligase, NEB M0202S) и соответствующий буфер (T4 DNA Ligase Buffer, поставляется вместе с ферментом).
- Фермент BsmBI (NEB R0580S).
- Бычий сывороточный альбумин (BSA), концентрация 20 мг/мл, качество, пригодное для молекулярно-биологических работ (например, NEB B9000S).
- Компетентные клетки *Escherichia coli* (например, NEB C3019).
- Канамицин (например, Sigma 25389-94-0), концентрация стока 100 мг/мл.
- Жидкая среда LB (на 100 мл содержит: бакто-триптон 1 г; бактериально-дрожжевой экстракт 0.5 г; NaCl 0.5 г).
- Агаризованная среда LB (на 100 мл содержит: бакто-триптон 1 г; бактериально-дрожжевой экстракт 0.5 г; NaCl 0.5 г; агар 1.5 г).
- Наборы для выделения плазмидной ДНК (Biosilica PLD-100 или аналог).

Оборудование

- Программируемый термошейкер и/или амплификатор.
- Прибор для трансформации в случае использования электрокомпетентных клеток (BioRad Micropulser или аналог) и специализированные кюветы (Gene Pulser/MicroPulser Cuvette, Bio-Rad).
- Пластиковые чашки Петри (*d* = 10 см).

Протокол

I. Отжиг и фосфорилирование нуклеотидов. Смешайте в пробирке в указанном порядке:

1. 6.5 мкл ddH₂O.

2. По 1 мкл каждого из двух олигонуклеотидов gRNA_F и gRNA_R.

3. 1 мкл T4 DNA Ligase Buffer*.

4. 0.5 мкл T4 PNK.

Объем реакции составляет 10 мкл.

Перемешайте содержимое пробирки пипетированием, затем инкубируйте в следующем температурном режиме:

1. 37 °C → 30 мин.

2. 95 °C → 5 мин.

3. Равномерное снижение температуры до 25 °C по 5 °C в минуту.

II. Реакция рестрикции–лигирования. Смешайте в пробирке в указанном порядке:

1. 6.5 мкл ddH₂O.

2. 1 мкл T4 DNA Ligase Buffer.

3. 0.1 мкл BSA.

4. 0.4 мкл реакционной смеси, полученной на шаге I (содержит фосфорилированные двуцепочечные фрагменты ДНК).

5. 1 мкл плазмиды gRNA_Cloning_Vector_BsmBI.

6. 0.5 мкл T4 DNA Ligase.

7. 0.5 мкл BsmBI.

Объем реакции составляет 10 мкл.

*Лигазный буфер (T4 DNA Ligase Buffer) содержит рибоаденозинтрифосфорную кислоту (pATФ), которая разрушается при повторном размораживании и замораживании буфера. Поэтому не рекомендуется использовать размороженные аликвоты буфера повторно. Кроме того, в случае неэффективного лигирования можно дополнительно добавлять pATФ (NEB P0756) в реакцию.

Перемешайте содержимое пробирки пипетированием, затем инкубируйте в следующем температурном режиме:

1. 37 °C → 5 мин.

На этом шаге происходит гидролиз вектора ферментом BsmBI.

2. 20 °C → 5 мин.

На этом шаге происходит лигирование вставки и гидролизованного вектора.

3. Повторить шаги 1 и 2 15–35 раз.

На шаге 2 в гидролизованный вектор может быть как лигирован целевой фрагмент, так и обратно лигирован фрагмент, вырезанный из вектора на шаге 1. Однако в случае лигирования целевого фрагмента в образовавшемся векторе нет сайта узнавания фермента BsmBI, тогда как при обратном лигировании этот сайт восстанавливается. Поэтому увеличение количества циклов рестрикции–лигирования приводит к увеличению выхода целевого продукта.

На этом этапе протокол может быть остановлен, продукт реакции II может в течение нескольких часов храниться при температуре 10 °C или в течение нескольких дней при температуре –20 °C.

III. Трансформация бактериальных клеток. Используйте 0.5–1 мкл продукта реакции II для трансформации компетентных клеток *E. coli*. Необходимо высадить трансформированные бактериальные клетки на чашку Петри на твердую агаризованную среду LB (20–25 мл), содержащую селективный антибиотик канамицин с конечной концентрацией 50 мкг/мл. Убрать чашки с бактериями в термостат, инкубировать при 37 °C в течение 12–18 ч.

Существует несколько различных протоколов приготовления компетентных клеток и их трансформации. Мы не приводим их подробного описания, рекомендуя читателю ознакомиться с классическими молекулярно-биологическими методиками (Sambrook, Russell, 2001; Щелкунов, 2004). Для лабораторий, не использующих генно-инженерные методы рутинно, рекомендуем покупку компетентных клеток (например, NEB C2989K) и проведение трансформации в соответствии с протоколом производителя (например, <https://www.neb.com/protocols/1/01/01/electroporation-protocol-c2989>). Экспериментатору надо учитывать, что компетентные клетки НЕ ДОЛЖНЫ нести устойчивость к канамицину.

IV. Скрининг трансформантов. Выберете 2–4 клон из полученных трансформантов (в обычном эксперименте мы получаем десятки или сотни трансформантов). Нарастите соответствующие бактериальные культуры и выделите плазмидные ДНК, как описано в стандартных молекулярно-биологических протоколах (Sambrook, Russell, 2001; Щелкунов, 2004) или в руководствах к соответствующим наборам. Проведите секвенирование плазмидной ДНК с использованием праймера M13F, чтобы удостовериться в корректности последовательности хнРНК.

Этап 3. Тестирование хнРНК

Во многих публикациях показано, что эффективность работы CRISPR/Cas9 может сильно зависеть от выбора конкретной хнРНК. Поэтому перед началом эксперимента мы рекомендуем провести тестирование хнРНК. Для этого предложены два протокола тестирования, один из которых основан на системе pDR, другой – на методе разрушения сайта эндонуклеазы рестрикции.

Тестирование хнРНК с помощью системы pDR

Впервые система на основе pDR-плазмиды была создана и использована для оценки эффективности процесса гомологичной рекомбинации у млекопитающих в работе (Pierce et al., 1999). На клетках китайского хомячка, дефицитных по продукту гена *XRCC3*, предполагалось проверить, насколько критично отсутствие данного белка и будут ли в этом случае осуществляться процессы репарации по гомологичному механизму. В других работах с использованием pDR-вектора исследовались каталитические активности различных эндонуклеаз (Windbichler et al., 2007; Smith et al., 2009), механизмы репарационного процесса при некоторых вирусных заболеваниях (Kulkarni, Fortunato, 2011; Datta et al., 2014) и при патологических изменениях (Golding et al., 2004), а также создавались модельные системы для изучения процессов клеточной репарации (Pierce et al., 2001; Bindra et al., 2013).

