

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992582** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.05.19

(51) Int. Cl. *A01K 67/027* (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.05.24

(54) **СПОСОБЫ И СРЕДСТВА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА ПТИЧЬИХ ЭМБРИОНОВ В НЕВЫВЕДЕННЫХ ЯЙЦАХ**

(31) **62/510,921**

(32) **2017.05.25**

(33) **US**

(86) **PCT/IL2018/050573**

(87) **WO 2018/216022 2018.11.29**

(71) Заявитель:

ЭГГКСИТ ЛТД (IL)

(72) Изобретатель:

Оффен Даниэль (IL)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к способам определения и идентификации оплодотворенности и пола у птиц. В частности, в изобретении предложены неинвазивные способы с использованием трансгенных птиц, содержащих по меньшей мере один репортерный ген, в частности RFP, встроенный по меньшей мере в одну половую Z- или W-хромосому. Трансгенных птиц согласно изобретению используют для определения пола и отбора эмбрионов в невыведенных птичьих яйцах.

A1

201992582

201992582

A1

СПОСОБЫ И СРЕДСТВА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА ПТИЧЬИХ ЭМБРИОНОВ В НЕВЫВЕДЕННЫХ ЯЙЦАХ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

- 5 Настоящее изобретение относится к способам определения и идентификации пола у птиц. В частности, в изобретении предложены неинвазивные способы и трансгенные птицы для определения пола и отбора эмбрионов в невыведенных птичьих яйцах.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

10 Источники, которые считаются релевантным уровнем техники для предмета настоящей заявки, перечислены ниже:

- WO 2010/103111
- WO 2014/0296707
- US 6244214
- 06124456A2
- 15 • US2014069336A
- WO16005539
- WO 96/39505
- WO 97/49806
- Quansah, E., Long, J.A., Donovan, D.M., Becker, S.C., Telugu, B., Foster Frey, J.A.,
20 Urwin, N. (2014). Sperm-mediated transgenesis in chicken using a PiggyBac transposon system. Poultry Science Association Meeting Abstract. BARC Poster Day.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
- 25 • Cong, L., & Zhang, F. (2015). Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. *Chromosomal Mutagenesis*, 197-217.
- Патент США № 6, 244,214.
- WO 2014/0296707.
- WO 06124456A2;
- 30 • WO16005539.
- Véron N., Qu Z., Kipen PA., Hirst CE., Marcelle C. (2015). CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken. *Dev. Biol.* 407(1):68-74. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.08.007. Опубликовано в электронном виде 13 августа 2015 г.
- CA2264450.

- Niu, Y., B. Shen, Y. Cui, Y. Chen, J. Wang et al., (2014). Generation of genemodified cynomolgus monkey via cas9/rna-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 156(4): 836–843.
 - Hwang, W. Y., Y. Fu, D. Reyon, M. L. Maeder, S. Q. Tsai et al., (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31(3): 227–229.
 - Nadège, V., Q. Zhengdong, P. A. S. Kipen, C. E. Hirst, M. Christophe et al., (2015). CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken. *Dev. Biol.* 407(1): 68–74.
 - Bai, Y., L. He, P. Li, K. Xu, S. Shao et al., (2016). Efficient genome editing in chicken DF-1 cells using the CRISPR/Cas9 system. *G3 (Bethesda)* pii: g3.116.027706.
 - Doran T. et al., (2016). Sex selection in layer chickens. *ASAP Animal Production*, Adelaide.
 - Tizard M. и Doran T. (2014). Precision genome engineering in the chicken: Th gap between science and market place. Презентация на IWRAB□II, в Бразилиа.
- 15 Упоминание вышеупомянутых источников в настоящей заявке не следует понимать как означающее, что они имеют какое-либо отношение к патентоспособности предмета настоящей заявки.

ОБЛАСТЬ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

20 В пищевой промышленности ежедневно отбраковывают миллиарды цыплят путем удушения или перемалывания. Самцов умерщвляют, поскольку они непригодны для несения яиц или для разведения на мясо, кроме того, слабых или нездоровых самок также умерщвляют. Таким образом, способ определения пола *in ovo*, или эмбриона, до вылупления очень востребован как по этическим, так и по экономическим соображениям.

25 В частности, визуальная идентификация оплодотворенных яиц домашней птицы важна для возможности удаления неоплодотворенных яиц, чтобы сэкономить затраты на выведение (путем предотвращения выведения неоплодотворенного яйца) и снизить риски биологической безопасности, связанные с продолжением инкубации этих подверженных

30 заражению неоплодотворенных яиц рядом с оплодотворенными яйцами.

Визуальная идентификация оплодотворенности яиц на ранней стадии развития эмбриона, находящегося внутри невыведенного яйца, включает просвечивание внешним источником света и может быть трудной, практически невозможной на ранних стадиях развития

35 эмбриона. Еще более сложной задачей является определение пола эмбрионов, и в

настоящее время не существует доступного способа различения самцов и самок в невыведенных яйцах, которые были определены как оплодотворенные. Однако идентификация оплодотворенности на ранней стадии развития эмбриона и определение пола домашней птицы имеют жизненно важное значение для птицеводства, научных исследований и охраны природы. Определение пола у молодых птиц по морфологическим признакам является чрезвычайно сложным для большинства видов. Пол может быть определен посредством индивидуального исследования клоаки, которое включает ручное выдавливание экскрементов из цыпленка, что слегка открывает клоачное отверстие цыплят, позволяя увидеть, есть ли у цыпленка небольшой «бугорок», свидетельствующий о том, что цыпленок является самцом. Однако этот способ представляет высокий риск травмирования птиц и ошибок в определении пола, будучи при этом трудоемкой работой, выполняемой вручную обученным персоналом.

Определение пола путем исследования клоаки или определение пола цыплят представляет собой способ установления пола цыплят и других птенцов, обычно с помощью обученного человека, называемого работником, определяющим пол цыплят, или работником, определяющим пол кур. Определение пола кур практикуется в основном в крупных коммерческих инкубаторных станциях, которые должны различать животных разного пола для разделения их на группы в зависимости от пола, и для распределения их в разные программы, которые могут включать выращивание желаемой группы и отбраковку нежелательной группы, не отвечающей коммерческим потребностям. Например, самец вылупился из яйца, снесенного несушкой коммерческой линии породы. Этот самец не даст хорошего выхода мяса и не будет нести яйца, и поэтому будет отбракован после определения пола. После определения пола нужный пол продолжит свой путь для выполнения своего назначения, в то время как другой пол или большая его часть будет отбракован в течение нескольких дней после вылупления, независимо от яйценоскости.

На фермах, производящих яйца, самцы являются нежелательными, и цыплят нежелательного пола почти сразу же умерщвляют, чтобы снизить затраты для заводчика. Цыплят спускают по конвейерной ленте, где работники, определяющие пол цыплят, отделяют самцов и бросают их в желоб, где их обычно размалывают заживо в мясорубке.

Идентификация и определение оплодотворенности яйца, а также пола эмбрионов в яйцах до их вылупления позволит исключить бесплодные яйца и нежелательный тип эмбрионов, пока они находятся в яйцах и, таким образом, значительно сократить расходы на инкубацию

(которые включает затраты на энергию и эффективность наряду с загрязнением воздуха и потреблением энергоресурсов). Кроме того, прекратятся страдания цыплят, и будет предотвращено загрязнение от отбраковки. Автоматическое устройство для определения пола также позволит снизить затраты на производство яиц за счет исключения потребности

5 в работниках, определяющих пол цыплят, а также уменьшить требуемый размер инкубаторных станций, так как на ранней стадии развития из процесса будет исключено 50% яиц, что приведет к снижению затрат на выведение этих яиц, а впоследствии – и необходимости каких-либо сложных процедур умерщвления.

10 У всех коммерческих видов птицы, предназначенных для разведения, несения яиц или производства мяса, необходимо определять оплодотворенность и пол эмбриона. Существуют большая экономическая отдача; в области энергосбережения, снижения риска биологической безопасности, вывоза мусора, затрат на оплату труда работников, определяющих пол, ошибок определения пола, затрат на отбраковку и утилизацию, а также

15 гуманного обращения с животными.

В публикации WO 2010/103111 описан инвазивный способ, включающий набор стадий, включающих введение в яйцо меченого антитела, специально сконструированного для соответствия полоспецифичному антигену на эмбрионе.

20 В публикации WO 2014/0296707 описана люминесцирующая композиция, предназначенная для использования в качестве биомаркера для количественной оценки или оценки эффективности вакцинации, осуществляемой путем инъекции в птичье яйцо. В этом источнике не описано и даже не предполагается никакое определение пола.

25 Приспособление для инъекций *in ovo* и способы обнаружения были раскрыты в патенте США № 6, 244,214.

В публикации WO 06124456A2 раскрыты инвазивные способы определения пола птичьего эмбриона *in ovo* путем определения наличия эстрогенного стероидного соединения в образце эмбриональной жидкости (например, аллантаоисной жидкости или крови) из

30 птичьего яйца. Определение наличия соединения осуществляют путем измерения аналитов в образцах, полученных из указанного птичьего яйца, с помощью конкурентного иммуноанализа с использованием флуоресцентной микроскопии.

Также были описаны спектроскопические подходы, в том числе в заявке US2014069336A, подход в которой основан на скрининге цвета перьев птичьего эмбриона (до вылупления) и определении пола птичьего эмбриона на основе цвета перьев, или в публикации WO16005539, где раскрыто устройство, получающее специфичный для скорлупы 5 спектральный отклик на падающий световой сигнал.

Другие генетические подходы, направленные на определение пола *in ovo*, включают секвенирование ДНК образцов ДНК, полученных из оплодотворенных яиц, для выявления двух определенных генов, расположенных на Z- и W-хромосомах птиц (WO 96/39505), или 10 применение олигонуклеотидных зондов, которые гибридизуются с определенными последовательностями женской W-хромосомы (WO 97/49806). Эти способы являются инвазивными и поэтому не обеспечивают безопасную методику.

Система кластерных регулярно перемежающихся коротких палиндромных повторов 15 (CRISPR)/CRISPR-ассоциированных белков (Cas) представляет собой современную систему редактирования генома, позволяющую легко создавать конструкции с высокой степенью успеха (M. Jinek, 2012).

Niu et al. (2014) вводили гидовую РНК (гРНК) и РНК Cas9 в ооциты обезьяны для 20 модификации трех генов-мишеней, а Hwang et al. (2013) модифицировали гены *drd3* и *gsk3b* у эмбрионов данио-рерио с получением двухлокусного мутанта. Cong и Zhang (2015) модифицировали систему CRISPR для редактирования любого гена в живых клетках.

Veron и коллеги (2015) продемонстрировали, что уровни экспрессии соматических клеток 25 в куриных эмбрионах были модифицированы электропорацией плазмид с гРНК CRISPR, направленных на фактор транскрипции PAX7 (Nadège et al. 2015), Bai и коллеги отредактировали PPAR-g, эpsilon-субъединицу АТФ-синтазы (ATP5E).

Quansah, E. et. al. раскрыли опосредованный спермой трансгенез у кур с использованием 30 системы транспозонов PiggyBac. В частности, они раскрывают, что комбинация плазмиды с aGFP и Lipofectamine LTX™ 9LPX) не влияла на жизнеспособность, подвижность или фертильность куриной спермы.

В публикации CA2264450 раскрыты плюрипотентные клетки, содержащие 35 последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую флуоресцентный белковый

маркер, селективно встроенный в гетерологичную половую хромосому в клеточных эмбрионах, и трансгенные животные, полученные с использованием плюрипотентных клеток, и применение таких клеток, эмбрионов и животных. Эта публикация, в частности, относится к GFP в клетках млекопитающих.

5

Dogan T. et al. в общем описывают стратегию различения самцов и самок до вылупления путем добавления биологического маркера, репортерного гена GFP, к половой хромосоме, в ASAP Animal Production 2016, Аделаида. Встраивание репортерного гена GFP в половую хромосому цыплят с использованием технологии CRISPR было также описано в презентации на IWRAB II в Бразилиа в 2014 году. Однако, поскольку в этой общей публикации раскрыто, что меченую хромосому визуализируют *in ovo* путем воздействия на яйцо УФ-излучения, из-за собственной флуоресценции яйца ожидается отсутствие обнаружимого сигнала.

15 Таким образом, в настоящее время отсутствуют эффективные и неинвазивные способы идентификации пола на стадии яйца, до вылупления цыпленка. Поэтому существует давно назревшая потребность в способе, позволяющем точно и безопасно идентифицировать пол эмбрионов в невыведенных яйцах.

20 **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Первый аспект изобретения относится к способу определения пола птицы или птичьего эмбриона в невыведенном яйце, в частности, в оплодотворенном невыведенном яйце. В некоторых конкретных вариантах осуществления способ может включать следующие стадии:

25 Сначала, на стадии (a), – обеспечение или получение по меньшей мере одной трансгенной птицы или животного, содержащих по меньшей мере один экзогенный репортерный ген, встроенный по меньшей мере в одно положение или местоположение (также называемое в настоящей заявке локусом) на по меньшей мере одной из их половых Z- и W-хромосом. На второй стадии (b) – получение по меньшей мере одного оплодотворенного яйца от
30 трансгенной птицы, или любых ее клеток.

Следующая стадия (c) включает определение, обнаруживается ли в яйце по меньшей мере один обнаружимый сигнал. В более конкретных вариантах осуществления обнаружение по меньшей мере одного обнаружимого сигнала свидетельствует об экспрессии указанного по меньшей мере одного репортерного гена, и, следовательно, наличии в птичьем эмбрионе

W-хромосомы или Z-хромосомы. В некоторых конкретных вариантах осуществления встроенный репортерный ген может кодировать красный флуоресцентный белок (RFP).

5 Во втором аспекте изобретение относится к трансгенной птице, содержащей по меньшей мере в одной из ее клеток по меньшей мере один экзогенный репортерный ген, встроенный по меньшей мере в одно положение или местоположение на по меньшей мере одной из половых Z- и W-хромосом. В некоторых конкретных вариантах осуществления встроенный репортерный ген может кодировать RFP.

10 В еще одном аспекте изобретение относится к клетке, содержащей по меньшей мере один экзогенный репортерный ген, встроенный по меньшей мере в одно положение или локус на по меньшей мере одной из половых Z- и W-хромосом.

В еще одном аспекте изобретения предложен набор, содержащий:

15 (a) по меньшей мере один белок Cas9 или любые его фрагменты или производные, или по меньшей мере одну первую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный по меньшей мере один белок Cas9; и по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере одну гидовую РНК (гРНК), нацеленную на по
20 меньшей мере один протоспейсер, расположенный на половой Z- или W-хромосоме; и (b) по меньшей мере одну вторую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую по меньшей мере один указанный репортерный ген.

Кроме того, изобретение относится к способу определения и обнаружения
25 оплодотворенности невыведенного яйца. Более конкретно, такой способ включает следующие стадии:

Сначала, на стадии (a), – обеспечение или получение по меньшей мере одной трансгенной птицы или животного, содержащих по меньшей мере один экзогенный репортерный ген, встроенный по меньшей мере в одно положение или местоположение на обеих половых Z-
30 и W-хромосоме в случае самки и на обеих половых Z-хромосомах у самца. На второй стадии (b) – получение по меньшей мере одного оплодотворенного яйца от трансгенной птицы, или любых ее клеток. Следующая стадия (c) включает определение, обнаруживается ли в яйце по меньшей мере один обнаружимый сигнал. В более конкретных вариантах осуществления обнаружение по меньшей мере одного обнаружимого сигнала
35 свидетельствует об экспрессии указанного по меньшей мере одного репортерного гена, и,

следовательно, наличии в птичьем эмбрионе меченой материнской W-хромосомы или Z-хромосомы (в случае самки), или меченой отцовской Z-хромосомы.

5 Эти и другие варианты осуществления изобретения будут более ясны из следующих графических материалов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Для лучшего понимания предмета настоящей заявки и для иллюстрации того, как он может быть реализован на практике, варианты осуществления далее будут описаны, только в
10 форме неограничивающего примера, со ссылкой на прилагаемые графические материалы, где:

Фиг. 1А-1В. Полностью собранная установка для оценки флуоресценции яиц

На **Фиг. 1А.** показана фотография устройства, используемого в способах согласно изобретению для определения пола *in ovo*. В полностью собранном виде установка состоит
15 из источника лазерного излучения (h), держателя источника лазерного излучения (g), подставки для яйца (e), яйца (f), линзы (d), фильтра (c), подставки для детектора (b) и детектора (a). Различные компоненты размещены на твердой основе (i).

На **Фиг. 1В.** показана схематическая иллюстрация устройства согласно изобретению, показанного на фиг. 1А. Устройство содержит источник лазерного излучения (h), держатель
20 источника лазерного излучения (g), подставку для яйца (e), яйцо (f), линзу (d), фильтр (c), подставку для детектора (b) и детектор (a). Различные компоненты размещены на твердой основе (i).

25 Фиг. 2. Интенсивность флуоресценции с использованием синего лазера (473 нм) с флуоресцентном или без него

Интенсивность флуоресценции [Р_{вых}], зарегистрированная детектором, когда цельное яйцо было подвергнуто воздействию синего лазера с 10 мкм или 1 мМ флуоресцеина (fl) или без него, и интенсивность представлена в виде функции от интенсивности источника
30 света [Р_{вх}].

Фиг. 3. Интенсивность флуоресценции с использованием зеленого лазера (532 нм) с родамином или без него

Интенсивность флуоресценции $[P_{\text{вых}}]$, зарегистрированная детектором, когда цельное яйцо было подвергнуто воздействию зеленого лазера с родамином или без него, и интенсивность представлена в виде функции от интенсивности источника света $[P_{\text{вх}}]$.

5 **Фиг. 4. Интенсивность флуоресценции с использованием зеленого лазера (532 нм) с *dir* или без него**

Интенсивность флуоресценции $[P_{\text{вых}}]$, зарегистрированная детектором, когда цельное яйцо было подвергнуто воздействию зеленого лазера с *dir* или без него, и интенсивность представлена в виде функции от интенсивности источника света $[P_{\text{вх}}]$.

10

Фиг. 5. Интенсивность флуоресценции с использованием красного лазера (632,8 нм) с *dir* или без него

Интенсивность флуоресценции $[P_{\text{вых}}]$, зарегистрированная детектором, когда цельное яйцо было подвергнуто воздействию красного лазера с *dir* или без него, и интенсивность представлена в виде функции от интенсивности источника света $[P_{\text{вх}}]$.

15

Фиг. 6. Клетки, экспрессирующие GFP

Изображение, демонстрирующее флуоресцентный сигнал клеток HEK, трансфицированных GFP-вектором, экспрессирующим GFP.

20

Фиг. 7. Клетки, экспрессирующие RFP

Изображение, демонстрирующее флуоресцентный сигнал клеток HEK, трансфицированных RFP-вектором, экспрессирующим RFP.

25 **Фиг. 8. Контрольные измерения**

Интенсивность флуоресценции с использованием зеленого лазера и красного фильтра при различных положениях яйца. Интенсивность флуоресценции $[P_{\text{вых}}]$, зарегистрированная детектором, представлена в виде функции от интенсивности источника света $[P_{\text{вх}}]$.

30 **Фиг. 9. Измерения RFP**

Измерения интенсивности флуоресценции яиц, инъецированных различными концентрациями RFP-экспрессирующих клеток, с использованием зеленого лазера и красного фильтра. Интенсивность флуоресценции $[P_{\text{вых}}]$, зарегистрированная детектором, представлена в виде функции от интенсивности источника света $[P_{\text{вх}}]$.

35

Фиг. 10. Угол для RFP

Измерение интенсивности флуоресценции RFP возбужденных яиц в установленном оптимальном положении яйца с использованием зеленого лазера и красного фильтра. Интенсивность флуоресценции [Рвых], зарегистрированная детектором, представлена в виде функции от интенсивности источника света [Рвх].

Фиг. 11А-11В. RFP-экспрессирующие клетки с PBS или глицерином

На фигуре показана интенсивность флуоресценции яиц, инъецированных различными концентрациями RFP-экспрессирующих клеток с PBS или глицерином, с использованием зеленого лазера.

На **фиг. 11А** показана интенсивность флуоресценции яиц, содержащих различные концентрации RFP-экспрессирующих клеток в PBS. На **фиг. 11В** показана интенсивность флуоресценции яиц, содержащих различные концентрации RFP-экспрессирующих клеток в глицерине. Интенсивность флуоресценции [Рвых], зарегистрированная детектором, представлена в виде функции от интенсивности источника света [Рвх].

Фиг. 12. GFP-экспрессирующие клетки с PBS или глицерином

На фигуре показана интенсивность флуоресценции яиц, инъецированных 30000 GFP-экспрессирующих клеток с PBS или глицерином, с использованием синего лазера. Интенсивность флуоресценции [Рвых], зарегистрированная детектором, представлена в виде функции от интенсивности источника света [Рвх].

Фиг. 13. Сравнение RFP и GFP

На фигуре показано соотношение между интенсивностью флуоресцентного белка от GFP-экспрессирующих клеток или RFP-экспрессирующих клеток, и интенсивностью собственной флуоресценции.

Параметр R , описывающий соотношение между флуоресценцией и собственной флуоресценцией, представлен в виде функции от интенсивности источника света [Рвх].

Фиг. 14. Включение RFP в женскую Z-хромосому

На фигуре показана линия женских куриных клеток, трансфицированных RFP с помощью pDsRed с левым и правым плечами куриной Z-хромосомы и CMV-hspCas9-H1-гРНК.

Фиг. 15А-15В. Схематическое изображение последовательности, встроенной в Z-хромосому линии женских куриных клеток

Выделенные жирным последовательности представляют собой фланкирующие левое и правое плечи Z-хромосомы и обозначены соответственно SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61; последовательность (1017 п. н.), выделенная курсивом, представляет собой левое плечо, обозначенное SEQ ID NO: 62; подчеркнутая последовательность (629 п. н.) представляет собой энхансер, промотор CMV и MCS, обозначенные SEQ ID NO: 63; последовательность, выделенная полужирным курсивом (714 п.н.), представляет собой репортерный ген dsRED2, обозначенный SEQ ID NO: 64; последовательность, не имеющая выделения - 3332 п. н. - представляет собой содержимое плазмиды dsRED; подчеркнутая последовательность, выделенная курсивом (1026 п. н.) представляет собой правое плечо, обозначенное SEQ ID NO: 65. Левая часть последовательности представлена SEQ ID NO: 66 (все части, 5'-концевые относительно векторных последовательностей, показанные на фиг. 15А), а правая часть последовательности обозначена SEQ ID NO: 67 (все части, 3'-концевые относительно векторных последовательностей, показанные на фиг. 15В).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Каждый день миллиарды самцов цыплят умерщвляют удушением или перемалыванием, поскольку они непригодны для несения яиц или для разведения на мясо. Возможность определения пола эмбриона до вылупления имеет большое значение как с этической, так и с финансовой точки зрения.

У кур генетическая организация половых хромосом представляет собой ZZ для самцов и ZW для самок. То есть, женский пол определяется W-хромосомой. У людей же, напротив, мужской пол определяется Y от отца.

Изобретение относится к неинвазивному эффективному способу определения пола с использованием репортерного гена, встроенного в полоспецифичные хромосомы трансгенных птиц. Экспрессия этого репортерного гена в эмбрионе в невыведенном яйце ясно и точно идентифицирует пол указанного эмбриона.

Таким образом, первый аспект изобретения относится к способу определения пола и, необязательно, отбора птицы или птичьего эмбриона в невыведенном яйце, в частности, в оплодотворенном невыведенном яйце. В некоторых конкретных вариантах осуществления способ может содержать следующие стадии:

Сначала, на стадии (а), – обеспечение или получение по меньшей мере одной трансгенной птицы или животного, содержащих по меньшей мере один экзогенный репортерный ген, встроенный по меньшей мере в одно положение или местоположение на по меньшей мере одной из половых Z- и W-хромосом. На второй стадии (b) – получение по меньшей мере одного оплодотворенного яйца от трансгенной птицы, в частности, животного, или любых их клеток.

Следующая стадия (с) включает определение, обнаруживается ли в яйце по меньшей мере один обнаружимый сигнал. В более конкретных вариантах осуществления обнаружение по меньшей мере одного обнаружимого сигнала свидетельствует об экспрессии по меньшей мере одного репортерного гена, и, следовательно, наличии в птичьем эмбрионе W-хромосомы или Z-хромосомы. Таким образом, если репортерный ген был встроен в Z-хромосому трансгенной самки птицы, идентификация обнаружимого сигнала в исследуемом яйце свидетельствует о том, что содержащийся в нем эмбрион имеет материнскую Z-хромосому, в которую встроен репортерный ген, и следовательно, эмбрион идентифицируют как самца. В некоторых других вариантах осуществления, если репортерный ген был встроен в W-хромосому трансгенной самки птицы, идентификация обнаружимого сигнала в исследуемом яйце свидетельствует о том, что содержащийся в нем эмбрион несет материнскую W-хромосому и, следовательно, определяется как самка, тем самым обеспечивая возможность определения пола эмбриона.

Следует принимать во внимание, что трансгенная птица, предложенная согласно изобретению, может представлять собой самку либо самца, как более подробно описано ниже. В некоторых дополнительных конкретных вариантах осуществления трансгенное животное может представлять собой животное пола, имеющего две разные половые хромосомы, в частности, гетерогаметного субъекта. В некоторых частных вариантах осуществления гетерогаметное животное может представлять собой самку. В более конкретных вариантах осуществления, где трансгенная птица представляет собой самку, яйцо, идентифицированное способом согласно изобретению, снесено трансгенной самкой птицы, предложенной согласно изобретению. В более конкретном варианте осуществления трансгенная самка может быть оплодотворена либо трансгенным самцом, либо, в некоторых других вариантах осуществления, самцом птицы дикого типа. Кроме того, оплодотворение может происходить либо путем спаривания, либо путем осеменения трансгенной самки птицы спермой, полученной от трансгенного самца птицы или самца птицы дикого типа. В некоторых других вариантах осуществления, где трансгенная птица представляет собой самца, яйцо, идентифицированное способом согласно изобретению,

может быть снесено самкой дикого типа или трансгенной самкой, спарившейся с трансгенным самцом, предложенным согласно изобретению, или осемененной любыми его клетками, в частности, сперматозоидами, в половые хромосомы которых встроены экзогенный репортерный ген согласно изобретению.

5

Таким образом, изобретение относится к способу определения пола птичьего эмбриона в невыведенном оплодотворенном яйце. Следует принимать во внимание, что способ согласно изобретению может быть пригоден для невыведенных яиц с птичьим эмбрионом на любой стадии эмбрионального развития.

- 10 Следует отметить, что **«стадия эмбрионального развития или стадия развития птичьего эмбриона»** в контексте настоящей заявки относится к стадии на **1 день**, на которой зародышевый диск находится на стадии бластодермы и сегментарная полость принимает форму темного кольца; стадии на **2 день**, на которой в центре бластодермы появляется первая бороздка и появляется желточная оболочка; стадии на **3 день**, на которой
- 15 начинается кровообращение, могут стать различимы голова и туловище, а также мозг и сердечные структуры, которые начинают биться; стадии на **4 день**, на которой развивается амниотическая полость, которая будет окружать эмбрион, и появляется аллантоисный пузырь; стадии на **5 день**, на которой эмбрион принимает форму буквы С и разгибаются конечности; стадии на **6 день**, на которой становятся различимы пальцы верхних и нижних
- 20 конечностей; стадии на **7 день**, на которой шея четко отделяет голову от тела, формируется клюв и мозг постепенно входит в область головного мозга; стадии на **8 день**, на которой хорошо видна пигментация глаз, крылья и ноги отделены друг от друга и открывается наружный слуховой канал; стадии на **9 день**, на которой появляются когти и зарождаются первые перьевые фолликулы; стадии на **10 день**, на которой присутствуют ноздри, растут
- 25 веки и появляется яйцевой зуб; стадии на **11 день**, на которой глазная щель имеет эллиптическую форму и эмбрион имеет вид цыпленка; стадии на **12 день**, на которой перьевые фолликулы окружают наружный слуховой проход и покрывают верхнее веко, тогда как нижнее веко покрывает большую часть роговицы; стадии на **13 день**, на которой аллантоис становится хориоаллантоисной мембраной, в то время как проявляются когти и
- 30 чешуйки на ногах; стадии с **14 по 16 дни**, на которой быстро растет все тело, ускоряется сокращение яичного желтка и постепенно исчезает яичный белок; стадии на **17 день**, на которой почечная система производит мочу, клюв направлен на воздушную камеру и яичный белок полностью рассасывается; стадии на **18 день**, на которой поглощается яичный желток и снижается количество околоплодных вод; стадии на **19 день**, на которой
- 35 ускоряется рассасывание яичного желтка и клюв готов проткнуть подскорлупную

оболочку; стадии на **20 день**, на которой яичный желток полностью рассасывается, пупок закрывается, цыпленок протыкает подскорлупную оболочку, вдыхает воздух из воздушной камеры и готов к вылуплению; стадии на **21 день**, на которой цыпленок протыкает скорлупу по кругу с помощью его яйцевого зуба, высвобождается из скорлупы за 12-18 часов и сбрасывает ее, обсыхая.

Более конкретно, способ согласно изобретению может быть пригоден для определения пола птичьего эмбриона *in ovo*, внутри яйца, на каждой стадии процесса эмбрионального развития. Более конкретно, с 1 дня, со 2 дня, с 3 дня, с 4 дня, с 5 дня, с 6 дня, с 7 дня, с 8 дня, с 9 дня, с 10 дня, с 11 дня, с 12 дня, с 13 дня, с 14 дня, с 15 дня, с 16 дня, с 17 дня, с 18 дня, с 19 дня, с 20 дня и с 21 дня. Более конкретно, способ согласно изобретению может быть пригоден для раннего определения пола эмбриона, в частности, в период с 1 по 10 день. В некоторых вариантах осуществления способ согласно изобретению может позволить определить пол эмбриона в первый день эмбрионального развития. В некоторых дополнительных вариантах осуществления способ согласно изобретению может позволить определить пол эмбриона на второй день. В некоторых дополнительных вариантах осуществления способ согласно изобретению может позволить определить пол эмбриона на третий день. В дополнительных вариантах осуществления способ согласно изобретению может позволить определить пол эмбриона на четвертый день. В некоторых дополнительных вариантах осуществления способ согласно изобретению может позволить определить пол эмбриона на пятый день. В дополнительных вариантах осуществления способ согласно изобретению может позволить определить пол эмбриона на шестой день. В дополнительных вариантах осуществления способ согласно изобретению может позволить определить пол эмбриона на седьмой день. В дополнительных вариантах осуществления способ согласно изобретению может позволить определить пол эмбриона на восьмой день. В некоторых дополнительных вариантах осуществления способ согласно изобретению может позволить определить пол эмбриона на девятый день. В некоторых дополнительных вариантах осуществления способ согласно изобретению может позволить определить пол эмбриона на десятый день. В некоторых конкретных вариантах осуществления способ согласно изобретению может позволить определить пол эмбриона между 1 и 5 днями эмбрионального развития.

Как отмечено выше, способ согласно изобретению может быть пригоден для оплодотворенных невыведенных яиц. Термин «**оплодотворенное яйцо**» здесь и далее относится к яйцу, снесенному курицей, которая спарилась с петухом не ранее, чем за две

недели, что обеспечило попадание спермы самца в воронку яйцевода самки и осуществление оплодотворения при выходе яйцеклетки из яичника. **«Выведенное яйцо»** в контексте настоящей заявки относится к яйцу, содержащему эмбрион (также называемому в настоящей заявке оплодотворенным яйцом) внутри структурно целостной (не сломанной) скорлупы.

Способ согласно изобретению основан на определении обнаружимого сигнала, формируемого репортерным геном, встроенным в определенные локусы трансгенной самки или самца птицы, снесшей исследуемое яйцо.

«Встраивание чужеродной или экзогенной ДНК/гена в хромосому» в контексте настоящей заявки здесь и далее относится к постоянной модификации нуклеотидной последовательности хромосомы организма. Эта модификация далее передается во время клеточного деления, и если она имеет место в зародышевых клеточных линиях, она также будет передана потомству. В этом случае встроенный репортерный ген может быть перенесен в эмбрион внутри невыведенного яйца. Термин **«экзогенный»** в контексте настоящей заявки относится к происходящему извне организма, введенному в организм, например, путем трансформации или трансфекции определенным образом управляемыми векторами, вирусами или любым другим носителем. Встроенный экзогенный ген согласно отдельным вариантам осуществления может представлять собой репортерный ген. Термин **«репортерный ген»** относится к гену, кодирующему полипептид, экспрессия которого может быть обнаружена посредством ряда известных анализов, где уровень обнаруженного сигнала свидетельствует о наличии указанного репортера.

Как отмечено выше, экзогенный репортерный ген может быть встроен в птичьи половые Z- или W-хромосомы. Птичья **«половая Z- или W-хромосома»** в контексте настоящей заявки относится к системе хромосом, определяющей пол потомства у кур, где самцы представляют собой гомогаметный пол (ZZ), а как самки представляют собой гетерогаметный пол (ZW). Наличие W-хромосомы в яйцеклетке определяет пол потомства, тогда как Z-хромосома, как известно, крупнее и обладает большим количеством генов.

Способ согласно изобретению основан на обнаружении обнаружимого сигнала, который свидетельствует о и отражает наличие репортерного гена и, следовательно, наличие определенной половой хромосомы. **«Обнаружимый сигнал»** здесь и далее относится к изменению, которое является различимым либо путем наблюдения, либо инструментально.

Не ограничиваясь указанным, сигнал может быть обнаружен напрямую. В некоторых вариантах осуществления обнаружимый отклик представляет собой оптический сигнал.

5 Следует принимать во внимание, что в некоторых конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одна трансгенная птица, получаемая способом согласно изобретению, может содержать по меньшей мере два разных репортерных гена, каждый из которых может быть
10 встроен по меньшей мере в одно положение или местоположение на одной из половых Z- или W-хромосом. В случае по меньшей мере двух разных репортерных генов в некоторых вариантах осуществления каждая из половых хромосом может быть мечена разным способом. Оценка сформированного обнаружимого сигнала может свидетельствовать о поле исследуемого эмбриона.

