

**BOT-117** Rev. Cientif. FCV-LUZ, XXXIII, SE, 281-282, 2023, <https://doi.org/10.52973/rcfcv-wbc125>**Successful establishment of CRISPR-based genome-edited clonal cell populations from primary cells of buffalo, goats, and sheep****Priyanka Singh, Bosco Jose, Devika Gautam, Aseem Tara, Shreya Malhotra, Sacchinandan De, Manoj K. Singh, Naresh L. Selokar\****Animal Biotechnology Division (ABTD), ICAR-National Dairy Research Institute, Karnal, Haryana, 132001, India*\*Corresponding author: Naresh L. Selokar ([naresh.selokar@icar.gov.in](mailto:naresh.selokar@icar.gov.in))**ABSTRACT**

Genome editing technology has great potential for precise DNA modification in mammalian cells. The ability to precisely generate the clonal population of CRISPR-edited genotype is of great importance in gene function/pathway analysis, drug discovery, and production of genome-edited animals. In the present study, we demonstrated an efficient method to generate CRISPR-edited single-cell clonal populations of farm animals, including buffalo, goats, and sheep. To generate clonal cell populations, the primary fibroblasts were established through explant culture and then electroporated with CRISPR/Cas RNPs targeted for the disrupted MSTN gene. We used a single-cell pickup method in which one cell was picked up using an ultra-fined glass capillary and transferred into each well of a 96-well plate. For promoting the growth of single cells, we used growth factor-supplemented media. After seeding a single cell to each well, the plate was kept undisturbed for 5-7 days, and then cell attachment rates were noted. We reported that the cell attachment rates for buffalo, goat, and sheep cells were 40%, 77.08%, and 83.67%, respectively. The proliferation rates were 70.83%, 75.67%, and 78.05% for buffalo, goat, and sheep cells, respectively. We noticed that cell attachment and proliferation rates were better in the case of goat and sheep cells; also, these cells exhibited less vacuolation compared to

Establecimiento exitoso de poblaciones de células clonales editadas con genoma basado en CRISPR a partir de células primarias de búfalo, cabra y oveja

**Priyanka Singh, Bosco Jose, Devika Gautam, Aseem Tara, Shreya Malhotra, Sacchinandan De, Manoj K. Singh, Naresh L. Selokar\****División de Biotecnología Animal (ABTD), ICAR-Instituto Nacional de Investigación Láctea, Karnal, Haryana, 132001, India*\*Autor de correspondencia: Naresh L. Selokar ([naresh.selokar@icar.gov.in](mailto:naresh.selokar@icar.gov.in)).**RESUMEN**

La tecnología de edición del genoma tiene un gran potencial para la modificación precisa del ADN en células de mamíferos. La capacidad de generar con precisión la población clonal del genotipo editado con CRISPR es de gran importancia en el análisis de la función/vía genética, el descubrimiento de fármacos y la producción de animales con genoma editados. En el presente estudio, demostramos un método eficiente para generar poblaciones clonales unicelulares de animales de granja editadas con CRISPR, incluidos búfalos, cabras y ovejas. Para generar poblaciones de células clonales, los fibroblastos primarios se establecieron mediante cultivo de explante y luego se sometieron a electroporación con CRISPR/Cas RNP dirigidas al gen MSTN alterado. Utilizamos un método de recogida de una sola célula en el que se recogió una célula utilizando un capilar de vidrio ultrafino y se transfirió a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Para promover el crecimiento de células individuales, utilizamos medios suplementados con factor de crecimiento. Después de sembrar una única célula en cada pocillo, la placa se mantuvo en reposo durante 5 a 7 días y luego se anotaron las tasas de unión de las células. Informamos que las tasas de unión celular para las células de búfalo, cabra y oveja fueron del 40%, 77,08% y 83,67%, respectivamente. Las ta-

buffalo cells. In the present study, we generated 11, 20, and 20 single-cell clones of MSTN-gene-edited buffalo, goat, and sheep cells. In conclusion, our method can be efficiently used to generate genome-edited single-cell clones to harness the potential of CRISPR technologies in farm animals.

**Keywords:** CRISPR, single cell, clonal population, genome-editing, farm animals.

sas de proliferación fueron del 70,83%, 75,67% y 78,05% para las células de búfalo, cabra y oveja, respectivamente. Notamos que las tasas de proliferación y unión celular eran mejores en el caso de las células de cabra y oveja; además, estas células exhibieron menos vacuolización en comparación con las células de búfalo. En el presente estudio, generamos 11, 20 y 20 clones unicelulares de células de búfalo, cabra y oveja editadas con el gen MSTN (miostatina). En conclusión, nuestro método se puede utilizar de manera eficiente para generar clones unicelulares con genoma editados para aprovechar el potencial de las tecnologías CRISPR en animales de granja.

**Palabras clave:** CRISPR, células unicelulares, población clonal, edición del genoma, animales de granja.