В первоначальной модели (Pierce et al., 1999) плаزمида pDR содержит две «неполноценные» копии гена *GFP*, разделенные геном селективного маркера пурамицина, которые не дают функционального белкового продукта, но при запуске процесса гомологичной рекомбинации экспрессия *GFP* восстанавливается. В первую копию, которая находится под промотором куриного β -актина, слитого для усиления эффекта с CMV-энхансером, встроены уникальный сайт узнавания редкой рестриктазы *I-SceI*,

содержащий несколько стоп-кодонов и нарушающий правильную рамку считывания гена *GFP*. Поскольку ни один из известных геномов млекопитающих исходно не содержит сайтов узнавания данной рестриктазы, ее действие может быть направлено исключительно на векторную конструкцию. Вторая копия представлена геном *GFP*, усеченным с 5' и 3'-концов, но содержащим центральную кодирующую часть, которая как раз нарушена в первой копии. В обоих вариантах гена *GFP* присутствуют гомологичные друг другу последовательности, разделенные 3.7 т.п.н., что в случае повреждения плазмидной ДНК направляет репарацию по механизму гомологичной рекомбинации.

При образовании двуцепочечного разрыва на месте сайта рестрикции *I-SceI* существует несколько альтернативных вариантов развития репарационных событий. В первом случае может происходить некроссоверный вариант репарации двуцепочечных разрывов (DSBR) – процесс, при котором разрыв репарируется по гомологичному аналогу, представленному второй копией *GFP*, с образованием классических структур Холлидея, но разрешающихся без обмена участками. Во втором случае запускается путь синтез-зависимого отжига цепей, при котором также не происходит обмена участками. Продуктом в обоих случаях будет появление функционального белка *GFP*.

Альтернативным продуктом гомологичной рекомбинации является транскрипированный по 3'-концу белок *GFP*, который может образоваться также несколькими путями: по кроссоверному варианту DSBR-репарационных событий с образованием промежуточных структур Холлидея и последующим обменом фланкирующими разрыв участками или по механизму гомологичной репарации путем отжига одиночной цепи, при котором целиком деградирует фрагмент между гомологичными участками. Для исследовательских целей второй вариант продукта не представляет большого интереса, поскольку не может быть идентифицирован так же легко, как появление флуоресцентного сигнала, но при этом и не вносит препятствий в оценку эффективности работы нуклеазы.

Для того чтобы использовать pDR-систему при оценке эффективности работы комплекса «Cas9/направляющая химерная РНК», вместо сайта *I-SceI* необходимо встроить выбранную целевую последовательность, которая бы распознавалась Cas9-нуклеазой. Белок Cas9, попадая в клетку и связываясь с направляющей молекулой РНК, будет узнавать целевой фрагмент и направленно вносить двуцепочечный разрыв в предварительно доставленную в клетки pDR-векторную конструкцию. В случае корректной и стабильной работы системы гомологичной рекомбинации в клетке будет возникать зеленая флуоресценция уже на вторые сутки после этапа трансфекции. Таким образом, эффективность работы системы CRISPR/Cas9 для конкретного геномного локуса может быть оценена на проточном цитометре прямо пропорционально количеству *GFP*-позитивных клеток.

Тестовый эксперимент с pDR-системой можно разделить на два основных этапа: предварительная подготовка векторных конструкций на основе плазмиды pDR и проведение эксперимента на клетках с последующей детекцией *GFP*-позитивных клеток.

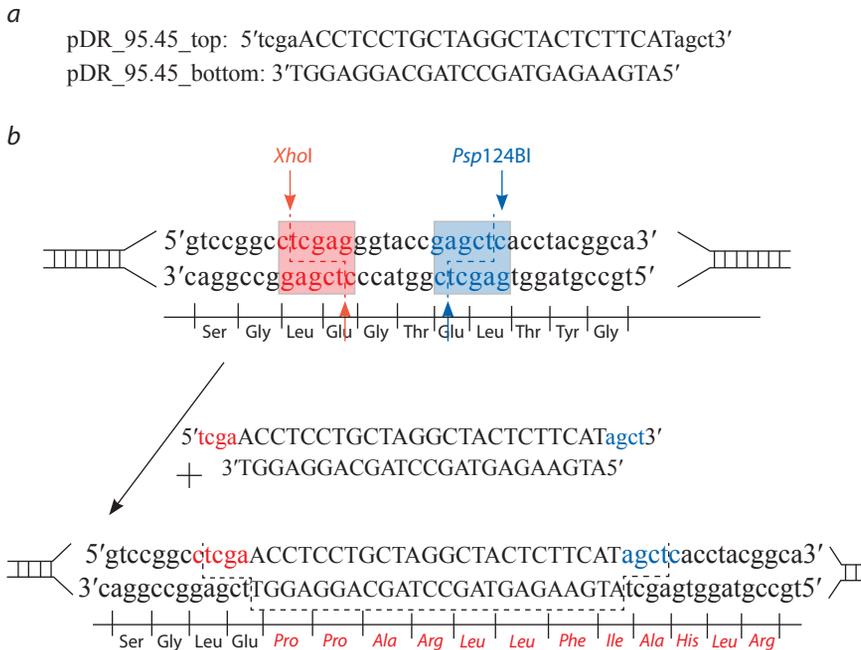


Fig. 2. pDR plasmid cloning. (a) Oligonucleotide primers used for synthesis of the target fragment, whose annealing results in the formation of a template flanked by *Psp124BI* and *XhoI* restriction sites and recognized by Cas9 nuclease. (b) The insertion of the target fragment into the linear pDR-vector through the *XhoI* and *Psp124BI* restriction sites and further shift of the *gfp* gene reading frame as a result of the insertion.

Материалы

- Плазмидные векторы pDR GFP univ (Addgene, #46085), hCas9 (вектор для экспрессии гена *Cas9*, Addgene #41815), pgRNA (вектор для экспрессии хнРНК, полученный на этапе 2).
- Олигонуклеотиды. Необходимо заказать синтез двух одноцепочечных олигонуклеотидов (top и bottom) такого состава, чтобы продукт их отжига был фланкирован сайтами рестриктаз *XhoI* и *Psp124BI* и содержал целевую последовательность для узнавания Cas9-нуклеазой (рис. 2, а). Встройка синтезированного фрагмента в первую из копий гена *GFP* pDR-плазмиды должна приводить к смещению рамки считывания данного гена и, как следствие, к нарушению экспрессии зеленого белка (см. рис. 2, б).
- Ферменты *XhoI* (Neb, R0146S), T4-лигаза (Neb, M0202), *Taq*-полимераза (Sibenzyme, E337), *Psp124BI* (Sibenzyme, E107), буфер Cut Smart (Neb, B7204S).
- NaCl (растворы с концентрациями 5 мМ и 1 М).
- Буфер TE (10 мМ Tris HCl, 1 мМ EDTA).
- Компетентные клетки, например XL1-Blue Supercompetent Cells (Neb, C2992).
- Клеточная линия Phoenix (доступна в лаборатории генетики развития ИЦиГ СО РАН либо под заказ ATCC® CRL-3215™, ATCC).
- Ампициллин (развести сток 100 мг/мл) (Sigma, A9393).
- Pen/Strep (смесь пенициллин–стрептомицин, рабочая концентрация 100 ед/мл пенициллин, 100 мкг/мл стрептомицин, 11074440001 Roche).
- Набор для выделения плазмидной ДНК (Biosilica PLD-100 или аналог).
- Липофектамин Lipofectamine® 3000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, L3000001).
- Бактериальная среда LB (описана выше).
- Среды Opti-MEM (Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, Thermo Fisher Scientific, 11058021), DMEM (DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement, HEPES, Thermo Fisher Scientific, 32430027).
- Fetal Bovine Serum (Thermo Fisher Scientific, 10270).

- GlutaMAX™ Supplement (Thermo Fisher Scientific, 35050061).
- Среда для клеток Phoenix (DMEM + 10 % FBS + 1 % GlutaMax + 1 % PenStrep).

