

Вестник Курганской ГСХА. 2023. № 1 (45). С. 33-39

Vestnik Kurganskoy GSHA. 2023; (1-45): 33-39

Научная статья

УДК 636.22/28.082.2

Код ВАК 4.2.5

EDN: JUMZSR

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ЛИПИДНОЙ ТРАНСФЕКЦИИ И ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ СПЕРМИЕВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Анастасия Сергеевна Метлева^{1✉}

¹Кузбасская государственная сельскохозяйственная академия, Кемерово, Россия

¹zveryski@mail.ru[✉]

Аннотация. Целью исследования является изучение возможностей применения спермиев крупного рогатого скота в качестве векторов доставки генетической конструкции CRISPR/Cas9 в ооциты для получения генно-редактированных животных. Для внедрения генетической конструкции спермии обрабатывались химическим (Lipofectamine CRISPRMAX) и физическим (электропорация) способами для создания временно проницаемой мембраны, с последующим внедрением рекомбинантной ДНК и оценкой сохранения жизнеспособности и усвоения генетическую конструкцию. Режимы электропорации и липофекция были опробованы на спермиях крупного рогатого скота для внедрения генетической конструкции CRISPR/Cas9 в ооциты для получения генно-редактированных животных. В результате проведенных экспериментов установлена эффективность применения липофекции на спермиях крупного рогатого скота, концентрация жизнеспособных спермиев и доставка генетической конструкции в половые клетки, также установлен наиболее оптимальный режим электропорации, при котором наблюдаются жизнеспособные спермии с внедренной ген-конструкцией. Полученные результаты позволили сформировать технологический регламент по геномному редактированию крупного рогатого скота с использованием спермиев в качестве вектора доставки генетических компонентов CRISPR/Cas9. Предложенный подход к геномному редактированию животных мало изучен и освещён в современной литературе. Но он имеет преимущества перед традиционными методами доставки генетической конструкции в клетки, в том числе в клетки ооцитов. Разработка технологии введения генетической конструкции для геномного редактирования методом CRISPR/Cas9 в яйцеклетки крупного рогатого скота путем переноса спермой является альтернативой использованию вирусных конструкций плазмид и метода микроинъекции.

Ключевые слова: спермии, крупный рогатый скот, CRISPR-Cas9, трансфекция, электропорация, липофекция, геномное редактирование, генетическая конструкция, генно-редактированные животные, вирус лейкоза крупного рогатого скота.

Благодарности: работа проводилась в рамках выполнения 3 этапа комплексного проекта по теме: «Разработка технологии геномного редактирования для воспроизводства высокоценного племенного крупного рогатого скота молочного направления, устойчивого к вирусу лейкоза», соглашение о предоставлении субсидии от «30» ноября 2018 г. № 05.607.21.0208, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60718X0208.

Для цитирования: Метлева А.С. Сравнение методов липидной трансфекции и электропорации спермиев крупного рогатого скота // Вестник Курганской ГСХА. 2023. № 1 (45). С. 33-39.

Scientific article

COMPARISON OF METHODS OF LIPID TRANSFECTION AND ELECTROPORATION OF BOVINE SPERM

Anastasia S. Metleva^{1✉}

¹Kuzbass State Agricultural Academy, Kemerovo, Russia

¹zveryski@mail.ru[✉]

Abstract. The aim of the study is to study the possibilities of using bovine sperm as vectors for delivering the CRISPR/Cas9 genetic construct to oocytes to obtain gene-edited animals. For the introduction of the genetic construct, sperm were treated by chemical (Lipofectamine CRISPRMAX) and physical (electroporation) methods to create a temporarily permeable membrane, followed by the introduction of recombinant DNA and evaluation of viability and assimilation of the genetic construct. Electroporation and lipofection modes were tested on bovine sperm to introduce the CRISPR/Cas9 genetic construct into oocytes to obtain gene-edited animals. As a result of the experiments, the effectiveness of the use of lipofection on sperm of cattle, the concentration of viable sperm and the delivery of the genetic construct to the germ cells were established. The most optimal electroporation mode was determined, in which viable sperm with the introduced gene construct was observed. The results obtained made it possible to form a technological regulation for genomic editing of cattle using sperm as a vector for the delivery of CRISPR/Cas9 genetic components. The proposed approach to genomic editing of animals has been little studied and consecrated in modern literature. But it has advantages over traditional methods of delivering a genetic construct into cells, including oocyte cells. The development of a technology for introducing a genetic construct for CRISPR/Cas9 genome editing into bovine eggs by sperm transfer is an alternative to using viral plasmid constructs and the microinjection method.