В некоторых конкретных вариантах осуществления репортерный ген, содержащийся в трансгенной птице согласно изобретению, может представлять собой по меньшей мере
15 один флуоресцентный репортерный ген. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления экспрессируемый полипептид представляет собой флуоресцентный белок, и, соответственно, в анализе измеряют уровни света, испускаемого при возбуждении, в частности, подходящим источником света.

Термин «**флуоресценция**» относится к испусканию света веществом, которое было
20 облучено светом, поглотило свет или другое электромагнитное излучение. Она представляет собой форму люминесценции, то есть, испускания веществом света, не являющегося результатом нагрева.

«**Флуоресцентный белок**» относится к белку, демонстрирующему яркую флуоресценцию при воздействии света. Флуоресцентные белки имеют определенную длину волны,
25 соответствующую пику интенсивности возбуждающего света, и длину волны, соответствующую пику интенсивности испускания флуоресценции. Возбуждение относится к облучению светом флуоресцентного белка. В некоторых вариантах осуществления возбуждение может быть обеспечено лазером. В некоторых вариантах осуществления сигнал может быть обнаружен при использовании подходящего
30 светофильтра.

В отдельных вариантах осуществления флуоресцентный репортерный ген может представлять собой красный флуоресцентный белок (RFP), голубой флуоресцентный белок (CFP), желтый флуоресцентный белок (YFP) и белки с собственной флуоресценцией, включая синий флуоресцентный белок (BFP).

Следует отметить, что в некоторых дополнительных конкретных вариантах осуществления для целей настоящего изобретения может быть пригоден любой флуоресцентный белок. Более конкретно, работы по мутагенезу исходного зеленого флуоресцентного белка медузы *Aequorea victoria* привели к появлению новых флуоресцентных зондов, цвет которых варьируется от синего до желтого, которые могут быть пригодны для настоящего изобретения в соответствии с некоторыми вариантами осуществления. Флуоресцентные белки с большей длиной волны, испускающие в оранжевой и красной областях спектра, были получены из морских анемонов, *Discosoma striata*, и рифовых кораллов, принадлежащих к классу **Anthozoa**. Было обнаружено, что и другие виды производят аналогичные белки с флуоресцентным излучением голубого, зеленого, желтого, оранжевого и темно-красного цвета.

В некоторых вариантах осуществления репортерный ген, который может быть пригоден для способов, трансгенных птиц, конструкций, клеток и наборов согласно изобретению, может представлять собой желтые флуоресцентные белки. Более конкретно, начало семейства желтых флуоресцентных белков было положено после того, как кристаллическая структура зеленого флуоресцентного белка показала, что остаток треонина 203 (**Thr203**) находится рядом с хромофором. Была введена мутация этого остатка в тирозин для стабилизации дипольного момента хромофора в возбужденном состоянии и привела к 20-ти нанометровому сдвигу в сторону больших длин волн для спектров как возбуждения, так и испускания. Дальнейшие усовершенствования привели к разработке улучшенного желтого флуоресцентного белка (**EYFP**), который является одним из самых ярких и широко используемых флуоресцентных белков.

Цитрин (**Citrine**), вариант желтого флуоресцентного белка, является очень ярким по сравнению с EYFP и может также быть пригоден для некоторых вариантов осуществления изобретения. Еще одно производное, названное Венера (**Venus**), является наиболее быстро созревающим и одним из самых ярких вариантов с желтой флуоресценцией, разработанных на сегодняшний день. Белок кораллового рифа, **ZsYellow1**, первоначально клонированный из вида *Zoanthus*, родом из Индийского и Тихого океанов, испускает излучение чистого желтого цвета и также пригоден для настоящего изобретения.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления репортерный ген, который может быть пригоден для способов, трансгенных птиц, конструкций, клеток и наборов согласно изобретению, может представлять собой синие флуоресцентные белки. Синий и голубой варианты зеленого флуоресцентного белка были получены в результате прямой модификации остатка тирозина в положении 66 (**Tyr66**) в нативном флуорофоре. Превращение этой аминокислоты в гистидин приводит к синему излучению, имеющему

максимумы при 450 нм, тогда как превращение в триптамин приводит к появлению основного пика флуоресценции при приблизительно 480 нм наряду с плечом, которое достигает пика при приблизительно 500 нм. Более конкретно, среди предложенных улучшенных голубых флуоресцентных белков наиболее перспективными являются **AmCyan1** и улучшенный голубой вариант под названием Лазурный (**Cerulean**). Полученный из кораллового рифа *Anemonia majano*, вариант флуоресцентного белка AmCyan1 также может быть пригоден для настоящего изобретения.

В некоторых конкретных вариантах осуществления репортерный ген, который может быть пригоден для способов, трансгенных птиц, конструкций, клеток и наборов согласно изобретению, может представлять собой красные флуоресцентные белки. Первый широко использованный флуоресцентный белок, полученный из кораллов, был получен из *Discosoma striata* и имеет общепринятое название **DsRed**. После полного созревания спектр флуоресцентного излучения DsRed имеет пик при 583 нм, тогда как спектр возбуждения имеет основной пик при 558 нм и небольшой пик приблизительно 500 нм. Кроме того, другие варианты, которые могут быть пригодны для настоящего изобретения, включают, не ограничиваясь перечисленным, **DsRed2**, **DsRed-Express** и **RedStar**. Несколько в высокой степени перспективных дополнительных красных флуоресцентных белков были выделены из рифовых коралловых организмов. Одним из этих белков, который может быть пригодным для настоящего изобретения, может быть **HcRed1**, выделенный из *Heteractis crispa* и в настоящее время коммерчески доступный. HcRed1 первоначально был получен из нефлуоресцентного хромопротеина, поглощающего красный свет посредством мутагенеза с образованием слабо флуоресцентного облигатного димера, имеющего максимум поглощения при 588 нм и максимум испускания при 618 нм.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления репортерный ген, который может быть пригоден для способов, трансгенных птиц, конструкций, клеток и наборов согласно изобретению, может представлять собой любой флуоресцентный белок, при условии, что такой белок не является GFP, и, в некоторых более конкретных вариантах осуществления, не является GFP дикого типа. Тем не менее, в некоторых вариантах осуществления для настоящего изобретения также могут быть пригодны некоторые мутанты и варианты GFP, образующие спектральные соединения с излучением красного цвета с максимумами возбуждения и испускания при 555 и 585 нм. В некоторых дополнительных конкретных вариантах осуществления такие мутанты или варианты могут содержать остатки серин 65 и/или аспарагин 68. В некоторых дополнительных вариантах осуществления такие мутанты или варианты GFP могут содержать мутацию по меньшей мере одного из F46L, V163A и

I167V. В некоторых дополнительных вариантах осуществления вариант может содержать любую комбинацию Ser65, Asn68, F46L, V163A и I167V.

Следует принимать во внимание, что в некоторых дополнительных вариантах осуществления репортерный ген, который может быть пригоден для способов, трансгенных птиц, конструкций, клеток и наборов согласно изобретению, может представлять собой любой из флуоресцентных белков, раскрытых в нижеприведенной **таблице 1**. В некоторых дополнительных вариантах осуществления репортерный ген, который может быть пригоден для способов, трансгенных птиц, конструкций, клеток и наборов согласно изобретению, может представлять собой любой из флуоресцентных белков, раскрытых в **таблице 1**, при условии, что указанный флуоресцентный белок не является GFP дикого типа. В некоторых других вариантах осуществления репортерный ген, который может быть пригоден для способов, трансгенных птиц, конструкций, клеток и наборов согласно изобретению, может представлять собой любой из флуоресцентных белков, раскрытых в **таблице 1**, при условии, что такой репортерный ген не является одним из **зеленых флуоресцентных белков**, раскрытых в таблице 1, более конкретно, одним из EGFP, Emerald, Superfolder GFP, Azami Green, mWasabi, TagGFP, TurboGFP, AcGFP, ZsGreen, T-Sapphire.

Таблица 1: флуоресцентные белки.

Белок (Аббревиатура)	Максимум Возбуждения (нм)	Максимум Испускания (нм)
GFP (дикий тип)	395/475	509
Зеленые флуоресцентные белки		
EGFP	484	507
Изумрудный (Emerald)	487	509
Суперсложенный GFP (Superfolder GFP)	485	510
Azami Green	492	505
mWasabi	493	509
TagGFP	482	505
TurboGFP	482	502
AcGFP	480	505
ZsGreen	493	505
T-Sapphire	399	511
Синие флуоресцентные белки		

EBFP	383	445
EBFP2	383	448
Azurite	384	450
mTagBFP	399	456
Голубые флуоресцентные белки		
ECFP	439	476
mECFP	433	475
Лазурный (Cerulean)	433	475
mTurquoise	434	474
CyPet	435	477
AmCyan1	458	489
Midori-Ishi Cyan	472	495
TagCFP	458	480
mTFP1 (бирюзовый)	462	492
Желтые флуоресцентные белки		
EYFP	514	527
Топаз (Topaz)	514	527
Венера (Venus)	515	528
mCitrine	516	529
YPet	517	530
TagYFP	508	524
Phi YFP	525	537
ZsYellow1	529	539
mBanana	540	553
Оранжевые флуоресцентные белки		
Kusabira Orange	548	559
Kusabira Orange2	551	565
mOrange	548	562
mOrange2	549	565
dTomato	554	581
dTomato-Tandem	554	581
TagRFP	555	584
TagRFP-T	555	584
DsRed	558	583
DsRed2	563	582
DsRed-Express (T1)	555	584
DsRed-Monomer	556	586
mTangerine	568	585
Красные флуоресцентные белки		

mRuby	558	605
mApple	568	592
mStrawberry	574	596
AsRed2	576	592
mRFP1	584	607
JRed	584	610
mCherry	587	610
HcRed1	588	618
mRaspberry	598	625
dKeima-Tandem	440	620
HcRed- Tandem	590	637
mPlum	590	649
AQ143	595	655

Как неожиданно показано в примерах 1 и 2, аутофлуоресцентные свойства яйца, обнаруженные в настоящем изобретении, позволяют обнаруживать только эмбрионы, несущие клетки, экспрессирующие RFP.

5

Таким образом, в более конкретных вариантах осуществления репортерный ген может представлять собой красный флуоресцентный белок (RFP). Термин «**красный флуоресцентный белок**» или «RFP» здесь и далее относится к флуоресцентному белку, испускающему флуоресцентное излучение в оранжевой, красной и дальней красной области спектра, который был выделен из коралловых полипов (кораллов) и анемонов, а также любым его вариантам. Существует два основных типа белков RFP – DsRed и Kaede. DsRed-подобные RFP получены из *Discosoma striata* и включают, не ограничиваясь перечисленным, mCherry, zFP538, mKO, mOrange, mRouge, E2-Crimson, mNeptune, TagRFP657, Keima, mKate, mStrawberry, mBanana, mHoneydew, niTangerine, mRaspberry, mPlum, mRFPmars и mRFPruby.

10

15

С другой стороны, Kaede является природным флуоресцентным белком, обнаруженным в каменистом коралле *Trachyphyllia geoffroyi*, который необратимо меняет длину волны своего излучения с зеленого (518 нм) на красное (582 нм) при облучении при приблизительно 400 нм. Члены семейства Kaede включают, например, EosFP, dendFP, mscavRFP и rfloRFP, обнаруженные соответственно в кораллах *Lobophyllia hemprichii*, *Dendronephthya*, *Monastrea cavernosa* и *Ricordea florida*.

20

Следует принимать во внимание, что любые из описанных здесь RFP, из любого источника, известного в данной области техники, могут быть пригодны для способов, трансгенных животных, клеток, наборов и устройств согласно изобретению.

25

В некоторых конкретных вариантах осуществления RFP, который может быть использован в способах согласно изобретению, может представлять собой RFP, используемый в pDsRed1-N1, который кодирует новый красный флуоресцентный белок [RFP; Matz, M. V., et al. (1999) *Nature Biotech.* 17:969–973], оптимизированный для высокой экспрессии в клетках млекопитающих (максимум возбуждения = 558 нм; максимум испускания = 583 нм). RFP был выделен из индо-тихоокеанского родственника морского анемона, *Discosoma* sp; кодирующая последовательность DsRed1 содержит 144 молчащих изменений пар нуклеотидов, соответствующих предпочтительному использованию человеческих кодонов для высокой экспрессии в клетках млекопитающих.

10 В некоторых вариантах осуществления RFP, используемый в способах и наборах согласно изобретению, может быть кодирован последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, обозначенную SEQ ID NO: 20. В некоторых дополнительных вариантах осуществления такой RFP может содержать аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO: 21, или любые ее гомологи, варианты, мутанты или производные.

В некоторых альтернативных конкретных вариантах осуществления RFP, используемый в изобретении, может представлять собой RFP, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, как раскрыто в GenBank: AF272711.1, имеющий аминокислотную последовательность, как раскрыто в GenBank: AAG16224.1. В некоторых дополнительных конкретных вариантах осуществления RFP, используемый в способах и наборах согласно изобретению, может быть кодирован последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, обозначенную SEQ ID NO: 22. В некоторых дополнительных вариантах осуществления такой RFP может содержать аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO: 23, или любые ее гомологи, мутанты или производные.

Следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления репортерный ген, используемый в способе согласно изобретению, может представлять собой любой флуоресцентный белок, при условии, что указанный флуоресцентный белок не является зеленым флуоресцентным белком (GFP). Другими словами, в некоторых конкретных вариантах осуществления репортерный ген, встроенный в половую хромосому трансгенного животного, получаемого способом согласно изобретению, может представлять собой любой флуоресцентный белок, при условии, что указанный флуоресцентный белок не является GFP.

Кроме того, в некоторых конкретных и частных вариантах осуществления, когда репортерным геном является RFP, следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления длины волн возбуждения RFP составляют приблизительно 500-650 нм, тогда как длины волн испускания могут составлять приблизительно 550-650 нм.

5

В некоторых других вариантах осуществления обнаружение обнаружимого сигнала способом согласно изобретению может дополнительно включать стадию воздействия на указанное яйцо подходящим источником света. В некоторых дополнительных вариантах осуществления воздействие на яйцо подходящим источником света включает длину волны от приблизительно 400 до приблизительно 650. В некоторых дополнительных вариантах осуществления может быть использован свет любой длины волны при условии, что указанный источник света не является ультрафиолетовым (УФ) излучением (длина волны 10-400 нм).

В отдельном конкретном варианте осуществления стадия воздействия на указанное яйцо источником света представляет собой возбуждение флуоресцентного белка. В некоторых частных вариантах осуществления длина волны возбуждения составляет от приблизительно 500 нм до приблизительно 650 нм. В некоторых дополнительных вариантах осуществления длина волны возбуждения составляет приблизительно 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640 нм.

В одном более конкретном варианте осуществления длина волны возбуждения может составлять от приблизительно 515 до приблизительно 555. В некоторых дополнительных вариантах осуществления длина волны может составлять 532 нм.

В отдельном конкретном и неограничивающем варианте осуществления источник света может быть обеспечен лазером.

В контексте настоящей заявки термин «лазер» относится к электромагнитному излучению любой частоты, которое усиливается за счет стимулированного испускаемого излучения. Лазер также относится к устройству, испускающему электромагнитное излучение в ходе процесса, называемого стимулированным испусканием. Лазерный свет обычно пространственно когерентен, что означает, что свет либо испускается в узком луче с малой расходимостью, либо может быть преобразован в такой луч с помощью оптических компонентов, таких как линзы.

30

В некоторых других вариантах осуществления лазер может представлять собой синий лазер или красный лазер. В более конкретных вариантах осуществления источник света представляет собой зеленый лазер.

В отдельных вариантах осуществления лазер может быть снабжен фильтром.

5

В контексте настоящей заявки термин «**фильтр**» относится к «светофильтру», который соответствует устройству, которое избирательно пропускает свет с различными длинами волн, обычно реализуемому в виде плоских стеклянных или пластиковых устройств на оптическом пути, которые либо окрашены во всем объеме, либо имеют интерференционные

10

покрытия. В некоторых вариантах осуществления фильтр может представлять собой зеленый фильтр, который пропускающий выше 500 нм, или темно-зеленый фильтр, пропускающий между 540 нм и 580 нм, или красный фильтр, пропускающий между 590 нм и 650 нм, или красный фильтр, пропускающий выше 650 нм или выше 660 нм.

15

В некоторых частных вариантах осуществления источник света может представлять собой зеленый лазер с длиной волны 532 нм. В некоторых дополнительных вариантах осуществления такой лазер может быть снабжен красным фильтром, пропускающим выше 650 нм.

20

Зародышевая линия цыпленка развивается из небольшой популяции примордиальных зародышевых клеток (ПЗК), мигрирующих в половой тяж из внегонадного участка, при этом проходя фазы активной миграции, а также пассивной циркуляции в кровотоке. ПЗК расположены в центре эпибласта свежеснесенного неинкубированного яйца – стадия

25 развития, называемая стадией X. В ходе инкубации ПЗК мигрируют в переднем направлении и накапливаются в зародышевом полумесяце эмбриона на стадии 10НН (примерно через 33-38 часов инкубации), считающимся основным сайтом для интравазации. Позже ПЗК могут быть обнаружены в кровотоке от стадии 12НН до 17НН (примерно через 45-64 часов инкубации), достигая пиковой концентрации на стадии 14НН

30 (примерно через 50-53 часов инкубации). ПЗК покидают кровотоки в месте, прилегающем к зачатку гонады в промежуточной мезодерме, где они могут быть обнаружены уже на стадии 15НН (через 55-55 часов инкубации). ПЗК достигают полового тяжа посредством активной миграции вдоль спинной брыжейки и заселяют обе гонады, где они позже дифференцируются в сперматогонию или оогонию.

35

Эмбрион расположен на вершине желточного мешка. Желток свободно вращается в яйце, и эмбрион всегда обращен к верхней стороне желтка. В ходе инкубации тупой конец яйца (где расположен воздушный мешок) обращен вверх, и яйца иногда поворачивают на 90°. По мере развития эмбриона образование внеэмбриональных тканей отдаляет эмбрион от яичной скорлупы, и эмбрион становится менее доступным.

Таким образом, в некоторых конкретных вариантах осуществления яйцо подвергают воздействию указанного источника света. В некоторых дополнительных вариантах осуществления яйцо помещают в положение, облегчающее воздействие источника света на эмбрион на любой стадии. В некоторых дополнительных вариантах осуществления область, содержащая верхнюю поверхность яичного желтка на стадии развития яйца X, возбуждается источником света.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления указанная стадия воздействия на указанное яйцо источником света обеспечивается системой, приспособлением или устройством, которое может содержать источник лазерного излучения, подставку для яйца, линзу, фильтр, подставку для детектора и детектор.

В контексте настоящей заявки термин «**детектор**» относится к любому типу устройства, которое обнаруживает и/или измеряет свет. В некоторых вариантах осуществления следует отметить, что обнаружимый сигнал, в частности, флуоресцентный сигнал, может быть обнаружен с использованием подходящих флуоресцентных средств. В некоторых вариантах осуществления обнаружимый сигнал, формируемый репортерным геном RFP, может быть обнаружен с помощью чувствительного к свету приспособления, такого как модифицированные оптические микроскопы или прибор с зарядовой связью (CCD), высокочувствительный фотонный детектор.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления способы согласно изобретению могут быть осуществлены с использованием любого устройства, приспособления или системы, снабженных по меньшей мере одним источником света, по меньшей мере одним детектором, по меньшей мере одним фильтром и по меньшей мере одним удерживающим устройством, устанавливающим яйцо в необходимом положении, облегчающем воздействие на клетки, экспрессирующие репортерный ген согласно изобретению, указанным источником света. В некоторых частных и неограничивающих вариантах осуществления в способе согласно изобретению может быть использовано устройство, показанное на фиг. 1. В некоторых дополнительных вариантах осуществления расстояние

между держателем для яйца и линзой и/или линзой и детектором может составлять приблизительно от 1 до 100 см, в частности, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 и 100 см, в частности, приблизительно от 5 до 25 см, более конкретно, приблизительно 20 см.

5 Следовательно, следует принимать во внимание, что в некоторых вариантах осуществления способы согласно изобретению могут дополнительно включать стадию обеспечения системы или устройства, например, как описано в настоящей заявке, приспособленного для определения наличия обнаружимого сигнала в исследуемом яйце. В частности, приспособления или устройства, содержащего источник лазерного излучения, подставку
10 для яйца, линзу, фильтр, подставку для детектора и детектор. Как указано выше, в некоторых вариантах осуществления для такого устройства может быть использован источник зеленого лазерного излучения, характеризующийся длиной волны возбуждения приблизительно 532 нм. В некоторых дополнительных вариантах осуществления может быть использован фильтр, в частности, красный фильтр, пропускающий выше 650 нм.

15 В других дополнительных вариантах осуществления по меньшей мере одна трансгенная птица или животное, получаемые способом согласно изобретению, могут представлять собой самку птицы или животного. В более конкретных вариантах осуществления, где по меньшей мере один репортерный ген встроен по меньшей мере в одно положение женской Z-хромосомы, обнаружение обнаружимого сигнала свидетельствует о том, что эмбрион в
20 невыведенном яйце является самцом. Более конкретно, эмбрион, содержащий отцовскую немеченую половую Z-хромосому и, кроме того, содержащий материнскую меченую Z-хромосому, содержит две Z-хромосомы и, следовательно, является самцом.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления по меньшей мере одна трансгенная птица или животное, получаемые способами согласно изобретению, могут представлять
25 собой самку птицы или животного. В некоторых конкретных вариантах осуществления, где по меньшей мере один репортерный ген встроен по меньшей мере в одно положение женской W-хромосомы, обнаружение обнаружимого сигнала свидетельствует о том, что эмбрион в невыведенном яйце представляет собой самку. Более конкретно, эмбрион, содержащий родительскую немеченую z-хромосому и меченую материнскую W-
30 хромосому, представляет собой гетерогаметный эмбрион, содержащий WZ-хромосомы, который является самкой.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления трансгенное животное, получаемые способами согласно изобретению, может представлять собой самца, в Z-хромосомы которого встроен репортерный ген. В таком случае обнаружимый сигнал,
35 определяемый в яйце, оплодотворенном таким трансгенным самцом или его спермой,

свидетельствует о том, что эмбрион несет отцовскую Z-хромосому, содержащую трансгенный репортерный ген, и, следовательно, является самцом. В других дополнительных вариантах осуществления обнаружение обнаружимого сигнала в яйце, снесенном трансгенной самкой птицы, оплодотворенной трансгенным самцом птицы, оба из которых несут репортерный ген согласно изобретению, встроенный в их Z-хромосомы, может свидетельствовать, в случае интенсивного сигнала, о том, что эмбрион несет две копии репортерного гена, встроенного в его женские и мужские Z-хромосомы. В случае менее интенсивного сигнала, например, сигнала со сниженной интенсивностью, равной приблизительно 50%, яйцо может быть определено как самка.

10 Как указано выше в настоящей заявке, способ согласно изобретению включает обеспечение трансгенных птиц. Получение трансгенных птиц требует использования подхода генной инженерии, в котором может быть задействовано определенное соединение или компонент для редактирования генома. Неограничивающие примеры компонентов для редактирования генома могут включать, в некоторых вариантах осуществления, применение нуклеаз.

В некоторых конкретных вариантах осуществления нуклеазы, подходящие для применения в способах согласно изобретению, могут представлять собой РНК-управляемые ДНК-связывающие белковые нуклеазы.

В контексте настоящей заявки **РНК-управляемая ДНК-связывающая белковая нуклеаза** представляет собой нуклеазу, которую направляет к ее сайту расщепления (или, в качестве альтернативы, к сайту для любой другой альтернативной активности) молекула РНК. Эта молекула РНК называется гидовой РНК.

Таким образом, в еще более конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген может быть встроен в половую хромосому трансгенной птицы или животного, получаемых способом согласно изобретению, с использованием по меньшей мере одной программируемой сконструированной нуклеазы (PEN). Термин «**программируемые сконструированные нуклеазы (PEN)**» в контексте настоящей заявки относится к синтетическим ферментам, разрезающим определенные последовательности ДНК, полученным из встречающихся в природе нуклеаз, участвующих в репарации двухцепочечных повреждений ДНК и позволяющих осуществлять прямое редактирование генома.

В некоторых более конкретных вариантах осуществления PEN, используемая в способах согласно изобретению, может представлять собой любую из системы кластерных регулярно перемежающихся коротких палиндромных повторов (CRISPR) 2 класса или 1 класса.

В частности, система кластерных регулярных кластерных регулярно перемежающихся коротких палиндромных повторов (CRISPR) II типа представляет собой бактериальную иммунную систему, модифицированную для конструирования генома.

Однако следует принимать во внимание, что для настоящего изобретения также могут быть пригодны другие подходы к конструированию генома, такие как нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN) или эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), которые основаны на использовании настраиваемых ДНК-связывающих белковых нуклеаз, требующих конструирования и получения пар со специфичными нуклеазами для каждой мишени в геноме.

10 **Системы CRISPR-Cas делятся на два класса.** В системах 1 класса используется комплекс из нескольких белков Cas для уничтожения чужеродных нуклеиновых кислот. В системах 2 класса используется один большой белок Cas для той же цели. Более конкретно, 1 класс можно разделить на типы I, III и IV, а 2 класс можно разделить на типы II, V и VI.

15 В контексте настоящей заявки массивы CRISPR, также известные как SPIDR (перемежающиеся спейсерами прямые повторы), составляют семейство недавно описанных локусов ДНК, которые обычно специфичны к конкретному виду бактерий. Массив CRISPR представляет собой отдельный класс перемежающихся коротких повторяющихся последовательностей (SSR), которые впервые были обнаружены в *E. coli*. В последующие
20 годы подобные массивы CRISPR были обнаружены у *Mycobacterium tuberculosis*, *Haloferax mediterranei*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Thermotoga maritima* и других бактерий и архей. Следует понимать, что изобретение предусматривает использование любой из известных систем CRISPR, в частности, и систем CRISPR, раскрытых в настоящей заявке. Система CRISPR-Cas развилась у прокариот для защиты от фаговой атаки и нежелательной
25 репликации плазмид путем нацеливания на чужеродную ДНК или РНК. Система CRISPR-Cas нацелена на молекулы ДНК на основе коротких гомологичных последовательностей ДНК, называемых спейсерами, существующих между повторами. Эти спейсеры направляют CRISPR-ассоциированные (Cas) белки на совпадающие (и/или комплементарные) последовательности в чужеродной ДНК, называемые протоспейсерами,
30 которые затем расщепляются. Спейсеры могут быть сконструированы целесообразным образом для нацеливания на любую последовательность ДНК. Кроме того, этот элемент распознавания может быть отдельно сконструирован для распознавания и нацеливания на любую желаемую мишень. Что касается систем CRISPR, как будет понятно специалистам в данной области техники, структура встречающегося в природе локуса CRISPR включает
35 ряд коротких повторяющихся последовательностей, обычно называемых «повторами».

Повторы встречаются в кластерах и обычно регулярным образом перемежаются уникальными промежуточными последовательностями, называемыми «спейсерами». Как правило, повторы CRISPR имеют длину от 24 до 47 пар нуклеотидов (п. н.) и являются частично палиндромными. Спейсеры расположены между двумя повторами, и обычно

5 каждый спейсер имеет уникальные последовательности длиной приблизительно от 20 или менее до 72 или более п. н. Таким образом, в отдельных вариантах осуществления спейсеры CRISPR, используемые в последовательности, кодирующей по меньшей мере одну гРНК в способах и наборах согласно изобретению, могут содержать от 10 до 75 нуклеотидов (нт)

10 каждый. Более конкретно, приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 или более. В некоторых конкретных вариантах осуществления спейсеры содержат приблизительно от 20 до 25 нуклеотидов, более конкретно, приблизительно 20 нуклеиновых оснований.

15 Помимо по меньшей мере одного повтора и по меньшей мере одного спейсера locus CRISPR также включает лидерную последовательность и, необязательно, последовательность, кодирующую по меньшей мере одну тракрРНК. Лидерная последовательность обычно представляет собой АТ-богатую последовательность длиной до 550 п.н., непосредственно примыкающую к 5'-концу первого повтора.

20 В отдельном конкретном варианте осуществления PEN, используемая в способах согласно изобретению, может представлять собой систему CRISPR 2 класса. В некоторых дополнительных частных вариантах осуществления такая система класса 2 может представлять собой систему CRISPR II типа.

Более конкретно, определены три основных типа системы CRISPR–Cas: I тип, II тип и III

25 тип.

Системы CRISPR–Cas II типа включают систему типа «HNH» (стрептококко-подобную; также известную как подтип Nmen1, что расшифровывается как штамм Z2491 *Neisseria meningitidis* серологической группы A или CASS4), в которой Cas9, одного очень крупного белка, по-видимому, достаточно для генерации крРНК и расщепления ДНК-мишени в

30 дополнение к общераспространенным Cas1 и Cas2. Cas9 содержит по меньшей мере два нуклеазных домена, RuvC-подобный нуклеазный домен вблизи аминоконца и HNH (или MscA-подобный) нуклеазный домен в середине белка, но функцию этих доменов еще предстоит выяснить. Однако, нуклеазный домен HNH широко распространен в ферментах рестрикции и обладает эндонуклеазной активностью, ответственной за расщепление

35 мишени.

Системы II типа расщепляют пре-крРНК по необычному механизму, включающему образование дуплекса между тракрРНК и частью повтора в пре-крРНК; первое расщепление в пути процессинга пре-крРНК затем происходит в этой области повтора. Кроме того, следует отметить, что система II типа содержит по меньшей мере один из генов *cas9*, *cas1*, *cas2* *csn2* и *cas4*. Следует принимать во внимание, что любые системы CRISPR-Cas II типа могут быть пригодны для настоящего изобретения, в частности, любая из систем типа II-A или B.

Таким образом, в некоторых дополнительных и альтернативных вариантах осуществления по меньшей мере один ген *cas*, используемый в способах и наборах согласно изобретению, может представлять собой по меньшей мере один ген *cas* системы CRISPR II типа (либо типа II-A, либо типа II-B). В частных вариантах осуществления по меньшей мере один ген *cas* системы CRISPR II типа, используемый в способах и наборах согласно изобретению, может представлять собой ген *cas9*. Следует принимать во внимание, что такая система может дополнительно содержать по меньшей мере один из генов *cas1*, *cas2*, *csn2* и *cas4*.

Расщепление двухцепочечной ДНК (дцДНК) с помощью Cas9 является отличительной чертой иммунных систем «*CRISPR-Cas II muna*». CRISPR-ассоциированный белок Cas9 представляет собой РНК-управляемую ДНК-эндонуклеазу, использующую комплементарность РНК:ДНК для идентификации сайтов-мишеней для сиквенс-специфичного расщепления двухцепочечной ДНК (дцДНК), создавая двухцепочечные разрывы (DSB), необходимые для HDR, что приводит к встраиванию репортерного гена в определенную последовательность-мишень, например, определенную мишень на птичьих половых W- и Z-хромосомах. Последовательности ДНК-мишени определяются массивом CRISPR, который представляет собой серию спейсеров из приблизительно 30-40 п. н., разделенных короткими палиндромными повторами. Массив транскрибируется в виде пре-крРНК и подвергается процессингу в более короткие крРНК, которые связываются с комплексом белков Cas для нацеливания на комплементарные последовательности ДНК, известные как протоспейсеры. Эти протоспейсерные мишени также должны иметь дополнительную соседнюю последовательность, известную как мотив, прилежащий к протоспейсеру (PAM), необходимый для распознавания мишени. После связывания комплекс белков Cas служит в качестве ДНК-эндонуклеазы для разрезания обеих цепей в месте-мишени, и последующее расщепление ДНК происходит благодаря экзонуклеазной активности.

Система CRISPR II типа, используемая в настоящей заявке, требует включения двух обязательных компонентов: «гидовой» РНК (гРНК) и неспецифичной CRISPR-

ассоциированной эндонуклеазы (Cas9). гРНК представляет собой короткую синтетическую РНК, состоящую из последовательности «каркаса», необходимой для связывания Cas9, и «спейсера» или «нацеливающей» последовательности длиной приблизительно 20 нуклеотидов, определяющей мишень в геноме, подлежащую модификации. Таким образом, можно изменить мишень для Cas9 в геноме, просто изменив нацеливающую последовательность, присутствующую в гРНК. Гидовая РНК (гРНК) в контексте настоящей заявки относится к синтетическому слиянию эндогенной бактериальной крРНК и тракрРНК, обеспечивающего как направленную специфичность, так и каркас/способность связывания с нуклеазой Cas9. Также называется «единой гидовой РНК» или «егРНК».

CRISPR первоначально использовались для «нокаута» генов-мишеней в различных типах клеток и организмах, но модификации фермента Cas9 расширили применение CRISPR до «нокина» генов-мишеней, избирательной активации или подавления генов-мишеней, очистки определенных областей ДНК и даже визуализации ДНК в живых клетках с помощью флуоресцентной микроскопии. Кроме того, простота получения гРНК делает CRISPR одной из наиболее масштабируемых технологий редактирования генома, и недавно она была использована для полногеномного скрининга.

Мишень в геноме, подлежащем редактированию, в частности, конкретные локусы-мишени на половых Z- или W-хромосомах, куда должен быть встроен репортерный ген согласно изобретению, должна присутствовать непосредственно перед мотивом, прилежащим к протоспейсеру (PAM).