Оборудование

- Электропоратор, в случае использования электрокомпетентных клеток (MicroPulser Electroporator, Bio rad или аналог), и специализированные кюветы (Gene Pulser/MicroPulser Cuvette, Bio-Rad).
- Амплификатор (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad или аналог).
- Термостат с температурным диапазоном 25–95 °С.
- Пластиковые чашки Петри ($d = 10$ см).
- Флуоресцентный микроскоп Axioskop 2 Plus (Carl Zeiss Microscopy, LLC, США) либо аналог.
- Проточный цитометр BD FACS Aria II (BD Biosciences, США) или аналог с возможностью детекции сигнала GFP.

Протокол дизайна и клонирования плазмидных конструкций pDR-тестовой системы

1. Развести одноцепочечные олигонуклеотиды до концентрации 100 мМ. Для отжига в 1.5 мл пробирку добавить ~1.5 мкл каждого из олигонуклеотидов (2–4 мкг), 5 мкл NaCl (стоковая концентрация 5 мМ) и довести объем смеси до 50 мкл буфером TE. Инкубировать реакционную смесь при 95 °С в течение 5 мин, затем снизить температуру на 0,5 °С каждые 20 с до достижения 25 °С. В дальнейших реакциях использовать рабочую концентрацию двуцепочечных олигонуклеотидов 20 нг/мкл. Хранить смесь при +16 °С.
2. Для линейаризации плазмиды и получения липких концов обработать вектор pDR GFP univ эндонуклеазами рестрикции *XhoI* и *Psp124BI*. Для этого в одной пробирке смешать 2 мкл буфера Cut Smart, по 1 мкл каждой из рестриктаз *XhoI* и *Psp124BI*, 2–3 мкг плазмидной ДНК и довести объем реакции до 20 мкл добавлением ddH₂O. Инкубировать 2–4 ч при 37 °С.
3. Инактивировать ферменты нагреванием при 80 °С в течение 20 мин. Мы не рекомендуем дальнейшую очистку вектора от побочных продуктов рестрикции (с использовани-

ем специальных колонок или методом выделения специфического бэнда из агарозного геля), поскольку в этом случае происходят большие потери материала, а эффективность реакции лигирования принципиально не изменяется.

4. На основе линеаризованного плазмидного вектора pDR GFP univ собрать векторную конструкцию со встройкой целевой нуклеотидной последовательности, распознаваемой Cas9-нуклеазой, поставив лигазную реакцию с T4-лигазой по предложенному протоколу. Для этого в пробирку добавить 2 мкл лигазного буфера, 1 мкл T4-лигазы, 30–50 нг вектора, 10–20 нг целевого двуцепочечного олигонуклеотида и довести объем реакции до 20 мкл добавлением ddH₂O. Рекомендуемое соотношение клонирующего вектора к олигонуклеотидному встраиваемому фрагменту 1:3. Инкубировать при комнатной температуре в течение 10–20 мин.
5. Инактивировать действие лигазы нагреванием до 65 °C в течение 10 мин.
6. Для наработки целевой плазмидной конструкции необходимо трансформировать бактериальные компетентные клетки инактивированной лигазной смесью (см. пункт III этапа 2; используемые для трансформации клетки НЕ ДОЛЖНЫ быть устойчивыми к ампициллину). Для трансформации желателен трехкратный разбавить инактивированную лигазную смесь добавлением ddH₂O, чтобы уменьшить количество солей, исходно присутствующих в лигазном буфере. Повышенное количество ионов лигазного буфера негативно сказывается на эффективности процесса электропорации. На 40 мкл электрокомпетентных клеток рекомендуется использовать 1.5 мкл разбавленной инактивированной лигазной смеси. Высадить трансформированные бактерии необходимо на чашку Петри на твердую агаризованную среду LB (20–25 мл), содержащую селективный антибиотик ампициллин с конечной концентрацией 100 мкг/мл. Затем убрать чашки с бактериями в термостат и инкубировать при 37 °C в течение 12–18 ч.
7. На следующий день следует проанализировать бактериальные колонии на наличие клонирующего вектора с целевой встройкой методом ПЦР с использованием следующих праймеров: forward – использовать топ-праймер, заказанный для синтеза целевого олигонуклеотида (пример на рис. 2, а), reverse – 5'ctgtacagctcgtccatgc3'. Рекомендуется использовать классический протокол приготовления ПЦР-реакции на 25 мкл, за тем исключением, что вместо выделенной ДНК использовать небольшой фрагмент бактериальной колонии. Удобно осуществлять перенос фрагмента анализируемой колонии носиком автоматической пипетки, затем тщательно пипетировать полученную смесь. Оптимальные условия ПЦР для данного набора праймеров и Taq-полимеразы приведены в табл. 1. Целевой ПЦР-продукт должен иметь размер 636 п. н. и может быть детектирован методом гель-электрофореза в 2 % агарозном геле.
8. Для амплификации целевой векторной конструкции со встройкой выбрать единичную позитивную колонию клеток используемого штамма и поставить с нее ночную культуру на питательной среде LB (5–10 мл) в присутствии селективного антибиотика ампициллина с конечной концентрацией 100 мкг/мл.

Table 1. Basic PCR protocol for verification of correct insertion into the pDR cloning vector

Step No.	Temperature, °C	Duration, sec	Number of cycles
I	95	300	1
II	95	30	25–30
	59	30	
	72	60	
III	72	300	1
IV	16	∞	

The optimum number of reaction cycles depends on the initial amount of plasmid DNA. Usually, 25 cycles suffice.

Table 2. Sanger sequencing reaction conditions

Step No.	Temperature, °C	Duration, sec	Number of cycles
I	96	1	1
II	96	10	40
	50	10	
	60	240	

Prior to the loading onto the sequencer, the reaction mix should be purified by gel filtration, e. g., with Sephadex G-50 (semisynthetic sorbent, highly hydrophilic dextran).

9. Выделить плазмидную ДНК при помощи специализированного набора для выделения по рекомендованному протоколу.
10. Проверить полученную векторную конструкцию на основе pDR GFP univ на наличие необходимой встройки, а также на целостность промоторного региона секвенированием по Сэнгеру целевых локусов. Использовать любой из указанных выше праймеров (forward или reverse) для контроля правильности встройки. Рекомендуемые параметры реакции секвенирования приведены в табл. 2.

Оценка эффективности работы системы CRISPR/Cas9 при помощи плазмидных конструкций pDR-тестовой системы

После того как все pDR-конструкции, а также ключевые компоненты системы CRISPR/Cas9 собраны и проверены на соответствие референсным последовательностям, можно приступать к тестовому эксперименту на клеточных культурах. Для дальнейшей работы обычно используются клетки HEK293 или их аналоги (Phoenix, 293T), которые быстро делятся и эффективно трансфицируются.

1. Предварительно, за несколько дней до эксперимента по трансфекции, необходимо разморозить клетки и нарастить их до рекомендуемой плотности (70–90 %). Мы используем рассадку на 12-луночных планшетах по (4–8) × 10⁵ клеток на лунку.
2. Провести трансфекцию липофектаминоом 3000 по стандартному протоколу с использованием P3000™ Enhancer-реагента, с максимально рекомендованной

концентрацией липофектамина, на среде Opti-MEM. Следует использовать соотношение плазмидных векторов 2.4:1:2.2, рассчитанное исходя из размеров конструкций, Cas9 (9553 п. н.):gRNA (3975 п. н.):pDR (8661 п. н.).

