

**КЛОНИРОВАНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
5'- И 3'-ОБЛАСТЕЙ ГЕНА КИСЛОГО СЫВОРОТОЧНОГО БЕЛКА МЫШИ
ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЯХ,
СОЗДАВАЕМЫХ НА ОСНОВЕ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9**

Езерский В.А., Колоскова Е.М., Белова Н.В., Кутын И.В., Рябых В.П.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных, Боровск
Калужской обл., Российская Федерация*

Цель работы – освоение первичных этапов новой технологии CRISPR/Cas9 с целью эффективного получения трансгенных животных-продуцентов биологически активных белков человека. На основе геномной последовательности гена кислого сывороточного белка мыши (*mWAP*), были подобраны праймеры для ПЦР-амплификации 5' и 3'-фланкирующих областей, предназначенных для роли правого и левого плечей гомологии в генно-инженерных конструкциях (ГИК) с целью замещения *mWAP* кодирующей последовательностью биологически активного белка человека с применением системы CRISPR/Cas9. 5'WAP ПЦР-амплификат делали с геномной ДНК мыши, промоторной области гена *mWAP*, содержащей непосредственно перед ATG-кодоном сайт для рестриктазы *KpnI*. Обратный праймер для ПЦР-амплификации содержал сайт для *KpnI*, а в прямой праймер был введен сайт для *EagI* (*NotI*). 3'WAP ПЦР-амплификат делали с геномной ДНК мыши: для амплификации 3'WAP-фрагмента была выбрана область 3-го интрона гена *mWAP*. В прямой и обратный праймеры для ПЦР-амплификации были введены сайты для рестриктаз *SalI* и *ClaI* соответственно. В результате клонирования амплификатов в *pTZ57R/T* были получены плазмиды *pTZ5'WAP* и *pTZ3'WAP*. Достоверность клонирования подтверждена секвенированием клонированных фрагментов.

Ключевые слова: генно-инженерные конструкции, CRISPR/Cas9, mWAP, плазмиды, биомодели, трансгенные мыши

Проблемы биологии продуктивных животных, 2018, № 1: 19-28

Введение

До недавнего времени основным способом получения трансгенных животных (ТЖ) со специфическим сайтом нокаута, внесения мутаций или встраивания чужеродного гена был метод гомологичной рекомбинации с использованием эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Модифицированные ЭСК инъецировали в бластоцисты животных-реципиентов с получением химерного потомства, с последующим выводением линий, содержащих нужную генетическую модификацию (Саресчи, 2005). Этот способ получения нокаутных генно-модифицированных животных очень трудоемкий и длительный, выполнение которого недоступно для многих лабораторий.

Относительно недавно появились новые, более эффективные методы геномной модификации, основанные на непосредственном введении сайт-специфичных нуклеаз в одноклеточный эмбрион (или ЭСК) для создания двухнитевых разрывов ДНК. У таких методов, как ZFN (Zinc-finger Nuclease - «цинковые пальцы») и TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases – эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции), существенным недостатком которых является высокая трудоемкость конструирования рекомбинантных векторов и дороговизна (Немудрый и др., 2014).

Начиная с 2013 года, активнее всего разрабатывается и интенсивно применяется новая система редактирования генома – CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated nuclease 9). Предполагается, что с использованием CRISPR/Cas9-системы можно решать самые разнообразные задачи, связанные с разными областями фундаментальной и прикладной биологии, биотехнологии, медицины (Закиян и др., 2016).

