

犬受精卵基因编辑

Injection of Canine Fertilized Oocytes

王晓民^{1,2}, 赖良学^{1,*}

¹中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州, 广东省; ²生命科学学院, 西湖大学, 杭州, 浙江省

*通讯作者邮箱: lai_liangxue@gibh.ac.cn

引用格式: 王晓民, 赖良学. (2022). 犬受精卵基因编辑. *Bio-101* e1010972. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010972.

How to cite: Wang, X. M. and Lan, L. X. (2022). Injection of Canine Fertilized Oocytes. *Bio-101* e1010972.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010972. (in Chinese)

摘要:

将 Cas9 mRNA 和 gRNA 注射到 1-cell 期受精卵中, 可以对受精卵基因组进行编辑, 从而获得基因编辑的动物个体。通过确定犬的发情排卵时间, 从体内获取 1-cell 期受精卵, 借助显微操作技术将终浓度分别为 200 ng/μl 和 20 ng/μl 的 Cas9 mRNA 和 gRNA 注射到受精卵胞质中, 再移植回受体输卵管内, 可获得基因编辑的犬。目前, 该方法是获得基因编辑犬模型的主要方法。

关键词: 受精卵, 基因编辑, Cas9, 显微注射

材料与试剂

1. 体外转录试剂盒 (NEB)
2. M199 (Invitrogen)
3. FBS (Gibco)
4. 矿物油 (Sigma)
5. 质粒 (Addgene)
6. 透明质酸酶 (Sigma)

仪器设备

1. 显微操作仪器（Eppendorf）
2. 倒置显微镜（Olympus）
3. 培养箱（Thermo）
4. 体视显微镜（Olympus）

实验步骤

1. 准确判断母犬的发情排卵时间以及卵母细胞成熟时间；
2. 术前 18-24 h 给母犬配种；
3. 通过手术冲胚从体内获取 1-cell 期受精卵；
4. 脱去受精卵颗粒细胞；
5. 将脱完颗粒细胞的胚胎转移至胚胎操作液中，并置于倒置显微镜下；
6. 调节好注射针液体流速，将注射针刺破透明带并扎入胞质中，每个胚胎大概注射 1 -5pl 体积；
7. 完成注射后的胚胎进行胚胎移植。

结果与分析

1. 注射过程中需要控制好注射的体积，注射量太少，胚胎编辑效率低，注射量大，可能会导致胚胎死亡；
2. 犬 1-cell 期受精卵进行编辑比较容易形成纯合子。

失败经验

1. 后代中获得基因编辑的犬的比例还是比较低，这可能与受精时间的把握有关。

溶液配方

1. 胚胎操作液：M199+10%FBS

致谢

1. 感谢十二五国家科技重大专项“实验用 Beagle 犬及疾病模式犬研究开发平台”[2011ZX09307-304]提供的经费支持；
2. 感谢广州生物医药研究总院有限公司提供的实验场地、实验用犬及相关技术支持；

3. 感谢北京希诺谷生物科技有限公司共同参与的技术研究；
4. 研究成果以“Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system ; Generation of ApoE deficient dogs via combination of embryo injection of CRISPR/Cas9 with somatic cell nuclear transfer”分别发表在 Journal of Molecular Cell Biology 和 Journal of Genetics and Genomics 杂志上。

参考文献

1. 胡敏华，周志东，王晓民，龙海斌，倪庆纯，刘运忠. (2015) [实验用 Beagle 犬的繁殖性能分析](#). 广东畜牧兽医科技, 3: 41-44.
2. 张敦伟，王晓民，连雪科，刘运忠，高翔，倪庆纯. (2013) [Beagle 犬活体取胎及其成纤维细胞的培养](#). 实验动物与比较医学, 3: 210-214.
3. Bouchard, G. F., Solorzano, N., Concannon, P. W., Youngquist, R. S., Bierschwal, C. J. (1991) [Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone](#). Theriogenology 3: 603-11.
4. Feng, C., Wang, X. M., Shi, H., Yan, Q. M., Zheng, M., Li, J., Zhang, Q. J., Qin, Y. M., Zhong, Y. G., Mi, J. D., Lai, L. X. (2018) [Generation of ApoE deficient dogs via combination of embryo injection of CRISPR/Cas9 with somatic cell nuclear transfer](#). J Genet Genomics 45: 47-50.
5. Concannon, P. W. (1986) [Canine pregnancy and parturition](#). Vet Clin North Am Small Anim Pract 16: 453-75.
6. Evans, J.M., and Savage, T.J. (1970) [The collection of vaginal smears from bitches](#). The Veterinary record 87: 598-599.
7. Jang, G., Kim, M. K., Oh, H. J., Hossein, M. S., Fibrianto, Y. H., Hong, S. G., Park, J. E., Kim, J. J., Kim, H. J., Kang, S. K., Kim, D. Y., Lee, B. C. (2007) [Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer](#). Theriogenology 5: 941-7.
8. Zou, Q. J., Wang, X. M., Liu, Y. Z., Ouyang, Z., Long, H. B., Wei, S., Xin, J. G., Zhao, B. T., Lai, S. S., Shen, J., Ni, Q. C., Yang, H. Q., Zhong, H. L., Li, L., Hu, M. H., Zhang, Q. J., Zhou, Z. D., He, J. X., Yan, Q. M., Fan, N. N., Zhao, Y., Liu, Z. M., Guo, L., Huang, J., Zhang, G. G., Ying, J., Lai, L. X., Gao, X. (2015) [Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system](#). J Mol Cell Biol 6: 580-3.