3. Инкубировать клетки в течение 6–8 ч в термостате при стандартных условиях (37 °C и 5 % CO₂), затем сменить среду на специализированную для фибробластов и оставить инкубироваться еще на 20–36 ч.
4. Появление зеленого свечения можно детектировать с использованием флуоресцентного микроскопа через 10–12 ч после этапа трансфекции.
5. По нашим оценкам, свечение GFP достигает максимума на вторые сутки после трансфекции. Именно в это время оптимально оценивать количество светящихся клеток на проточном цитометре. По результатам FACS-анализа (Fluorescence Activated Cell Sorting – активированная флуоресценцией сортировка клеток; несмотря на общее название, сортировка клеток в этом эксперименте не требуется, проводится только подсчет доли флуоресцирующих клеток) можно судить об эффективности действия комплекса Cas9/направляющая РНК – чем больше клеток экспрессируют зеленый флуоресцентный белок, тем лучше работает Cas9-нуклеаза, внося двуцепочечный разрыв в тестовую pDR-конструкцию, – и таким образом отбирать наиболее перспективные направляющие РНК.

Тестирование хнРНК на основе детекции разрушения сайта эндонуклеазы рестрикции в таргетируемом районе

Эффективностью внесения разрывов системой CRISPR/Cas9 может зависеть от многих параметров: нуклеотидной композиции хнРНК, доступности хроматина в данном типе клеток, эффективности доставки компонентов системы в клетки и времени их жизни и т. д. Наиболее адекватно отражают эффективность системы CRISPR/Cas9 тесты, проводимые непосредственно на культуре целевых клеток.

Предлагаемый тест основан на том, что при внесении двуцепочечного разрыва и его репарации по механизму NHEJ в клетках возникают мутации, разрушающие сайт узнавания какой-либо эндонуклеазы рестрикции. Следует отметить, что при этом возможно тестирование только тех хнРНК, для которых на расстоянии 3–4 нуклеотидов от PAM (в месте внесения двуцепочечного разрыва) расположен сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции. Для тестирования других хнРНК следует использовать систему pDR, описанную выше.

Тест проводят следующим образом: в клетки вводят компоненты системы CRISPR/Cas9, спустя несколько дней выделяют геномную ДНК. Участок, фланкирующий место внесения разрыва, амплифицируют, после чего проводят рестрикционный анализ соответствующей эндонуклеазой рестрикции. Наличие негидролизованного продукта свидетельствует об эффективной работе системы CRISPR/Cas9.

Материалы и оборудование

- Олигонуклеотиды. На основе последовательности модифицируемого генома необходимо выбрать праймеры

(gRNA_test_F и хнРНК_test_R), фланкирующие таргетируемый район. Мы рекомендуем программу NCBI Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) для дизайна праймеров. При дизайне праймеров нужно учитывать следующие рекомендации:

- размер ПЦР-продукта должен находиться в диапазоне 200–800 п. н.;
- сайт(ы) эндонуклеазы рестрикции, используемой в тесте, должны находиться достаточно далеко от начала и конца ПЦР-продукта (т. е. в результате гидролиза размер ПЦР-продукта изменяется более чем на 10 %);
- если в составе ПЦР-продукта сайт гидролиза эндонуклеазы рестрикции встречается более одного раза, все продукты гидролиза должны иметь различную длину и могут быть визуализированы в агарозном геле.
- Материалы и оборудование, необходимые для культивирования клеток млекопитающих и проведения трансфекций (описаны выше).
- Стандартные материалы (например, Sigma G1N10) и оборудование для выделения ДНК и проведения ПЦР.
- Фермент рестрикции и соответствующий ему буфер. Сайт узнавания выбранного фермента рестрикции должен присутствовать в редактируемом геноме на расстоянии 3–4 нуклеотидов от PAM. Кроме того, при выборе фермента рестрикции следует учитывать рекомендации, относящиеся к дизайну ПЦР-продукта (приведены выше).
- Плазмидные векторы, экспрессирующий хнРНК (приготовление описано в рамках этапа 2) и Cas9 (pCas9, описан выше).

Протокол

1. Провести трансфекцию клеток плазмидными векторами, экспрессирующими хнРНК и Cas9 (с использованием реактива Lipofectamin 3000, как указано в протоколе производителя). Параллельно проводить культивирование контрольных клеток, не трансфицированных компонентами системы CRISPR/Cas9.
2. Инкубировать клетки 2–4 сут, при необходимости выполнять смену среды и пассирование клеток.
3. Выделить из контрольных и трансфицированных клеток геномную ДНК. Геномная ДНК может быть выделена при помощи коммерчески доступных наборов или фенол-хлороформной экстракцией.
4. Для каждого образца геномной ДНК провести ПЦР с праймерами хнРНК_test_F и хнРНК_test_R в объеме 50 мкл. Использовать 10 мкл ПЦР-продукта для анализа в агарозном геле. В результате реакции должен с высокой эффективностью образовываться единственный продукт.
5. Разделить оставшиеся 40 мкл продукта ПЦР на две части. Подготовить тестовую реакцию и отрицательный контроль:

Тестовая реакция:	Отрицательный контроль:
Продукт ПЦР 20 мкл*	Продукт ПЦР 20 мкл
Буфер эндонуклеазы рестрикции 2.3 мкл	Буфер эндонуклеазы рестрикции 2.3 мкл
Эндонуклеаза рестрикции 1 мкл	ddH ₂ O 1 мкл

*Для большинства ферментов очистка продуктов ПЦР перед гидролизом не требуется. Однако при возникновении сложности с рестрикционным гидролизом мы рекомендуем

провести очистку ПЦР-продукта стандартным методом (например, переосаждением этиловым спиртом).

6. Инкубировать реакции в оптимальных для используемого фермента условиях 12–24 ч. Оценить количество и размер продуктов гидролиза в агарозном геле.

В случае корректной работы системы CRISPR/Cas9 ожидается неполный гидролиз ПЦР-продуктов в образцах, полученных из трансфицированных клеток. В случае контрольных клеток гидролиз должен быть полным. Гидролиз должен наблюдаться только в тестовых реакциях, в случае отрицательного контроля ПЦР-продукт должен оставаться интактным.

Следует отметить, что даже для высокоэффективных хнРНК мы наблюдали лишь небольшую долю негидролизованного продукта в тестовых реакциях. Надо учитывать, что эффективность трансфекции многих типов клеток далека от 100 %. Кроме того, при использовании диплоидных культур одна и та же клетка может давать как модифицированный, так и немодифицированный продукт ПЦР, если модификация затрагивает лишь один из аллелей.

Этап 4. Модификация генома клеток *in vitro*

Внесение генетических изменений удобно проводить *in vitro* на культурах клеток. В этом случае можно осуществлять выбор клонов, в которых произошло желаемое изменение генома, и даже последовательно вносить несколько генетических модификаций. В зависимости от целей экспериментатора есть две основные стратегии селекции клонов, которые можно сочетать: отбор события попадания в клетку генетической конструкции, в которой работает белок Cas9, например для получения INDEL или делеций протяженных участков ДНК (типы модификаций 1 и 3 описаны выше); и отбор события модификации генома с выбором клонов на последующих этапах культивирования (тип модификации 2).