Создание линий животных, способных продуцировать белки человека с молоком – одно из самых перспективных направлений прикладной биотехнологии – в настоящее время становится актуальным на рынке биотехнологической продукции. Содержание рекомбинантных белков в молоке трансгенных животных обычно невелико, что обусловлено как позиционным эффектом встраивания генно-инженерной конструкции (преимущественно – случайным), так и особенностями самой конструкции. В настоящее время в экспрессионный вектор для продукции рекомбинантных белков в молочной железе животных включают протяженную 5'-область гена молочного белка, состоящую из промотора, тканеспецифичных энхансеров, первых некодирующих экзонов и расположенных между ними интронов. В экспрессионный вектор также включают 3'-нетранслируемую область гена, содержащую последние некодирующие экзоны и интроны, сайт полиаденилирования и прилежащие последовательности, потенциально способные усиливать терминацию транскрипции. Кроме того, для накопления целевого белка в молоке кодирующая часть гена должна содержать последовательность сигнального пептида, необходимого для секреции (Максименко и др., 2013). Все это делает конструкцию очень громоздкой, и создание таких ГИК превращается в достаточно сложный процесс с труднопредсказуемым конечным результатом. Высокая специфичность системы CRISPR/Cas9 позволяет существенно упростить и ускорить процедуру получения генномодифицированных организмов. Метод получения генномодифицированных животных путем микроинъекции в зиготы ГИК получил существенную техническую поддержку в виде CRISPR/Cas9-системы, позволяющую значительно увеличить его эффективность (Singh et al., 2014).

Проблема неспецифической модификации генома особенно актуальна для биомедицинских исследований: вероятность внесения нежелательных мутаций по нецелевым сайтам остаётся всегда (Mashiko et al., 2013). Тем не менее, в многочисленных исследованиях на мышах, проведенных с применением CRISPR/Cas9-системы в сочетании с микроинъекциями в зиготы, отмечено практически полное отсутствие новорожденных мышей, несущих неспецифические мутации.

Исходя из вышеизложенного, представляется крайне важным своевременно освоить перспективную CRISPR/Cas9 технологию с целью эффективного получения трансгенных животных-продуцентов биологически активных белков человека. В нашей лаборатории традиционным способом уже получены трансгенные кролики, продуцирующие с молоком лактоферрин человека, хотя и в невысоких концентрациях (Езерский и др., 2013).

Освоение новых технологий получения ТЖ, как правило, начинается с лабораторных животных – мышей. Ген кислого сывороточного белка (whey acidic protein - WAP, основной белок сыворотки молока мыши с концентрацией около 2 г/л (Wall et al., 1991)) – потенциально очень перспективный кандидат для замены геном биологически активного белка человека при использовании системы CRISPR/Cas9. Фланкирующие области *mWAP* ранее успешно использовали в составе конструкций для получения ТЖ традиционным способом МИ (Maga @ Murray, 1995; Wall et al., 1997).

Логично предположить, что замена кодирующей части гена *mWAP* на ДНК (кДНК), например, лактоферрина человека, повлечет за собой изменение состава молока вплоть до полного замещения мышиногo WAP белком человека у гомозиготных особей. Молекулярная масса *mWAP* - около 14.4 kDa, чЛФ - 80 kDa. Если экспрессия чЛФ у трансгенной мыши под управлением *mWAP* элементов будет происходить так же, как и эндогенного *mWAP*, ожидаемое содержание чЛФ может составлять 10-12 г на литр молока (Shi et al., 2009). Используя

ГИК, содержащую кодирующую последовательность выбранного белка и плечи гомологии к 5'- и 3'-фланкирующим областям *mWAP* совместно с компонентами системы CRISPR/Cas9, мы можем рассчитывать на желаемый эффект. Репарация сайт-специфичных двухнитевых разрывов хромосомной ДНК с использованием матрицы, имеющей плечи гомологии к сайту разрыва, по механизму HDR (прямой гомологичной рекомбинации) сможет обеспечить точное встраивание трансгена после работы сайт-специфичных gRNA и Cas9 нуклеазы, микроинъектированных в эмбрионы в том или ином виде и составе, например, в виде плазмид, экспрессирующих в клетках эукариот (компоненты CRISPR/Cas9), и HDR-матрицы, линейаризованной или в виде плазмиды.

Цель данной работы – освоение первичных этапов новой технологии CRISPR/Cas9 с целью эффективного получения трансгенных животных-продуцентов биологически активных белков человека.