Последовательность PAM абсолютно необходима для связывания с мишенью, и точная последовательность зависит от вида Cas9 (5' NGG 3' для Cas9 *Streptococcus pyogenes*). В отдельных вариантах осуществления в способах и наборах согласно изобретению используют Cas9 из *S. pyogenes*. Тем не менее, следует принимать во внимание, что может быть пригоден любой известный Cas9. Неограничивающие примеры Cas9, пригодных для настоящего изобретения, включают, не ограничиваясь перечисленным, *Streptococcus pyogenes* (SP), также обозначаемый в настоящей заявке как SpCas9, *Staphylococcus aureus* (SA), также обозначаемый в настоящей заявке как SaCas9, *Neisseria meningitidis* (NM), также обозначаемый в настоящей заявке как NmCas9, *Streptococcus thermophilus* (ST), также обозначаемый в настоящей заявке как StCas9, и *Treponema denticola* (TD), также обозначаемый в настоящей заявке как TdCas9. В некоторых конкретных вариантах осуществления Cas9 *Streptococcus pyogenes* M1 GAS, в частности, Cas9 с идентификационным номером белка AAK33936.1, может быть пригоден для способов и наборов согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты, обозначенной SEQ ID NO: 24. В

дополнительных конкретных и неограничивающих вариантах осуществления белок Cas9 может содержать аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO: 25, или любые ее производные, мутанты или варианты. После экспрессии белок Cas9 и гРНК образуют рибопротеиновый комплекс посредством взаимодействий между «каркасным» доменом гРНК и расположенными на поверхности положительно заряженными бороздками на Cas9. Cas9 претерпевает изменение конформации при связывании гРНК, которое меняет конформацию молекулы из неактивной не связывающей ДНК конформации в активную ДНК-связывающую конформацию. Важно, что «спейсерная» последовательность гРНК остается свободной для взаимодействия с ДНК-мишенью.

5 Комплекс Cas9-гРНК связывает любую геномную последовательность с PAM, но степень, в которой спейсер гРНК соответствует ДНК-мишени, определяет, будет ли Cas9 осуществлять разрез. Как только комплекс Cas9-гРНК связывает потенциальную ДНК-мишень, «якорная» последовательность на 3'-конце нацеливающей последовательности гРНК начинает гибридизоваться с ДНК-мишенью. Если якорная последовательность и

10 последовательность ДНК-мишени совпадают, гРНК продолжает гибридизоваться с ДНК-мишенью в 3'-5'-направлении.

Cas9 будет расщеплять мишень только в том случае, если существует достаточная гомология между спейсером гРНК и последовательностями-мишенями. Кроме того, нуклеаза Cas9 имеет два функциональных эндонуклеазных домена: RuvC и HNH. Cas9 претерпевает второе изменение конформации при связывании мишени, которое перемещает нуклеазные домены в положение для расщепления противоположных цепей ДНК-мишени. Конечным результатом Cas9-опосредованного расщепления ДНК является двухцепочечный разрыв (DSB) в ДНК-мишени, который происходит примерно на 3-4

20 нуклеотида выше последовательности PAM.

Полученный DSB может затем быть репарирован по одному двух общих путей репарации: эффективному, но подверженному ошибкам пути негомولوجичного соединения концов (NHEJ) и менее эффективному, но высокоточному пути направляемой гомологией репарации (HDR). В некоторых вариантах осуществления вставка, которая приводит к

30 специфичному встраиванию репортерного гена согласно изобретению в конкретные локусы-мишени на половых W- или Z-хромосомах, является результатом репарации DSB, вызванных Cas9. В некоторых конкретных вариантах осуществления репортерный ген согласно изобретению встроен или осуществлен его нокин в локусах-мишенях с помощью HDR.

Термин «**направляемая гомологией репарация (HDR)**» в контексте настоящей заявки относится к клеточному механизму репарации двухцепочечных повреждений ДНК. Наиболее распространенной формой HDR является гомологичная рекомбинация. Механизм репарации HDR может быть использован клеткой только в том случае, если в ядре присутствует гомологичный фрагмент ДНК, в основном в G2- и S-фазе клеточного цикла. Когда фрагмент гомологичной ДНК отсутствует, взамен может протекать другой процесс, называемый негомологичным соединением концов (NHEJ). Принципы редактирования генома с помощью программируемых сконструированных нуклеаз (PEN) основаны на активации в клетке механизма HDR после специфичного двухцепочечного расщепления ДНК.

Как обсуждается выше, Cas9 создает двухцепочечные разрывы (DSB) посредством объединенной активности двух нуклеазных доменов, RuvC и HNH. Известны точные аминокислотные остатки в каждом нуклеазном домене, которые являются определяющими для эндонуклеазной активности (D10A для HNH и H840A для RuvC в Cas9 *S. pyogenes*), и были созданы модифицированные версии фермента Cas9, содержащие только один активный каталитический домен (называемые «Cas9-никаза»). Cas9-никазы по-прежнему связываются с ДНК на основе специфичности гРНК, но никазы способны разрезать только одну из цепей ДНК, что приводит к «нику» или одноцепочечному разрыву вместо DSB. «Ники» ДНК быстро репарируются посредством HDR (направляемой гомологией репарации) с использованием интактной комплементарной цепи ДНК в качестве матрицы. Таким образом, для создания DSB в ДНК-мишени необходимы две никазы, нацеленные на противоположные цепи (часто называемые системой CRISPR «двойной ник» или «двойная никаза»). Это требование значительно повышает специфичность к мишени, так как маловероятно, что два нецелевых «ника» будут созданы достаточно близко друг к другу, чтобы вызвать DSB. Следовательно, следует понимать, что изобретение дополнительно охватывает применение подхода двойной никазы для создания вызванного двойным «ником» DSB для повышения специфичности и уменьшения нецелевых эффектов.

Таким образом, в отдельных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген может быть встроен в половую хромосому трансгенной птицы, в частности, животного, путем направляемой гомологией репарации (HDR), опосредованной по меньшей мере одной системой CRISPR/CRISPR-ассоциированная эндонуклеаза 9 (Cas9).

Как указано выше, система CRISPR II типа содержит по меньшей мере два элемента: нуклеазу, в частности, Cas9, и гидовую РНК. Следовательно, для включения и встраивания репортерного гена, используемого в изобретении, в половые хромосомы трансгенной птицы, помимо Cas9 или любой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей Cas9, в изобретении дополнительно предложена гидовая РНК или любая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая такую гРНК, нацеливающую Cas9 на сайт-мишень на определенной половой хромосоме. В некоторых дополнительных вариантах осуществления гРНК из набора согласно изобретению может содержать по меньшей мере одну РНК CRISPR (крРНК) и по меньшей мере одну транс-активирующую крРНК (тракрРНК).

В некоторых альтернативных вариантах осуществления набор согласно изобретению может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере одну гРНК. Такая последовательность нуклеиновой кислоты может содержать массив CRISPR, содержащий по меньшей мере одну спейсерную последовательность, которая нацелена на и, следовательно, идентична по меньшей мере одному протоспейсеру в последовательности геномной ДНК-мишени. Следует отметить, что последовательность нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность, кодирующую по меньшей мере одну тракрРНК.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген может быть встроен в половую хромосому трансгенной птицы, в частности, животного, путем приведения в контакт или совместной трансфекции по меньшей мере одной клетки птицы или животного, или по меньшей мере одной клетки, введенной птице или животному, с: (a) элементами системы CRISPR Cas9, в частности, по меньшей мере одним белком Cas9 или по меньшей мере одной первой последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный по меньшей мере один белок Cas9; и по меньшей мере одной гидовой РНК (гРНК), нацеленной на протоспейсер на половой Z- или W-хромосоме, или по меньшей мере одной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей указанную по меньшей мере одну гРНК; и (b) по меньшей мере одной второй последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере один репортерный ген. Следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления, в случае, если элементы системы CRISPR Cas9 (a) представлены в форме последовательности нуклеиновой кислоты, они могут быть представлены либо в одной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей

разные элементы (называемой в настоящей заявке «первой последовательностью нуклеиновой кислоты»), либо в двух или более молекулах нуклеиновой кислоты, каждая из которых содержит один из элементов, указанных выше, в частности, последовательности, кодирующие гРНК и Cas9.

5 Таким образом, для получения трансгенной птицы, используемой в способах согласно изобретению, должны быть обеспечены по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты.

Кроме того, «**гРНК**» или «**нацеливающая РНК**» представляет собой РНК, которая при транскрипции с части кодирующей ее системы CRISPR содержит по меньшей мере один сегмент последовательности РНК, идентичный (за исключением замены Т на U в случае РНК) или комплементарный (и, следовательно, «нацеленный на») последовательности ДНК в геномной ДНК-мишени, называемой в настоящей заявке протоспейсером. Системы CRISPR согласно настоящему изобретению могут необязательно кодировать более одной нацеливающей РНК, и нацеливающие РНК должны быть направлены на одну или более последовательностей-мишеней в геномной ДНК. Термин «**протоспейсер**» в контексте настоящей заявки относится к последовательности-мишени на хромосоме-мишени. Такие протоспейсеры содержат последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую достаточную комплементарность нацеливающей РНК, кодируемой спейсерами CRISPR, содержащимися в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей гРНК в способах и наборах согласно изобретению.

Способы согласно изобретению, а также наборы, описанные далее в настоящей заявке, обеспечивают последовательности нуклеиновых кислот. В контексте настоящей заявки «**нуклеиновые кислоты или молекулы нуклеиновых кислот**» являются взаимозаменяемыми с термином «**полинуклеотид(ы)**» и обычно относятся к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК, или модифицированную РНК или ДНК, или любую их комбинацию. «Нуклеиновые кислоты» включают, не ограничиваясь перечисленным, одноцепочечные и двухцепочечные нуклеиновые кислоты. В контексте настоящей заявки термин «нуклеиновая(ые) кислота(ы)» также включает ДНК или РНК, как описано выше, содержащие одно или более модифицированных оснований. В контексте настоящей заявки термин «**олигонуклеотид**» определен как молекула, состоящая из двух или более дезоксирибонуклеотидов и/или рибонуклеотидов, предпочтительно из более чем трех. Ее точный размер будет зависеть от многих факторов, которые, в свою очередь, зависят от

конечной функции и применения олигонуклеотида. Олигонуклеотиды могут иметь длину от приблизительно 8 до приблизительно 1000 нуклеотидов. Более конкретно, молекула(ы) олигонуклеотида, используемая в наборе согласно изобретению, может иметь длину 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более оснований.

Молекулы нуклеиновых кислот могут состоять из мономеров, которые представляют собой встречающиеся в природе нуклеотиды (такие как ДНК и РНК) или аналоги встречающихся в природе нуклеотидов (например, альфа-энантиомерные формы встречающихся в природе нуклеотидов), или модифицированные нуклеотиды, или любую их комбинацию. В настоящей заявке данный термин также охватывает кДНК, то есть, комплементарную ДНК или ДНК-копию, получаемую на матрице РНК под действием обратной транскриптазы (РНК-зависимой ДНК-полимеразы).

В этой связи «**выделенный полинуклеотид**» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, отделенную от генома организма. Например, молекула ДНК, кодирующая репортерный ген, используемый в способах и наборах согласно изобретению, или любые ее производные или гомологи, а также последовательности, кодирующие CRISPR/Cas9 и гРНК в способах и наборах согласно изобретению, которые были отделены от геномной ДНК клетки, представляют собой выделенную молекулу ДНК. Еще одним примером выделенной молекулы нуклеиновой кислоты является химически синтезированная молекула нуклеиновой кислоты, которая не встроена в геном организма. Молекула нуклеиновой кислоты, которая была выделена из определенного вида, меньше полной молекулы ДНК хромосомы этого вида.

В некоторых вариантах осуществления последовательности нуклеиновых кислот, используемые в способах и наборах (описанных ниже в настоящей заявке) согласно изобретению, в частности, последовательности нуклеиновых кислот, содержащие последовательности, кодирующие Cas9 и гРНК, или, в качестве альтернативы, репортерный ген согласно изобретению, могут быть предложены в виде конструкции в векторе, кассете или любом другом носителе. Таким образом, изобретение, кроме того, относится к рекомбинантным ДНК-конструкциям, содержащим полинуклеотиды согласно изобретению и, необязательно, другие дополнительные элементы, такие как промоторы, регуляторные и контрольные элементы, сигналы трансляции, экспрессии и другие сигналы, функционально связанные с последовательностью нуклеиновой кислоты согласно

изобретению. Неограничивающим примером вектора, предложенного согласно изобретению, может быть любой вектор, содержащий последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие Cas9 и определенную гРНК, необходимую для встраивания репортерного гена в половую хромосому-мишень. В некоторых конкретных вариантах осуществления изобретение относится к ДНК-конструкциям или ДНК-векторам, содержащим последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие Cas9, обозначенный SEQ ID NO: 25, и гРНК7, обозначенную SEQ ID NO: 26, которая нацеливает репортерный ген на половую Z-хромосому. В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретение дополнительно относится к вектору или любой ДНК-конструкции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей репортерный ген согласно изобретению, в частности, RFP, фланкированную левым и правым плечами, необходимыми для рекомбинации и встраивания в локус-мишень на половой хромосоме, в частности, половой Z-хромосоме. Неограничивающим примером такого вектора может быть вектор, содержащий последовательности нуклеиновых кислот, как показано на фиг. 15. В некоторых дополнительных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 66 и/или SEQ ID NO: 67. Кроме того, изобретение дополнительно охватывает любую клетку-хозяина, содержащую и/или экспрессирующую векторы и ДНК-конструкции согласно изобретению, в частности, любой из векторов, описанных в изобретении.

В контексте настоящей заявки термины «**рекомбинантная ДНК**», «**последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты**» или «**рекомбинантный ген**» относятся к нуклеиновой кислоте, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую одну из систем CRISPR согласно изобретению, в частности, CRISPR/Cas9 II типа, вместе с гРНК согласно изобретению, нацеливающей Cas9 на соответствующий протоспейсер в определенном локусе на птичьих Z- и/или W-хромосомах. В некоторых других вариантах осуществления рекомбинантная ДНК, используемая в настоящем изобретении, дополнительно относится к нуклеиновой кислоте, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую репортерный ген согласно изобретению, в частности, трансген.

В контексте настоящей заявки под термином «**ген**» или «**трансген**» подразумевается нуклеиновая кислота, встречающаяся в природе или синтетическая, кодирующая белковый продукт. Термин «нуклеиновая кислота» предназначен для обозначения природных и/или синтетических линейных, кольцевых и последовательных массивов нуклеотидов и

нуклеозидов, например кДНК, геномной ДНК (гДНК), мРНК и РНК, олигонуклеотидов, олигонуклеозидов и их производных.

Фраза «**функционально связанный**» предназначена для обозначения присоединения таким образом, что допускается транскрипция трансгена. Как отмечено выше, трансген, используемый в способе согласно изобретению, получают путем обеспечения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей трансген, подлежащий включению в половые Z- или W-хромосомы, в частности, репортерный ген, и системы редактирования генома (например, системы CRISP/Cas9). Термин «**кодирование**» предназначен для обозначения того, что рассматриваемая нуклеиновая кислота может транскрибироваться и транслироваться либо в желаемый полипептид, либо в рассматриваемый белок в подходящей системе экспрессии, например, когда рассматриваемая нуклеиновая кислота связана с подходящими контрольными последовательностями, такими как промоторные и энхансерные элементы, в подходящем векторе (например, в векторе экспрессии), и когда вектор вводят в подходящую систему или клетку.

Следует принимать во внимание, что в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из первой и второй последовательностей нуклеиновой кислоты, предложенных и используемых в способах и наборах согласно изобретению, может присутствовать в виде конструкции и содержаться в векторе. «**Векторы**» или «**носители**» в контексте настоящей заявки охватывают векторы, такие как плазмиды, фагемиды, вирусы, встраиваемые фрагменты ДНК и другие носители, которые обеспечивают встраивание фрагментов ДНК в геном хозяина или, в качестве альтернативы, обеспечивают экспрессию невстраиваемых генетических элементов. Векторы обычно представляют собой самореплицирующиеся ДНК- или РНК-конструкции, содержащие желаемые последовательности нуклеиновых кислот и функционально связанные генетические контрольные элементы, которые распознаются в подходящей клетке-хозяине и осуществляют трансляцию желаемых спейсеров. Как правило, генетические контрольные элементы могут включать систему прокариотического промотора или систему эукариотического промотора для контроля экспрессии. Такая система обычно включает промотор транскрипции, энхансеры транскрипции для повышения уровня экспрессии РНК. Векторы обычно содержат точку начала репликации, позволяющую вектору реплицироваться независимо от клетки-хозяина. В некоторых альтернативных вариантах осуществления векторы экспрессии, используемые в изобретении, могут содержать элементы, необходимые для встраивания желаемого

репортерного гена согласно изобретению в птичьих полоспецифичные W- и/или Z-хромосомы.

Соответственно, термин «**контрольные и регуляторные элементы**» включает промоторы, терминаторы и другие элементы контроля экспрессии. Такие регуляторные элементы описаны в источнике Goeddel; [Goeddel., et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)]. Например, любая из широкого ряда последовательностей контроля экспрессии, которые контролируют экспрессию последовательности ДНК, будучи функционально с ней связанными, может быть использована в этих векторах для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих любой желаемый белок, с использованием способа согласно данному изобретению.

Вектор может дополнительно включать подходящие сайты рестрикции, устойчивость к антибиотикам или другие маркеры для отбора клеток, содержащих вектор. Плазмиды являются наиболее часто используемой формой вектора, но для настоящего изобретения пригодны и другие формы векторов, которые выполняют эквивалентную функцию и известны или становятся известными в данной области техники. См., например, источники Pouwels et al., Cloning Vectors: a Laboratory Manual (1985 и приложения), Elsevier, N.Y.; и Rodriguez, et al. (eds.) Vectors: a Survey of Molecular Cloning Vectors and their Uses, Butterworth, Boston, Mass (1988), включенные в настоящую заявку посредством ссылки.

Для создания трансгенной птицы, используемой в способах согласно изобретению, необходимо получить птичью клетку, содержащую репортерный ген, встроенный в определенные локусы на ее половой Z- или W-хромосоме. Такая клетка может быть получена в некоторых вариантах осуществления путем приведения в контакт, введения или совместной трансфекции птичьей клетки или любой клетки, введенной указанной птице, с первой и второй последовательностями нуклеиновой кислоты, предложенными в способах и наборах согласно изобретению, или с любой содержащей их конструкцией, вектором, носителем. В некоторых вариантах осуществления последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие элементы редактирования генома, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие желаемый репортерный ген, в частности, RFP. «**Трансфекция**» в контексте настоящей заявки означает процесс вставки генетического материала, такого как ДНК и двухцепочечная РНК, в клетки млекопитающих. Введение ДНК в клетку дает возможность осуществления экспрессии или продукции белков с использованием собственных механизмов клетки. Таким образом, совместная трансфекция в контексте настоящей заявки относится к одновременной трансфекции по меньшей мере

двух разных молекул нуклеиновой кислоты или любого содержащего их вектора в каждую отдельную клетку. Кроме того, последовательности нуклеиновой кислоты, подлежащие трансфекции, могут быть временно экспрессированы в течение короткого периода времени или могут быть включены в геномную ДНК, где изменение передается от клетки к клетке при ее делении.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способам *in ovo* определения пола птичьего эмбриона *in ovo* на основе экспрессии репортерного гена, в частности, красного флуоресцентного белка (RFP), встроенного в его половую(ые) хромосому(ы) (в частности, Z- и/или W-). «Экспрессия» в общем относится к процессу, посредством которого закодированная в генах информация преобразуется в структуры, присутствующие и функционирующие в клетке. Следовательно, согласно изобретению «экспрессия» репортерного гена, в частности, может относиться к транскрипции в полинуклеотид, трансляции в белок или даже к посттрансляционной модификации белка.

Вставка и специфичное встраивание репортерного гена в конкретный локус-мишень на половых хромосомах трансгенной птицы может включать, в некоторых вариантах осуществления, обеспечение системы CRISPR/Cas9, включающей определенную гРНК и последовательность нуклеиновой кислоты репортерного гена, подлежащего встраиванию. Чтобы облегчить и обеспечить встраивание, в некоторых вариантах осуществления репортерный ген должен быть фланкирован, в некоторых вариантах осуществления, последовательностями, которые могут быть гомологичны последовательностям, фланкирующим сайт-мишень для встраивания, и тем самым обеспечить рекомбинацию. Таким образом, в некоторых дополнительных конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген во второй последовательности нуклеиновой кислоты может быть фланкирован гомологичными плечами с его 5'- и 3'-конца. Следует принимать во внимание, что в некоторых вариантах осуществления эти плечи необходимы и, следовательно, облегчают HDR репортерного гена в сайте встраивания.

В более конкретных вариантах осуществления репортерный ген во второй последовательности нуклеиновой кислоты, используемой в способе согласно изобретению, может быть фланкирован двумя плечами, гомологичными или демонстрирующими приблизительно 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% гомологию или идентичность всей, целой или полной по меньшей мере одной

последовательности нуклеиновой кислоты, содержащейся в локусах-мишенях на половых Z- или W-хромосомах, служащей сайтом встраивания, для облегчения специфического встраивания посредством HDR. В отдельных вариантах осуществления последовательность-мишень также называется в настоящей заявке по меньшей мере одним «протоспейсером», распознаваемым «спейсерными» последовательностями, которые являются частью гРНК, используемой в изобретении, и обеспечиваемой первой последовательностью нуклеиновой кислоты.

Термин «**гомологичные плечи**» в контексте настоящей заявки относится к матрицам для HDR, вводимым в определенные векторы или вирусы, используемые для создания определенных мутаций или вставки новых элементов в ген, которые обладают определенной степенью гомологии окружению последовательности-мишени, подлежащей модификации (в зависимости от того, какая РЕН используется). В некоторых дополнительных конкретных вариантах осуществления, где в качестве РЕН используют CRISPR, последовательности плеч (левого, вышележащего, и правого, нижележащего) могут содержать приблизительно от 10 до 5000 п. н., в частности, приблизительно от 50 до 1000 п. н., от 100 до 500, в частности, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 п. н.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления нацеливающая последовательность в гРНК, кодируемой первой последовательностью нуклеиновой кислоты, предложенной в способах и наборах согласно изобретению, также называемая в настоящей заявке «спейсерной» последовательностью, демонстрирует приблизительно 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% гомологию или идентичность целой, полной или всей по меньшей мере одной последовательности нуклеиновой кислоты, содержащейся в локусах-мишенях на половых Z- или W-хромосомах, называемой в настоящей заявке «протоспейсером».

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген во второй последовательности нуклеиновой кислоты может быть функционально связан с любым из полоспецифического промотора, эмбрионально-специфического промотора (например, α -глобинового промотора) и индуцибельного промотора (например, индуцируемых светом промоторов, полученных из гена SSU сои, или полученных из промотора CHS халконсинтазы петрушки, или генетически сконструированной версии EL222,

бактериального белка Light-Oxygen-Voltage, который активирует экспрессию при освещении синим светом). В еще более конкретных вариантах осуществления репортерный ген может находиться под контролем эмбрионального промотора, что позволяет ограничить экспрессию трансгенного репортерного гена эмбриональной стадией без экспрессии у взрослого цыпленка. В таком варианте осуществления репортерный трансген может использоваться и экспрессироваться только на эмбриональной стадии для диагностических целей.

Более конкретно, «**промотор**» в контексте настоящей заявки относится к конкретной области ДНК, обладающей способностью контролировать экспрессию гена, расположенного ниже по ходу транскрипции.

Таким образом, «**промотор, специфичный к полу цыплят**» здесь и далее относится к промотору, который будет активировать экспрессию гена только у цыплят определенного пола (то есть, самцов или самок). Кроме того, «**промотор, специфичный к развитию цыплят**» относится к промотору, который будет активировать экспрессию гена только на определенных стадиях развития цыпленка.

В некоторых конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген может быть вставлен и, таким образом, встроен по меньшей мере в одну некодирующую область целевой половой хромосомы. Такой подход позволяет избежать разрушения генов, которые могут быть необходимы для развития и созревания невылупившегося эмбриона.

«**Некодирующая область**» в контексте настоящей заявки относится к компонентам ДНК организма, которые не кодируют белковые последовательности. Некоторые некодирующие области ДНК транскрибируются в функциональные некодирующие молекулы РНК, другие функции некодирующих областей ДНК включают регуляцию транскрипции и трансляции кодирующих белок последовательностей, последовательностей связывания с ядерным матриксом, точек начала репликации ДНК, центромер и теломер. Предполагаемая нефункциональная часть (или ДНК с неизвестной функцией) часто именовалась «мусорной ДНК».

В некоторых конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген, используемый в способе согласно изобретению для получения трансгенной птицы, может быть встроен по меньшей мере в один сайт на половой Z-хромосоме. В более конкретных вариантах осуществления определенные локусы на Z-хромосоме могут

представлять собой любую из областей 9156874-9161874, обозначенной SEQ ID NO:15, 27764943-27769943, обозначенной SEQ ID NO:16, 42172748-42177748, обозначенной SEQ ID NO:17, 63363656-63368656, обозначенной SEQ ID NO:18 и 78777477-78782477, обозначенной SEQ ID NO:19, Z-хромосомы самки курицы.

5 В некоторых конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген может быть встроен по меньшей мере в один сайт в локусе 42172748-42177748 половой Z-хромосомы, в частности, обозначенном SEQ ID NO: 17. В некоторых дополнительных конкретных вариантах осуществления последовательность гРНК, подходящая для встраивания в определенные локусы на Z-хромосоме, может включать, не ограничиваясь

10 перечисленным, гРНК7, направленную на протоспейсер, расположенный в локусе chrZ_42174515_-1 Z-хромосомы. В некоторых конкретных вариантах осуществления гРНК может представлять собой гРНК, обозначаемую как гРНК7. В более конкретных вариантах осуществления такая гРНК7 может содержать последовательность нуклеиновой кислоты GTAATACAGAGCTAAACCAG, также обозначенной SEQ ID NO: 26. В некоторых

15 дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме последовательность, кодирующая репортерный ген, в частности, RFP, предложенная согласно изобретению, может быть фланкирована левым плечом с ее 5'-конца и правым плечом с ее 3'-конца. В некоторых дополнительных конкретных вариантах осуществления левое плечо может содержать

20 последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 31, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 32, которые могут быть использованы для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК7 с SEQ ID NO: 26.

25 В некоторых дополнительных конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одна гРНК, необходимая для нацеливания репортерного гена на такое определенное местоположение на Z-хромосоме, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную любой из гРНК3: ACAGACCTATGATATGT, обозначенной SEQ ID NO: 11; гРНК4: CGATTATCACTACAAG, обозначенной SEQ ID NO: 12; гРНК5:

30 CTGGTTAGCATGGGGAC, обозначенной SEQ ID NO: 13; гРНК6: GTAAAGAGTCAGATACA, обозначенной SEQ ID NO: 14.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты,

35 обозначенную SEQ ID NO: 41, и правое плечо, содержащее последовательность

нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 42, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК3 с SEQ ID NO: 11. В дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 43, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 44, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК4 с SEQ ID NO: 12. В других дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 45, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 46, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК5 с SEQ ID NO: 13. В некоторых дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 47, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 48, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК6 с SEQ ID NO: 14.

Дополнительные неограничивающие примеры последовательностей гРНК, пригодных для встраивания в определенные локусы на Z-хромосоме, могут включать, не ограничиваясь перечисленным, гРНК8 локуса chrZ_9157091_1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты ACAGACCTATGATATGTGAG, также обозначенную SEQ ID NO: 27, гРНК9 локуса chrZ_27767602_-1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты GAGCTTGTGAGTGATAATCG, также обозначенную SEQ ID NO: 28, гРНК10 локуса chrZ_78779927_1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты GTAAAGAGTCAGATACACAG, также обозначенную SEQ ID NO: 29, и гРНК11 локуса chrZ_63364946_-1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты CAGTGGGTACTGAAGCTGTG, также обозначенную SEQ ID NO: 30.

В дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 33, и

правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 34, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК8 с SEQ ID NO: 27. В других дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 35, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 36, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК9 с SEQ ID NO: 28. В дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 37, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 38, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК10 с SEQ ID NO: 29. В еще одном дополнительном варианте осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 39, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 40, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК11 с SEQ ID NO: 30.

В некоторых альтернативных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген может быть встроен по меньшей мере в один сайт на половой W-хромосоме. В более конкретных вариантах осуществления определенным локусом на W-хромосоме может быть местоположение 1022859-1024215. В некоторых конкретных вариантах осуществления локус-мишень может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 3.

В более конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одна гРНК, необходимая для нацеливания репортерного гена на такое определенное местоположение на W-хромосоме, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную любой из SEQ ID NO: 1 и 2, эти гРНК обозначены в настоящей заявке как гРНК1 и гРНК2, соответственно.

В некоторых более конкретных вариантах осуществления гРНК, используемая в способе согласно изобретению для получения трансгенной самки птицы, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 1 (гРНК1). В таком случае по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся в указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты, может быть фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 4 и 5, которые облегчают его встраивание в указанные определенные локусы на W-хромосоме. Следует принимать во внимание, что эти плечи также называются в настоящей заявке левым и правым плечами, соответственно.

В некоторых альтернативных вариантах осуществления гРНК, используемая для получения трансгенной самки птицы согласно изобретению, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 2 (гРНК2). В таком случае по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся во второй последовательности нуклеиновой кислоты, фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 6 и 7. Следует принимать во внимание, что эти плечи также называются в настоящей заявке левым и правым плечами, соответственно.

При нацеливании и/или трансфекции генетических локусов зигот хозяина-птицы экзогенными последовательностями, в частности, репортерным геном, используемым в изобретении, может быть желательно использовать такие клетки для получения трансгенных животных. Для такой процедуры после введения нацеливающей конструкции в эмбриональные стволовые (ЭС) клетки они могут быть высеяны на питательный слой в подходящей среде, например, DMEM с добавками факторов роста и цитокинов, фетальной бычьей сыворотки и антибиотиков. У эмбриональных стволовых клеток мишенью может выступать один локус (гетерозиготные) или оба локуса (гомозиготные). Клетки, содержащие конструкцию, могут быть обнаружены с использованием селективной среды, и после роста в течение достаточного времени колонии могут быть отобраны и проанализированы на предмет нацеливания на гены. В некоторых конкретных вариантах осуществления для проверки встраивания желаемых экзогенных последовательностей в локусы-мишени может применяться ПЦР с использованием праймеров внутри и вне последовательности конструкции. Колонии, демонстрирующие нацеливание на гены, могут затем быть использованы для инъекции в птичьих эмбрионы. Затем ЭС клетки могут быть трипсинизированы, а модифицированные клетки могут быть инъецированы через

отверстие, сделанное в боковой поверхности яйца. После запечатывания яиц они могут быть инкубированы в подходящих условиях до выведения. Только что вылупившаяся птица может быть проверена на наличие целевых сконструированных последовательностей, например, путем исследования взятого у нее биологического образца, например, образца крови. После достижения птицами зрелости их разводят, и их потомство может быть исследовано для определения того, передаются ли экзогенные встроенные последовательности через зародышевую линию.

Получают химерных птиц, частично происходящих из модифицированных эмбриональных стволовых клеток или зигот, способных передавать генетические модификации через зародышевую линию. Спаривание штаммов птиц, содержащих экзогенные последовательности, в частности, репортерный ген, используемый в изобретении, или его части, со штаммами, в которых восстановлен птичий локус дикого типа или его части, должно приводить к получению потомства с обнаружимым *in ovo* полом.

Кроме того, трансгенная птица также может быть получена другими способами, некоторые из которых обсуждаются ниже. К числу птичьих клеток, пригодных для трансформации для получения трансгенных животных, относятся примордиальные зародышевые клетки (ПЗК), сперматозоиды и зиготы (включая эмбриональные стволовые клетки). Сперматозоиды могут быть трансформированы ДНК-конструкциями любым подходящим способом, включая электропорацию, бомбардировку микрочастицами, липофекцию и тому подобное. Сперма может быть использована для искусственного осеменения птиц. Потомство осемененной птицы может быть исследовано на наличие экзогенной последовательности, как описано выше.

В качестве альтернативы, примордиальные зародышевые клетки могут быть выделены из птичьих яиц, трансфицированы экзогенным репортерным геном согласно изобретению любым подходящим способом и перенесены или вставлены в новые эмбрионы, где они могут встроиться в развивающиеся гонады. Вылупившаяся птица и ее потомство могут быть исследованы на наличие последовательности экзогенного репортерного гена, как описано в изобретении.

В еще одном подходе диспергированные бластодермальные клетки, выделенные из яиц, могут быть трансфицированы любым подходящим способом последовательностью экзогенного репортерного гена или ее частями, встраиваемых в полоспецифичные Z- или

W-хромосомы, с последующей инъекцией в подзародышевую полость интактных яиц. Вылупившиеся птицы и их потомство могут быть исследованы на наличие экзогенного репортерного гена, как описано выше.

- 5 Куриные примордиальные зародышевые клетки (ПЗК) являются предшественниками яйцеклеток и сперматозоидов. Таким образом, в некоторых аспектах изобретения предложено получение трансгенных кур с помощью системы передачи зародышевой линии с использованием ПЗК, совместно трансфицированных конструкцией репортерного гена и конструкцией CRISPR/ гРНК Cas9, направляющей встраивание репортерного гена в
- 10 полоспецифичные W- и/или Z-хромосомы. ПЗК отбирают и переносят в кровотоки 2,5-дневных эмбрионов-реципиентов для передачи зародышевой линии.

ПЗК являются предшественниками гамет и демонстрируют уникальную миграционную активность на ранних стадиях эмбриогенеза у птиц по сравнению с млекопитающими. У

15 птичьих эмбрионов ПЗК сначала возникают из эпибласта и мигрируют в гипобласт зародышевого полумесяца на 4 стадии (по НН), примерно через 18–19 ч после инкубации. Между 10 и 12 стадиями (по НН) ПЗК перемещаются из зародышевого полумесяца в кровотоки и мигрируют через систему кровообращения, пока не достигают половых тяжей, а затем заселяют развивающиеся гонады. В этом состоит отличие от млекопитающих, у

20 которых ПЗК мигрируют через эмбриональные ткани, чтобы достичь развивающихся гонад. Именно эта уникальная особенность миграции птичьих ПЗК через кровотоки способствовала значительному прогрессу в генетической модификации кур.