В зависимости от цели и удобства для отбора генетически модифицированных клонов можно использовать флуоресцентные белки (GFP и т. д.) и/или устойчивость к антибиотикам. При высокой эффективности доставки компонентов системы CRISPR/Cas9 в клетки и ее активности можно вообще отказаться от проведения селекции, а все полученные клоны анализировать на присутствие генетической модификации.

Селекция попадания в клетку компонент системы CRISPR/Cas9

Для того чтобы сразу отобрать клоны с возможной генетической модификацией, используем кольцевые плазмиды, несущие ген *Cas9*. Известно, что случайная негомологичная встройка кольцевой ДНК менее эффективна, чем встройка линейного фрагмента (Brinster et al., 1985). При использовании плазмиды Cas92AGFP (Addgene #48138), кодирующей GFP и Cas9, соединенные через 2A пептид, по свечению GFP на первый-второй день после трансфекции можно отобрать клетки с экспрессией белка Cas9. Для отбора клеток мы используем BD FACSAria II (BD Biosciences, США). После сортировки GFP-позитивных клеток их можно редко рассадить для получения индивидуальных колоний или же сразу про-

вести сортировку единичных клеток в 96-ячеечное плато для дальнейшего культивирования и анализа генетической модификации.

Еще один вариант – использование плазмиды pHCas9 (Addgene #41815), коэкспрессирующей Cas9 и ген устойчивости к антибиотику геницину (G418). С каждым делением клеток плазида разбивается и разрушается ферментами. Пока в клетках остается плазида, можно провести экспресс-селекцию на устойчивость к определенному антибиотику.

Селекция направленной модификации генома

Следующий вариант селекции – использование для отбора клеток экспрессии введенной конструкции. При необходимости можно ввести в геном GFP или другой флуоресцентный белок и отбирать клоны со встройкой. Для упрощения селекции (или в случае, когда введение флуоресцентного белка в геном нежелательно) используется конструкция, обеспечивающая устойчивость к антибиотику. Добавление в среду для культивирования антибиотика позволяет оставить только устойчивые клоны, несущие генетическую конструкцию.

Однако необходимо учитывать, что вводимая генетическая конструкция может встроиться не только в целевой локус, но и в случайное место в геноме. По нашим данным, в ряде случаев частота такой «случайной» встройки сопоставима с частотой встройки в таргетируемый участок. При этом клетки, в которых встройка происходит в случайный район генома, также будут устойчивы к действию селективного антибиотика. Поэтому необходимо во всех случаях проводить анализ полученных клонов на присутствие необходимой модификации генома.

Рассмотрим протокол генетической модификации на примере эмбриональных стволовых (ЭС) клеток мыши.

Материалы

- Среда для ЭС клеток мыши: среда DMEM с 4.5 г/мл глюкозы (Thermo Fisher Scientific, 32430-100), 7.5 % FBS для ЭС клеток (Thermo Fisher Scientific, 16141079), 7.5 % KSR (Thermo Fisher Scientific, 10828-028), 1X GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 35050038), 1X NEAA (Thermo Fisher Scientific, 11140050), 1X пенициллин-стрептомицин (Thermo Fisher Scientific, 15140122), 1000 ед/мл LIF (PolyGene, PG-A1140-0100).
- 2i ингибиторы: PD0325901 (Sigma-Aldrich, PZ0162), стоковая концентрация 1 мМ, рабочая концентрация 1 мкМ; CHIR99021 (Sigma-Aldrich, SML1046), стоковая концентрация 3 мМ, рабочая концентрация 3 мкМ.
- Трипсин-ЭДТА 10X 0.5 % (Thermo Fisher Scientific, 15400054), рабочая концентрация 0.05 %.
- Желатин (Sigma, G1890).
- Митомин С (Sigma, M4287). Стоковая концентрация 200 мкг/мл, рекомендуемая рабочая концентрация 10 мкг/мл, мы используем 5 мкг/мл. Продолжительность обработки эмбриональных фибробластов мыши 2–3 ч. Так как митомин С очень токсичен, после обработки необходимо не менее трех раз промыть клетки фосфатным буфером.
- Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific, 11058021).
- Пуромицин (Thermo Fisher Scientific, A1113803). Стоковая концентрация 1 мг/мл, рекомендуемая рабочая

концентрация 1–10 мкг/мл, мы используем 2 мкг/мл. Продолжительность селекции 2–7 дней, в день посева клеток добавлять антибиотик нельзя.

- Геницитин (сульфат G418) (Sigma, A1720). Стоковая концентрация 100 мг/мл, рекомендуемая рабочая концентрация 100–1000 мкг/мл, мы используем 400 мкг/мл. Продолжительность селекции не менее 7 дней.
- Липофектамин 3000 (Thermo Fisher Scientific, L3000001).
- Среда для заморозки клеток млекопитающих: 90 % KSR (см. выше) и 10 % ДМСО (Amresco, Am-0231). Заморозка клеток проводится в криоконтейнере (Thermo Fisher Scientific, 5100-0001), хранение в жидком азоте.
- Линия ЭС клеток. Линию ЭС клеток DGES1 получали по следующему протоколу (Bryja et al., 2006). Она доступна в лаборатории генетики развития ИЦиГ СО РАН и в «Коллекции клеточных культур плюрипотентных клеток человека и животных для проведения фундаментальных исследований в области биомедицины и генетики развития» ИЦиГ СО РАН.

Протокол

1. ЭС клетки культивировать в среде для ЭС клеток. Для пересадки использовать 0.05 % трипсин-ЭДТА. В зависимости от задачи ЭС клетки рассаживать на пластик, покрытый только 0.1 % желатином, или дополнительно использовать инактивированные митомицином С эмбриональные фибробласты мыши (фидер) в концентрации 15 тыс. кл./см². ЭС клетки лучше растут в присутствии фидера, однако при добавлении антибиотиков фидер нельзя использовать. Свойства ЭС клеток при переводе с фидера на желатин меняются. Если ЭС клетки полностью изменяют морфологию, можно использовать 2i ингибиторы или кондиционированную среду: через день после рассадки фидера промыть клетки фосфатным буфером и добавить ЭС среду. На следующий день собрать кондиционированную среду, профильтровать через фильтр 0.22 мкм и добавить LIF.
2. ЭС клетки рассаживать так, чтобы на следующий день (день проведения трансфекции) плотность культуры была 50–80 %. Трансфекцию проводить с помощью липофектамина 3000 в соответствии с рекомендациями производителя, использовать рекомендуемое производителем количество P3000 реагента и среднее от рекомендованного липофектамина 3000. Для трансфекции смешать плазмиды pHCas9 (или Cas92AGFP) и pgRNA (приготовлена на этапе 2) в соотношении 1 : 1 (для внесения INDEL) или pHCas9 (или Cas92AGFP), pgRNA и вектор для гомологичной рекомбинации в соотношении 1 : 1 : 1 (для получения встройки конструкции по механизму гомологичной рекомбинации). Смесь ДНК, P3000 и липофектамина 3000 готовить в среде Opti-MEM I, добавлять к клеткам в ЭС среде, культивировать до следующего дня и на следующий день сменить среду.
3. Селекция клонов.
 - А. Селекция на попадание в клетку системы CRISPR/Cas9. На следующий день после трансфекции клетки рассадить и провести отбор с помощью FACS или добавлением антибиотика. Полученные клоны нарастить и провести анализ генетической модификации.