Keywords: sperm, cattle, CRISPR-Cas9, transfection, electroporation, lipofection, genome editing, genetic construct, gene-edited animals, bovine leukemia virus.

Acknowledgments: the work was carried out as part of the implementation of the 3rd stage of a comprehensive project on the topic: «Development of genomic editing technology for the reproduction of high-value pedigree dairy cattle resistant to the leukemia virus», subsidy agreement dated 30 November 2018 No. 05.607.21.0208, unique project ID RFMEFI60718X0208.

For citation: Metleva A.S. Comparison of methods of lipid transfection and electroporation of bovine sperm. Vestnik Kurganskoy GSHA. 2023; (1-45). 33-39. (In Russ).

Введение. Генная инженерия является одним из методов борьбы со многими вирусными заболеваниями, включая вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), который является наиболее актуальной проблемой для животноводства Кемеровской области.

Механизм заражения ВЛКРС зависит от аминокислотных последовательностей. Например, аллели *11, *23, *28, кодирующие аминокислотную последовательность Glu-Arg, не встречаются у животных, больных ВЛКРС. В то время как у больных животных не встречаются данные аллели, кодирующие указанную аминокислотную последовательность. Но у восприимчивых к ВЛКРС наиболее часто встречаются аллели *16, *8 и *22. Для больных лейкозом животных характерно наличие последовательности VDTN (валин-аспарагиновая кислота-треонин-аспарагин) в положении 75-78 (аллели *16 и *8), а также последовательности VDTV (валин-аспарагиновая кислота-треонин-валин) (*22 аллель). Эти аллели связаны с аллелями гена BoLA-DRB3*1C, для которого ранее была показана корреляция с предрасположенностью к ВЛКРС [1].

По официальным данным с сайта Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору [2] 66 из 89 существующих субъектов Российской Федерации являются неблагополучными по ВЛКРС. Подобная распространенность инфекции указывает на низкую эффективность существующих мер борьбы. Следовательно, есть необходимость по созданию альтернативных методов профилактики этого заболевания. Один из таких методов основан на технологии редактирования генома посредством применения бактериальных нуклеаз для модификации геномных последовательностей почти во всех эукариотических клетках [3]. Технология редактирования генов кластеризованных регулярно чередующихся коротких палиндромных повторов (CRISPR)/CRISPR-ассоциированных белков 9 (Cas9) является идеальным инструментом для лечения заболеваний путем коррекции болезнетворных генов с большой точностью и эффективностью [4]. Компоненты CRISPR/Cas являются частью бактериальной иммунной системы и способны вызывать двухцепочечные разрывы ДНК в геноме, которые разрешаются эндогенными механизмами репарации ДНК. Технология CRISPR/Cas9 не только проста и удобна в исполнении, но и значительно улучшила производительность генно-инженерных исследований [5].

Компоненты системы CRISPR подвержены деградации *in vivo* после прямой доставки и, следовательно, требуют помощи векторов доставки [6] для внедрения генетической конструкции в эукариотические клетки, в т. ч. половые клетки.

Системы доставки генов можно отнести как к вирусным, так и к невирусным. Вирусные методы доставки Cas9 и гРНК осуществляются через лентивирусный или ретровирусный вектор в клетку-мишень. Эти векторы обеспечивают высокоэффективную, но неспецифическую интеграцию генетического материала в геном хозяина. Неспецифическая интеграция имеет риски, связанные с тенденцией к мутагенезу жизненно важных генов хозяина [7].