Таким образом, в некоторых конкретных вариантах осуществления «**получение**

25 **трансгенной птицы**» относится к многостадийному способу, включающему методы генной инженерии для получения курицы с модификациями генома, где а) примордиальные зародышевые клетки (ПЗК) выделяют из крови двухдневных эмбрионов цыплят; б) в культивируемые ПЗК включают трансгенную конструкцию, например, с использованием лентивирусной системы, транспозонных векторов Piggybac, методов TALEN или

30 CRISPR/Cas9; (с) трансгенные ПЗК идентифицируют и вводят в систему кровообращения эмбрионов, после чего они мигрируют в развивающиеся гонады; д) эмбрионов-реципиентов инкубируют при 37 °С до выведения; (d) вылупившихся самцов выращивают до половой зрелости и скрещивают с курами дикого типа; (е) потомство подвергают скринингу для выявления особей, полученных из трансгенных ПЗК.

Таким образом, во втором аспекте изобретение относится к трансгенной птице или субъекту, содержащему по меньшей мере в одной из его клеток по меньшей мере один экзогенный репортерный ген, встроенный по меньшей мере в одно положение или местоположение (также называемое в настоящей заявке локусом) на по меньшей мере одной из половых Z- и W-хромосом.

Термин «птица» относится к любым видам, происходящим от птиц, для которых характерны перья, челюсти в форме клюва, лишенные зубов, кладка яиц с твердой скорлупой, интенсивный обмен веществ, четырехкамерное сердце и легкий, но прочный скелет. Виды птиц включают, не ограничиваясь перечисленным, курицу, перепела, индейку, утку, виды курообразных (Gallinacea), гуся, фазана и другую домашнюю птицу. Термин «курица» включает самок всех видов птиц. «Трансгенная птица» обычно относится к птице, в зародышевые клетки которой была хромосомно встроена гетерологичная последовательность ДНК или одна или более дополнительных последовательностей ДНК, обычно эндогенных для указанной птицы (в совокупности называемых в настоящей заявке «трансгенами»). В результате такого переноса и встраивания перенесенная последовательность может передаваться через зародышевые клетки потомству трансгенной птицы. У трансгенной птицы (включая ее потомство) в половые хромосомы соматических клеток также встроен трансген.

В некоторых конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одно трансгенное животное согласно изобретению может содержать по меньшей мере два разных репортерных гена. В таком случае каждый репортерный ген может быть встроен по меньшей мере в одно положение или местоположение на одной из половых Z- и/или W-хромосом. В некоторых дополнительных вариантах осуществления каждый репортерный ген может быть встроен по меньшей мере в два, по меньшей мере в три, по меньшей мере в четыре, по меньшей мере в пять, по меньшей мере в шесть, по меньшей мере в семь, по меньшей мере в восемь, по меньшей мере в девять, по меньшей мере в десять или более положений или местоположений на одной из половых Z- и/или W-хромосом.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления репортерный ген, содержащийся в трансгенном животном согласно изобретению, может представлять собой по меньшей мере один флуоресцентный репортерный ген. Следует принимать во внимание, что любой репортерный ген и, в частности, любой флуоресцентный репортерный ген, раскрытый в изобретении, в частности, в приведенной выше таблице 1, применительно к другим

аспектам изобретения, также может быть пригоден применительно к трансгенной птице, предложенной согласно изобретению.

5 В более конкретных вариантах осуществления такой флуоресцентный репортерный ген может содержать или может представлять собой по меньшей мере один красный флуоресцентный белок (RFP). Однако следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления репортерный ген, экспрессируемый в виде трансгена трансгенной птицей согласно изобретению, может представлять собой любой флуоресцентный белок, например, RFP, YFP, BFP и тому подобное, при условии, что указанный флуоресцентный
10 белок не является зеленым флуоресцентным белком (GFP). Другими словами, в некоторых конкретных вариантах осуществления репортерный ген, встроенный в половую хромосому трансгенного животного, предложенного согласно изобретению, может представлять собой любой флуоресцентный белок, при условии, что указанный флуоресцентный белок не является GFP.

15 В отдельных вариантах осуществления по меньшей мере одна трансгенная птица, предложенная согласно изобретению, может являться самкой. В более конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген в такой трансгенной самке птицы может быть встроен по меньшей мере в одно положение женской Z-хромосомы.

В некоторых альтернативных вариантах осуществления по меньшей мере одна трансгенная птица может являться самкой, по меньшей мере в одно положение женской W-хромосомы которой встроен по меньшей мере один репортерный ген.

В некоторых дополнительных альтернативных вариантах осуществления трансгенное
25 животное, предложенное согласно изобретению, может представлять собой трансгенного самца, несущего трансгенный репортерный ген, встроенный по меньшей мере в одну из двух его половых Z-хромосом. В некоторых дополнительных вариантах осуществления трансгенное животное, предложенное согласно изобретению, может представлять собой трансгенного самца, несущего трансгенный репортерный ген, встроенный в одну из двух
30 его половых Z-хромосом. В дополнительных альтернативных вариантах осуществления трансгенное животное, предложенное согласно изобретению, может представлять собой трансгенного самца, несущего трансгенный репортерный ген, встроенный в две его половые Z-хромосомы.

В некоторых конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген может быть встроен в половую хромосому трансгенного животного согласно изобретению с использованием по меньшей мере одной PEN. Как отмечено выше применительно к способам согласно изобретению, может быть использована любая система 5 генной инженерии или любая PEN, в частности, любая РНК-управляемая система, например, одна из CRISPR, TALEN, ZFN, и тому подобное.

Более конкретно, в качестве такой PEN в отдельных вариантах осуществления может быть использована система CRISPR. В более конкретных вариантах осуществления при создании 10 трансгенного животного согласно изобретению может быть использована система CRISPR 2 класса. В некоторых дополнительных конкретных вариантах осуществления может быть использована система CRISPR II типа.

В еще более конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген 15 может быть встроен в половую хромосому трансгенной птицы согласно изобретению с помощью HDR, опосредованной по меньшей мере одной системой CRISPR/Cas9.

В более конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген может быть встроен в половую хромосому трансгенной птицы согласно изобретению путем 20 приведения в контакт или совместной трансфекции по меньшей мере одной клетки этой птицы/субъекта или по меньшей мере одной клетки, подлежащей введению в указанную птицу, с по меньшей мере двумя последовательностями нуклеиновой кислоты. Более конкретно, такая клетка может быть приведена в контакт или совместно трансфицирована с (a) по меньшей мере одним компонентом системы редактирования генома, в частности, 25 по меньшей мере одним белком Cas9 или по меньшей мере одной первой последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный по меньшей мере один белок Cas9; и по меньшей мере одной гРНК, нацеленной на по меньшей мере один протоспейсер на по меньшей мере одной половой хромосоме, Z- или W-, или по меньшей мере 30 мере одной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей указанную по меньшей мере одну гРНК, тем самым обеспечивая CRISPR-опосредованное встраивание; и (b) по меньшей мере одной второй последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере один репортерный ген или любые его фрагменты.

В более конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген во второй последовательности нуклеиновой кислоты может быть фланкирован гомологичными плечами с его 5'- и 3'-конца. Эти плечи демонстрируют гомологию с сайтом-мишенью для встраивания на половой хромосоме-мишени, тем самым способствуя HDR в сайте встраивания.

В еще более конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген во второй последовательности нуклеиновой кислоты может быть функционально связан с любым из полоспецифичного промотора, эмбрионально-специфичного промотора и индуцибельного промотора. Такой промотор может, в некоторых вариантах осуществления, ограничивать экспрессию репортерного гена согласно изобретению конкретным желаемым полом (в случае полоспецифичного промотора), конкретной стадией эмбрионального развития (эмбрионально-специфичный промотор) или конкретными условиями (индуцируемые условия).

В некоторых дополнительных конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся в трансгенной птице согласно изобретению, может быть встроен по меньшей мере в одну некодирующую область одной из его половых хромосом.

В некоторых дополнительных альтернативных вариантах трансгенная птица согласно изобретению может содержать по меньшей мере один репортерный ген, встроенный по меньшей мере в один сайт на половой Z-хромосоме. В некоторых частных и неограничивающих вариантах осуществления такая трансгенная птица может быть самкой, несущей трансгенный репортерный ген, встроенный в Z-хромосому. В более конкретных вариантах осуществления конкретные локусы на Z-хромосоме могут представлять собой любую из областей 9156874-9161874, обозначенной SEQ ID NO:15, 27764943-27769943, обозначенной SEQ ID NO:16, 42172748-42177748, обозначенной SEQ ID NO:17, 63363656-63368656, обозначенной SEQ ID NO:18 и 78777477-78782477, обозначенной SEQ ID NO:19, Z-хромосомы самки курицы.

В некоторых конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген может быть встроен по меньшей мере в один сайт в локусе 42172748-42177748 половой Z-хромосомы, в частности, обозначенном SEQ ID NO: 17. В некоторых дополнительных конкретных вариантах осуществления последовательность гРНК, подходящая для встраивания в конкретные локусы на Z-хромосоме, может включать, не ограничиваясь перечисленным, гРНК7, направленную на протоспейсер, расположенный в локусе Z-

хромосомы chrZ_42174515_-1. В некоторых конкретных вариантах осуществления гРНК может представлять собой гРНК, обозначаемую как гРНК7. В более конкретных вариантах осуществления такая гРНК7 может содержать последовательность нуклеиновой кислоты GTAATACAGAGCTAAACCAG, также обозначенную SEQ ID NO: 26. В некоторых дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме последовательность, кодирующая репортерный ген, в частности, RFP, предложенная согласно изобретению, может быть фланкирована левым плечом с ее 5'-конца и правым плечом с ее 3'-конца. В некоторых конкретных вариантах осуществления левое плечо может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 31, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 32, может быть использовано для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК7 с SEQ ID NO: 26.

В некоторых более конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одна гРНК, необходимая для нацеливания репортерного гена на такое определенное местоположение на Z-хромосоме трансгенной птицы, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную любой из гРНК3: ACAGACCTATGATATGT, обозначенной SEQ ID NO: 11; гРНК4: CGATTATCACTACAAG, обозначенной SEQ ID NO: 12; гРНК5: CTGGTTAGCATGGGGAC, обозначенной SEQ ID NO: 13; гРНК6: GTAAAGAGTCAGATACA, обозначенной SEQ ID NO: 14.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 41, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 42, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК3 с SEQ ID NO: 11. В дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 43, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 44, для встраивания репортерного гена у трансгенной птицы согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК4 с SEQ ID NO: 12. В других дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме трансгенной птицы может быть использовано левое

плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 45, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 46, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК5 с SEQ ID NO: 13. В некоторых дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 47, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 48, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК6 с SEQ ID NO: 14.

Дополнительные неограничивающие примеры последовательностей гРНК, подходящих для встраивания в определенные локусы на Z-хромосоме трансгенной птицы согласно изобретению, могут включать, не ограничиваясь перечисленным, гРНК8 локуса chrZ_9157091_1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты ACAGACCTATGATATGTGAG, также обозначенную SEQ ID NO: 27, гРНК9 локуса chrZ_27767602_-1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты GAGCTTGTGAGTGATAATCG, также обозначенную SEQ ID NO: 28, гРНК10 локуса chrZ_78779927_1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты GTAAAGAGTCAGATACACAG, также обозначенную SEQ ID NO: 29, и гРНК11 локуса chrZ_63364946_-1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты CAGTGGGTAAGCTGTG, также обозначенную SEQ ID NO: 30.

В дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме трансгенной птицы согласно изобретению может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 33, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 34, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК8 с SEQ ID NO: 27. В других дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 35, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 36, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК9 с SEQ ID NO: 28. В

дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 37, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 38, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК10 с SEQ ID NO: 29. В еще одном дополнительном варианте осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 39, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 40, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК11 с SEQ ID NO: 30.

В некоторых дополнительных альтернативных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген может быть встроен по меньшей мере в один сайт на половой W-хромосоме трансгенной птицы согласно изобретению. В некоторых частных вариантах осуществления сайт встраивания может быть расположен в локусе 1022859-1024215 на W-хромосоме, в частности, в диапазоне ДНК galGal5 хромосомы W:1022859-1024215. В некоторых дополнительных конкретных вариантах осуществления такие локусы содержат последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 3.

Для специфичного встраивания репортерного гена согласно изобретению в любое положение в описанных выше локусах могут потребоваться определенные гРНК. Следовательно, в некоторых частных и неограничивающих вариантах осуществления подходящие гРНК, используемые для получения трансгенной птицы согласно изобретению, могут содержать последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную любой из SEQ ID NO: 1 и 2. В некоторых конкретных вариантах осуществления эти гРНК называются в настоящей заявке гРНК1 и гРНК2, соответственно.

В некоторых частных вариантах осуществления трансгенная птица, предложенная согласно изобретению, была получена с использованием гРНК1, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 1. Чтобы обеспечить встраивание репортерного гена согласно изобретению в такое определенное место, репортерный ген, подлежащий встраиванию, в отдельных вариантах осуществления должен нести особые плечи, облегчающие его включение в сайт-мишень для встраивания, управляемое

используемой гРНК. Таким образом, в некоторых конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген может содержаться во второй последовательности нуклеиновой кислоты, где данный репортерный ген фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 4 и 5.

В некоторых альтернативных вариантах осуществления трансгенная птица, предложенная согласно изобретению, может быть получена с использованием гРНК2, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 2. В таком случае, чтобы обеспечить встраивание репортерного гена согласно изобретению в определенный сайт, распознаваемый указанной гРНК2, по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся во второй последовательности нуклеиновой кислоты, может, согласно конкретным вариантам осуществления, быть фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 6 и 7.

Следует также принимать во внимание, что изобретение дополнительно охватывает любую из трансгенных птиц, как описано в настоящей заявке, для применения в любом из способов согласно изобретению, в частности, в способах определения пола *in ovo*, как обсуждается в настоящей заявке.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретение дополнительно охватывает использование любого яйца, снесенного любой из трансгенных птиц, получаемых согласно изобретению, в частности, как раскрыто выше, для применения в любом из способов согласно изобретению. В еще одном аспекте изобретение относится к клетке, содержащей по меньшей мере один экзогенный репортерный ген, встроенный по меньшей мере в одно положение или местоположение по меньшей мере на одной из половых Z- и W-хромосом.

В некоторых конкретных вариантах осуществления клетка, предложенная согласно изобретению, может представлять собой птичью клетку.

В некоторых частных вариантах осуществления птичья клетка, предложенная согласно изобретению, может представлять собой примордиальную зародышевую клетку (ПЗК).

Термин «**зародышевые клетки**» относится к эмбриональной клетке, которая после объединения с другими зародышевыми клетками образует гамету. «**Примордиальные зародышевые клетки (ПЗК)**» в контексте настоящей заявки относятся к стволовым клеткам зародышевой линии, которые служат предшественниками гамет и дают начало

плюрипотентным эмбриональным стволовым клеткам. Клетки в гастрულიрующем эмбрионе, получившие сигнал превратиться в ПЗК во ходе эмбриогенеза, мигрируют в половые тяжи, которые превращаются в гонады, и дифференцируются в зрелые гаметы.

В некоторых вариантах осуществления репортерный ген, встроенный по меньшей мере в одну половую хромосому клетки согласно изобретению, может представлять собой флуоресцентный белок, в частности RFP, YFP, BFP и тому подобное, или любой из флуоресцентных белков, раскрытых в таблице 1. В некоторых дополнительных вариантах осуществления репортерный ген, встроенный в клетку согласно изобретению, может представлять собой любой флуоресцентный белок, при условии, что указанный флуоресцентный белок не является зеленым флуоресцентным белком (GFP). Другими словами, в некоторых конкретных вариантах осуществления репортерный ген, встроенный в половую хромосому трансгенной клетки, предложенной согласно изобретению, может представлять собой любой флуоресцентный белок, при условии, что указанный флуоресцентный белок не является GFP.

В еще более конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген может быть встроен в половую хромосому трансгенной птицы или животного, получаемого из клетки согласно изобретению, с использованием по меньшей мере одной программируемой сконструированной нуклеазы (PEN). Термин «**программируемые сконструированные нуклеазы (PEN)**» в контексте настоящей заявки относится к синтетическим ферментам, разрезающим определенные последовательности ДНК, полученным из встречающихся в природе нуклеаз, участвующих в репарации двухцепочечных разрывов ДНК и позволяющих осуществлять прямое редактирование генома. В некоторых более конкретных вариантах осуществления PEN может представлять собой систему кластерных регулярно перемежающихся коротких палиндромных повторов (CRISPR) 2 класса, в частности, II типа.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления клетка, предложенная согласно изобретению, может содержать по меньшей мере один репортерный ген, встроенный в ее половую хромосому. В более конкретных вариантах осуществления такое специфичное встраивание репортерного гена может быть обеспечено путем приведения в контакт или совместной трансфекции клетки с: (а) по меньшей мере одной системой редактирования генома, содержащей по меньшей мере один белок Cas9 или по меньшей мере одну первую последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащую по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный по меньшей мере один белок Cas9; и по меньшей мере одной гРНК, нацеленной на по меньшей мере один

протоспейсер на по меньшей мере одной половой Z- и/или W-хромосоме, или по меньшей мере одной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей указанную по меньшей мере одну гРНК; и (b) по меньшей мере одной второй последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере один указанный репортерный ген.

5

В отдельных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген во второй последовательности нуклеиновой кислоты, совместно трансфицированной в клетку согласно изобретению, может быть фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами для HDR в сайте встраивания.

10

В некоторых конкретных вариантах осуществления клетка, предложенная согласно изобретению, может быть получена путем встраивания по меньшей мере одного репортерного гена согласно изобретению в Z-хромосому клетки. В отдельных вариантах осуществления для получения клетки согласно изобретению по меньшей мере один репортерный ген может быть встроен по меньшей мере в один сайт на половой Z-хромосоме. В более конкретных вариантах осуществления определенные локусы на Z-хромосоме могут представлять собой любую из областей 9156874-9161874, обозначенной SEQ ID NO:15, 27764943-27769943, обозначенной SEQ ID NO:16, 42172748-42177748, обозначенной SEQ ID NO:17, 63363656-63368656, обозначенной SEQ ID NO:18 и 78777477-78782477, обозначенной SEQ ID NO:19, Z-хромосомы самки курицы.

20

В некоторых дополнительных альтернативных вариантах осуществления клетка, предложенная согласно изобретению, может быть получена с использованием гРНК, облегчающих встраивание по меньшей мере в один сайт в локусе 42172748-42177748 половой Z-хромосомы, в частности, SEQ ID NO: 17. В некоторых дополнительных конкретных вариантах осуществления последовательность гРНК, подходящая для встраивания в определенные локусы на Z-хромосоме, может включать, не ограничиваясь перечисленным, гРНК7 локуса chrZ_42174515_-1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты GTAATACAGAGCTAAACCAG, также обозначенную SEQ ID NO: 26. В некоторых дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 31, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 32, для встраивания

30

репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК7 с SEQ ID NO: 26.

5 В более конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одна гРНК, необходимая для нацеливания репортерного гена на такое определенное местоположение на Z-хромосоме клетки согласно изобретению, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную любой из гРНК3: ACAGACCTATGATATGT, обозначенной SEQ ID NO: 11; гРНК4: CGATTATCACTCACAAG, обозначенной SEQ ID NO: 12; гРНК5: CTGGTTAGCATGGGGAC, обозначенной SEQ ID NO: 13; гРНК6: 10 GTAAAGAGTCAGATACA, обозначенной SEQ ID NO: 14.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме клетки согласно изобретению может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 41, и правое плечо, содержащее 15 последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 42, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК3 с SEQ ID NO: 11. В дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, 20 обозначенную SEQ ID NO: 43, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 44, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК4 с SEQ ID NO: 12. В других дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме клетки согласно изобретению 25 может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 45, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 46, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК5 с SEQ ID NO: 13. В некоторых дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена 30 согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 47, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 48, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК6 с SEQ ID NO: 14.

Дополнительные неограничивающие примеры последовательностей гРНК, подходящих для встраивания в определенные локусы на Z-хромосоме, могут включать, не ограничиваясь перечисленным, гРНК8 локуса chrZ_9157091_1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты ACAGACCTATGATATGTGAG, также обозначенную SEQ ID NO: 27, гРНК9 локуса chrZ_27767602_-1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты GAGCTTGTGAGTGATAATCG, также обозначенную SEQ ID NO: 28, гРНК10 локуса chrZ_78779927_1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты GTAAAGAGTCAGATACACAG, также обозначенную SEQ ID NO: 29, и гРНК11 локуса chrZ_63364946_-1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты CAGTGGGTAAGCTGTG, также обозначенную SEQ ID NO: 30.

В дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме клетки согласно изобретению может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 33, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 34, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК8 с SEQ ID NO: 27. В других дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме клетки согласно изобретению может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 35, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 36, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК9 с SEQ ID NO: 28. В дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 37, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 38, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК10 с SEQ ID NO: 29. В еще одном дополнительном варианте осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 39, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 40, для

встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК11 с SEQ ID NO: 30.

В некоторых частных вариантах осуществления для нацеливания встраивания репортерного гена в W-хромосому в клетке, предложенной согласно изобретению, следует использовать определенные гРНК. В дополнительных частных вариантах осуществления гРНК может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 1, называемую в настоящей заявке гРНК1. В таком случае по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся во второй последовательности нуклеиновой кислоты, может быть фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 4 и 5.

В некоторых дополнительных альтернативных вариантах осуществления клетка, предложенная согласно изобретению, может быть получена с использованием гРНК, называемой в настоящей заявке гРНК2. В отдельных вариантах осуществления гРНК2 может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 2. В таких конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся во второй последовательности нуклеиновой кислоты, может быть фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 6 и 7.

Кроме того, изобретение относится к способу обнаружения оплодотворенности невыведенного яйца. В некоторых конкретных вариантах осуществления такой способ может включать стадию (а) обеспечения или получения по меньшей мере одной трансгенной птицы или животного, содержащих по меньшей мере один экзогенный репортерный ген, встроенный по меньшей мере в одно положение или местоположение на обеих половых Z- и W-хромосомах в случае, если обеспеченное трансгенное животное представляет собой самку, и на обеих половых Z-хромосомах в случае, если обеспеченное трансгенное животное представляет собой самца. На второй стадии (b) получают по меньшей мере одно оплодотворенное яйцо от трансгенной птицы, в частности, животного, или любых ее клеток. Следующая стадия (с) включает определение, обнаруживается ли в яйце по меньшей мере один обнаружимый сигнал. В более конкретных вариантах осуществления обнаружение по меньшей мере одного обнаружимого сигнала свидетельствует об экспрессии указанного по меньшей мере одного репортерного гена, и,

следовательно, наличии меченой материнской W-хромосомы или Z-хромосомы (в случае самки) или меченой отцовской Z-хромосомы в птичьем эмбрионе.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления трансгенное животное, получаемое способом согласно изобретению, может представлять собой самца, в обе Z-хромосомы которого встроен репортерный ген. В таком случае обнаружимый сигнал, определенный в яйце, оплодотворенном таким трансгенным самцом или его спермой, свидетельствует о том, что эмбрион несет отцовскую Z-хромосому, содержащую трансгенный репортерный ген, и, следовательно, яйцо является оплодотворенным. В других дополнительных вариантах осуществления трансгенное животное, получаемое способом согласно изобретению, может представлять собой самку, в обе, Z- и W-, хромосомы которой встроен репортерный ген. В таком случае обнаружимый сигнал, определенный в яйце, снесенном такой трансгенной самкой, свидетельствует о том, что эмбрион несет материнскую Z- или W-хромосому, содержащую трансгенный репортерный ген, и, следовательно, яйцо является оплодотворенным. Следует принимать во внимание, что в дополнительных вариантах осуществления для обнаружения оплодотворенного яйца репортерный ген, в частности, ген RFP, может быть вставлен в две копии любых хромосом для создания гомозиготной трансгенной птицы, в частности, самца птицы. Оплодотворенное яйцо будет обнаруживаться как несущее репортерный ген RFP.

В еще одном аспекте изобретения предложен набор, содержащий:

(а) по меньшей мере один компонент по меньшей мере одной системы редактирования генома, в частности, системы CRISPR/Cas9, которая может содержать по меньшей мере один белок Cas9 или по меньшей мере одну первую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный по меньшей мере один белок Cas9; и по меньшей мере одну гРНК, нацеленную на по меньшей мере один протоспейсер на по меньшей мере одной половой Z- и/или W-хромосоме, или по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанную по меньшей мере одну гРНК; и (b) по меньшей мере одну вторую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую по меньшей мере один указанный репортерный ген.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления гРНК, используемая в способе, а также в наборе согласно изобретению (описанном далее в настоящей заявке), может содержать по меньшей мере одну РНК CRISPR (крРНК) и по меньшей мере одну транс-активирующую крРНК (тракрРНК).

В некоторых альтернативных вариантах осуществления набор согласно изобретению может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере одну гРНК. Такая последовательность нуклеиновой кислоты может содержать массив CRISPR, содержащий по меньшей мере одну спейсерную последовательность, которая нацелена на и, следовательно, гомологична или идентична по меньшей мере одному протоспейсеру в последовательности геномной ДНК-мишени. Следует отметить, что последовательность нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать последовательность, кодирующую по меньшей мере одну тракрРНК.

10 В некоторых вариантах осуществления массив CRISPR согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере один спейсер и по меньшей мере один повтор. В еще одном варианте осуществления изобретение дополнительно охватывает вариант обеспечения пре-крРНК, которая может быть подвергнута процессингу до нескольких конечных продуктов гРНК, которые могут быть нацелены на одинаковые или разные мишени.

В некоторых более конкретных вариантах осуществления крРНК, содержащаяся в гРНК согласно изобретению, может представлять собой последовательность одноцепочечной рибонуклеиновой кислоты (оцРНК), комплементарную последовательности геномной ДНК-мишени. В некоторых конкретных вариантах осуществления последовательность геномной ДНК-мишени может быть расположена непосредственно перед последовательностью мотива, прилежащего к протоспейсеру (РАМ), и далее.

Как указано в настоящей заявке, гРНК из наборов и способов согласно изобретению может быть комплементарна, по меньшей мере частично, геномной ДНК-мишени, в этом случае локус-мишень на половых Z- или W-хромосомах называется в настоящей заявке «протоспейсером». В отдельных вариантах осуществления «комплементарность» относится к взаимосвязи двух структур, каждая из которых следует принципу «ключа и замка». В природе комплементарность является основополагающим принципом репликации и транскрипции ДНК, поскольку она является свойством, общим для двух последовательностей ДНК или РНК, так что при их выравнивании в противоположном друг другу направлении нуклеотидные основания в каждом положении в последовательностях будут комплементарными (например, А и Т или U, С и G).

Как указано выше, последовательность геномной ДНК, на которую нацелена гРНК из набора согласно изобретению, расположена непосредственно перед последовательностью

РАМ. В некоторых вариантах осуществления такая последовательность РАМ может представлять иметь нуклеотидную последовательность NGG.

В отдельных вариантах осуществления последовательность РАМ, упоминаемая в изобретении, может содержать N, то есть, любой нуклеотид, в частности, любой из аденина (A), гуанина (G), цитозина (C) или тимина (T). В некоторых дополнительных вариантах осуществления последовательность РАМ согласно изобретению состоит из A, G, C или T и двух гуанинов.

10 Согласно одному из вариантов осуществления полинуклеотид, кодирующий гРНК согласно изобретению, может содержать по меньшей мере один спейсер и, необязательно, по меньшей мере один повтор. В некоторых дополнительных вариантах осуществления ДНК, кодирующая гРНК согласно изобретению, может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 15 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или более, в частности, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 или более спейсеров. В некоторых вариантах осуществления каждый спейсер расположен между двумя повторами. Кроме того, следует 20 понимать, что спейсеры последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей гРНК согласно изобретению, могут быть либо одинаковыми, либо разными спейсерами. В других вариантах осуществления эти спейсеры могут быть нацелены либо на одну и ту же, либо на разные геномные ДНК-мишени. В некоторых других вариантах осуществления такой спейсер может быть нацелен на по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 25 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или более последовательностей геномной ДНК-мишени. Эти последовательности-мишени могут быть получены из одного локуса или, в качестве 30 альтернативы, из нескольких локусов-мишеней.

В контексте настоящей заявки термин «спейсер» относится к неповторяющейся спейсерной последовательности, предназначенной для нацеливания на определенную последовательность и расположенной между несколькими короткими прямыми повторами (т. е., повторами CRISPR) массивов CRISPR. В некоторых конкретных вариантах 35

осуществления спейсеры могут содержать от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов, в частности, приблизительно 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более нуклеотидов. Более конкретно, приблизительно 20-25 нуклеотидов.

5 Гидовая или нацеливающая РНК, кодируемая системой CRISPR согласно изобретению, может содержать РНК CRISPR (крРНК) и транс-активирующую РНК (тракрРНК). Последовательность нацеливающей РНК, кодируемой спейсерами CRISPR, не имеет конкретных ограничений помимо требования, чтобы она была направлена на
10 последовательность-мишень в птичьей геномной ДНК (то есть, имела сегмент, идентичный или комплементарный ей), в частности, в локусе-мишени на половых Z- или W-хромосомах, также называемой в настоящей заявке «**протоспейсером**». Такие протоспейсеры содержат последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую достаточную комплементарность с нацеливающей РНК, кодируемой спейсерами CRISPR, содержащимися в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей гРНК в
15 способах и наборах согласно изобретению.

В некоторых вариантах осуществления крРНК содержит или состоит из 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 нт спейсерной (нацеливающей) последовательности, за которой следуют 19-36 нт последовательности повтора. В
20 конкретных и неограничивающих вариантах осуществления нацеливающий спейсер может содержать или состоять из сегмента, нацеленного на любую из последовательностей геномной ДНК, для которых в настоящей заявке приведены типичные спейсерные последовательности.

25 Следует отметить, что в некоторых конкретных вариантах осуществления спейсеры системы CRISPR согласно изобретению могут кодировать нацеливающую гидовую РНК (гРНК). «**гРНК**» или «**нацеливающая РНК**» представляет собой РНК, которая при транскрипции с части кодирующей ее системы CRISPR содержит по меньшей мере один сегмент последовательности РНК, идентичный (за исключением замены Т на U в случае
30 РНК) или комплементарный (и, следовательно, «нацеленный на») последовательности ДНК в геномной ДНК-мишени. Системы CRISPR согласно настоящему изобретению могут необязательно кодировать более одной нацеливающей РНК, и нацеливающие РНК должны быть направлены на одну или более последовательностей-мишеней в геномной ДНК.

В некоторых вариантах осуществления белок Cas9, предложенный в наборе согласно изобретению, может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты, обозначенной SEQ ID NO: 24. В дополнительных конкретных и неограничивающих вариантах осуществления белок Cas9 может содержать аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO: 25, или любые ее производные, мутанты или варианты.

Следует отметить, что «аминокислотная последовательность» или «пептидная последовательность» представляет собой порядок, в котором аминокислотные остатки, соединенные пептидными связями, находятся в цепи в пептидах и белках. Последовательность обычно описывают от N-конца, содержащего свободную аминогруппу, к C-концу, содержащему амид. Аминокислотную последовательность часто называют пептидом, белковой последовательностью, если она представляет собой первичную структуру белка, однако следует различать термины «аминокислотная последовательность» или «пептидная последовательность» и «белок», поскольку белок определен как аминокислотная последовательность, свернутая в определенную трехмерную конфигурацию и обычно претерпевшая посттрансляционные модификации, такие как фосфорилирование, ацетилирование, гликозилирование, манозилирование, амидирование, карбоксилирование, образование сульфгидрильной связи, расщепление и тому подобное.

Под «фрагментами или пептидами» подразумевается фракция указанных молекул Cas9 или RFP (описанных далее в настоящей заявке). Подразумевается, что «фрагмент» молекулы, такой как любая из аминокислотных последовательностей согласно настоящему изобретению, относится к любой подсовкупности аминокислот молекул Cas9 или RFP. Он может также включать их «варианты» или «производные». Подразумевается, что «пептид» относится к определенной подсовкупности аминокислот, обладающей функциональной активностью. Под «функциональным» подразумевается наличие неизменной биологической функции, например, способности осуществлять редактирование генома, как Cas 9, или генерировать обнаружимый сигнал, как RFP.

Следует принимать во внимание, что изобретение охватывает любой вариант или производное молекул RFP или Cas9 согласно изобретению, и любые по существу идентичные или гомологичные полипептиды. Термин «*производное*» используется для обозначения аминокислотных последовательностей (полипептида) с любыми вставками, делециями, заменами и модификациями аминокислотных последовательностей (полипептида), которые не изменяют активность исходных полипептидов. В этой связи производное или фрагмент молекул Cas9 или RFP согласно изобретению может

представлять собой любое производное или фрагмент молекул Cas9 или RFP, в частности, обозначенные SEQ ID NO: 25, 21, 23, не снижающие или не изменяющие активность молекул Cas9 или RFP. Термином «производное» также обозначают гомологи, варианты и аналоги. Ортологи или гомологи белков, последовательность которых гомологична или идентична последовательности представляющих интерес белков согласно изобретению, в частности, которые могут совпадать по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60% и, в частности, на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% или более, в частности, по сравнению с целой последовательностью представляющих интерес белков согласно изобретению, например, любого из белков, содержащих аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO: 25, 21, 23. В частности, гомологи, содержащие или состоящие из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60% и, в частности, на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичной SEQ ID NO: 21, 23, 25, в частности, целой последовательности, обозначенной SEQ ID NO: 21, 23, 25.

В некоторых вариантах осуществления производные относятся к полипептидам, которые отличаются от полипептидов, конкретно определенных в настоящем изобретении, вставками, делециями или заменами аминокислотных остатков. Следует принимать во внимание, что под терминами «вставка(и)», «делеция(ии)» или «замена(ы)» в контексте настоящей заявки подразумевается любое добавление, делеция или замена, соответственно, аминокислотных остатков полипептидов, раскрытых в изобретении, составляющее от 1 до 50 аминокислотных остатков, от 20 до 1 аминокислотного остатка и, в частности, от 1 до 10 аминокислотных остатков. Более конкретно, вставка(и), делеция(ии) или замена(ы) могут составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. Следует отметить, что вставка(и), делеция(ии) или замена(ы), охватываемые изобретением, могут встречаться в любом положении модифицированного пептида, а также на любом из его N'- или C'-конца.