Б. Селекция на направленную модификацию генома. На следующий день после трансфекции клетки рассадить в соотношении 1 : 5 – 1 : 20 и селекцию провести с помощью антибиотика или, в случае встройки генетической конструкции с флуоресцентным белком, по свечению колоний. Полученные клоны нарастить и провести анализ генетической модификации. Для анализа генетической модификации нарастить отобранные клоны до необходимого количества – обычно одна лунка планшета на 24 ячейки (2 см²) – и разделить культуру на две части: половину заморозить, половину использовать для выделения ДНК. Геномная ДНК может быть выделена при помощи коммерчески доступных наборов или фенол-хлороформной экстракцией.

4. Анализ генетической модификации.

- А. При анализе на присутствие INDEL разработать праймеры, фланкирующие область генетической модификации. Экспресс-анализ клонов можно проводить с помощью электрофореза в 3 % агарозном геле. Желательно, чтобы размер продукта ПЦР был около 100 п. о., в этом случае различная длина аллелей может быть выявлена электрофорезом. В случае, если генетическая модификация разрушает известный сайт рестрикции, можно использовать рестрикционный анализ. Для подтверждения генетической модификации необходимо провести секвенирование.
- Б. При анализе направленной модификации генома в случае инсерции генетического материала необходимо разработать праймеры, фланкирующие обе границы трансгена. То есть один из пары праймеров должен быть комплементарен последовательности генома за пределами плечей гомологии, использовавшихся в конструкции для гомологичной рекомбинации, а второй праймер должен быть комплементарен участку трансгена и не иметь районов комплементарности в интактном геноме. При таком дизайне праймеров присутствие продукта ПЦР нужного размера возможно только при встройке в ожидаемое место. Правильность встройки необходимо подтвердить секвенированием. При анализе делеции разработать праймеры, фланкирующие ожидаемое место разрыва, провести ПЦР и в случае присутствия продукта ожидаемой длины подтвердить секвенированием.
- В. Известно, что система CRISPR/Cas9 может разрезать участки генома с частичной гомологией к хнРНК (Fu et al., 2013). Для проверки таких событий можно провести полногеномное секвенирование или секвенировать потенциальные сайты, которые могут быть разрезаны системой (имеющие 15 и более букв, гомологичных хнРНК). В случае вставки в геном генетической конструкции дополнительные копии можно обнаружить с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени, Digital PCR (http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf) или с помощью инвертированного или TAIL ПЦР (Liu, Chen, 2007).

Этап 5. Создание трансгенных животных с использованием системы CRISPR/Cas9

После появления системы редактирования CRISPR/Cas9 существенно упростилось получение нокаутных и транс-

генных животных, в частности мышей. Существует три разных способа для редактирования генома при помощи системы CRISPR/Cas9 путем микроинъекции в зиготы. Принципиальные отличия в этих процедурах заключаются в белке Cas9. В первом случае это введение мРНК Cas9 совместно с хнРНК (Yang et al., 2014). Поскольку вводится матричная РНК, то нет необходимости в инъекции в пронуклеус, что технически упрощает процедуру. Поэтому смесь из РНК (мРНК Cas9 и хнРНК) вводится в цитоплазму зигот. Во втором случае система CRISPR/Cas9 представлена готовым комплексом из белка Cas9 и хнРНК (Kouranova et al., 2016). В этом случае нет необходимости в трансляции и наработке белка Cas9 в цитоплазме, и комплекс вводится непосредственно в пронуклеус. В третьем случае используется трансгенная мышь, которая несет эндогенный *Cas9*, и белок уже присутствует в зиготе в пронуклеусе (Sakurai et al., 2016). Поэтому вводится не вся система CRISPR/Cas9, а только хнРНК. Мы остановимся на первом варианте, потому что он технически наиболее простой.

Получение хнРНК

Материалы и оборудование

- HiScribe T7 High Yield RNA synthesis Kit (NewEngland BioLabs, E2040S).
- QIAprep Spin miniprep Columns (QUAGEN, 27115).
- RNA Clean and Concentrator 25 (ZymoResearch, R1017).
- Матричная РНК Cas9 (ThermoFisher A29378).
- Спектрофотометр NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Для получения хнРНК в первую очередь надо определить целевой участок генома и последовательность для хнРНК (см. этап 1). Затем необходимо синтезировать матрицу для *in vitro* транскрипции, как описано в (Kistler et al., 2015).

После получения ДНК-матрицы производят ее очистку на колонках (QIAprep Spin miniprep Columns). Далее, следуя протоколу от производителя, получают хнРНК, используя набор для проведения *in vitro* транскрипции (HiScribe T7 High Yield RNA synthesis Kit). Перед внесением ДНК-матрицы в реакцию *in vitro* транскрипции важно проверить ее при помощи гель-электрофореза, а также измерить конечную концентрацию продукта на спектрофотометре.

После получения хнРНК необходимо отобрать аликвоту для последующего гель-электрофореза и далее очистить ее при помощи набора (RNA Clean & Concentrator) в соответствии с рекомендациями производителя. Очищенную хнРНК и отобранную до очистки аликвоту хнРНК оценивают при помощи гель-электрофореза. Количество хнРНК оценивают на спектрофотометре NanoDrop 2000. Полученную РНК следует хранить при температуре -80°C .

Предварительно можно приготовить готовые рабочие растворы для инъекции из расчета 50 нг/мкл мРНК Cas9 и 10 нг/мкл хнРНК. Для удобства и экономии растворов используются пробирки объемом 200 мкл, в которые помещается по 15 мкл раствора РНК. Предварительно пробирки необходимо промыть водой (RNase free) для удаления микрочастиц пластика. Полученные аликвоты

готовых растворов хранить при -80°C . После инъекции аликвоты рабочих растворов повторно не замораживать.

Работа с животными. Микроинъекция

Материалы и оборудование

- Гибридные мыши первого поколения C57Bl/6 × CBA/Lac или C57Bl/6 × DBA/2JrccHsd, самки, возраст два месяца.
- Мыши линии C57Bl/6, самцы.
- Мыши линии CD-1, самцы и самки.
- PMSG (Фоллигон (Folligon), Интервет Интернэшнл Б.В., Нидерланды), препарат доступен в ветеринарных аптеках.
- hCG (Хорулон (Chorulon), Интервет Интернэшнл Б.В., Нидерланды), препарат доступен в ветеринарных аптеках.
- Домитор (методомина гидрохлорид) (Orion Corporation, Finland), препарат доступен в ветеринарных аптеках.
- Золетил (VIRBAC, Франция). Препарат доступен в ветеринарных аптеках.
- Центрифуга Centrifuge 5810 R, Eppendorf или аналогичная.
- Стеклянные капилляры (Harvard Apparatus, GC100-15).
- Пуллер (P-97, Sutter Instrument Co.).
- Micro Forge MF-90 (Narishige).
- Инвертированный микроскоп (Olympus IX71) с интерференционной оптикой Номарского или аналогичный.
- Держатель (холдер) Eppendorf™ VacuTip (кат. ном. 930001015).
- Наконечники Eppendorf™ Femtotips™ Microloader Tips for Femtojet Microinjector (кат. ном. 5242956003).
- Компрессор Transjector 5246, Eppendorf или аналогичный.
- Микроинъекционный шприц Narishige или аналогичный.
- Гидравлические манипуляторы Narishige или аналогичные.
- Среда для культивирования M2 (Sigma, M7167).
- Среда для культивирования M16 (Sigma, M7292).