Прямая трансфекция сперматозоидов рассматривается как перспективная стратегия доставки генетической конструкции в яйцеклетку во время оплодотворения, вызывающая значительный интерес и разные точки зрения у научного сообщества [8-9], т. к. применение сперматозоидов в качестве векторов доставки генетической конструкции возможно без значительных финансовых затрат, и перенос генов, опосредованный сперматозоидами, основан на способности сперматозоидов нести экзогенные гены и переносить их в яйцеклетки для производства трансгенного потомства путем развития трансгенной зиготы и эмбриона [10]. У спермиев есть способность переносить чужеродную ДНК в клетки, вступившие в контакт со спермой, в ооцит во время оплодотворения после спонтанного поглощения рекомбинантной ДНК. Проникновение экзогенной ДНК в сперматозоиды не является пассивным процессом и происходит при взаимодействии определенных мембранных белков, с которыми связывается чужеродная ДНК посредством эндоцитоза, т. е. активного переноса клеточной мембраной [11]. Сперматозоиды способны поглощать экзогенную ДНК разного размера и различной нуклеотидной последовательности. Ученые успешно продемонстрировали эту способность по доставке рибонуклеинового комплекса спермиями после липофекции при искусственном оплодотворении цыплят. Этот метод успешно сочетается с системой редактирования генов CRISPR/Cas9 и использует способность сперматозоидов доставлять нуклеиновые кислоты [6].

Внедрение генетической конструкции в спермии осуществляется следующими методами:

- липофекцией – представляет собой липид-опосредованную систему доставки генов на основе слияния липосомы с клеточной мемб-

раной (Lipofectamine). Продемонстрировали крайне низкую эффективность трансфекции (< 1,5 %) и выживаемость (< 80,0 %) [12];

- интрацитоплазматической инъекцией сперматозоидов (техника ИКСИ) с последующим культивированием ex ovo эмбриона в суррогатной оболочке [13]. Микроинъекция – один из наиболее часто используемых методов в геномной инженерии, но она требует большого мастерства и довольно редко используется для геномного редактирования домашнего скота [14]. При работе с методом геномного редактирования CRISPR-Cas9 нужно учитывать, что деление клеток зиготы у коровы длится примерно 8 суток, и только после 96 ч она перемещается в виде морулы в рога матки. В этом случае вымывать эмбрион из полости матки можно только на стадии многоклеточной морулы, когда микроинъекция приводит к зарождению химерного организма [15];

- электропорацией – это невирусный метод электротрансфекции для доставки ДНК в клетки или ткани без использования дополнительных химических веществ или вирусов и быстрый и недорогой подход к трансфекции сперматозоидов [16]. Доказано, что электропорация демонстрирует более эффективную трансфекцию по сравнению с методами химической трансфекции, опосредованными биополимерами и мицеллами [12]. Также сравнение электропорации и микроинъекции показывает, что наиболее ценным методом для получения эмбрионов с использованием технологии CRISPR/Cas9 является электропорация: простота получения большего количества эмбрионов за более короткое время; меньшее количество высококвалифицированного персонала и дорогостоящего оборудования по сравнению с микроинъекцией. Все это увеличивает возможность его использования для получения эмбрионов [17].

Как показывает практика, трансфекция сперматозоидов крупного рогатого скота в 80 % случаев заканчивается интеграцией чужеродной ДНК. Сперматозоиды – твердые клетки для трансфекции, поэтому эффективность внедрения ДНК в спермии повышается при использовании специальных адъювантов в среде для трансфекции или при снижении количества холестерина в плазматической мембране сперматозоидов. Но оплодотворяющая способность сперматозоидов снижается после трансфекции [18].

Липидная трансфекция и электропорация – наиболее распространенные методы в геномной

инженерии. Поэтому нами проведен эксперимент по сравнению эффективности методов липидной трансфекции и электропорации сперматозоидов крупного рогатого скота для получения генно-редактированных животных.