Что касается аминокислотных последовательностей, специалисту в данной области техники будет ясно, что отдельные замены, делеции или добавления в последовательности нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, которые изменяют, добавляют или удаляют одну аминокислоту или небольшой процент аминокислот в кодируемой последовательности, представляют собой «консервативно модифицированный вариант», где изменение приводит к замене аминокислоты химически схожей аминокислотой. В данной области техники хорошо известны таблицы консервативных замен, перечисляющие функционально схожие аминокислоты. Такие консервативно модифицированные варианты

являются дополнением и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллелеморфы согласно изобретению.

Например, могут быть сделаны замены, состоящие в замене алифатической аминокислоты (G, A, I, L или V) другим членом группы, или замена, состоящая в замене одного полярного остатка другим, например, аргинина лизином, глутаминовой кислоты аспарагиновой кислотой или глутамина аспарагином. Каждая из следующих восьми групп содержит другие иллюстративные аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга:

- 1) аланин (A), глицин (G);
- 10 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E);
- 3) аспарагин (N), глутамин (Q);
- 4) аргинин (R), лизин (K);
- 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V);
- 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W);
- 15 7) серин (S), треонин (T); и
- 8) цистеин (C), метионин (M).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретение охватывает молекулы Cas9 или RFP или любые их производные, в частности, производное, содержащее по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более консервативных замен в аминокислотных последовательностях, обозначенных любой из SEQ ID NO: 21, 23, 25. Более конкретно, аминокислотные «замены» являются результатом замены одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей схожие структурные и/или химические свойства, то есть, консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные замены могут быть сделаны на основе сходства в полярности, заряде, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природе вовлеченных остатков. Например, неполярные **«гидрофобные»** аминокислоты выбраны из группы, состоящей из валина (V), изолейцина (I), лейцина (L), метионина (M), фенилаланина (F), триптофана (W), цистеина (C) аланина (A), тирозина (Y), гистидина (H), треонина (T), серина (S), пролина (P), глицина (G), аргинина (R) и лизина (K); **«полярные»** аминокислоты выбраны из группы, состоящей из аргинина (R), лизина (K), аспарагиновой кислоты (D), глутаминовой кислоты (E), аспарагина (N), глутамина (Q); **«положительно заряженные»** аминокислоты выбраны из группы, состоящей из аргинина (R), лизина (K) и гистидина (H), и **«кислые»** аминокислоты выбраны из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты (D), аспарагина (N), глутаминовой кислоты (E) и глутамина (Q).

Варианты полипептидов согласно изобретению могут обладать по меньшей мере 80% сходством или идентичностью последовательностей, часто по меньшей мере 85% сходством или идентичностью последовательностей, 90% сходством или идентичностью последовательностей или по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% сходством или идентичностью последовательностей на уровне аминокислот с представляющим интерес белком, таким как различные полипептиды согласно изобретению.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген во второй последовательности нуклеиновой кислоты, содержащийся в наборе согласно изобретению, может быть фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами для HDR в сайте встраивания.

В некоторых дополнительных конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген во второй последовательности нуклеиновой кислоты из набора согласно изобретению может быть функционально связан с любым из полоспецифичного промотора, эмбрионально-специфичного промотора и индуцибельного промотора.

В некоторых дополнительных альтернативных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген может быть встроен по меньшей мере в один сайт на половой Z-хромосоме. В более конкретных вариантах осуществления определенные локусы на Z-хромосоме могут представлять собой любую из областей 9156874-9161874, обозначенной SEQ ID NO:15, 27764943-27769943, обозначенной SEQ ID NO:16, 42172748-42177748, обозначенной SEQ ID NO:17, 63363656-63368656, обозначенной SEQ ID NO:18 и 78777477-78782477, обозначенной SEQ ID NO:19, Z-хромосомы самки курицы.

В некоторых конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген может быть встроен по меньшей мере в один сайт в локусе 42172748-42177748 половой Z-хромосомы. Неограничивающие примеры первой последовательности нуклеиновой кислоты из набора согласно изобретению могут содержать гРНК, представляющую собой по меньшей мере одну из гРНК7 локуса chrZ_42174515_-1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты GTAATACAGAGCTAAACCAG, также обозначенную SEQ ID NO: 26. Более конкретно, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 31, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты,

обозначенную SEQ ID NO: 32, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК7 с SEQ ID NO: 26.

Таким образом, в более конкретных вариантах осуществления первая последовательность нуклеиновой кислоты из набора согласно изобретению может содержать гРНК, представляющую собой по меньшей мере одну из гРНК3: ACAGACCTATGATATGT, обозначенной SEQ ID NO: 11; гРНК4: CGATTATCACTCACAAG, обозначенной SEQ ID NO: 12; гРНК5: CTGGTTAGCATGGGGAC, обозначенной SEQ ID NO: 13; гРНК6: GTAAAGAGTCAGATACA, обозначенной SEQ ID NO: 14.

10 В дополнительных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся во второй последовательности нуклеиновой кислоты из набора согласно изобретению, может быть фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную любой из SEQ ID NO: 15 41-48. Более конкретно, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 41, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 42, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК3 с SEQ ID NO: 11. В дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 43, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 44, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК4 с SEQ ID NO: 12. В других дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 45, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 46, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК5 с SEQ ID NO: 13. В некоторых дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 47, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты,

обозначенную SEQ ID NO: 48, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК6 с SEQ ID NO: 14.

5 Дополнительные неограничивающие примеры первой последовательности нуклеиновой кислоты из набора согласно изобретению могут включать гРНК, представляющую собой по меньшей мере одну из гРНК8 локуса chrZ_9157091_1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты ACAGACCTATGATATGTGAG, также обозначенную SEQ ID NO: 27, гРНК9 локуса chrZ_27767602_-1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты GAGCTTGTGAGTGATAATCG, также
10 обозначенную SEQ ID NO: 28, гРНК10 локуса chrZ_78779927_1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты GTAAAGAGTCAGATACACAG, также обозначенную SEQ ID NO: 29, и гРНК11 локуса chrZ_63364946_-1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты CAGTGGGТАCTGAAGCTGTG, также обозначенную SEQ ID NO: 30.

15 В дополнительных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся во второй последовательности нуклеиновой кислоты из набора согласно изобретению, может быть фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную любой из SEQ ID NO: 20 31-40. Более конкретно, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 33, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 34, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы,
25 управляемого гРНК8 с SEQ ID NO: 27. В других дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 35, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 36, для встраивания
30 репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК9 с SEQ ID NO: 28. В дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 37, и правое плечо, содержащее последовательность
35 нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 38, для встраивания репортерного гена

согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК10 с SEQ ID NO: 29. В еще одном дополнительном варианте осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 39, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 40, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК11 с SEQ ID NO: 30.

В отдельных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген, предложенный в наборах согласно изобретению, может быть встроен по меньшей мере в одну некодирующую область половой хромосомы, в частности, в W-хромосомы. В таком случае первая последовательность нуклеиновой кислоты из набора согласно изобретению может кодировать по меньшей мере одну гРНК, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную любой из SEQ ID NO: 1 и 2, также называемую в настоящей заявке соответственно gRNA1 и gRNA2.

В некоторых конкретных вариантах осуществления первая последовательность нуклеиновой кислоты из набора согласно изобретению может содержать гРНК, представляющую собой гРНК1. В некоторых вариантах осуществления такая гРНК1 может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 1. В таком случае репортерный ген, содержащийся в указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты из набора согласно изобретению, может быть фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 4 и 5.

В некоторых дополнительных альтернативных вариантах осуществления набор согласно изобретению может содержать в первой содержащейся в нем последовательности нуклеиновой кислоты последовательность, кодирующую гРНК2. В некоторых конкретных вариантах осуществления такая последовательность кодирует последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 2. В некоторых дополнительных вариантах осуществления по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся во второй последовательности нуклеиновой кислоты из набора согласно изобретению, может быть фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 6 и 7.

В некоторых вариантах осуществления репортерный ген, содержащийся во второй последовательности нуклеиновой кислоты из набора согласно изобретению, может представлять собой по меньшей мере один флуоресцентный репортерный ген. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления репортерный ген, предложенный в наборе согласно изобретению, может представлять собой любой флуоресцентный белок, в частности, RFP, YFP и любой из флуоресцентных белков, раскрытых в изобретении, или любой из флуоресцентных белков, раскрытых в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления репортерный ген, используемый в наборах согласно изобретению, может представлять собой любой флуоресцентный белок, при условии, что указанный флуоресцентный белок не является зеленым флуоресцентным белком (GFP). Другими словами, в некоторых конкретных вариантах осуществления репортерный ген, встроенный в половую хромосому трансгенного животного, предложенного в наборе согласно изобретению, может представлять собой любой флуоресцентный белок, при условии, что указанный флуоресцентный белок не является GFP. В некоторых дополнительных вариантах осуществления репортерный ген может представлять собой RFP. В более конкретных вариантах осуществления такой RFP может содержать аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO: 21, или любые ее гомологи, варианты, мутанты или производные. В некоторых альтернативных конкретных вариантах осуществления RFP, используемый в изобретении, может представлять собой RFP, который может содержать аминокислотную последовательность, обозначенную SEQ ID NO: 23, или любые ее гомологи, мутанты или производные.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления набор согласно изобретению может быть пригоден для применения при получении трансгенной птицы, содержащей по меньшей мере один экзогенный репортерный ген, встроенный по меньшей мере в одно положение или местоположение на по меньшей мере одной из половы Z- и W-хромосом.

В некоторых вариантах осуществления в способе согласно изобретению может быть использован любой из наборов согласно изобретению, как описано в настоящей заявке.

Кроме того, следует принимать во внимание, что наборы согласно изобретению могут дополнительно содержать любой реагент, буфер, среду или материал, необходимые для получения трансгенных птиц согласно изобретению. Набор согласно изобретению может дополнительно содержать инструкции, а также контейнеры для различных его компонентов.

В некоторых вариантах осуществления наборы согласно изобретению могут быть использованы для получения любой из трансгенных птиц согласно изобретению, или любой их клетки согласно изобретению. В некоторых дополнительных вариантах осуществления трансгенные птицы и клетки, полученные с использованием наборов согласно изобретению, могут быть использованы в любом из способов согласно изобретению, с использованием любой из систем и устройств, раскрытых в настоящей заявке. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления набор согласно изобретению может дополнительно содержать любое приспособление, систему и/или устройство, приспособленные для определения наличия репортерного гена в эмбрионе *in ovo*, исследованном способами согласно изобретению. В некоторых конкретных вариантах осуществления такое приспособление или устройство может представлять собой любое из устройств, раскрытых в изобретении, в частности, показанных на фиг. 1.

В еще одном аспекте изобретения предложена система, приспособление или устройство, специально приспособленные для обнаружения репортерного гена в эмбрионе *in ovo*. В некоторых вариантах осуществления устройство согласно изобретению может содержать источник лазерного излучения, подставку для яйца, линзу, фильтр, подставку для детектора и детектор. Устройство согласно изобретению может, в некоторых вариантах осуществления, необязательно содержать твердую основу, удерживающую все элементы системы согласно изобретению, например, как показано на фиг. 1. В контексте настоящей заявки термин «детектор» относится к любому типу устройства, которое обнаруживает и/или измеряет свет.

В некоторых вариантах осуществления следует отметить, что обнаружимый сигнал, в частности, флуоресцентный сигнал, может быть обнаружен с помощью устройства согласно изобретению с использованием подходящих флуоресцентных средств. В некоторых вариантах осуществления обнаружимый сигнал, формируемый репортерным геном RFP, может быть обнаружен с помощью чувствительного к свету приспособления, такого как модифицированные оптические микроскопы или прибор с зарядовой связью (CCD), высокочувствительный фотонный детектор.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления устройство, приспособление или система согласно изобретению могут содержать по меньшей мере один источник света, по меньшей мере один детектор, по меньшей мере один фильтр и по меньшей мере одно удерживающее устройство, устанавливающее яйцо в необходимом положении, облегчающем воздействие на клетки, экспрессирующие репортерный ген согласно

изобретению, указанным источником света. В некоторых вариантах осуществления такое яйцо может представлять собой оплодотворенное невыведенное птичье яйцо. В некоторых дополнительных вариантах осуществления такое яйцо может быть снесено любой из трансгенных птиц согласно изобретению. В некоторых частных и неограничивающих вариантах осуществления такое устройство согласно изобретению может быть таким, как показано на фиг. 1. В некоторых дополнительных вариантах осуществления расстояние между держателем для яйца и линзой и/или линзой и детектором может составлять приблизительно от 1 до 100 см, в частности, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 и 100 см, в частности, от приблизительно 5 до 25 см, более конкретно, приблизительно 20 см.

Следовательно, следует принимать во внимание, что в некоторых вариантах осуществления система или устройство согласно изобретению могут быть приспособлены для осуществления любого из способов, раскрытых в изобретении.

В некоторых конкретных вариантах осуществления устройство согласно изобретению может содержать подходящий источник света, позволяющий проводить обнаружение репортерного гена в исследуемом яйце. В некоторых дополнительных вариантах осуществления источник света может включать длину волны от приблизительно 400 до приблизительно 650. В некоторых дополнительных вариантах осуществления может быть использован свет любой длины волны при условии, что указанный источник света не является ультрафиолетовым (УФ) излучением (длина волны 10-400 нм).

В отдельном конкретном варианте осуществления подходящий источник света подходит для возбуждения флуоресцентного белка. В некоторых частных вариантах осуществления длина волны возбуждения может составлять от приблизительно 500 нм до приблизительно 650 нм. В некоторых дополнительных вариантах осуществления длина волны возбуждения составляет приблизительно 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640 нм.

В отдельном более конкретном варианте осуществления длина волны возбуждения может составлять от приблизительно 515 до приблизительно 555. В некоторых дополнительных вариантах осуществления длина волны может составлять 532 нм. В отдельном конкретном и неограничивающем варианте осуществления источник света может быть обеспечен лазером. В некоторых других вариантах осуществления лазер в составе устройства согласно изобретению может представлять собой синий лазер или красный лазер. В более конкретных вариантах осуществления источник света представляет собой зеленый лазер.

В отдельных вариантах осуществления лазер может быть снабжен фильтром. В некоторых вариантах осуществления фильтр может представлять собой зеленый фильтр, который

пропускающий выше 500 нм, или темно-зеленый фильтр, пропускающий между 540 нм и 580 нм, или красный фильтр, пропускающий между 590 нм и 650 нм, или красный фильтр, пропускающий выше 650 нм или выше 660 нм.

- 5 В некоторых частных вариантах осуществления источник света может представлять собой зеленый лазер с длиной волны 532 нм. В некоторых дополнительных вариантах осуществления такой лазер может быть снабжен красным фильтром, пропускающим выше 650 нм.
- 10 Следовательно, следует также принимать во внимание, что изобретение дополнительно охватывает устройство, как описано в настоящей заявке, для применения в любом из способов согласно изобретению, в частности, в способах определения пола *in ovo*, как обсуждается в настоящей заявке, с использованием любых трансгенных птиц согласно изобретению.
- 15 Следует принимать во внимание, что в отдельных вариантах осуществления олигонуклеотид(ы) или полинуклеотид(ы), используемые в наборе(ах) и способе(ах) согласно изобретению, представляют собой выделенные и/или очищенные молекулы. В контексте настоящей заявки «**выделенный**» или «**очищенный**» применительно к нуклеиновой кислоте означает, что встречающаяся в природе последовательность была удалена из ее нормального клеточного (например, хромосомного) окружения, или она была синтезирована в неприродных условиях (например, искусственно синтезирована). Таким образом, «выделенная» или «очищенная» последовательность может находиться в бесклеточном растворе или может быть помещена в другое клеточное окружение. Термин «очищенный» означает не то, что последовательность является единственным присутствующим нуклеотидом, а то, что она по существу не содержит (приблизительно 90-25 95% чистота) ненуклеотидного материала, связанного с ней в природных условиях, и, следовательно, отличается от выделенных хромосом.

30 Все научные и технические термины, использованные в настоящей заявке, имеют значения, обычно используемые в данной области техники, если не указано иное. Определения, приведенные в настоящей заявке, предназначены для облегчения понимания некоторых терминов, часто используемых в настоящей заявке, и не подразумевают ограничение объема настоящего изобретения.

Перед подробным описанием конкретных аспектов и вариантов осуществления изобретения необходимо иметь в виду, что данное изобретение не ограничивается конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Также следует понимать, что употребляемая в
5 настоящей заявке терминология предназначена исключительно для описания частных вариантов осуществления и не подразумевает ограничительный характер, так как объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Используемые в данном описании и прилагаемой формуле изобретения формы
10 единственного числа включают множественное число, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, упоминание «способа» включает в себя один или более способов, и/или стадий описанного в настоящей заявке типа, и/или которые будут очевидны специалистам в данной области техники после прочтения данного описания, и так далее.

15 Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в настоящей заявке, имеют значения, совпадающие с общепринятыми среди специалистов в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя для реализации или испытаний настоящего изобретения могут быть использованы любые методы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящей заявке, далее описаны предпочтительные
20 методы и материалы.

Во всем тексте описания и нижеследующей формулы изобретения, если контекст явно не требует иного, слово «содержать» и его вариации, такие как «содержит» и «содержащий», будут подразумевать включение указанного целого числа или стадии, или группы целых
25 чисел или стадий, но не исключая любое другое целое число или стадию, или группу целых чисел или стадий. Более конкретно, термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеющий» и их сочетания означают «включая, но не ограничиваясь перечисленным». Этот термин охватывает термины «состоящий из» и «по существу состоящий из». Фраза «по существу состоящий из» означает, что композиция или способ
30 могут включать дополнительные ингредиенты и/или стадии, но только если эти дополнительные ингредиенты и/или стадии по существу не изменяют основные и новые характеристики заявленной композиции или способа.

Термин «около» в контексте настоящей заявки означает значения, которые могут
35 отклоняться вплоть до 1%, в частности, вплоть до 5%, в частности, вплоть до 10%, в

частности, вплоть до 15%, а в некоторых случаях вплоть до 20% вверх или вниз от указанного значения, где диапазон отклонения включает целочисленные значения, и, если применимо, также нецелые значения, составляющие непрерывный диапазон. В контексте настоящей заявки термин «около» относится к $\pm 10\%$.

5

Следует отметить, что различные варианты осуществления данного изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона приводится просто для удобства и краткости и не должно истолковываться как жесткое ограничение объема изобретения. Соответственно, описание диапазона следует

10 рассматривать как конкретно раскрывающее все возможные поддиапазоны, а также отдельные численные значения в этом диапазоне. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует рассматривать как специально раскрывающее поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельные числа в этом диапазоне, например, 1, 2, 3, 4, 5 и 6. Это применимо вне зависимости от

15 ширины диапазона. Всякий раз, когда в настоящей заявке указывается числовой диапазон, подразумевается, что он включает любое упомянутое число (дробное или целое) в рамках указанного диапазона. Фразы «составляющий/составляет между» первым указанным числом и вторым указанным числом, и «составляющий/составляет от» первого указанного числа «до» второго указанного числа в настоящей заявке используются взаимозаменяемо и

20 подразумевается, что они включают первое и второе указанные числа, а также все дробные и целые числа между ними.

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как реализовывать и применять способы и композиции согласно изобретению, и не подразумевают ограничение того, что

25 авторы рассматривают в качестве созданного ими изобретения. Были предприняты меры для соблюдения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т. д.), однако следует учитывать наличие некоторых экспериментальных ошибок и отклонений. Если не указано иное, части являются массовыми частями, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура

30 приведена в градусах Цельсия, и давление равно или близко к атмосферному.

Приведенные примеры иллюстрируют методики, использованные авторами при реализации аспектов настоящего изобретения. Следует принимать во внимание, что, хотя эти методики являются примерами предпочтительных вариантов осуществления для

35 реализации изобретения, специалистам в данной области техники в свете настоящего

раскрытия будет ясно, что без отклонения от сущности и предполагаемого объема изобретения может быть сделано множество модификаций.

5 Следует принимать во внимание, что отдельные признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть представлены по отдельности или в любой подходящей подкомбинации, или как того требует любой другой описанный вариант осуществления изобретения. Отдельные признаки, описанные в контексте различных вариантов осуществления, не следует считать существенными признаками этих вариантов осуществления, при условии, что этот вариант осуществления не является нерабочим в отсутствие этих элементов.

15 Различные варианты осуществления и аспекты настоящего изобретения, как определено выше в настоящей заявке и как заявлено в приведенном ниже разделе формулы изобретения, экспериментально подтверждены в следующих примерах.

20 Следует понимать, что данное раскрытое и описанное изобретение не ограничено конкретными примерами, стадиями способов и композициями, раскрытыми в настоящей заявке, поскольку такие стадии способов и композиции могут до некоторой степени различаться. Также следует понимать, что используемая в настоящей заявке терминология предназначена исключительно для описания частных вариантов осуществления и не подразумевает ограничительный характер, так как объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

25 Необходимо отметить, что в контексте данного описания и прилагаемой формулы изобретения формы единственного числа включают множественное число, если из контекста явно не следует иное.

ПРИМЕРЫ

Без дальнейших уточнений можно полагать, что специалист в данной области техники способен использовать настоящее изобретение в полном его объеме, основываясь на вышеприведенном описании. Следовательно, следующие предпочтительные конкретные варианты осуществления следует толковать как носящие лишь иллюстративный характер и никоим образом не подразумевающие ограничение объема заявленного изобретения.

Стандартные протоколы молекулярной биологии, известные в данной области техники, не описанные конкретно в настоящей заявке, в целом осуществляют, как описано в Sambrook et al., *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New-York (1989,1992), и в Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1988).

Реагенты

Животные:
Куры породы для коммерческого разведения White Leghorn были получены от Hendrix ISA и из Миннесоты.
Куры с маркерными генами были получены из Тихоокеанского агропродовольственного исследовательского центра, Агассис, Британская Колумбия, Канада.

Эксперименты на животных проводили в строгом соответствии с утвержденными IACUC (Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию) протоколами и под надзором комитета Crystal Bioscience IACUC, гарантирующего, что в ходе экспериментов ни одно животное не будет страдать от заболевания и не умрет.

Векторы:

Векторная система PrecisionX™ Cas9 SmartNuclease была заказана у System Bioscience Inc., каталожный номер CAS8/серия 9xx.
pDsRed1-N1 от Clontech#6921-1.
Плазмида GFP-FUGW-H1-GFP-неомицин (Addgene), каталожный номер 37632.

Линии клеток: женские клетки принадлежали виду *Gallus gallus*, женская линия лимфоцитов Con A - C1 – VICK была заказана у ATCC®, номер: CRL-12135™. Для эксперимента в культуре куриных клеток использовали линию женских куриных

фибробластов **UMNSAH/DF-1 (ATCC® CRL-12203™)** от ATCC. Мужские клетки принадлежали виду *Gallus gallus*, мужская линия эпителиальных клеток LMH/2A была заказана у ATCC®, номер: CRL-2118™.

Линия примордиальных зародышевых клеток (ПЗК).

- 5 линия клеток из эмбриональных почек человека 293 (HEK-293) (ATTC).

Реагенты и материалы, необходимые для получения трансгенных птиц

Выделение ПЗК

1. Вытягиватель микроэлектродных пипеток (Shutter Instrument Co.).
- 10 2. Микрошлифовальная машина (NARISHIGE).
3. Стеклопипетка малого диаметра (25 мкм).
4. Пипетка со шлангом для всасывания ртом (Sigma-Aldrich).
5. 1х сбалансированный солевой раствор Хенкса (HBSS) без CaCl₂ или MgCl₂ (Hyclone, Логан, Юта).
- 15 6. 1х фосфатно-солевой буфер Дульбекко (PBS), без Ca²⁺ или Mg²⁺ (Hyclone).
7. Трипсин/этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) (Gibco).
8. Куриные эмбрионы на 14–17 стадиях по Гамбургеру и Гамильтону (Hamburger and Hamilton, NH).
9. Буфер для магнитно-активированной сортировки клеток (MACS). 1х PBS с добавками
- 20 0,5% бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 2 мМ EDTA.
10. Колонка MiniMACS (Miltenyi Biotec).
11. Антитело к стадиеспецифичному эмбриональному антигену 1 (SSEA-1) (Santa Cruz Biotechnology, Санта-Круз, Калифорния).
12. Микрогранулы, покрытые антимышиным IgM (Miltenyi Biotec).

25

Культивирование ПЗК

1. PBS (Hyclone).
2. HBSS (Hyclone).
3. Культуральная среда для ПЗК (50 мл). 3,75 мл фетальной бычьей сыворотки (FBS,
- 30 Hyclone), 1,25 мл куриной сыворотки (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури), 500 мкл добавки GlutaMAX-I (100х, Invitrogen), 500 мкл нуклеозидов (100х, Millipore), 500 мкл антибиотика/фугицида (ABAM; 100х, Invitrogen), 500 мкл добавки инсулин-трансферрин-селен (100х, Gibco), 500 мкл заменимых аминокислот (NEAA; 100х, Invitrogen), 50 мкл β-меркаптоэтанола (1000х, Sigma-Aldrich), 10 мкл человеческого основного фактора роста

фибробластов в концентрации 50 нг/мкл (bFGF, Sigma-Aldrich), и добавить среду Игла в модификации Дульбекко Knockout (DMEM; Invitrogen) до 50 мл. Хранить при 4 °С.

4. Accutase (Millipore).

5 **Получение и трансгенез химерной зародышевой линии**

Перенос генов в куриные ПЗК

1. Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

2. Среда Opti-MEM (Invitrogen).

3. Среда для трансфекции (культуральная среда PGC без АВАМ; 50 мл): 3,75 мл FBS (Hyclone), 1,25 мл куриной сыворотки (Sigma-Aldrich), 500 мкл добавки GlutaMAX-I (100х, Invitrogen), 500 мкл нуклеозидов (100х, Millipore), 500 мкл добавки инсулин-трансферрин-селен (100х, Gibco), 500 мкл NEAA (100х, Invitrogen), 50 мкл β-меркаптоэтанола (1000 х, Sigma-Aldrich) и 10 мкл bFGF при 50 нг/мкл (Sigma-Aldrich), и добавить DMEM Knockout (Invitrogen) до 50 мл. Хранить при 4 °С.

15 4. PBS, без Ca² или Mg².

5. HBSS, без Ca² или Mg².

6. Получить плазмидную ДНК в концентрации 1 мкг/мкл.

Пролиферация и отбор трансгенных ПЗК in vitro

1. HBSS, без Ca² или Mg² (Hyclone).

20 2. Гемоцитометр.

3. Трипановый синий, 0,4% (Invitrogen).

4. Инвертированный флуоресцентный микроскоп (Leica Microsystems).

5. Селективный антибиотик Geneticin® (Gibco).

Трансплантация ПЗК в яйца-реципиенты

25 1. Стеклопипетка малого диаметра (25 мкм) (изготовленная с помощью вытягивателя микроэлектродных пипеток (Shutter Instrument Co.) и микрошлифовальной машины (NARISHIGE).

2. Пипетка со шлангом для всасывания ртом.

3. HBSS, без CaCl₂ или MgCl₂ (Hyclone).

30 4. Куриные эмбрионы-реципиенты на 14-17 стадиях по НН.

5. PBS, без Ca² или Mg² (Hyclone).

6. Промывочный раствор для пипеток. 0,1% перекись водорода (Sigma-Aldrich) в стерилизованной в автоклаве дистиллированной воде.

7. Пинцет.

35 8. Стереомикроскоп с источником света.

9. Карандаши термокля и клеевой пистолет.

10. Парафильм.

11. Донорские ПЗК, приготовленные в концентрации 3×10^3 клеток/мкл в HBSS.

Анализирующее скрещивание

- 5
1. Самка курицы Korean Ogye (КО) дикого типа.
 2. Шприц на 1 мл.
 3. PBS, без Ca² или Mg² (Hyclone).

Проверка потомства от донора и трансгенных кур

- 10
1. Набор DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen).
 2. Набор праймеров, специфичных к донорским ПЗК.
 3. Набор праймеров, специфичных к трансгенам.
 4. ПЦР-машина.
 5. Реагенты для ПЦР: буфер для ПЦР, dNTP, Taq-полимераза.
- 15
6. Агароза.
 7. Буфер TAE.
 8. Аппарат для электрофореза.

Методики экспериментов

20

Анализ флуоресценции

В полностью собранном виде эксперимент включает источник лазерного излучения, держатель или подставку, позволяющие установить яйцо в необходимом положении, обеспечивая возможность воздействия на клетки, экспрессирующие репортерный ген в

25

яйце, указанным источником света, линзу, фильтр, подставку для детектора и детектор, как показано на **фиг. 1**. Расстояние между образцом и линзой, а также между линзой и детектором составляет приблизительно 20 см. Фокальная плоскость линзы составляет приблизительно 10 см, и на ней размещен фильтр.

Оптимальные условия были обнаружены путем размещения фильтра перед детектором и

30

укрывания всей площади вокруг детектора, чтобы предотвратить прохождение рассеянного света мимо фильтра.

Использовали три типа лазеров с начальной мощностью I_0 , и фильтры, как указано в следующей **таблице 2**:

35 **Таблица 2:** используемый источник света:

Тип лазера (длина волны)	Мощность [Вт]	Фильтры
Синий лазер (473±1 нм)	$I_o = 17,3 \text{ мВт}$	выше 500 нм
Зеленый лазер (532 нм)	$I_o = 3,9 \text{ мВт}$	540 нм-580 нм
Красный лазер (632,8 нм)	$I_o = 3,3 \text{ мВт}$	выше 660 нм

Иньекция в яйца трансфицированных клеток, экспрессирующих GFP или RFP

Клетки НЕК поддерживали в среде DMEM с добавками 1% L-глутамин, 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% PenStrep (пенициллин + стрептомицин) (Biological industries, Израиль). Клетки выращивали в увлажненном инкубаторе при 37 °C с 5% CO₂. Среду обновляли 2-3 раза в неделю, и количество клеток поддерживали в диапазоне от 1 x 10⁵ до 3 x 10⁵ клеток/мл. Клетки пересеивали и повторно суспендировали в свежей среде следующим образом:

1. Из колбы удаляли супернатант, чтобы клетки прикрепилась к поверхности колбы.
2. Отделенные клетки повторно суспендировали в 5 мл свежей среды.

После второго посева клетки трансфицировали 2 мкг ДНК плазмиды с использованием реагента для трансфекции ДНК *in vitro* PolyJet™ (SignaGen Laboratories, Мэриленд, США) в соответствии с инструкциями производителя. Две плазмиды по отдельности трансфицировали в клетки – плазмиду с GFP и плазмиду с RFP, как указано выше.

- Затем трансфицированные клетки (RFP) готовили в концентрации 10⁶ клеток/мл. Затем в общей сложности 100 мкл клеток инъецировали в центр свежего куриного яйца, в соответствии с таблицами 3 и 4.

Таблица 3: инъекция RFP

Номер яйца	Состояние яйца	Солевой раствор (мкл)	Линия клеток (мкл), млн клеток/мкл	Линия клеток после трансфекции GFP или RFP
1.	Без обработки	0	0	-----
2.	Небольшое отверстие сверху	100	0	0,1 мл солевого раствора
11.	Небольшое отверстие сверху	97	3	3000 клеток + RFP
12.	Небольшое отверстие сверху	97	3	3000 клеток + RFP
13.	Небольшое отверстие сверху	90	10	10000 клеток + RFP
14.	Небольшое отверстие сверху	90	10	10000 клеток + RFP
15.	Небольшое отверстие сверху	70	30	30000 клеток + RFP
16.	Небольшое отверстие сверху	70	30	30000 клеток + RFP
17.	Небольшое отверстие сверху	0	100	100000 клеток + RFP

18.	Небольшое отверстие сверху	0	100	100000 клеток + RFP
-----	----------------------------------	---	-----	---------------------

Во втором эксперименте клетки выращивали и трансфицировали, как описано ранее. Затем клетки переносили либо в PBS, либо в 50% глицерин (для контроля распределения) и инъецировали в центр свежего куриного яйца. Разные инъецированные яйца описаны в

5 **таблице 4.**

Таблица 4: инъекция RFP или GFP

Номер яйца	Состояние яйца	PBS (мкл) или 50% глицерин	Линия клеток (мкл), 1 млн клеток/мкл	Линия клеток после трансфекции GFP или RFP
1.	Без обработки	0		Контроль - НЕ трансфицированные
2.	Небольшое отверстие сверху	100	0	0,2 мл PBS
3.	Небольшое отверстие сверху	100	0	0,2 мл 50% глицерина
4.	Небольшое отверстие сверху	99	1	1000 клеток в PBS
5.	Небольшое отверстие сверху	99	1	1000 клеток в 50% глицерине
6.	Небольшое отверстие сверху	97	3	3000 клеток в PBS
7.	Небольшое отверстие сверху	97	3	3000 клеток в 50% глицерине
8.	Небольшое отверстие сверху	90	10	10000 клеток в PBS
9.	Небольшое отверстие сверху	90	10	10000 клеток в 50% глицерине
10.	Небольшое отверстие сверху	70	30	30000 клеток в PBS

11.	Небольшое отверстие сверху	70	30	30000 клеток в 50% глицерине
12.	Небольшое отверстие сверху	99	1	1000 клеток в PBS
13.	Небольшое отверстие сверху	99	1	1000 клеток в 50% глицерине
14.	Небольшое отверстие сверху	97	3	3000 клеток в PBS
15.	Небольшое отверстие сверху	97	3	3000 клеток в 50% глицерине
16.	Небольшое отверстие сверху	90	10	10000 клеток в PBS
17.	Небольшое отверстие сверху	90	10	10000 клеток в 50% глицерине
18.	Небольшое отверстие сверху	70	30	30000 клеток в PBS
19.	Небольшое отверстие сверху	70	30	30000 клеток в 50% глицерине

Линия мужских куриных клеток

Мужские клетки, а именно, *Gallus gallus*, курица (клетки печени; химически индуцированные; трансфицированные геном куриного эстрогенового рецептора),
5 выращивали в среде MB 752/1 Уэймота (Waymouth) с добавками 1% L-глутамина, 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% PenStrep (пенициллин + стрептомицин) (Biological industries, Израиль). Колбу для культивирования (T25) покрывали 0,1% желатином). Среду обновляли раз в 3 дня. Клетки выращивали в увлажненном инкубаторе при 37 °C с 5% CO₂.

