

**ID.1****ELECTROPORACIÓN DE CIGOTOS DE RATÓN CON EL SISTEMA CRISPR/CAS9 PARA LA GENERACIÓN DE RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE**

José María Fernández Toro, Laura Cernadas González, María Clemente Maltes, Juan De Dios Hourcade Bueno

*Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid.*

La técnica de referencia para la generación de animales modificados genéticamente ha sido, desde sus orígenes, la microinyección de cigotos. Esta técnica ha supuesto grandes avances para el campo de la transgénesis. Sin embargo, no debemos obviar su coste y la necesidad de un entrenamiento previo del personal técnico que permita la consecución de unos resultados altamente eficientes y reproducibles.

Con la llegada de la edición de genes y el uso del sistema CrispR-Cas9, se han desempolvado técnicas que en otras épocas no dieron buenos resultados. Es el caso de la electroporación. Una técnica sencilla, rápida y de relativo bajo coste que puede ser empleada en combinación con el sistema CrispR-Cas9 para la generación de ratones modificados genéticamente.

El objetivo de este trabajo consiste en demostrar que la electroporación es un sistema que permite de una manera rápida, eficiente y a bajo coste generar ratones Knock Out.

Como modelos de estudio se tomó el gen Vegfd, y concretamente la generación de un modelo knock out para Vegfd de los exones 3 y 4.

Para ello, hembras prepúberes C57BL/6J (Charles River Laboratories) fueron superovuladas con PMSG y eCG (5UI) con el fin de obtener mediante cruce natural embriones en estadio de cigoto. La electroporación de los cigotos con el complejo ribonucleoproteico (RNP) formado por las guías crRNA (200 µM, IDT Inc.), tracrRNA (200 µM, IDT Inc.) y la nucleasa Cas9 (Alt-R Cas9 GFP V3, 61µM, IDT Inc.) se llevó a cabo mediante el uso de portaobjetos con electrodos y electroporador BTX ECM 2001. Los embriones fueron evaluados posteriormente en cultivo hasta blastocisto o transferidos a hembras CD-1 en estadio de 2 células para desarrollo postimplantacional. Del análisis de los genotipos de los blastocistos y de los animales nacidos se desprendió que un 84% de los embriones electroporados sobrevivía al proceso y que, a nivel de edición genética, tanto blastocistos (48%) como crías nacidas (39%) eran portadoras de la modificación objeto de estudio.

Se concluye que la electroporación del sistema CrispR-Cas9 es capaz de generar modelos Knock out con alta eficiencia y más fácilmente que con el sistema clásico de microinyección, postulándose como una técnica de transfección que supone un gran avance en el campo de la transgénesis. La reducción del tiempo de trabajo, la mayor eficiencia en consumo de reactivos y la eliminación de la necesidad de personal experto y equipo sofisticado son ventajas que brinda esta técnica.