Материалы и методы. Генетическая конструкция вводилась в виде нативного белка Cas9 (TrueCut™ Cas9 Protein v2 Invitrogen™) и готовой направляющей РНК с последовательностью нуклеотидов GGAGCGGGAGCGGGCCUAUG.

С целью проведения электропорации применялись 24 дозы сексированной спермы, а при липофекции – 45 доз, полученных от быка Спайдермен в ОАО «Кемеровоплем» (Кемеровская область). Для работы сперму размораживали, затем разбавляли в 10-кратном размере в охлажденной среде для искусственного осеменения.

С целью установления необходимого режима для электропорации спермиев крупного рогатого скота проводились 24 опытные работы на приборе Neon Transfection System в соответствии с протоколом Invitrogen Neon™ Transfection System 96 Pub. No. MAN0001632 (таблица 1).

Таблица 1 – Режимы электропорации спермиев на Neon Transfection System

Режим	Напряжение	Продолжительность импульса	Количество
1	0	1	1
2	1400	20	1
3	1500	20	1
4	1600	20	1
5	1700	20	1
6	1100	30	1
7	1200	30	1
8	1300	30	1
9	1400	30	1
10	1000	40	1
11	1100	40	1
12	1200	40	1
13	1100	20	2
14	1200	20	2
15	1300	20	2
16	1400	20	2
17	850	30	2
18	950	30	2
19	1050	30	2
20	1150	30	2
21	1300	10	3
22	1400	10	3
23	1500	10	3
24	1600	10	3

При проведении эксперимента по применению метода электропорации при различных режимах на приборе Neon Transfection System, со сменой напряжения, продолжительности и числа импульсов, определялись те режимы, при которых выживало максимальное количество спермиев с внедренной генетической конструкцией. Электропорацию проводили на спермиях в количестве 500 млн. Центрифугировали клетки в течение 5 мин при 1000 об./мин., удаляли супернатант и ресуспендировали клетки в чистой среде DMEM/F12, исходя из соотношения 200 мкл раствора на одну дозу спермиев для одной трансфекции и переносили в 24-луночный планшет. Добавляли 3 мл Neon Buffer E в емкость для пипетки и вставляли пипетку в фиксатор для пипетки. Добавляли генетическую конструкцию в готовую суспензию клеток, исходя из расчета 5-15 мкг компонентов системы CRISPR/Cas9 в 200 мкл раствора. Осторожно аспирировали 10 мкл смеси генетической конструкции и клеток в наконечник неоновой системы. Помещали неоновую пипетку с образцом в неоновую трубку в фиксатор для пипетки. На устройстве Neon выбирали программу электропорации. После отображения настроек кнопкой «Пуск» задавали устройству необходимый импульс, до отображения сообщения «Завершено». Для определения оптимального режима электропорации спермиев было проведено 24 эксперимента на приборе Neon Transfection System. Отработанную смесь клеток и генетической конструкции в неоновой пипетке распределяли в новом 24-луночном планшете. Для выполнения всех настроек программы шаги 3-7 повторялись. Спермии инкубировались в течение 20 мин при комнатной температуре.

Липофекцию спермиев крупного рогатого скота в количестве 45 доз проводили в соответствии с протоколом Invitrogen Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Transfection Reagent Pub. No. MAN0014545 в ламинарном шкафу, который предварительно стерилизовали УФ-облучением, экспозицией в 20 мин. Перед трансфекцией в культуральную чашку диаметром 60 мм добавляют по 5 мл 1 дозы разбавленной спермы; реагенты Opti-MEM и «Lipofectamine CRISPRMAX» до комнатной температуры. Отдельно в полипропиленовых пробирках по 1,5 мл вносят по 300 мкл Opti-MEM – из расчета две пробирки на каждую дозу трансфецированной спермы. В одну из пробирок с Opti-MEM добавляли 60 мкл реагента для трансфекции Lipofectamine CRISPRMAX, перемешивали, инкубировали 5 мин. Lipofectamine