Линия женских куриных клеток

Использовали линию женских куриных фибробластов **UMNSAH/DF-1 (ATCC® CRL-12203™)** от ATCC. Более подробная информация о клетках представлена в таблице 5:

5

Таблица 5: линия женских куриных клеток

Организм	<i>Gallus Gallus</i> , курица	Женские клетки
Тип клеток	спонтанно трансформированные фибробласты	
Форма продукта	замороженный	
Морфология	фибробласт	
Свойства культуры	прикрепляющаяся	
Возраст	10 дней созревания	
Пол	женский	

10 выращивали в среде DMEM с добавками 1% L-глутамина, 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% PenStrep (пенициллин + стрептомицин) (Biological industries, Израиль). Клетки выращивали в увлажненном инкубаторе при 37 °C с 5% CO₂. Среду обновляли 2-3 раза в неделю.

Культура ПЗК

15 Эмбриональные гонады извлекают из эмбрионов White Leghorn (WL) через 6,5 дней инкубации, и затем извлеченные гонадные клетки подвергают обработке в магнитно-активированным сортировщике клеток (MACS) для отделения ПЗК от общей массы эмбриональных гонадных клеток. ПЗК выращивают в KO-DMEM (Life Technologies), 40% которой предварительно выдерживают на клетках печени крыс линии Buffalo (BRL, ATCC),
 20 и добавляют 7,5% фетальную бычью сыворотку (Hyclone), 2,5% облученную куриную сыворотку, 1X заменимые аминокислоты, 2 мМ глутамина, 1 мМ пирувата натрия, 0,1 мМ β-меркаптоэтанола (все от Life Technologies), 4 нг/мл человеческого рекомбинантного фактора роста фибробластов, 6 нг/мл мышинового рекомбинантного фактора стволовых клеток (оба от R&D Systems), и выращивают на облученных питательных слоях клеток
 25 BRL. Клетки пассируют 3 раза в неделю на свежие питательные слои.

Клонирование без использования ферментов рестрикции (RF)

Встраивание гРНК в вектор Cas9-SmartNuclease™ выполняют методом клонирования без использования ферментов рестрикции [Peleg Y et al., J. Struct. Biol. 172(1):34-44 (2010) 2010]. Праймеры были заказаны у Sigma-Genosys (Реховот, Израиль), а последующие RF-
 30 взаимодействия проводили с использованием полимеразы Phusion (Thermo Scientific, Хадсон, Нью-Гэмпшир, США). Очистку плазмиды проводят с использованием набора

MEGAspin и набора для очистки плазмидной ДНК DNA-spin, соответственно (Intron Biotechnology, Тэджон, Южная Корея).

Трансфекция в куриные W- или Z-хромосомы

Клетки совместно трансфицируют 2 мкг ДНК каждой плазмиды (подробное описание см. ниже) с использованием реагента для трансфекции ДНК in vitro PolyJet™ (SignaGen Laboratories, MD, США) в соответствии с инструкциями производителя. Совместную трансфекцию двух плазмид проводят следующим образом:

1. pDsRed с левым и правым плечами куриной Z-хромосомы или левым и правым плечами W-хромосомы, и CMV-hspCas9-H1-гРНК (анализ).
2. pCMVGluc с левым и правым плечами куриной Z-хромосомы или левым и правым плечами W-хромосомы, и CMV-hspCas9-H1-гРНК (контроль).

Затем клетки покрывают устойчивыми к неомицину и высевают в 48-луночный планшет с плотностью 10^5 клеток на лунку. Через 3 дня добавляют 40 мкг/мл неомицина для отбора клеток со стабильно встроенными репортерными генами.

ДНК-анализ встраивания в Z- или W-хромосому

Для проверки встраивания в хромосому использовали следующую стратегию. Клетки выделяли, и ДНК половины из них выделяли и анализировали на агаровом геле (1%). Геномную ДНК разрезали и очищали (оставляя плазмидную ДНК на геле). Проводили анализ методом ПЦР со следующими праймерами. Продукты разделяли на геле и затем секвенировали. Поскольку вставка была слишком длинной, чтобы ее можно было обнаружить методом ПЦР, был разработан метод ПЦР по типу скользящего окна, которое начинается с исходного продукта ПЦР.

а. Анализ для линии клеток со вставкой (включает часть левого плеча, энхансер, промотор CMV и MCS, и часть dsRED2):

Левый праймер-ТТGGTGTGTGСТААТАGGCAGT, обозначенный SEQ ID NO 49; правый праймер-TAGTCCTCGTTGTGGGAGGT, обозначенный SEQ ID NO 50, размер продукта: 1489 п. н.

б. Анализ для линии клеток со вставкой (включает часть фланкирующих частей (до плеч) Z-хромосомы, левое плечо и часть энхансера, промотора CMV):

Левый праймер-GCATTGATCTGTCCAGTTGC, обозначенный SEQ ID NO 51, правый праймер-TACTGCCAAAACCGCATCASC, обозначенный SEQ ID NO 52, размер продукта: 1462 п. н.

Получение трансгенных кур

Концентрированный носитель (который может представлять собой либо лентивирус с титром приблизительно 10^7 MOI, либо плазмидную ДНК) инъецируют 25 эмбрионам в свежеснесенных яйцах. Еженедельно осуществляют по три инъекции. Инъецированные эмбрионы вылупляются через 3 недели после инъекции. Эти птицы относятся к поколению G0. Сразу после вылупления извлекают ДНК из образцов САМ вылупившихся цыплят и проводят обнаружение наличия/отсутствия векторной ДНК методом полуколичественной ПЦР. У кур G0 в возрасте 2-3 недель берут образец крови и повторно проводят ПЦР-скрининг. Птиц G0 выращивают до достижения половой зрелости – 16-20 недель для самцов, 20-24 недели для самок. Петушков исследуют на образование спермы примерно с 16 недель.

Кур осеменяют, оплодотворенные яйца собирают ежедневно. Куры G1 вылупляются через 3 недели, и каждому отдельному цыпленку устанавливают крылометку, и из скорлупы берут образец хориоаллантаической мембраны (САМ) цыпленка. Извлекают ДНК из образцов САМ и проводят ПЦР-скрининг на наличие трансгена, который ожидается на уровне одной копии. Через 2-3 недели скрининг проводят повторно для подтверждения и определения пола цыплят по анализу ДНК из образца крови.

В возрасте нескольких недель у птиц G1 берут образец крови для получения геномной ДНК для анализа методом ПЦР. Птиц G1 используют для разведения G2.

20 **Выделение ПЗК**

1. Инкубировать свежие куриные яйца (стадия Х по ЕСК), например, Korean Ogye (КО), при 37 °С в течение 50–54 ч (14-17 стадия по НН) для выделения ПЗК крови. Положить инкубированные яйца горизонтально на подставку для яиц и осторожно протереть скорлупу яиц с помощью продезинфицированной хлопчатобумажной ткани с 70% этанолом.
- 25 2. Используя заостренный пинцет, осторожно сделать отверстие в яичной скорлупе (диаметром <1 см) для выделения клеток цельной крови.
3. Собрать приблизительно 2–3 мкл клеток цельной крови из спинной аорты эмбриона, используя тонко отшлифованную стеклянную иглу диаметром 25 мкм и пипетку со шлангом для всасывания ртом. Смешать с 500 мкл PBS. Для микроинъекции ПЗК можно использовать пипетку со шлангом для всасывания ртом и стеклянную микропипетку диаметром 20–25 мкм. Стеклянная микропипетка изготовлена с помощью вытягивателя микроэлектродных пипеток (Shutter Instrument Co.) и отшлифована при 25 градусах с помощью микрошлифовальной машины (NARISHIGE).
- 30 4. Перенести клетки цельной крови в стерильную пробирку объемом 1,5 мл, провести центрифугирование (250 x g, 5 мин) и удалить супернатант.
- 35

5. Для выделения гонадных ПЗК инкубировать свежие куриные яйца при 37 °С в течение 5,5 дней (НН 20–26). Извлечь эмбриональные гонады из эмбрионов на 20–26 стадиях по НН с помощью заостренного пинцета и инкубировать с 500 мкл 0,05% трипсина/EDTA в инкубаторе при 37 °С в течение 5 минут.
- 5 6. Добавить 50 мкл FBS для инактивации, провести центрифугирование (250 x g, 5 мин) и удалить супернатант.
7. Повторно суспендировать клетки цельной крови или диссоциированные гонадные клетки в 1 мл PBS и нанести антитело к SSEA-1 (Santa Cruz Biotechnology, SC-21702) в разведении 1:200, а затем инкубировать смесь в течение 15 минут при комнатной температуре (комн.
- 10 темп.).
8. Промыть клетки для удаления несвязанного первичного антитела, добавив 5 мл буфера MACS (0,5% BSA и 2 мМ EDTA в PBS, pH 7,2) в общей сложности на 10⁷ клеток и провести центрифугирование (250 x g, 5 мин).
9. Полностью аспирировать супернатант и повторно суспендировать клеточный осадок в 80
- 15 мкл буфера MACS в общей сложности на 10⁷ клеток.
10. Добавить 20 мкл микрогранул, покрытых крысиным анти-мышиним IgM (Miltenyi Biotec. 130-047-301), в общей сложности на 10⁷ клеток. Для большего числа клеток увеличить объем буфера соответствующим образом.
11. Инкубировать клетки с антителами при 2–8 °С в течение 20 мин.
- 20 12. Промыть клетки, добавив 2 мл буфера MACS в общей сложности на 10⁷ клеток, и провести центрифугирование (250 x g, 5 мин).
13. Полностью аспирировать супернатант и повторно суспендировать в общей сложности не более 10⁸ клеток в 500 мкл буфера MACS.
14. Поместить колонку в магнитное поле подходящего сепаратора MACS.
- 25 15. Подготовить колонку, проведя промывку 500 мкл буфера MACS.
16. Нанести клеточную суспензию на колонку и трижды промыть колонку 500 мкл буфера. Добавить новый буфер при опустошении емкости колонки.
17. Снять колонку с сепаратора и поместить ее на подходящую пробирку-сборник.
18. Добавить в колонку 1 мл буфера MACS и немедленно смыть магнитно-меченные
- 30 клетки, с усилием толкая поршень в колонку.
19. Перенести выделенные клетки, содержащие ПЗК, в предварительно подогретую культуральную среду для ПЗК (1 мл среды для ПЗК на 1 x 10⁵ очищенных ПЗК).

Культивирование ПЗК

1. Перенести выделенные клетки, содержащие ПЗК, в предварительно подогретую культуральную среду для ПЗК (1 мл среды для ПЗК на 1×10^5 очищенных ПЗК) и провести инкубирование при 37 °С.
2. Через 7–14 дней роста большинство первичных культивируемых ПЗК образуют колонии и утрачивают клеточные агрегаты.
3. Суспендированные колонии ПЗК могут быть осторожно извлечены со средой после осторожного переливания пипеткой и центрифугирования (200 x g, 5 мин).
4. Разбить клеточный осадок с помощью Accutase (1 мл раствора Accutase на приблизительно 5×10^5 ПЗК).
5. Провести центрифугирование (200 x g, 5 мин) и повторно суспендировать клеточный осадок в культуральной среде для ПЗК
6. Высеять суспендированные ПЗК в 12-луночный планшет (1 x 10^5 культивируемых ПЗК в 1 мл культуральной среды для ПЗК на лунку 12-луночного планшета).
7. ПЗК могут регулярно пересеваться каждые 3-4 дня.

15

Перенос генов в куриные ПЗК, получение химерной зародышевой линии и трансгенез

Перенос генов в куриные ПЗК

1. Смешать 4 мкг хелперной плазмиды, содержащей CAGG-PBase (pCyL43B), и 6 мкг транспозона piggyBac (pCyL50), содержащего репортерный ген (RFP) и, необязательно, маркер отбора (например, ген устойчивости к неомицину), со 100 мкл Opti-MEM (Gibco), и инкубировать в течение 5 мин при комнатной температуре. Для трансфекции с помощью CRISPR/Cas смешать 2,5 мкг плазмидного вектора экспрессии CMVRFPP, 2,5 мкг Cas9 и плазмидные векторы экспрессии гидовой РНК со 100 мкл Opti-MEM (Gibco), и инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре.
2. Смешать 10 мкл реагента Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher-Invitrogen) со 100 мкл Opti-MEM и инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре.
3. Смешать плазмиды с Opti-MEM и реагентом Lipofectamine 2000 и инкубировать в течение 20 минут при комнатной температуре.
4. Во время инкубации собрать культивируемые ПЗК и провести центрифугирование (200 x g, 5 мин). Отбросить супернатанты.
5. Добавить 1 мл Accutase (Millipore) к собранным ПЗК и инкубировать в течение 10 минут при 37 °С.
6. Определить количество ПЗК, используя гемоцитометр (Marienfeld), и высеять 5×10^5 ПЗК в 12-луночный планшет с 1 мл культуральной среды для ПЗК без антибиотиков.

30

7. Нанести на ПЗК комплекс ДНК-Lipofectamine и инкубировать в течение 1 дня при 37 °С в CO₂-инкубаторе.

8. Собрать трансфицированные ПЗК и провести центрифугирование (200 x g, 5 мин). Удалить супернатанты.

5 9. Трижды промыть ПЗК 1 мл HBSS и суспендировать их в культуральной среде для ПЗК с антибиотиками.

Пролиферация и отбор трансгенных ПЗК in vitro

1. Отобрать трансфицированные ПЗК из культуральной среды для ПЗК, содержащей 100 мкг/мл G418 (для гена устойчивости к неомицину), на следующий день после трансфекции.

10 2. Отслеживать экспрессию репортерного гена с помощью флуоресцентной микроскопии.

3. Проводить пересев ПЗК каждые 3-4 дня. Полный период отбора занимает до 3 недель.

4. Если в трансфицированных плазмидных векторах нет маркера чувствительности к лекарственному средству, ПЗК, экспрессирующие флуоресцентный белок, могут быть отобраны методом FACS.

15

Трансплантация ПЗК в яйца-реципиенты

1. Инкубировать яйца-реципиенты до 14–17 стадии по НН при 37 °С на воздухе при относительной влажности 60–70%.

20 2. Собрать трансфицированные ПЗК, провести центрифугирование (200 x g, 5 мин) и удалить супернатанты.

3. Добавить 1 мл Accutase (Millipore) к собранным ПЗК и инкубировать в течение 10 минут при 37 °С.

4. Провести центрифугирование (200 x g, 5 мин). Отбросить супернатанты.

5. Суспендировать ПЗК в HBSS (Hyclone).

25 6. Сделать небольшое окошко на заостренном конце яйца-реципиента и провести микроинъекцию аликвоты объемом 2 мкл, содержащей более 3000 ПЗК, в спинную аорту эмбриона-реципиента с помощью микропипетки.

30 7. Запечатать окошко в яйце эмбриона-реципиента парафильмом с помощью клеевого пистолета и инкубировать яйцо заостренным концом вниз до выведения при 37 °С на воздухе при относительной влажности 60–70%.

Отслеживание генетически модифицированных ПЗК в эмбриональных гонадах

1. Инкубировать яйца-реципиенты до 28–30 стадии по НН при 37 °С на воздухе при относительной влажности 60–70%.

2. Иссечь гонаду на 6 эмбриональный день.

3. Отслеживать экспрессию флуоресцентного белка в эмбриональных гонадах с помощью флуоресцентной микроскопии.

Анализирующее скрещивание

- 5 1. Дважды в течение 1 недели взять сперму у половозрелых реципиентов и кур дикого типа (WT).
2. Ввести 50 мкл спермы от зрелых самцов-реципиентов и петухов WT курам-несушкам WT и зрелым самкам-реципиентам, соответственно.
3. Собрать яйца у кур-несушек WT и зрелых самок-реципиентов на следующий день после искусственного осеменения, и инкубировать яйцо заостренным концом вниз до выведения
10 при 37 °C на воздухе при относительной влажности 60–70%.

ПРИМЕР 1***Флуоресцентный анализ с использованием лазеров различных цветов и фильтров для визуальной идентификации пола у домашней птицы***Оптическая флуоресцентная система

5 Чтобы продемонстрировать возможность визуальной идентификации пола домашней птицы *in ovo*, была проведена оценка использования репортерного гена с зеленой флуоресценцией по сравнению с репортерными генами с синей флуоресценцией или красной флуоресценцией.

10 Определяли собственную флуоресценцию цельных яиц или яиц, разделенных на яичный белок, яичный желток и скорлупу, с использованием синего лазера, зеленого лазера или красного лазера. Сравнение пустого яйца (скорлупы) с цельным яйцом свидетельствует об отсутствии существенной разницы в уровне собственной флуоресценции (данные не показаны).

15 Интенсивность рассеяния и собственной флуоресценции, обеспечиваемые различными компонентами и частями яйца, описаны в **таблице 6**.

Немаловажно, что было отмечено, что фоновый шум (без лазера) составлял приблизительно 4 нВт, в то время как в присутствии лазера (532 нм) он составлял приблизительно 12 нВт из-за рассеяния света, проходящего мимо фильтра (фильтр нижних частот, пропускающий выше 660 нм).

20

Таблица 6. Интенсивность рассеяния и собственной флуоресценции частей яйца с использованием 3 разных лазеров, индуцирующих флуоресценцию

Лазер	Интенсивность рассеяния			Интенсивность собственной флуоресценции		
	Пустой контейнер	Контейнер + яичный белок	Контейнер + яичный желток	Пустой контейнер	Контейнер + яичный белок	Контейнер + яичный желток
Синий лазер (473 ± 1 нм)	2 мВт	1,02 мВт	1,2 мВт	16,5 нВт	26,12 ± 6,25 нВт	10,33 ± 1,5 нВт
Зеленый лазер (532 нм)	370 мкВт	484 мкВт	415 мкВт	13,6 нВт	14,5 нВт	16 нВт

Красный лазер (632,8 нм)	300 мкВт	160 мкВт	156 мкВт	13 нВт	8,33±1,86 нВт	10,82±3,42 нВт
---------------------------------	----------	----------	----------	--------	---------------	----------------

Было проанализировано использование синего лазера (473 нм) вместе с зеленым (+500 нм) или красным фильтром (590-650 нм) с добавлением или без добавления различных концентраций флуоресцеина (1 мкМ, 10 мМ) в цельное яйцо, и результаты обобщены на **фиг. 2**. По-видимому, существует значительная собственная зеленая флуоресценция, однако интенсивность флуоресценции можно было обнаружить при использовании высокой концентрации флуоресцеина.

Было проанализировано использование зеленого лазера (532 нм) вместе с темно-зеленым (540-580 нм) или красным фильтром (+660 нм) с добавлением или без добавления родамина В (10 мкМ) в цельное яйцо, и результаты обобщены на **фиг. 3**. По-видимому, при мощности свыше 40 мВт флуоресцентное излучение красителя становится хорошо обнаружимым с зеленым фильтром (почти в 2 раза больше). Однако с красным фильтром никакой разницы не наблюдалось.

Было проанализировано использование зеленого лазера (532 нм) вместе с красным фильтром А (590-650 нм) или красным фильтром В (+660 нм) с добавлением или без добавления *dir* (10 мкМ) в цельное яйцо, и результаты обобщены на **фиг. 4**. По-видимому, при мощности свыше 80 мВт флуоресцентное излучение красителя становится обнаружимым при использовании красного фильтра А, тогда как при использовании красного фильтра В (+660 нм) наблюдается лишь небольшая разница.

Было проанализировано использование красного лазера (632,8 нм) вместе с красным фильтром (+660 нм) или зеленым фильтром (540-580 нм) с добавлением или без добавления *dir* (10 мкМ) в цельное яйцо, и результаты обобщены на **фиг. 5**. Различий в интенсивности при использовании флуоресцентного красителя или без него практически не наблюдалось. Все эксперименты повторяли с использованием только яичной скорлупы. Наблюдались аналогичные результаты (данные не показаны).

Эти наблюдения демонстрируют практическую возможность обнаружения RFP через яичную скорлупу.

ПРИМЕР 2

Флуоресценция клеток, трансфицированных RFP или GFP, в яйцах

Чтобы проиллюстрировать практическую возможность обнаружения RFP-экспрессирующих клеток в эмбрионе *in ovo*, авторы далее исследовали, можно ли обнаружить клетки, трансфицированные флуоресцентным белком, в частности, RFP или GFP, после их инъекции в цельное яйцо.

5

Более конкретно, клетки НЕК трансфицировали векторами с GFP или RFP, как описано в методиках экспериментов. Флуоресценцию клеток, трансфицированных GFP и трансфицированных RFP, исследовали после возбуждения. **Фиг. 6** (GFP) и **фиг. 7** (RFP) ясно демонстрируют, что как GFP, так и RFP экспрессируются трансфицированными

10

клетками, и можно наблюдать флуоресцентные сигналы. Затем трансфицированные клетки НЕК инъецировали в свежие яйца, как описано в методиках экспериментов, и оценивали интенсивность флуоресценции яиц.

15

Сначала была охарактеризована интенсивность флуоресценции яиц с RFP-экспрессирующими клетками или без них при возбуждении яиц зеленым лазером (532 нм) с красным фильтром, работающим в диапазоне +650 нм. На **фиг. 8** показано, что интенсивность флуоресценции яйца без RFP, измеренная **в пяти разных положениях яйца**, довольно схожа. На **фиг. 9** показана измеренная интенсивность флуоресценции с использованием различных концентраций RFP-экспрессирующих клеток при возбуждении

20

центра яйца. Отчетливо наблюдалась корреляция между концентрацией RFP и интенсивностью, регистрируемой детектором. Было проведено несколько тестов, чтобы проверить, влияет ли положение яйца, т. е. точное место возбуждения, обеспечиваемого лазером, на интенсивность флуоресценции в присутствии RFP-экспрессирующих клеток. Как оказалось, интенсивность, регистрируемая

25

детектором, сильно менялась с изменением положения яйца во время возбуждения. Это было ожидаемо, поскольку после инъекции RFP-экспрессирующих клеток в яйцо RFP распределяется неравномерно. На **фиг. 10** представлена максимальная интенсивность, наблюдаемая в определенном положении яйца во время возбуждения, которое соответствует положению, в котором концентрация RFP-экспрессирующих клеток является

30

самой высокой. Эта фигура демонстрирует, что минимальное количество, которое может быть обнаружено, составляет приблизительно 3000 клеток. В данной области техники известно, что в эмбрионе половые клетки, ПЗК, расположены в центре эпибласта свежеснесенного яйца на стадии развития яйца X. Следует отметить, что эмбрион всегда обращен к верхней стороне желточного мешка.

Представленные выше результаты приводят к выводу, что при возбуждении области, расположенной в нескольких миллиметрах за яичной скорлупой и вблизи яичного желтка, может быть обнаружено максимальное испускание излучения RFP.

5 Эксперименты повторяли через неделю после инъектирования в яйца RFP-экспрессирующих клеток. Результаты были аналогичными и показали, что краситель RFP не диффундирует внутри яйца.

10 Исследовали влияние PBS и глицерина на интенсивность флуоресценции яиц с использованием зеленого лазера (532 нм) и красного фильтра, работающего в диапазоне +650 нм, в присутствии или в отсутствие RFP-экспрессирующих клеток. По-видимому, ни глицерин, ни PBS не влияют на измерения интенсивности флуоресценции RFP-экспрессирующих клеток в яйцах, как показано на **фиг. 11А и 11В**.

15 Затем было исследовано влияние PBS и глицерина на интенсивность флуоресценции яиц с использованием синего лазера (483 нм) и фильтра, работающего в диапазоне +500 нм, в присутствии или в отсутствие GFP-экспрессирующих клеток. По-видимому, GFP-экспрессирующие клетки не могут быть обнаружены при любой заданной концентрации (1000, 3000, 10000 и 30000 клеток), как показано на **фиг. 12**, например, с 30000 GFP-
20 экспрессирующих клеток. Такие же результаты были получены с использованием трех разных фильтров: +500 нм, 530-550 нм и 540-580 нм.

Чтобы дополнительно оценить неожиданное преимущество использования RFP в качестве репортерного гена, наконец, провели сравнительную оценку флуоресценции GFP- и RFP-
25 экспрессирующих клеток, как показано на **фиг. 13**. Параметр R был введен для обозначения соотношения между интенсивностью флуоресцентного белка (ФБ) ($I_{\text{ФБ}}$) и интенсивностью собственной флуоресценции ($I_{\text{собственной флуоресценции}}$):

$$R = \frac{I_{\text{ФБ}}}{I_{\text{собственной флуоресценции}}}$$

Параметр R был рассчитан для разных концентраций GFP- и RFP-экспрессирующих клеток.
30 Как показано на фигуре, по-видимому, GFP-экспрессирующие клетки не могут быть обнаружены ни в одной из заданных концентраций (1000 и 30000 клеток, как показано на **фиг. 13**).

С другой стороны, RFP-экспрессирующие клетки обеспечивали значительные значения параметра R даже при низкой концентрации (1000 RFP-экспрессирующих клеток). При

высокой концентрации RFP-экспрессирующих клеток (30000 RFP-экспрессирующих клеток) значение R достигло 3 и, таким образом, было ясно продемонстрировано, что репортерный ген RFP может быть легко обнаружен в возбужденных яйцах.

5 Основные результаты обобщены ниже:

1. При использовании синего лазера наблюдается сильная собственная флуоресценция, которая не наблюдается при использовании зеленого и красного лазеров.
2. Основным источником собственной флуоресценции является яичная скорлупа.
3. Система может обнаруживать зеленые и красные флуоресцентные красители при
10 относительно низкой концентрации красителей и при низкой мощности возбуждения.
4. Синяя флуоресценция почти не обнаруживается (только при mM концентрации красителей) из-за собственной флуоресценции.
5. RFP обнаруживается внутри яиц намного проще и в более высокой степени.
6. Тип GFP не обнаруживается в этой системе.
- 15 7. Точное местоположение RFP-экспрессирующих клеток внутри яйца является важным для определения области возбуждения.
8. Краситель RFP не диффундирует в яйца в течение 14 дней после инъекции.
9. Ни PBS, ни глицерин не влияют на обнаружение RFP.

Эти результаты ясно демонстрируют, что эмбрион, экспрессирующий ген RFP, встроенный
20 в половую хромосому, может быть обнаружен на ранней стадии развития, где приблизительно 1000 клеток экспрессируют RFP.

ПРИМЕР 3

Конструирования вектора с гидовыми РНК

25 Для включения репортерного гена RFP в половые W- или Z-хромосомы был выбран метод HDR, опосредованной CRISPR/Cas9. Затем проводили поиск подходящих сайтов для гРНК в обеих половых хромосомах.

Встраивание в женскую Z-хромосому

Область 9156874-9161874, обозначенную SEQ ID NO:15, 27764943-27769943,
30 обозначенную SEQ ID NO:16, 42172748-42177748, обозначенную SEQ ID NO:17, 63363656-63368656, обозначенную SEQ ID NO:18 и 78777477-78782477, обозначенную SEQ ID NO:19, Z-хромосомы самки курицы анализировали для конструирования гидовой РНК. Более конкретно, для направления встраивания RFP в Z-хромосому затем была получена гРНК локуса chrZ_42174515_-1 Z-хромосомы, обозначенная как гРНК7, содержащая

последовательность нуклеиновой кислоты GTAATACAGAGCTAAACCAG, также обозначенную SEQ ID NO: 26.

Процедуру проводили согласно руководству пользователя «PrecisionV Cas9 SmartNuclease Vector System». В частности, для клонирования были сконструированы два праймера:
5 ChZgRNA_Прямой: TGTATGAGACCACGTAATACAGAGCTAAACCAG, обозначенный SEQ ID NO: 53, ChZgRNA_Обратный: AAACCTGGTTTAGCTCTGTATTACGTGGTCTCA, обозначенный SEQ ID NO: 54.

Праймеры гибридизовали с получением дуплекса в реакционной смеси, содержащей 5 мкМ
10 каждого из праймеров. Смесь инкубировали при 95 °С в течение 5 минут и вынимали для охлаждения до комнатной температуры.

Затем дуплекс клонировали в предоставленный линейизованный вектор Cas9 путем реакции лигирования, проведенной в следующих условиях: 1 мкл линейизованного вектора, 3 мкл смеси гибридизованных олигомеров, 1 мкл лигирующего буфера и 0,25 мкл
15 лигазы Fast. Смесь инкубировали в течение 5-7 минут при 25 °С.

Смесь трансформировали в компетентные клетки DH5 α и культивировали клетки на планшете со средой LB, содержащем 50 мкг/мл канамицина, и инкубировали в течение ночи при 37 °С.

На следующий день случайным образом выбирали две колонии, которые выращивали в
20 среде LB/канамицин в течение ночи при 37 °С при встряхивании.

На следующий день получали плазмидные ДНК с помощью набора Qiagen mini-prep и секвенировали с использованием предоставленного праймера для секвенирования.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления четыре дополнительных гидовых РНК были выбраны, синтезированы и клонированы по отдельности в вектор SmartNuclease
25 Cas9, содержащий нуклеазу Cas9 дикого типа (Horizon), по протоколу клонирования без использования ферментов рестрикции: гРНК3: ACAGACCTATGATATGT, обозначенная SEQ ID NO: 11; гРНК4: CGATTATCACTCACAAG, обозначенная SEQ ID NO: 12; гРНК5: CTGGTTAGCATGGGGAC, обозначенная SEQ ID NO: 13; гРНК6: GTAAAGAGTCAGATACA, обозначенная SEQ ID NO: 14.

30 Дополнительные неограничивающие примеры последовательностей гРНК, подходящих для встраивания в определенные локусы на Z-хромосоме, могут включать, не ограничиваясь перечисленным, гРНК8 локуса chrZ_9157091_1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты ACAGACCTATGATATGTGAG, также обозначенную SEQ ID NO: 27, гРНК9 локуса chrZ_27767602_-1 Z-хромосомы, содержащую
35 последовательность нуклеиновой кислоты GAGCTTGTGAGTGATAATCG, также

обозначенную SEQ ID NO: 28, гРНК10 локуса chrZ_78779927_1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты GTAAAGAGTCAGATACACAG, также обозначенную SEQ ID NO: 29, и гРНК11 локуса chrZ_63364946_-1 Z-хромосомы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты CAGTGGGTACTGAAGCTGTG, также обозначенную SEQ ID NO: 30.

Для этих гРНК ожидается мало неспецифичных сайтов связывания, ни один из которых не содержался в известных кодирующих последовательностях.

Встраивание в женскую Z-хромосому

10 Область 1022859-1024215 W-хромосомы самки курицы, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 3, анализировали для конструирования гидовой РНК. Две гидовых РНК отбирали, синтезировали и клонировали по отдельности в вектор SmartNuclease Cas9, содержащий нуклеазу Cas9 дикого типа (Horizon), по протоколу клонирования без использования ферментов рестрикции: гРНК1:

15 GCACTAGGAACCAGCAGCAG, обозначенную SEQ ID NO: 1, и гРНК2: GTAGCCCCAAGAGGGCTAGG, обозначенную SEQ ID NO: 2.

Ожидаемые параметры этих двух гРНК приведены в таблице 7:

Таблица 7

Параметры гРНК	гРНК1	гРНК2
Система оценки егРНК «sgRNA designer»	0,506	0,63
Система оценки «sscore»	0,8677	0,5323
Система оценки егРНК «sgRNA scorer»	94,8	99,9

20

ПРИМЕР 4

Конструирование вектора, нацеленного на RFP

Фланкирующие последовательности, гомологичные соответствующим фланкирующим последовательностям, указанным выше для локусов женской W-хромосомы или женской

25

Z-хромосомы, вводят в RFP-экспрессирующий вектор, в частности, в плазмиду pDsRed1-N1.

Для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 31, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 32, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК7 с SEQ ID NO: 26.

10 Более конкретно, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК7, в частности, GTAATACAGAGCTAAACCAG, обозначенной SEQ ID NO: 26, клонирование «левого плеча» проводили выше энхансера CMV в плазмиде pDsRed1-N1 с использованием метода RF.

15 Были использованы следующие праймеры:

Прямой праймер:

ACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGTGAACGGATAGGCAGCAAGC, обозначенный SEQ ID NO: 55 (содержит последовательность 5'-левого плеча и 30 нуклеотидов сайта встраивания в плазмиду).

20 Обратный праймер:

GGCGGGCCATTTACCGTAAGTTATGTAACGTGAGGAAGGGTCTGTTACTGGA, обозначенный SEQ ID NO: 56.

Правое плечо клонировали ниже гена устойчивости Neo, используя следующие праймеры.

25 Прямой праймер:

TTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGTCATGTCGGTGGAGGAGAAA, обозначенный SEQ ID NO: 57 (3'-последовательность гена устойчивости Neo отмечена зеленым цветом)

Обратный праймер:

30 GTGATGGCAGGTTGGGCGTCGCTTGGTCGGGCATGGGATGTTAAAGAGAAGCT, обозначенный SEQ ID NO: 58 (оранжевым отмечены векторные последовательности, 3'-концевые относительно гена Neo).

Клонирование подтверждали секвенированием, чтобы удостовериться в правильности встраивания.

Следует отметить, что энхансер CMV содержит делецию 193 нуклеотидов вследствие повтора 16 нуклеотидов (CGGTAAATGGCCCGCC, обозначенного SEQ ID NO: 59) в области энхансера, фланкирующей сайт встраивания.

5 В некоторых дополнительных вариантах осуществления репортерный ген RFP может быть клонирован с использованием любой из гРНК3, обозначенной SEQ ID NO: 11, гРНК4: обозначенной SEQ ID NO: 12, гРНК5, обозначенной SEQ ID NO: 13, гРНК6, обозначенной SEQ ID NO: 14.