Животные. Супероуляция. Получение зигот

Для проведения эксперимента по инъекции системы CRISPR/Cas9 в цитоплазму зигот мыши надо предварительно подготовить необходимое количество животных. В первую очередь нужны животные-доноры зигот. Для этих целей подходят любые линии мышей, но наиболее приемлемой схемой является получение зигот от самок-гибридов первого поколения (C57Bl/6 × CBA/Lac или C57Bl/6 × DBA/2JrccHsd), покрытых самцами C57Bl/6. Возможно применение других линий мышей, но эффективность супероуляции и выживаемости после цитоплазматической микроинъекции при этом будут ниже. Для более эффективной работы следует использовать протокол супероуляции по следующей схеме.

В первый день самкам-донорам производится внутрибрюшинная инъекция 7.5 ед. PMSG в 16:00. На третий день этим же самкам производится внутрибрюшинная инъекция 7.5 ед. hCG в 13:00. Наиболее результативной супероуляция будет в случае использования самок двух-

месячного возраста. Подсадка стимулированных самок к самцам производится в 17:00. Важно не производить смену подстилки у мышей перед тем, как производится подсадка, а самки по одной должны подсаживаться к самцам, а не наоборот. Данная схема подходит для искусственного 12-часового цикла со световым временем суток с 7:00 до 19:00. Для удобства дозирования препараты для супероуляции следует дополнительно развести физиологическим раствором до рабочей концентрации 0.05 ед./мкл, расфасовать полученные растворы в пробирки 1.5 мл и хранить при -80°C . Растворы не подлежат повторной заморозке, после размораживания их надо хранить на льду. Эффективность супероуляции при использовании данных гормонов в среднем составляет 30 зигот на одну гибридную самку. На четвертый день с 9:00 до 10:00 производится осмотр самок мышей на наличие пробок (Hogan et al., 1994). Самки с пробками используются для получения зигот с 10:00 до 11:00. При расчете необходимого количества зигот для одного дня эксперимента следует учитывать, что покрытие самок самцами происходит не в 100 % случаев и зависит от индивидуальных особенностей конкретного самца. Поэтому следует вести дневник покрытия самок самцами на этикетках клеток, отмечая дату покрытия. При постоянной работе с каждым из самцов можно отобрать группу наиболее активных, тем самым повысив долю покрытых самок. В среднем для одного дня работы достаточно 8–10 супероулированных самок. При проведении эксперимента следует опираться также на личный опыт, поскольку влияние оказывают и такие факторы, как корм, условия содержания, возраст и линия животных и пр.

Помимо мышей-доноров, для эксперимента по инъекции системы CRISPR/Cas9 в цитоплазму зигот также необходимы суррогатные псевдобеременные самки. Для этих целей предпочтительнее использовать аутбредную линию мышей CD-1. Минимум за одну-две недели до начала эксперимента выполняется вазэктомия самцов CD-1 по стандартной методике (Hogan et al., 1994). Для упрощения операции вместо перевязывания семенных канатиков можно пережигать их при помощи паяльника с небольшим жалом. После вазэктомии самцов в течение одной-двух недель следует содержать с самками любых линий для тренировки, после этого данных самок использовать в экспериментах нельзя.

Для получения псевдобеременных животных самок подсаживают в клетки к вазэктомированным самцам по 2–3 самки на одного самца в тот же день, когда производится подсадка супероулированных самок-доноров. В данном случае следует учитывать, что самки находятся в естественном овуляторном цикле, длительность которого четыре дня. Этот фактор является решающим для получения нужного количества псевдобеременных самок, но важна также активность самца. Как описано выше, следует отмечать активных самцов и выбраковывать неактивных. В среднем для успешной работы необходимо иметь 20–25 вазэктомированных самцов. Осмотр самок на наличие пробок производится в то же время, что и осмотр супероулированных самок. Далее самки с пробками будут использоваться для проведения операции трансплантации эмбрионов.

Микроинъекция

После получения зигот их следует культивировать в каплях среды M16 под минеральным маслом в инкубаторе при 37°C и 5 % CO_2 . С правилами культивирования эмбрионов можно подробно ознакомиться в (Hogan et al., 1994). Микроинъекцию следует начинать после 13:00. До этого времени надо подготовить растворы для микроинъекции, иглы и оборудование к работе.

После размораживания раствор РНК необходимо хранить на льду. Перед тем как наполнять раствором РНК инъекционные иглы, его следует центрифугировать при 14000 g, 0°C , 10 мин.

Для получения игл для микроинъекции используются стеклянные капилляры, которые оттягивают на пуллере при следующих параметрах: Heat 535, Pull 180, Vel. 60, Time 125, Pressure 200, Ramp 497. Полученные иглы загибаются на Micro Forge. Готовые иглы не следует хранить более одной недели.

Микроинъекция осуществляется на инвертированном микроскопе с интерференционной оптикой Номарского, оснащенном гидравлическими манипуляторами Narishige. Для удержания зигот используются холдеры, которые подключаются к микроинъекционному воздушному шприцу. Иголка заполняется 2–3 мкл рабочего раствора смеси РНК при помощи удлиненных носиков (EppendorfTM FemtotipsTM Microloader Tips), а затем аккуратно обламывается о холдер. Следует добиться слома с острым краем иглы, диаметр скола иглы в каждом случае подбирается индивидуально. После этого при помощи максимального давления нужно протолкнуть раствор РНК на кончик иголки, чтобы не осталось пузырька воздуха. Важным фактором при инъекции является отсутствие сильного смятия зиготы иглой. Игла должна прокалывать блестящую оболочку достаточно легко.

Для создания положительного давления в игле используется компрессор (трансжектор). Обычное инъекционное давление 30–40 Па. Микроинъекция осуществляется в капле среды M2 (объем около 100 мкл) под минеральным маслом. Важно производить инъекцию на стекле, а не на пластике, из-за плохих преломляющих качеств последнего. Камеру для инъекции можно сделать самостоятельно, для этого к обычному гистологическому стеклу приклеиваются импровизированные бортики из культурального пластика, для того чтобы минеральное масло не стекало вниз и могло полностью покрыть каплю.

При микроинъекции в цитоплазму важно не повредить пронуклеусы зиготы и контролировать введение раствора в цитоплазму. Иголка не всегда может сразу пройти насквозь плазматическую мембрану, и тогда приходится прокалывать зиготу до противоположной стенки блестящей оболочки.

Признаком успешной инъекции является локальное расширение и разрежение цитоплазмы. Зиготы оптимально прокалывать партиями по 20–30 шт. Для этого их нужно предварительно отмыть от среды M16 в среде M2, а затем перенести в один из полюсов капли. Холдер и инъекционную иглу удобнее расположить чуть выше плоскости зигот, опускаясь только холдером и забирая по одной зиготе; прокалывать зиготы нужно в противоположном полюсе, создавая группу проинъекцированных эмбрионов.

После инъекции зиготы помещаются в капли с M16 для культивирования в инкубаторе.