CRISPRMAX перед использованием аккуратно перемешивали. Параллельно в другую пробирку с Opti-MEM вносили 60 мкг плазмидной ДНК в концентрации 30 нг/мкл, перемешивали, инкубировали 5 мин. В пробирку, содержащую смесь Opti-MEM и Lipofectamine CRISPRMAX, вносили весь раствор плазмидной ДНК на Opti-MEM. Тут же тщательно перемешивали, избегая вспенивания. Инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. В чашки Петри добавляли 2,5 мл Opti-MEM. По окончании инкубации комплекс плазмидной ДНК с Lipofectamine CRISPRMAX равномерно вносили в культуральную чашку. Перемешивали покачиванием. Чашку помещают инкубироваться при 37 °С и 5 % CO₂ на 24 ч. По окончании инкубации непосредственно перед осеменением исследовали спермии на подвижность и жизнеспособность под микроскопом.

Для проведения электропорации и липидной трансфекции сперму разбавляли до 500 млн спермиев в 1 мл. Количество полученных трансфецированных спермиев определяли с помощью специальных стандартов мутности, соответствующих различной концентрации спермиев на 1 мл: 10, 50, 100, 200, 300, 500 и 1000 млн спермиев.

Учитывая токсичность любого метода трансфекции, методом микроскопирования определяли жизнеспособные спермии, используя общепринятую методику в соответствии с ГОСТ 20909.3-75 - ГОСТ 20909.6-75. Сперма быков неразбавленная. Методы испытания:

1 применяли краситель – 1-5%-раствор эозина водорастворимого на 3%-растворе лимоннокислого натрия, который окрашивает мертвые спермии и спермии с колебательными движениями;

2 каплю исследуемой спермы в концентрации 500 млн/мл спермиев наносили на чистое обезжиренное теплое (35±2 °С) предметное стекло;

3 добавляли 2-3 капли краски, подогретой до температуры 30 °С, перемешивали 2-4 сек и делили три тонких мазка;

4 в каждом препарате подсчитывали 100-150 спермиев, учитывали число спермиев с окрашенными и неокрашенными головками.

Для определения наличия внедренной генетической конструкции производили отбор сперматозоидов с измененными физическими параметрами спермиев (вес и плотность) после центрифугирования спермиев в градиенте плотности «PureSperm» («Nidac International AB», Швеция). Этот метод позволяет отбирать жизнеспособ-

ные сперматозоиды с нормальной морфологией с измененными удельным весом и плотностью, свидетельствующим о внедренной генетической конструкции. При выполнении метода градиентного центрифугирования образец эякулята располагается поверх градиента. При центрифугировании различные клетки занимают определенное положение, в котором их плавучая плотность соответствует плотности градиента. Разделение основано на том, что зрелые нормальные сперматозоиды с измененными удельным весом и плотностью имеют плотную упаковку ДНК, больший вес и плотность, чем 80 % раствор, поэтому проходят сквозь него и оседают на дне пробирки.

Для выделения сперматозоидов из спермы с большим удельным весом и плотностью, в соответствии с протоколом PureSperm 100, методом центрифугирования в градиенте плотности применяется набор «PureSperm» («Nidacon International AB», Швеция), состоящий из коллоидного раствора двуокиси кремния в сбалансированном растворе солей. Инкубировали сперму при 37 °С в течение 30 минут для разжижения; подготавливали два градиента: 1,5 мл 40 % компонента и 1,5 мл 80 % компонента в пробирке с коническим дном; трансфецированный эякулят осторожно, не нарушая разделение слоев, что может понизить эффективность сепарации, наслаивали на градиент; центрифугировали в течение 20 мин. После центрифугирования на дне конической центрифужной пробирки образовывался осадок из наиболее подвижной фракции сперматозоидов; пастеровской пипеткой осторожно удаляют семенную плазму, а также верхнюю интерфазу, 40 % слой и нижнюю интерфазу. Оставляли основную часть 80 % слоя. Чистой стерильной пастеровской пипеткой, погруженной в 80 % слой, аспирировали осадок, ресуспендировали его в буфере для гамет и перенесли в чистую центрифужную пробирку для отмывания остатков коллоидного раствора. Центрифугировали 10 мин. Повторяли отмывку с буфером для гамет. Удаляли супернатант и ресуспендировали в небольшом объеме среды для приготовления сперматозоидов или среды для оплодотворения. Подсчитывали количество сперматозоидов и вычисляли концентрацию. При необходимости делали разведение. Отобранные сперматозоиды с внедренной генконструкцией хранили в условиях инкубатора в присутствии 6 % CO₂ при температуре 37 °С для последующего искусственного осеменения коров-доноров.