Для клонирования с использованием гРНК3 предложены «левое плечо», содержащее
10 последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 41, и «правое плечо», содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 42. Для клонирования с использованием гРНК4 предложены «левое плечо», содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 43, и «правое плечо», содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO:
15 44. Для клонирования с использованием гРНК5 предложены «левое плечо», содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 45, и «правое плечо», содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 46. Для клонирования с использованием гРНК6 предложены «левое плечо», содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 47, и «правое
20 плечо», содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 48.

В дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 33, и
25 правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 34, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК8 с SEQ ID NO: 27. В других дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее
30 последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 35, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 36, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК9 с SEQ ID NO: 28. В дополнительных вариантах осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-
35 хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность

нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 37, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 38, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК10 с SEQ ID NO: 29. В еще одном дополнительном варианте осуществления для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенный локус на Z-хромосоме может быть использовано левое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 39, и правое плечо, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 40, для встраивания репортерного гена согласно изобретению в определенные локусы, управляемого гРНК11 с SEQ ID NO: 30.

Для женской W-хромосомы репортерный ген, в частности, RFP, может быть клонирован с использованием либо Гида 1 (гРНК1), обозначенного SEQ ID NO: 1, либо Гида 2 (гРНК2): обозначенного SEQ ID NO: 2. Для клонирования с использованием гРНК1 предложены «левое плечо», содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 4, и «правое плечо», содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 5. Для клонирования с использованием гРНК2 предложены «левое плечо», содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 6, и «правое плечо», содержащее последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 7.

Кроме того, «левое плечо» для области выше промотора CMV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 8, и «правое плечо» для области ниже гена резистентности к неомицину может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 9, или SEQ ID NO:10 для области ниже сайта полиА.

ПРИМЕР 5

Встраивание репортерного гена RFP в Z-хромосому линии женских куриных клеток

Линию женских куриных клеток совместно трансфицировали двумя плазмидами, т. е. pDsRed, содержащей левое и правое плечи куриной Z-хромосомы, и плазмидой, содержащей CMV-hspCas9-N1-гРНК, как подробно описано в методиках экспериментов. Используемая последовательность гРНК представляла собой гРНК 7, обозначенную SEQ ID NO: 26. В таблице 8 предоставлена более подробная информация об использованной гидовой РНК.

Таблица 8. Характеристики использованной гРНК 7

протоспейсер гРНК	цепей	место_разреза	хромосома	идентификационный номер гидовой РНК, guide_id
GTAATACAGAGC TAAACCAG, SEQ ID NO: 26	-1	421745 15	chrZ	ZNF367_HABP4_ENSGALG0000001262 9_ENSGALG00000012628_chrZ_4217451 5_-1

Трансфицированные клетки затем подвергали воздействию возбуждающего красного флуоресцентного излучения. Как видно из **фиг. 14**, трансфекция была положительной. Облученные клетки собирали, выделяли геномную ДНК и проводили анализ ПЦР методом скользящего окна (как описано в методиках экспериментов). Затем фрагменты ПЦР отправляли для секвенирования SANGER и получили встроенные последовательности, как показано на **фиг. 15**, которые демонстрируют успешное встраивание гена RFP в Z-хромосому.

Подводя итоги, эти результаты показывают, что:

- 10 • была установлена успешная процедура выращивания линий женских куриных клеток
- установлена успешная трансфекция репортерного гена RFP и системы CRISPR Cas9 в линию женских куриных клеток
- при возбуждении красным светом генерировался сильный флуоресцентный сигнал
- 15 • установлено успешное точечное встраивание репортерного гена RFP в Z-хромосому

ПРИМЕР 6

Передача зародышевой линии клетками, обработанными CRISPR

Использование примордиальных зародышевых клеток (ПЗК) для получения трансгенных кур имеет много преимуществ для биотехнологии и биологического моделирования животных. Поскольку куриные эмбрионы откладываются в виде яиц, ПЗК на ранней стадии легко доступны и могут быть подвергнуты манипуляциям *in vitro* для применений на практике, включая восстановление генетического материала, редактирование генома и трансгенные исследования. Были предприняты значительные усилия для создания систем культивирования куриных ПЗК из разных эмбриональных источников, и было продемонстрировано, что только куриные ПЗК могут поддерживаться *in vitro* неограниченно долго без потери их свойств.

Более конкретно, у цыплят ПЗК сначала отделяются в эпибласте на стадии эмбрионального развития X по Eyal-Giladi и Kochav (EGK), а затем перемещаются вниз по гипобласту в

прозрачной зоне и далее к зародышевому полумесяцу, и попадают в кровоток. После миграции через систему кровообращения они достигают половых тяжей.

Эти уникальные характеристики развития зародышевой линии делают возможным их использование для получения трансгенных кур путем инъекции генетически модифицированных ПЗК в кровеносные сосуды яиц-реципиентов.

Два вышеописанных вектора, в частности, гРНК/Cas9 и векторы с репортерным геном, совместно трансфицируют в ПЗК, как подробно описано в методиках экспериментов. После идентификации стабильных клонов клетки размножают и подтверждают встраивание RFP с помощью ПЦР. Подтвержденные клоны инъецируют в куриные эмбрионы-реципиенты на 14-16 стадии (по Н&Н). Инъецированные эмбрионы перемещаются к суррогатной скорлупе и инкубируются до вылупления при 37 °С. Пол цыплят определяют после вылупления с помощью анализа W- или Z-хромосом методом ПЦР.

Женские и мужские химеры выращивают до половой зрелости и скрещивают с самцами и самками кур дикого типа. Вылупившихся цыплят оценивают в отношении экспрессии RFP, и с помощью ПЦР подтверждают, что потомство зародышевой линии несет целевой RFP.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения пола птичьего оплодотворенного невыведенного яйца, включающий следующие стадии:
- (a) обеспечение по меньшей мере одной трансгенной птицы, содержащей по меньшей мере один экзогенный репортерный ген, встроенный по меньшей мере в одно положение или местоположение на по меньшей мере одной из половых хромосом Z и W;
- (b) получение по меньшей мере одного оплодотворенного яйца от указанной трансгенной птицы, или любых ее клеток;
- (c) определение того, обнаруживается ли в указанном яйце по меньшей мере один обнаружимый сигнал, где обнаружение указанного по меньшей мере одного обнаружимого сигнала свидетельствует об экспрессии указанного по меньшей мере одного репортерного гена, и, следовательно, наличии указанной Z-хромосомы или W-хромосомы в птичьем эмбрионе, содержащемся в указанном оплодотворенном невыведенном яйце.
2. Способ по п. 1, где указанный репортерный ген представляет собой по меньшей мере один флуоресцентный репортерный ген.
3. Способ по п. 2, где указанный репортерный ген представляет собой красный флуоресцентный белок (RFP).
4. Способ по п. 2 или п. 3, где определение того, обнаруживается ли обнаружимый сигнал, включает стадию воздействия на указанное яйцо источником света.
5. Способ по любому из пп. 1-4, где указанная по меньшей мере одна трансгенная птица является самкой птицы, и где указанный по меньшей мере один репортерный ген встроен по меньшей мере в одно положение женской Z-хромосомы, следовательно, обнаружение обнаружимого сигнала свидетельствует о том, что указанный эмбрион в указанном невыведенном яйце является самцом.
6. Способ по любому из пп. 1-4, где указанная по меньшей мере одна трансгенная птица является самкой птицы, и где указанный по меньшей мере один репортерный ген встроен по меньшей мере в одно положение женской W-хромосомы, следовательно, обнаружение обнаружимого сигнала свидетельствует о том, что указанный эмбрион в указанном невыведенном яйце является самкой.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где указанный по меньшей мере один репортерный ген встроен в указанную половую хромосому указанной трансгенной птицы с использованием по меньшей мере одной программируемой сконструированной нуклеазы (PEN).
- 5 8. Способ по п. 7, где указанная PEN представляет собой систему кластерных регулярно перемежающихся коротких палиндромных повторов (CRISPR) II типа.
9. Способ по п. 8, где указанный по меньшей мере один репортерный ген встроен в указанную половую хромосому указанной трансгенной птицы путем направляемой гомологией репарации (HDR), опосредованной по меньшей мере одной системой
10 CRISPR/CRISPR-ассоциированная эндонуклеаза 9 (Cas9).
10. Способ по п. 9, где указанный по меньшей мере один репортерный ген встроен в половую хромосому указанной трансгенной птицы путем приведения в контакт или
15 совместной трансфекции по меньшей мере одной клетки указанной птицы или по меньшей мере одной клетки, введенной в указанную птицу, с:
- (a) по меньшей мере одним белком Cas9 или по меньшей мере одной первой последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный по меньшей мере один
20 белок Cas9; и гидовой РНК (гРНК), нацеленной на по меньшей мере один протоспейсер на по меньшей мере одной половой Z- и/или W-хромосоме, или по меньшей мере одной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей указанную по меньшей мере одну гРНК; и
- (b) по меньшей мере одной второй последовательностью нуклеиновой кислоты,
25 содержащей по меньшей мере один указанный репортерный ген.
11. Способ по п. 10, где указанный по меньшей мере один репортерный ген в указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами для HDR в сайте встраивания.
30
12. Способ по любому из п. 10 или п. 11, где указанный по меньшей мере один репортерный ген в указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты функционально связан с любым из полоспецифичного промотора, эмбрионально-специфичного промотора и индуцибельного промотора.
35

- 13.** Способ по любому из пп. 10-12, где указанный по меньшей мере один репортерный ген встроен по меньшей мере в одну некодирующую область указанной половой хромосомы.
- 5 **14.** Способ по п. 13, где указанный по меньшей мере один репортерный ген встроен по меньшей мере в один сайт в локусе 42172748-42177748 половой Z-хромосомы.
- 15.** Способ по п. 10 и п. 14, где указанная по меньшей мере одна гРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 26.
- 10 **16.** Способ по п. 15, где указанный по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся в указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты, фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 31 и 32.
- 15 **17.** Способ по п. 13, где указанный по меньшей мере один репортерный ген встроен по меньшей мере в один сайт в локусе 1022859-1024215 половой W-хромосомы, где по меньшей мере одна из:
- (a) указанных гРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную
- 20 SEQ ID NO: 1, и указанный по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся в указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты, фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 4 и 5; и
- (b) указанный гРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную
- 25 SEQ ID NO: 2, и указанный по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся в указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты, фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 6 и 7.
- 30 **18.** Трансгенная птица, содержащая по меньшей мере один экзогенный репортерный ген, встроенный по меньшей мере в один локус на по меньшей мере одной из половых Z- и W-хромосом.
- 19.** Трансгенная птица по п. 18, где указанный репортерный ген представляет собой по
- 35 меньшей мере один флуоресцентный репортерный ген.

20. Трансгенная птица по п. 19, где указанный репортерный ген представляет собой красный флуоресцентный белок (RFP).
- 5 21. Трансгенная птица по любому из пп. 18-20, где указанная по меньшей мере одна трансгенная птица является самкой, и где указанный по меньшей мере один репортерный ген встроен по меньшей мере в одно положение женской Z-хромосомы.
- 10 22. Трансгенная птица по любому из пп. 18-20, где указанная по меньшей мере одна трансгенная птица является самкой, и где указанный по меньшей мере один репортерный ген встроен по меньшей мере в одно положение женской W-хромосомы.
- 15 23. Трансгенная птица по любому из пп. 18-20, где указанный по меньшей мере один репортерный ген встроен в указанную половую хромосому указанного трансгенного животного с использованием по меньшей мере одной PEN.
24. Трансгенная птица по п. 23, где указанная PEN представляет собой систему CRISPR II типа.
- 20 25. Трансгенная птица по п. 24, где указанный по меньшей мере один репортерный ген встроен в указанную половую хромосому указанной трансгенной птицы с помощью HDR, опосредованной по меньшей мере одной системой CRISPR/Cas9.
- 25 26. Трансгенная птица по п. 25, где указанный по меньшей мере один репортерный ген встроен в половую хромосому указанной трансгенной птицы путем приведения в контакт или совместной трансфекции по меньшей мере одной клетки указанной птицы или по меньшей мере одной клетки, введенной в указанную птицу, с:
- 30 (а) по меньшей мере одним белком Cas9 или по меньшей мере одной первой последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный по меньшей мере один белок Cas9; и по меньшей мере одной гРНК, нацеленной на по меньшей мере один протоспейсер на по меньшей мере одной половой Z- и/или W-хромосоме, или по меньшей мере одной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей указанную по меньшей мере одну гРНК; и

(b) по меньшей мере одной второй последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере один указанный репортерный ген.

27. Трансгенная птица по п. 26, где по меньшей мере один репортерный ген в указанной
5 второй последовательности нуклеиновой кислоты фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами для HDR в сайте встраивания.

28. Трансгенная птица по п. 26 или п. 27, где по меньшей мере один репортерный ген в
10 указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты функционально связан с любым из полоспецифичного промотора, эмбрионально-специфичного промотора и индуцибельного промотора.

29. Трансгенная птица по любому из пп. 26-28, где указанный по меньшей мере один
15 репортерный ген встроен по меньшей мере в одну некодирующую область указанной половой хромосомы.

30. Трансгенное животное по п. 29, где указанный по меньшей мере один репортерный
20 ген встроен по меньшей мере в один сайт в локусе 42172748-42177748 половой Z-хромосомы.

31. Трансгенная птица по любому из пп. 26-30, где указанная по меньшей мере одна
гРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 26.

32. Трансгенная птица по п. 31, где по меньшей мере один репортерный ген,
25 содержащийся в указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты, фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 31 и 32.

33. Трансгенная птица по любому из пп. 26-29, где указанный по меньшей мере один
30 репортерный ген встроен по меньшей мере в один сайт в локусе 1022859-1024215 половой W-хромосомы, и где по меньшей мере одна из:

(a) указанных гРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную
SEQ ID NO: 1, и указанный по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся в
указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты, фланкирован с его 5'- и 3'-

конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 4 и 5; и

(b) указанных гРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 2, и указанный по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся в 5
указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты, фланкирован с его 5'- и 3'-
конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 6 и 7.

34. Клетка, содержащая по меньшей мере один экзогенный репортерный ген, 10
встроенный по меньшей мере в один локус на по меньшей мере одной из половых Z- и W-
хромосом.

35. Клетка по п. 34, представляющая собой птичью клетку.

15 **36.** Клетка по п. 35, где указанная птичья клетка представляет собой примордиальную
зародышевую клетку (ПЗК).

37. Клетка по любому из пп. 34-36, где указанный по меньшей мере один репортерный
ген встроен в половую хромосому указанной клетки путем приведения в контакт или 20
совместной трансфекции указанной клетки с:

(a) по меньшей мере одним белком Cas9 или по меньшей мере одной первой
последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере одну
последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный по меньшей мере один
белок Cas9; и по меньшей мере одной гРНК, нацеленной на по меньшей мере один
25 протоспейсер на по меньшей мере одной половой Z- и/или W-хромосоме, или
последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей указанную по меньшей мере
одну гРНК; и

(b) по меньшей мере одной второй последовательностью нуклеиновой кислоты,
содержащей по меньшей мере один указанный репортерный ген.

30 **38.** Клетка по п. 37, где указанный по меньшей мере один репортерный ген в указанной
второй последовательности нуклеиновой кислоты фланкирован с его 5'- и 3'-конца
гомологичными плечами для HDR в сайте встраивания.

39. Клетка по любому из п. 37 и п. 38, где указанная гРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 26, и где указанный по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся в указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты, фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 31 и 32.
40. Клетка по любому из п. 37 и п. 38, где по меньшей мере одна из:
- (a) указанных гРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 1, и где указанный по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся в указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты, фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 4 и 5; и
- (b) указанных гРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 2, и где указанный по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся в указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты, фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 6 и 7.
41. Набор, содержащий:
- (a) по меньшей мере один белок Cas9 или по меньшей мере одну первую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный по меньшей мере один белок Cas9; и по меньшей мере одну гРНК, нацеленную на по меньшей мере один протоспейсер на по меньшей мере одной половой Z- и/или W-хромосоме, или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанную по меньшей мере одну гРНК; и
- (b) по меньшей мере одну вторую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую по меньшей мере один указанный репортерный ген.
42. Набор по п. 41, где указанный по меньшей мере один репортерный ген в указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами для HDR в сайте встраивания.

43. Набор по п. 41 или п. 42, где указанный по меньшей мере один репортерный ген в указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты функционально связан с любым из полоспецифичного промотора, эмбрионально-специфичного промотора и индуцибельного промотора.

5

44. Набор по любому из пп. 41-43, где указанный по меньшей мере один репортерный ген выполнен с возможностью встраивания по меньшей мере в одну некодирующую область указанной половой хромосомы.

10 **45.** Набор по п. 44, где указанный по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся в указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты, фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 31 и 32, и где указанная по
15 меньшей мере одна гРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 26.

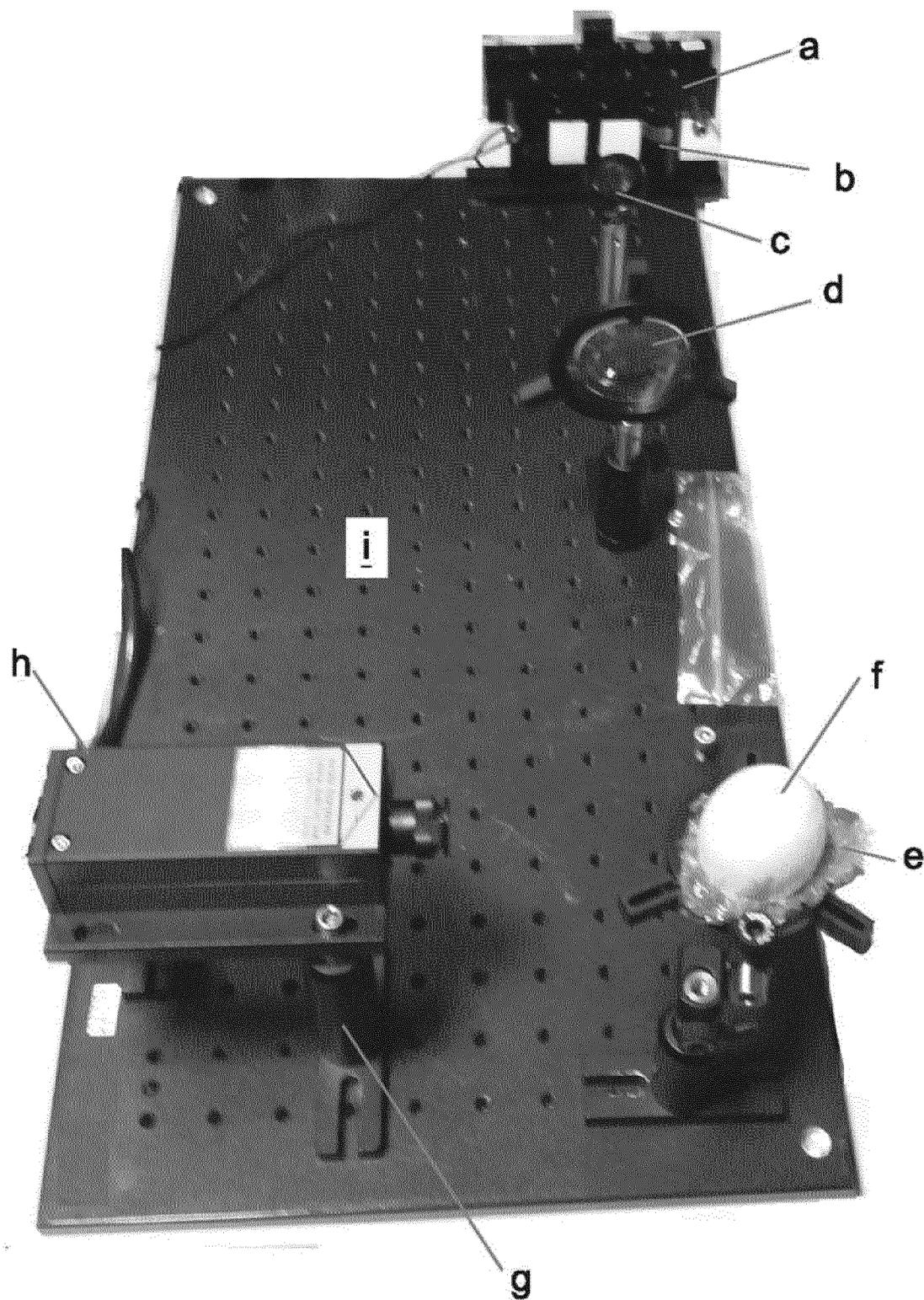
46. Набор по любому из пп. 41-43, где по меньшей мере одна из:

(a) указанных гРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 1, и где указанный по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся в
20 указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты, фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 4 и 5; и

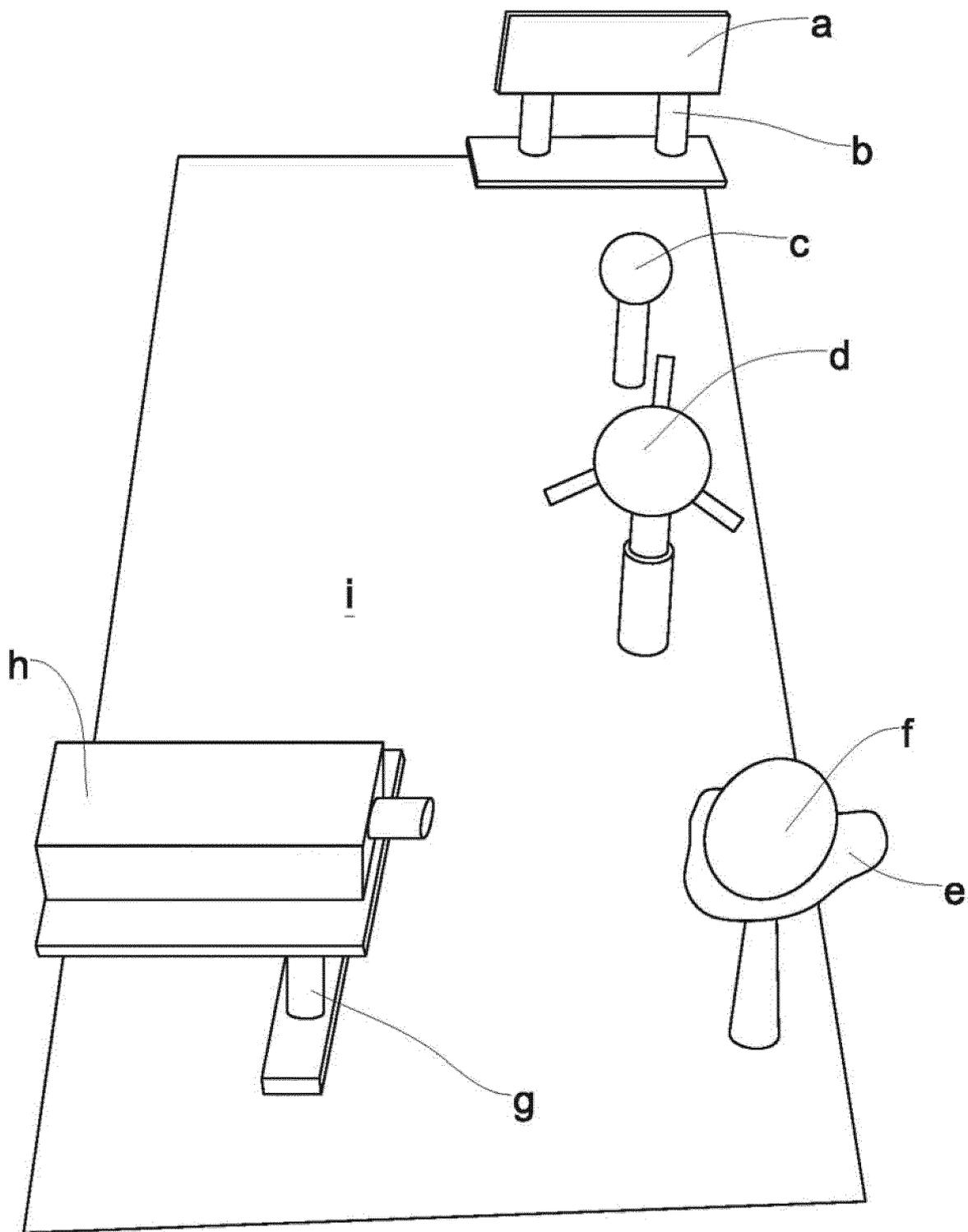
(b) указанных гРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, обозначенную SEQ ID NO: 2, и где указанный по меньшей мере один репортерный ген, содержащийся в
25 указанной второй последовательности нуклеиновой кислоты, фланкирован с его 5'- и 3'-конца гомологичными плечами, содержащими аминокислотную последовательность, обозначенную соответственно SEQ ID NO: 6 и 7.

47. Набор по любому из пп. 41-46, где указанный репортерный ген представляет собой
30 по меньшей мере один флуоресцентный репортерный ген.

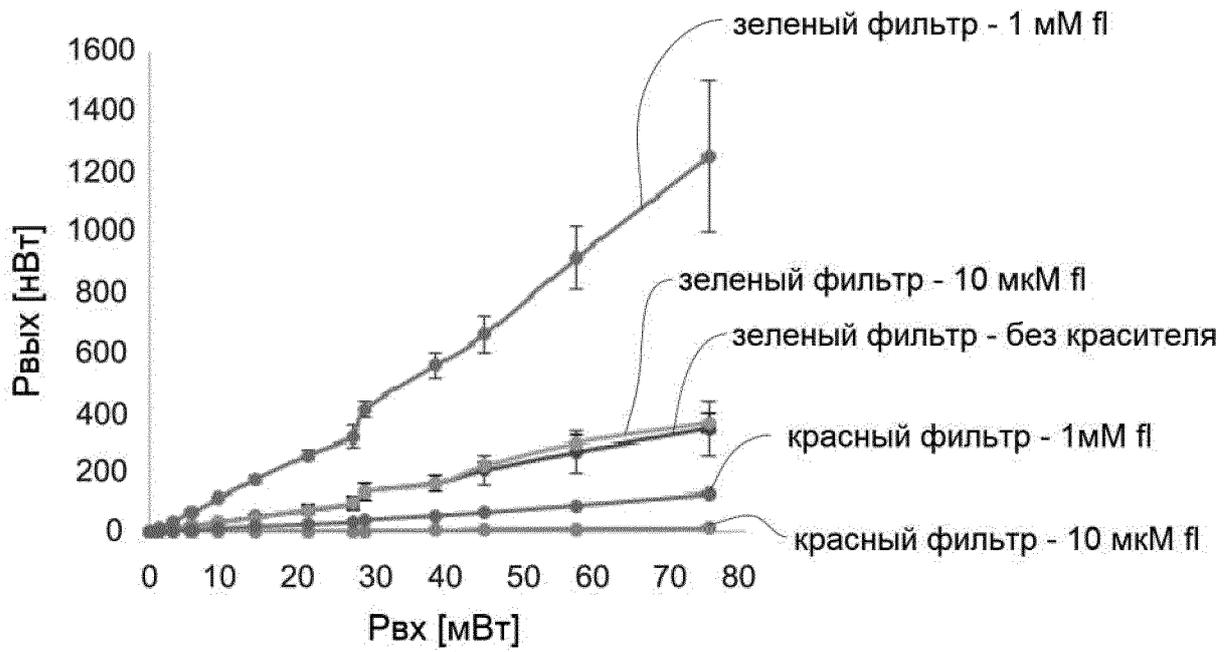
48. Набор по любому из пп. 41-47 для применения для получения по меньшей мере одной трансгенной птицы, содержащей по меньшей мере один экзогенный репортерный ген, встроенный по меньшей мере в один локус на по меньшей мере одной из половых Z- и
35 W-хромосом.