Трансплантация зигот

Перед операцией подсадки эмбрионы следует культивировать более часа, для того чтобы остались только жизнеспособные зиготы. После этого нужно отобрать жизнеспособные зиготы по характерному блеску в стереомикроскопе и четкой границе между блестящей оболочкой и плазматической мембраной.

Перед подсадкой зиготы снова отмывают в среде M2 и подсаживают псевдобеременным матерям по 15–20 шт., как описано в (Hogan et al., 1994). Надо учитывать, что могут встречаться «ложные пробки», и при выполнении операции по подсадке эмбрионов необходимо удостовериться в наличие ампулы яйцевода. Если ампула отсутствует, то операцию производить не следует.

Операция проводится под действием общей анестезии. Для наркоза можно применять следующую схему. В качестве премедикации используется домитор в количестве 0.125–0.25 мкг на 1 г массы тела мыши. Спустя 10–15 мин после введения домитора осуществляют инъекцию золетила в дозировке 15–30 мг на 1 г массы тела мыши. При использовании этой схемы мыши входят в длительный глубокий сон. Недостатки данного наркоза – охлаждение тела животного и сухость слизистых глаз. Для предотвращения этих эффектов необходимо дополнительное обогревание мышцей на термостолке при 37 °C либо использование тепла от лампы накаливания. Глаза следует накрыть небольшим лоскутом марлевой салфетки, смоченным физиологическим раствором. Препараты после разведения по инструкции производителя можно хранить в морозильной камере при –20 °C. Целесообразно сделать небольшие аликвоты данных медикаментов и размораживать их по мере необходимости. После размораживания аликвоты доводят физиологическим раствором до концентрации домитора 0.25 мкг на 7.5–10 мкл, а золетила – 30 мг на 7.5–10 мкл. После размораживания и разведения препараты не подлежат повторному замораживанию, но возможно хранение готовых растворов при +4 °C в течение недели. Данную схему анестезии можно использовать и при операции по вазэктомии самцов.

Как правило, после успешной трансплантации развивается беременность, которая заметна через две недели. Забор материала для генотипирования от родившихся детенышей можно проводить со второй недели после рождения.

Заключение

Ежегодно публикуются тысячи статей, в которых применяется технология CRISPR/Cas9. Несмотря на общее сходство, детали протоколов использования CRISPR/Cas9 системы в этих работах часто различаются. Все приведенные нами протоколы были многократно проверены в нашей лаборатории и показали себя как эффективное средство внесения направленных геномных модификаций. Надеемся, что публикация этих протоколов будет способствовать быстрому и успешному освоению технологии CRISPR/Cas9 научными коллективами лабораторий, специализирующихся в самых разнообразных областях биологии и биотехнологии.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-04-01453a, and State Budgeted Project 0324-2015-0004. The authors are grateful to the Center for Genetic Resources of Laboratory Animals, Institute of Cytology and Genetics (RFMEFI61914X0005).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bindra R.S., Goglia A.G., Jasin M., Powell S.N. Development of an assay to measure mutagenic non-homologous end-joining repair activity in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* 2013;41(11):e115-e115. DOI 10.1093/nar/gkt255.
- Brinster R.L., Chen H.Y., Trumbauer M.E., Yagle M.K., Palmiter R.D. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985;82(13):4438-4442.
- Bryja V., Bonilla S., Arenas E. Derivation of mouse embryonic stem cells. *Nat. Protoc.* 2006;1(4):2082-2087. DOI 10.1038/nprot.2006.355.
- Chari R., Mali P., Moosburner M., Church G.M. Unraveling CRISPR-Cas9 genome engineering parameters via a library-on-library approach. *Nature Methods.* 2015;12(9):823-826. DOI 10.1038/nmeth.3473.
- Datta S., Roychoudhury S., Ghosh A., Dasgupta D., Ghosh A., Chakraborty B., Roy S., Gupta S., Santra A.K., Datta S., Das K. Distinct distribution pattern of hepatitis B virus genotype C and D in liver tissue and serum of dual genotype infected liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma patients. *PloS One.* 2014;9(7):e102573. DOI 10.1371/journal.pone.0102573.
- Fu Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D., Joung J.K., Sander J.D. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(9):822-826. DOI 10.1038/nbt.2623.
- Golding S.E., Rosenberg E., Khalil A., McEwen A., Holmes M., Neill S., Povirk L.F., Valerie K. Double strand break repair by homologous recombination is regulated by cell cycle-independent signaling via ATM in human glioma cells. *J. Biol. Chemistry.* 2004;279(15):15402-15410. DOI 10.1074/jbc.M314191200.
- Hogan B., Beddington R., Costantini F., Lacy E. *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
- 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.
- Kistler K., Voshall L., Matthews B. Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Report.* 2015;11(1):51-60. DOI 10.1016/j.celrep.2015.03.009.
- Kouranova E., Forbes K., Zhao G., Warren J., Bartels A., Wu Y. CRISPRs for optimal targeting: Delivery of CRISPR components as DNA, RNA, and protein into cultured cells and single-cell embryos. *Hum. Gene Ther.* 2016;27(6):464-475. DOI 10.1089/hum.2016.009.
- Kulkarni A.S., Fortunato E.A. Stimulation of homology-directed repair at I-SceI-induced DNA breaks during the permissive life cycle of human cytomegalovirus. *J. Virology.* 2011;85(12):6049-6054. DOI 10.1128/JVI.02514-10.
- Li K., Wang G., Andersen T., Zhou P., Pu W.T. Optimization of genome engineering approaches with the CRISPR/Cas9 system. *PLoS One.* 2014;9(8):e105779. DOI 10.1371/journal.pone.0105779.
- Liu Y.G., Chen Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. *Biotechniques.* 2007;43(5):649-650,652,654.
- Pierce A.J., Hu P., Han M., Ellis N., Jasin M. Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mam-

- malian cells. *Genes & Development*. 2001;15(24):3237-3242. DOI 10.1101/gad.946401.
- Pierce A.J., Johnson R.D., Thompson L.H., Jasin M. XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes & Development*. 1999;13(20):2633-2638.
- Sakurai T., Kamiyoshi A., Kawate H., Mori C., Watanabe S., Tanaka M. A non-inheritable maternal Cas9-based multiple-gene editing system in mice. *Sci. Reports*. 2016;6:20011. DOI 10.1038/srep20011.
- Sambrook J.F., Russell D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Shchelkunov S.N. *Geneticheskaya inzheneriya [Genetic Engineering]*. Novosibirsk, 2004. (in Russian)
- Smirnov A.V., Yunusova A.M., Lukyanchikova V.A., Battulin N.R. CRISPR/Cas9: a universal tool for genomic engineering. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(4):493-510. DOI 10.18699/VJ16.175. (in Russian)
- Smith A.M., Takeuchi R., Pellenz S., Davis L., Maizels N., Monnat R.J., Stoddard B.L. Generation of a nicking enzyme that stimulates site-specific gene conversion from the I-Anil LAGLIDADG homing endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009;106(13):5099-5104. DOI 10.1073/pnas.0810588106.
- Windbichler N., Papathanos P.A., Catteruccia F., Ranson H., Burt A., Crisanti A. Homing endonuclease mediated gene targeting in *Anopheles gambiae* cells and embryos. *Nucl. Acids Res.* 2007;35(17):5922-5933. DOI 10.1093/nar/gkm632.
- Yang H., Wang H., Jaenisch R. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nat. Protocols*. 2014;9:1956-1968.