Количество спермиев после липофекции обработаны статистически с применением метода количественного анализа.

Результаты исследований и их обсуждение.

В результате поведенных опытов, направленных на электропорацию, установлено, что 22 режима убивают спермии, и при микроскопировании обнаруживаются фиолетовые неподвижные спермии или спермии с колебательными движениями. Но режимы № 1 и № 6 сохраняют спермии жизнеспособными. При работе в режиме № 1 60 % сперматозоидов остаются живыми, а при работе в режиме № 6 обнаруживаются как мёртвые спермии, так и спермии с колебательными движениями в количестве 23 жизнеспособных сперматозоида из 150 имеющихся в поле зрения (15,3 %).

С целью отделения жизнеспособных спермиев с генетической конструкцией спермии, прошедшие электропорацию, разделяли в градиенте плотности, а затем центрифугировали и подсчитывали количество живых спермиев на 1 мл:

- режим № 1: количество трансфецированных жизнеспособных спермиев соотносилось с 400 млн;
- режим № 6: количество пригодных для дальнейшей работы спермиев – 100 млн;

Трансфекция методом электропорации при использовании прибора Neon Transfection System, показала, что оптимальными для сохранения жизнеспособности спермиев является режим № 1 с напряжением 0 В, продолжительностью импульса в 1 сек, и количеством импульсов – 1, а так же режим № 6 с напряжением 1100 В, продолжительностью импульса 30 сек, количеством импульсов – 1. При этом многие режимы электропорации (22 из 24 исследованных) являются для спермиев крупного рогатого скота губительными.

При липофекции в 45 дозах спермы 40 % спермиев остались жизнеспособными и обладали поступательным прямолинейным движением, в то время как 60 % спермиев погибли и окрасились раствором эозина в красный цвет. При этом количество спермиев с низкой удельным весом и плотностью в 1 мл составляло 400 млн.

При определении жизнеспособности спермиев после липофекции установлено, что в 45 дозах обнаруживаются как мёртвые спермии, так и спермии с колебательными движениями в количестве 60±12 (p < 0,05) жизнеспособных сперматозоида из 150 имеющихся в поле зрения (40 %).

Таким образом, результатом работы после липофекции является 40 % живых спермиев с прямолинейным поступательным движением в 45 дозах спермы. По итогу выполненной работы оформлен вывод о том, что метод липидной трансфекции спермиев крупного рогатого скота с использованием реактива «Lipofectamin

CRISPRMAX» является эффективным для проведения трансфекции.

Метод липидной трансфекции с Lipofectamine CRISPRMAX и режим № 1 при электропорации прибором Neon Transfection System сопоставимы по эффективности внедрения генетической конструкции и сохранения жизнеспособности трансфицированных спермиев. При обоих методах количество спермиев с внедренной генетической конструкцией в 1 мл составляет 400 млн. Поэтому оба этих метода применимы для трансфицирования спермиев крупного рогатого скота.

Заключение. Развитие геномного редактирования, как очень перспективного направления в науке, следует за тенденциями науки и запросами общества:

- изучение и разработка методов сохранения жизни, здоровья людей и животных в условиях изменения инфекционных агентов и возникновения тяжелых болезней незаразного характера;
- повышение и сохранение наиболее значимых продуктивных качества животных и растений;
- разработка методов получения редких, но очень необходимых химических соединений (гормоны, ферменты, компоненты иммунной системы и т. д.) – это и многое другое являются областями изучения и применения геномной инженерии.

Генетическая модификация, предрасположенного к ВЛКРС крупного рогатого скота, позволяет изменить нуклеотидную последовательность ДНК методом CRISPR/Cas9, что способствует получению не восприимчивых к данному вирусу животных.