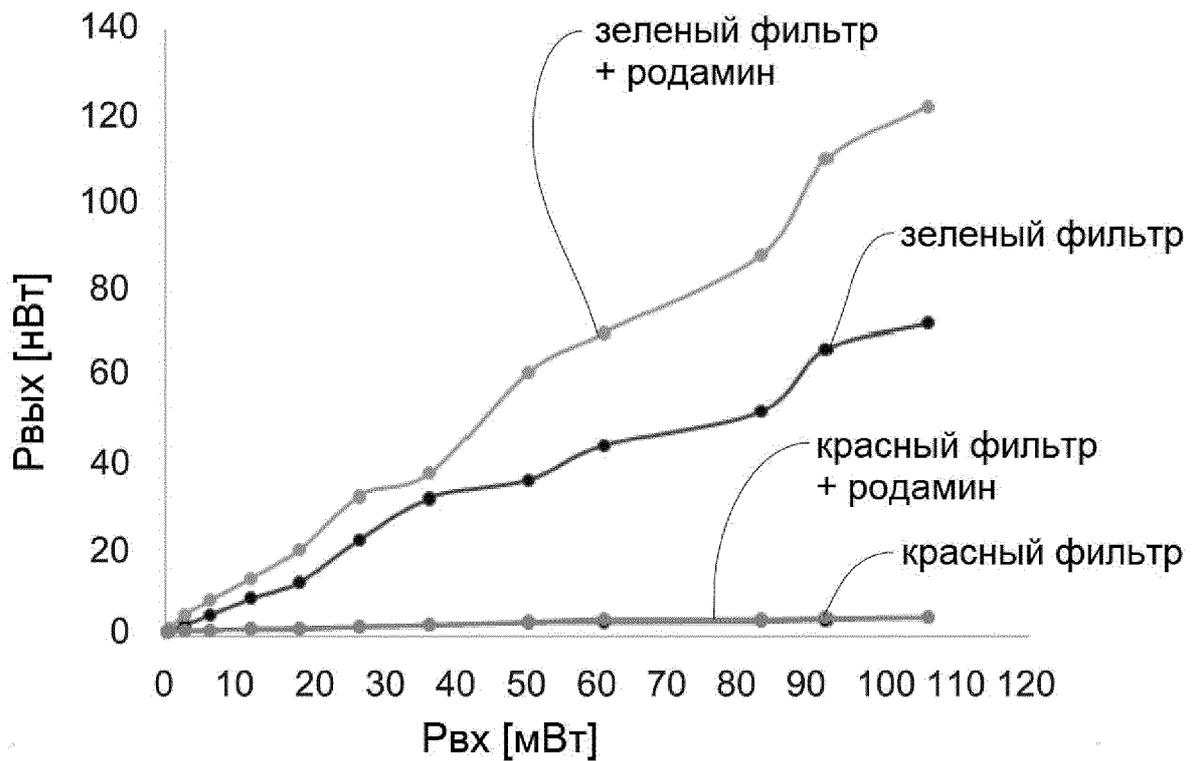
Фиг. 1А



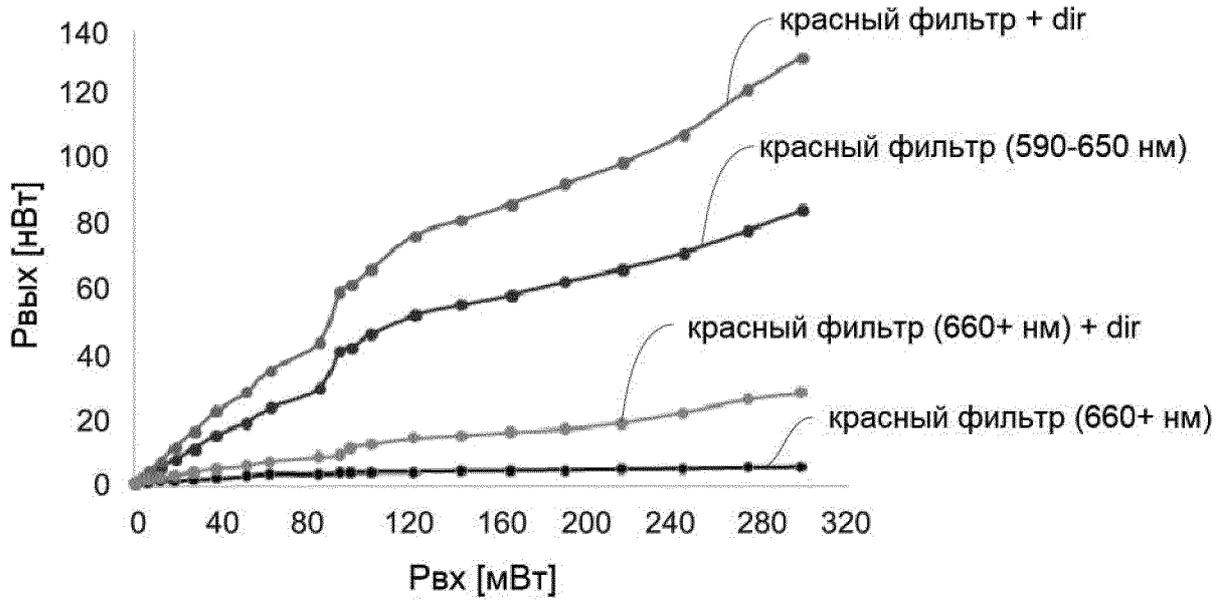
Фиг. 1В



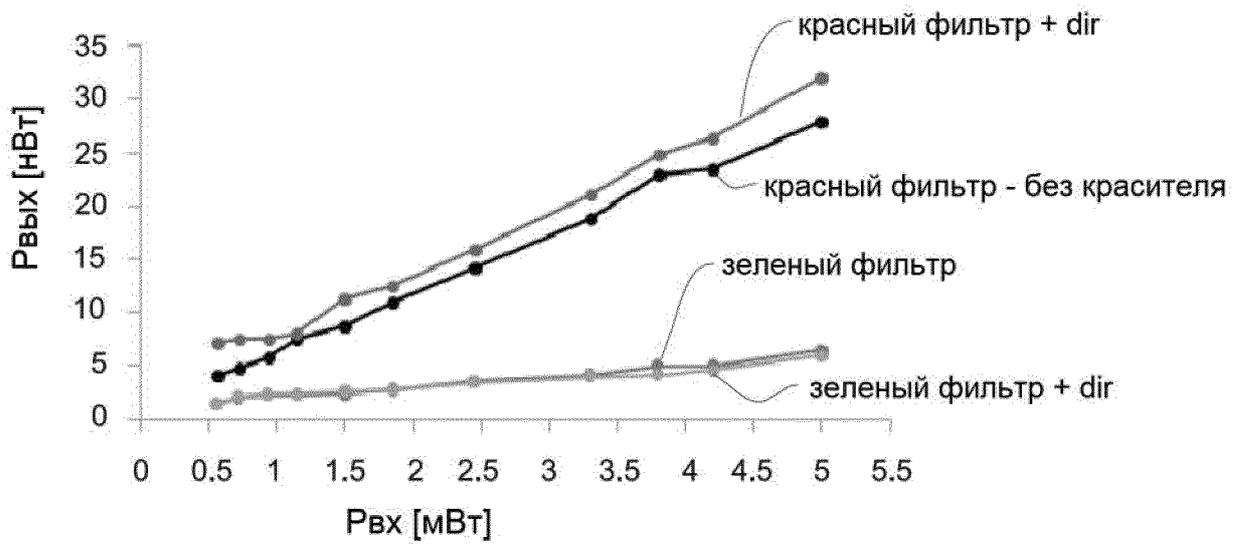
Фиг. 2



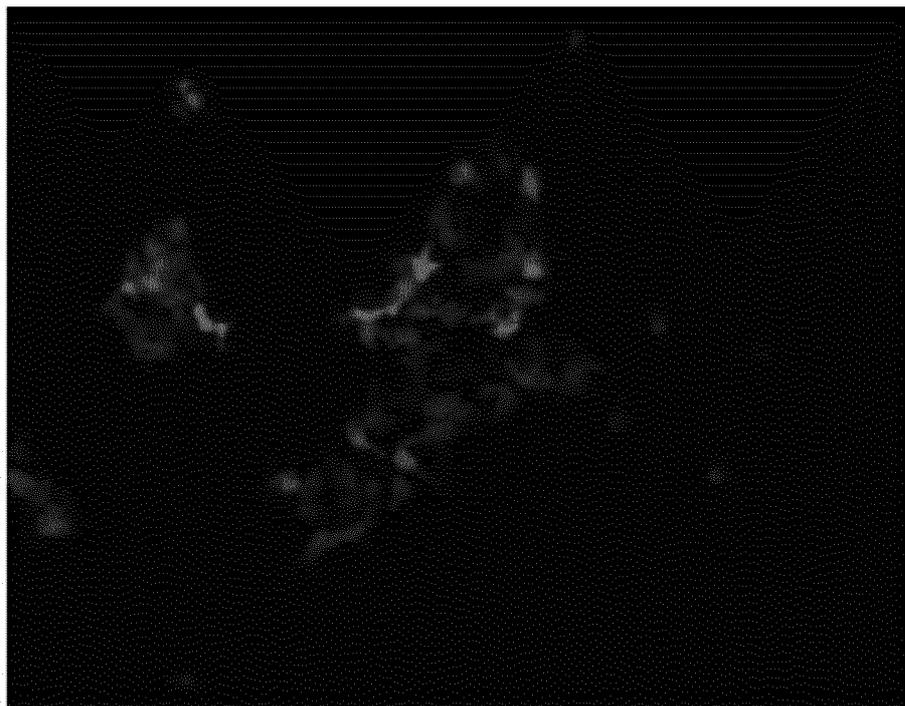
Фиг. 3



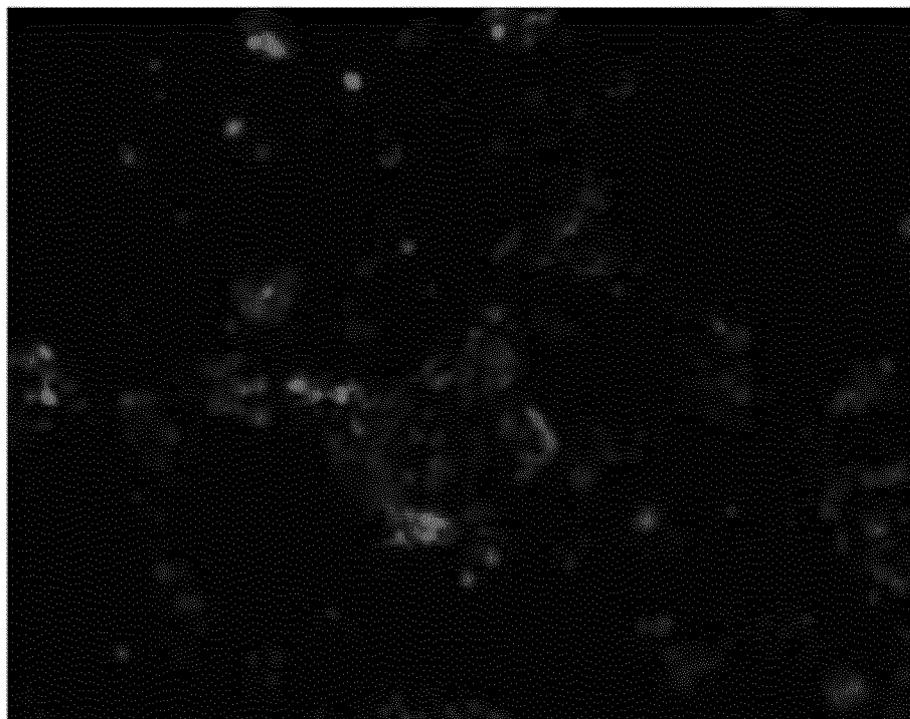
Фиг. 4



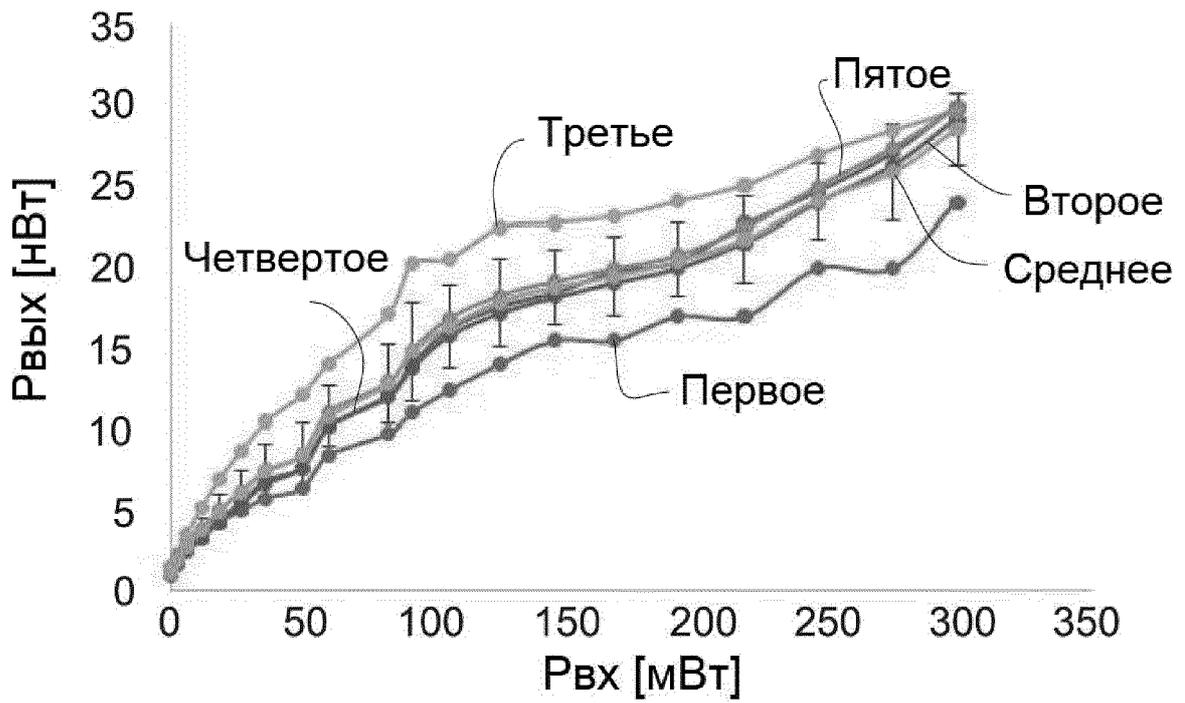
Фиг. 5



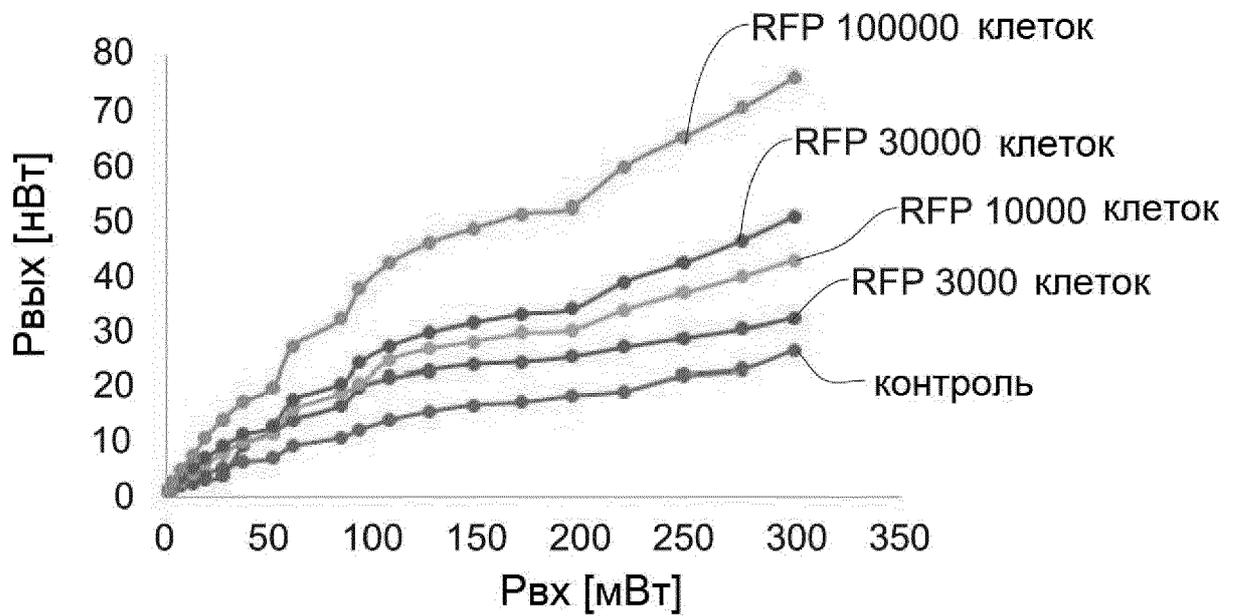
Фиг. 6



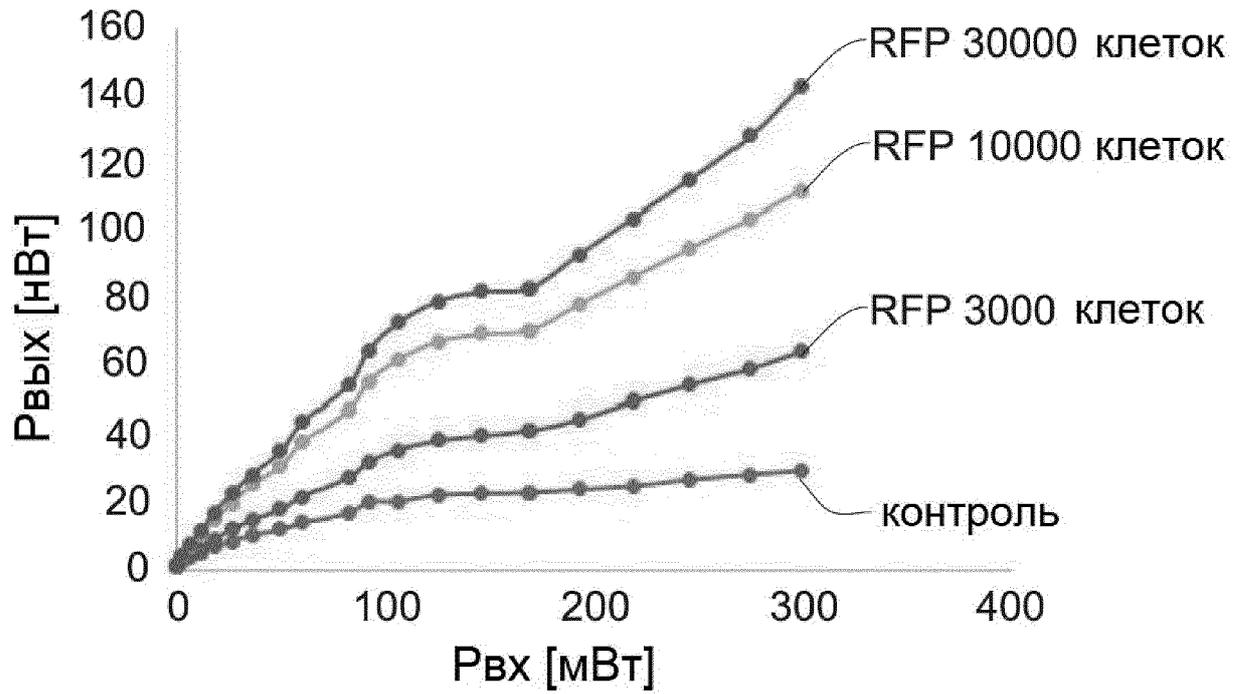
Фиг. 7



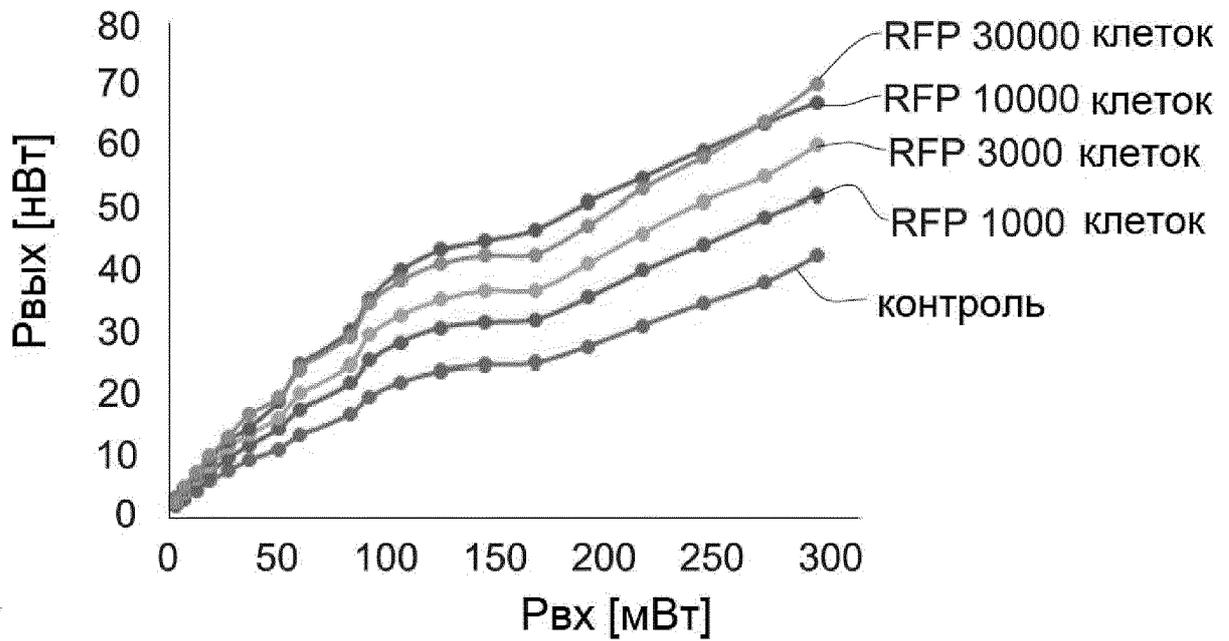
Фиг. 8



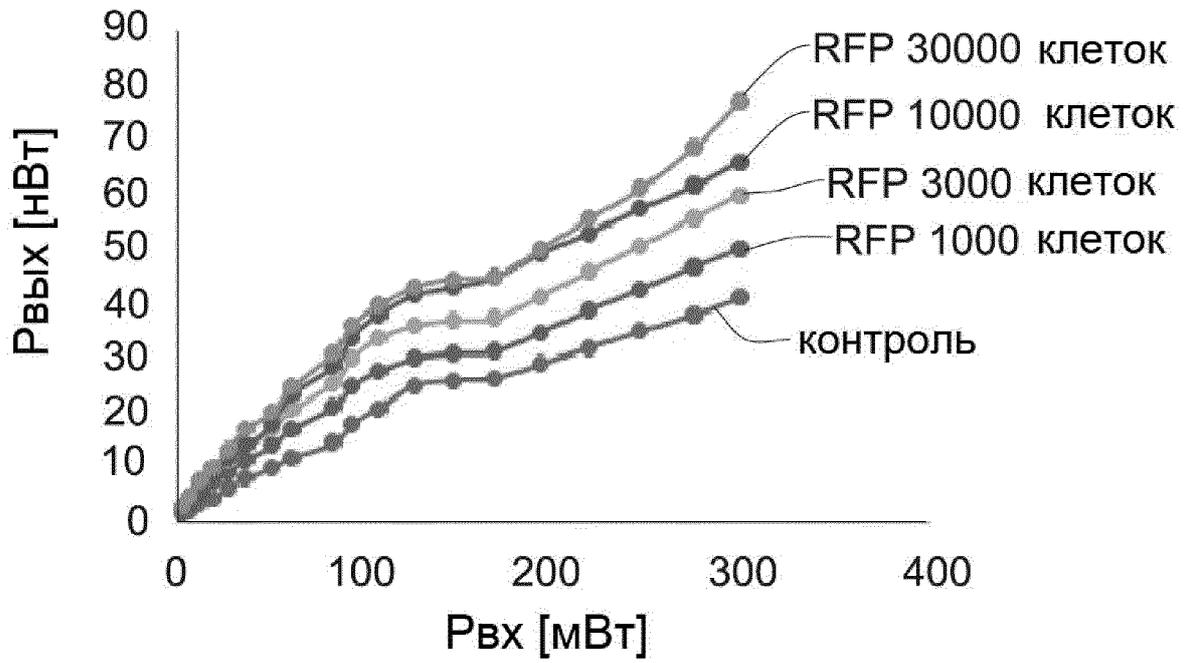
Фиг. 9



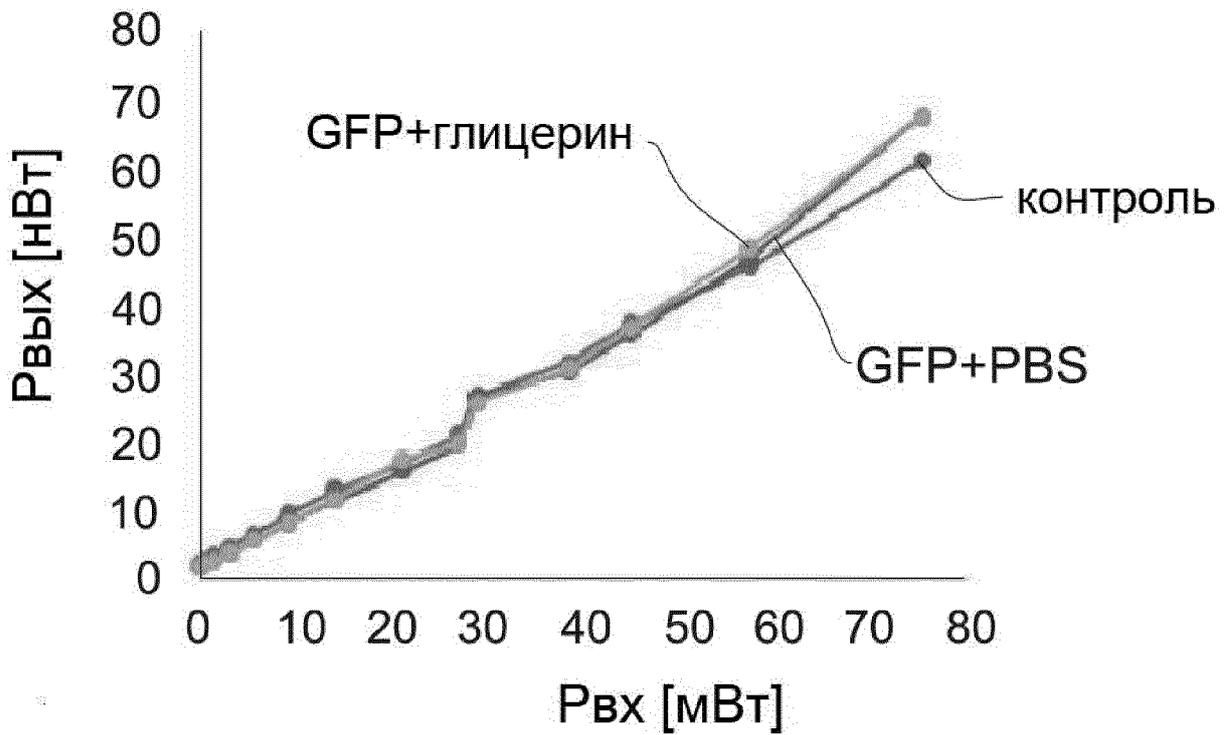
Фиг. 10



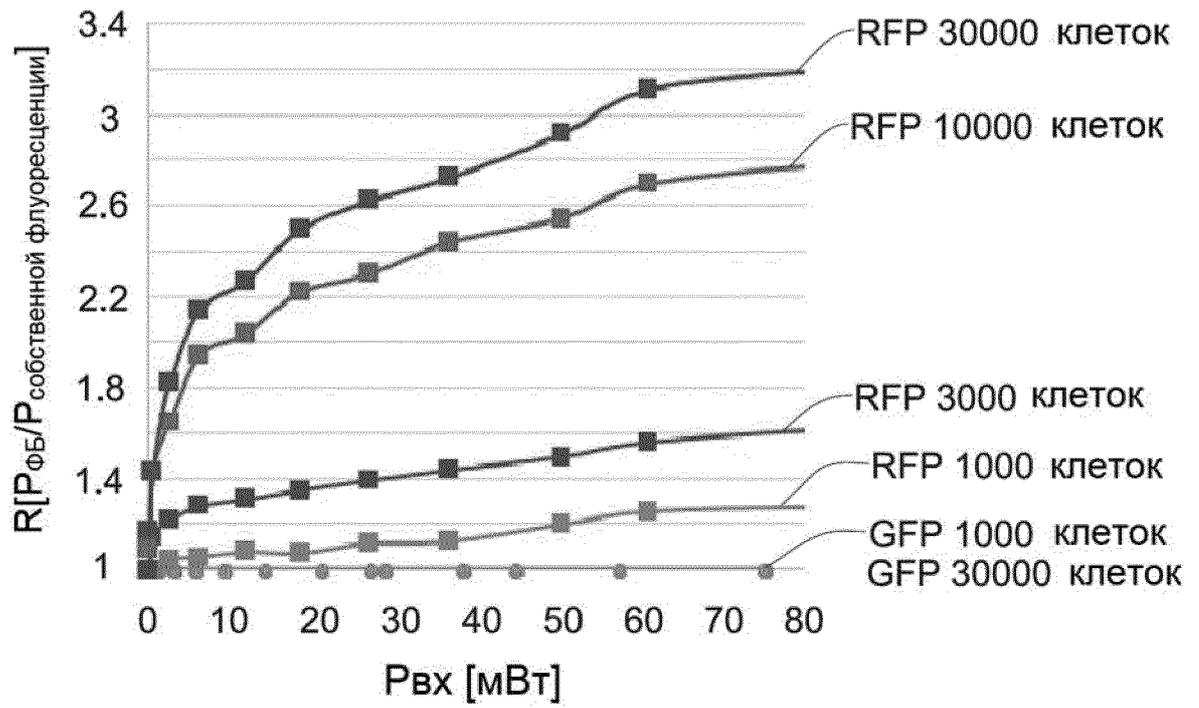
Фиг. 11А



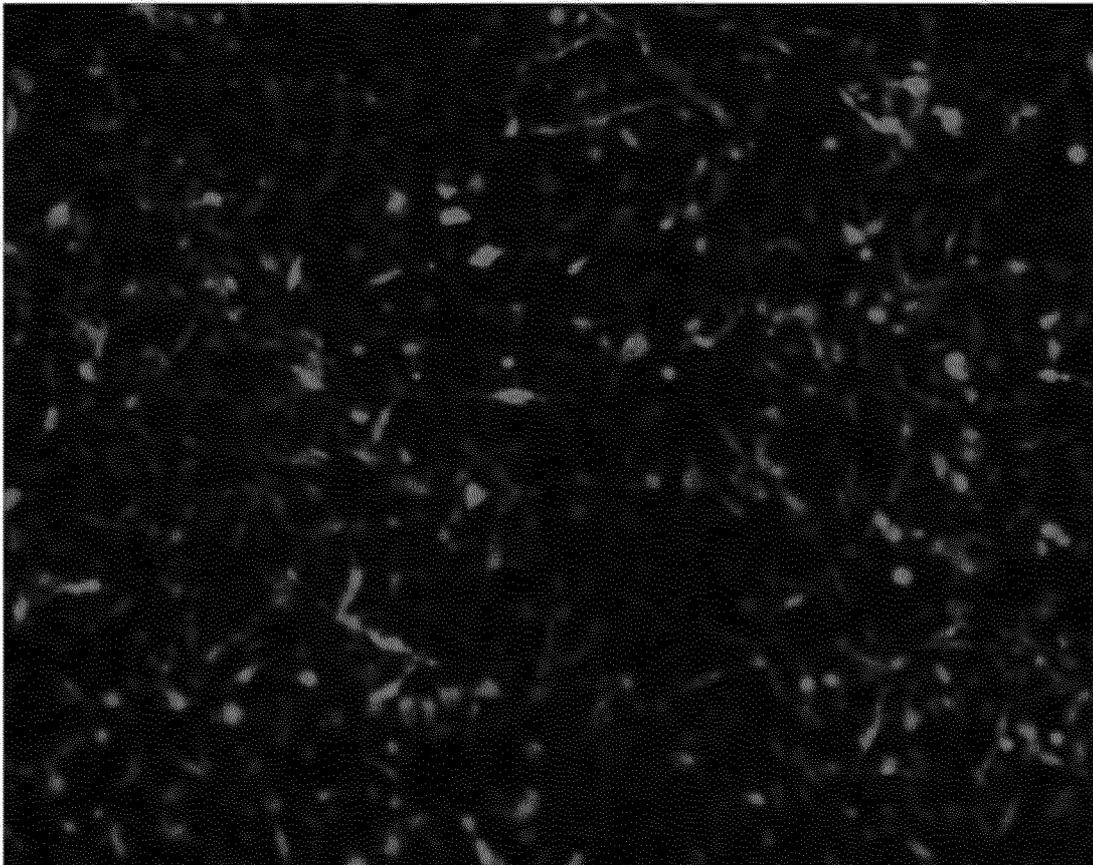
Фиг. 11В



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

TGGAGATCCCTTATTGGTGAAGCTTTCCCTGCAAACCTAGAATCTTCTGATGCAAGTGAAGCAATCTTCTTCCCTTCCCTAGCAGCTCTCTGTGCACC
 AGTCCCTCCATCCTTGCACCTTTGTTGTAATGCTTTTCCCATGGCATTGATCTGTCCAGTTGCTACAGTGTAGAAACAAGAAAGTGTTTTCTCAAAACA
 TTATACATGCTTACTATCAGATCTTACTTAACATTGATAAGAAGTACACCTTTTATTACAACAGTGAACGGATAGGCAGCAAGCATTGAGAACAATGAA
 AAAGATCTGCGTTCTATTGTAAGCAAACAAGGTGATGACGGAAACGTTTATTTGAGATACAGGCACCATAGTACAAGATATCAAAGAGGAATTAATTC
 AACCTCCCAACAACAGTTGGGAAAAAAAAGGATAAGCTGAGGAATGCAGCCTTCTCCGATTTTTACTCTGGTGCCGGAAGGAGGAGGAGGAGCGGGG
 GAAAACCCAGCGGACTCAGACTGCATACGCCTCTCGGAAGTACCTCTGAGGCGGGGTGAGAGGAAGGGTGGATCTAGGCTCCCCCGCTCCACACACT
 CACGTGCTCGTGTACTGGTTCAGGCTGTGACTTGGCAACTCCTCTACATCTATCCATCTAGTTAGACTCAACAAGACCATCGTGATTGAGGAGTCTGAA
 GATGCTTAACTCTCTCAGAACGTCTAGTTCTCCTGGCCTGGTAAATGCTATGTTTCTCATACTGCCTCTCTGAAGAATGCTTCGAATGCTTCTAGTGAT
 GCTCTAAAGTTCTAAACAGAAAAATCTGGAGACAGTTCTGGTCTTTAGATAGAAAAATGCCAACATGCCAAAGGATGGTTACATCCTTCAAGCAACCT
 TGTTGCATGCTGTACAATAGACTCATGTAATAACTTAGCCGTAGTCATCGTATCTCTTATTTACCTGTTGTTATTACATTTTCTGTTACTGCTTTAT
 ATTTAGTCAGTTGTCCTTTTAAGACAAATTTTTGGTGTGTGCTAATAGGCAGTTACCAAATGTTCTAGAGGGAGGGAATATAATCAGTGAGTATGTAG
 ATGTATATAGATGTATAACCAGTAAGTATACAGAGAAGTTAGGGTGGTCTTTTGGAGAGCATATAGCTGGAAAGATTATCACATGGGAAAAGGTAATCAG
 AAATAAATGGAAAAATGCTCACCAGTGTATAGGCTCACAAAGAAAACCTCCCAAGGAGCAATCTCCAGTAACAGACCCTTCTCAGTTGGAGTTCCG
CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCAT
AGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA
TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCC
TACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTT
GACTCACGGGATTTCOAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGT
CGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCG
TCAGATCCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCCGGGATCCACCG
GTCGCCACCATGGCCCTCCTCCGAGAACGTCATACCGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCACCGTGAACGGCCACGAGT
TCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCCACAACACCGTGAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGGCCCCCTGCCCT
TCGCCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACAAGAAGCT
GTCTTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGTGAACCTCGAGGACGGCGGGCGTGGCGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCA
GGACGGCTGCTTACCTACAAGGTGAAGTTCATCGGCGTGAACCTCCCCCTCCGACGGCCCCGTGATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGG
GAGGCCTCCACCGAGCGCCTGTACCCCCGCGACGGCGTGTGAAGGGCGAGACCCACAAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCAC
TACCTGGTGGAGTTCAAGTCCATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCTACTACTACGTGGACGCCAAGCTGGACATCA
CCTCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAGCAGTACGAGCGCACCGAGGGCCGCCACCACCTGTTCTGTAGCGGGCCGCGACTCTA
GATCATAATCAGCCATACCACAT

[сигнал поли(А) SV40-точка начала репликации f1-промотор AmpR-промотор sv40-устойчивость к неомицину/устойчивость к канамицину-сигнал поли(А) тимидинкиназы HSV- точка начала репликации]

GAGTCATGTCGGTGGAGGAGAAAGTGGCTGTAGAAAAGGTAACGGACAAGAAATCCCTCACTGGCTTAGCTGTAAAGGTCAGAGGAAAATCATCTTCTG
 TTCTCCATACACATCTCCTGTAATTAGGCACCTGTGCCCTTTAAAAAAGTAAAGTAATCAAAGAGTCATTTGGTGAAAATAGAAGCCAAACAGTTACAA
 AATTTAGTTAATATTCAAAGACAAAACAACCTCTGGTTCCAAATATAAAACCCCTTTGTGTAAACACTGCGGGAAGGTGCCAAAGAGCCACCTACACAAAG
 AGATGCCACAGAGTAATTTGCGTACCCCAACAATAGGATCATATATGGGCAAACCAAAAGACCAACAAAGACCCCTTGCAATAATCCCTTGATTGGCAG
 AAGCAAGTGCAGCGTTAGATTTAGTATGTGTGACAATTCTGAGAATAGGAAGGAATTTCACTGAAACTGTGTGAAGATTTGTATGTTAAATACATATAA
 TGAGGGTTATTTAGCTCTGGGGTGTGCATGCTATGTGGAGAGATCCCCATGTGCCAGCACTGCAATAGACTAATGTCAGCTTTTTAAACCATCATTTG
 GTTTGAAGAGTTTATTATGATTTTCAGAAACAGAATTATGTATTCAGTGTCTGTACATTCTTACAAGCCTGCTGTTCTGTACACATGAAAAAGCTACTT
 ATGGTGCAAATCAGTATAGAGAAGCAGTTTTGACATACAGTGGTCATGACTGGGTGATCTGCTGTCAGAAGGTAAGACACTGGTATACAGAATTGCAAA
 CGTGAGATGAAGACCTCAAGTGCAACTCTGTCATCATAACCACTTCTCTTGCTATTATCTATTTCAGTGTGTTGTTCTAAATATTCAGGCAGAAGGCTTGGT
 TTCACATCAGGTGTTACATTTAAGTATTCTTTGCCATTTTTTTGCTGTTTGTATGTGTAACCTTCAGATTCTCACATTGACTGTGTAGTGTAATTTGCA
 AATAGATGTAACAGCTTCTCTTTAACATCCCATGCA**CAAAC**TTTTAATCACTTTCAATCAATGTTGGAAATCTGCAGTACATAAAATTTTATTTTGATTC
 ATTATTCAGAGAATCAGAGAAATAAGGACTTTTTTAGAGGTTATGTTTATTTTAGAAAATATAAATAAATCTTGTATACATAGATTTCCAAC**TAGTAA**
 AATTTTTAGCTATCGCTGTAGCATTTCTATGAGGAGTTTTACTTTTTACTGTCTCTTATGAAACTTAGTGAAACAAAGCTAG

Фиг. 15B