Методы доставки компонентов системы CRISPR/Cas9 изучены достаточно хорошо и апробированы на разных типах и видах эукариотических клеток. Но разработки методологий для производства генно-редактированных животных должны быть направлены на экономию времени, ресурсов и сохранение здоровья животных.

В связи с этим нами предложена эффективная методика трансфекции для получения генно-редактированных животных без использования дорогостоящего и трудозатратного метода микроинъекции, а также без использования вирусных векторов доставки.

Список источников

1. Ran F.A. et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9 // *Nature*. 2015. Vol. 520. No 7546. Pp. 186-91.
2. Сайт Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору [электронный ресурс]. URL: <https://cerberus.vetr.ru/cerberus/regionalization/pub> (дата обращения 22.12.2022).
3. Li H. et al. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects // *Sig Transduct Target Ther*. 2020. Vol. 5. No 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>.
4. Li T. et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects // *Sig Transduct Target Ther*. 2023. Vol. 8. No 36. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01309-7>
5. Lin H., Deng Q., Li L., Shi L. Application and Development of CRISPR/Cas9 Technology in Pig Research // *Gene Editing – Technologies and Applications* [Internet]. 2019. No 29. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85540>.
6. Wilbie D., Walther J., Mastrobattista E. Delivery aspects of CRISPR/Cas for in vivo genome editing // *Accounts of chemical research*. 2019. Vol. 6. No 52. Pp. 1555-1564.
7. Barkova O.Y., Larkina T.A., Krutikova A.A. et al. Innovative Approaches to Genome Editing in Chickens // *Cytol. Genet*. 2022. No. 56. Pp. 196-207. <https://doi.org/10.3103/S0095452722020037>.
8. Ebnali A. et al. In vivo Testis Transfection Efficiently Produced Transfected Sperm Cells in Ram but not Rooster // *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 2020. Vol. 4 No.10. Pp. 679-685.
9. Зырянова А.А., Севостьянов М.Ю., Шевкунов О.А. Генетическая структура симментальского скота по гену каппа-казеина и её влияние на молочную продуктивность // *Вестник Курганской ГСХА*. 2022. № 1 (41). С. 26-31.
10. Singh B. et al. Transgenesis and genetically engineered livestock as live bioreactors // *Advances in Animal Biotechnology*. 2019. Pp. 249-264.
11. Rahimi M. The effect of methyl-beta-cyclodextrin on DNA absorption and quality of post-transfected sperm // *Poultry Science*. 2021. Vol. 5. No 100. P. 101058.
12. Kim M. S. et al. Establishment of an electroporation-mediated gene delivery system in porcine spermatogonial stem cells // *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 2019. Vol. 3. No 55. Pp. 177-188.
13. Dehdilani N. et al. Genetically engineered birds; pre-CRISPR and CRISPR era // *Biology of Reproduction*. 2022. Vol. 1. No 106. Pp. 24-46.
14. Rubessa M. Wheeler SLIM microscopy allows for visualization of DNA-containing liposomes designed for sperm-mediated gene transfer in cattle // *Mol. Biol. Rep*. 2019. No 46. Pp. 695-703.
15. Daneluz L. O. et al. Efficiency and cell viability implications using tip type electroporation in zebrafish sperm cells // *Molecular biology reports*. 2020. Vol. 8. No 47. Pp. 5879-5887.

16. Акушерство, гинекология и биотехника репродукции животных: учебник для вузов / под ред. А.П. Студёнова, В.С. Шипилова. 10-е изд. СПб: Лань, 2020. 548 с.

17. Daneluz L.O. Efficiency and cell viability implications using tip type electroporation in zebrafish sperm cells // *Mol. Biol. Rep.* 2020. No 47. Pp. 5879-5887.

18. Navarro-Serna S. et al. First production of Calpain3 KO pig embryo by CRISPR/Cas9 technology for human disease modelling: efficiency comparison between electroporation and intracytoplasmic microinjection // *Anim. Reprod.* 2019. Vol. 3. No 16. P. 770.

References

1. Ran F.A. et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 2015; (520-7546): 186-91.

2. Website of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance [Internet]. URL: <https://cerberus.vetrif.ru/cerberus/regionalization/pub> (accessed: 22.12.2022).

3. Li H. et al. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Sig Transduct Target Ther.* 2020; (5-1). <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>.

4. Li T., Yang, Y., Qi H. et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Sig Transduct Target Ther.* 2023; (8-36). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01309-7>

5. Lin H, Deng Q, Li L, Shi L. Application and Development of CRISPR/Cas9 Technology in Pig Research. *Gene Editing - Technologies and Applications [Internet]*. 2019; (29). <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85540>

6. Wilbie D., Walther J., Mastrobattista E. Delivery aspects of CRISPR/Cas for in vivo genome editing. *Accounts of chemical research.* 2019; (6-52): 1555-1564.

7. Barkova O.Y., Larkina T.A., Krutikova A.A. et al. Innovative Approaches to Genome Editing in Chickens. *Cytol. Genet.* 2022; (56): 196-207. <https://doi.org/10.3103/S0095452722020037>.

8. Ebnali A. et al. In vivo Testis Transfection Efficiently Produced Transfected Sperm Cells in Ram but not Rooster. *Iranian Journal of Applied Animal Science.* 2020; (4-10): 679-685.

9. Zyryanova A.A., Sevostyanov M. Yu., Shevkunov O.A. Geneticheskaya struktura simmental'skogo skota po genu kappa-kazeina i ee vliyanie na molochnyuyu produktivnost' [Genetic structure of Simmental cattle according to the gene of kappa-ca-

sein and its influence on milk productivity]. *Vestnik Kurganskoy GSHA.* 2022; (1-41): 26-31. (In Russ).

10. Singh B. et al. Transgenesis and genetically engineered livestock as live bioreactors. *Advances in Animal Biotechnology.* 2019: 249-264.

11. Rahimi M. The effect of methyl-beta-cyclodextrin on DNA absorption and quality of post-transfected sperm. *Poultry Science.* 2021; (5-100): 101058.

12. Kim M. S. et al. Establishment of an electroporation-mediated gene delivery system in porcine spermatogonial stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal.* 2019; (3-55): 177-188.

13. Dehdilani N. et al. Genetically engineered birds; pre-CRISPR and CRISPR era. *Biology of Reproduction.* 2022; (1-106): 24-46.

14. Rubessa M. Wheeler SLIM microscopy allows for visualization of DNA-containing liposomes designed for sperm-mediated gene transfer in cattle. *Mol. Biol. Rep.* 2019; (46): 695-703.

15. Daneluz L. O. et al. Efficiency and cell viability implications using tip type electroporation in zebrafish sperm cells. *Molecular biology reports.* 2020; (8-47): 5879-5887.

16. Акушерство, гинекология и биотехника репродукции животных: учебник для вузов [Obstetrics, gynecology and biotechnology of animal reproduction: a textbook for universities]. In: Studenov A.P., Shipilov V.S., editors. St. Petersburg: Lan'; 2020, 548 p. (In Russ).

17. Daneluz L.O. Efficiency and cell viability implications using tip type electroporation in zebrafish sperm cells. *Mol. Biol. Rep.* 2020; (47): 5879-5887.

18. Navarro-Serna S. et al. First production of Calpain3 KO pig embryo by CRISPR/Cas9 technology for human disease modelling: efficiency comparison between electroporation and intracytoplasmic microinjection. *Anim. Reprod.* 2019; (3-16): 770.

Информация об авторах

A.C. Метлева – кандидат ветеринарных наук, доцент; AuthorID 1041727.

Information about the author

A.S. Metleva – Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor; AuthorID 1041727.

Статья поступила в редакцию 27.01.2023; одобрена после рецензирования 10.03.2023; принята к публикации 08.06.2023.

The article was submitted 27.01.2023; approved after reviewing 10.03.2023; accepted for publication 08.06.2023.