Объекты и методы

Выделение геномной ДНК проводили методом щелочного лизиса и спиртового осаждения. Временные и температурные параметры ПЦР были подобраны в зависимости от структуры праймеров. Праймеры заказывали и синтезировали в ЗАО «Синтол» (<http://www.syntol.ru>). При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали смесь dNTP 2 мМ раствор (Fermen-tas), Taq-полимеразу 5 ед/мкл, 10×Taq-буфер с 25 mM MgCl₂, Pfu-ДНК-полимеразу 5 ед/мкл (Силекс). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) при получении амплификатов и анализе ДНК клонов проводили на амплификаторе ДНК «Терцик» («ООО ДНК-Технология», Москва). Временные и температурные параметры ПЦР были подобраны в зависимости от структуры праймеров.

Амплификаты клонировали в промежуточный вектор *pTZ57R/T* из набора Thermo Scientific InsTAclone PCR Cloning Kit (Fermentas или Thermoscientific <<http://www.thermoscientific.com/fermentas>>). Трансформацию компетентных клеток *E.coli Dh5α* проводили по методике и с реагентами набора Transform-Aid Bacterial Transformation Kit (Thermoscientific). На конечном этапе брали 5 мкл лигазной смеси из 50 мкл клеточной суспензии в буфере T(AB). Трансформированные клетки высевали на твердую селективную среду, содержащую ампициллин (чашки Петри с ЛБ, Ам⁺) по 10-25 мкл. Выросшие клоны пересеивали на чашки Петри с ЛБ, Ам⁺. ДНК из клонов для ПЦР-анализа выделяли с помощью лизирующей смеси с протеиназой К. Инкубировали при 50°C и инактивировали фермент при 94°C по 15 минут.

Для отбора положительных клонов после легирования и трансформации применяли метод ПЦР-анализа и рестриктоного картирования. Отобранные клоны были использованы для наработки и очистки плазмидной ДНК. Выделение плазмидной ДНК проводили по методике и с реагентами набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermoscientific).

Расщепление плазмидной ДНК рестриктазами проводили стандартными методами с учетом активности и условий работы каждого фермента, описанных в сертификатах анализа или справочных каталогах (“Fermentas”, “Invitrogen”). Рестриктированные плазмидные ДНК после препаративного электрофореза выделяли из агарозного геля (АГ) с помощью набора Gene JET Gel Extraction Kit (Thermoscientific). ДНК снимали элюирующим буфером из набора (10 mM Трис-HCl, pH 8,5).

Качество и количество выделенных плазмид и фрагментов оценивали визуально в УФ свете после электрофореза образцов в АГ. Электрофорез проводили в горизонтальном агарозном геле, содержащем бромистый этидий, с применением ×0,5 Трис-боратного буфера (TBE), pH 8,0, с бромистым этидием, используя набор оборудования фирмы Hoeffer (USA). Размер фрагментов ДНК в агарозном геле оценивали, используя в качестве стандарта DNA Ladder Mix (Fermentas). Секвенирование клонированных последовательностей осуществляли в ЗАО «Синтол» (Москва).

Результаты и обсуждение

Выбор фрагментов клонирования

Основная мишень – кластер генов сывороточных белков молока с высокой экспрессией, выбрана с целью нокаута собственного гена кислого сывороточного протеина (*mWAP*) и интеграции на его место гена биологически активного белка человека (например, кДНК лактоферрина человека) по механизму прямой гомологичной рекомбинации.

Геномная последовательность *mWAP* была взята из интернет-базы данных GenBank, запись NC_000077.6, соответствует: *Mus musculus* strain C57BL/6J chromosome 11, GRCm38.p4 C57BL/6J.

В качестве плечей гомологии в потенциальной HDR-матрицы были выбраны фрагменты размером около 1 т.п.н. В 5'WAP фрагменте был сохранен сайт для уникальной рестриктазы *KpnI*, примыкающий непосредственно к *ATG*-кодону. Это позволит облегчить сохранение рамки считывания при планировании конструкции HDR-матрицы.

Исходя из необходимости сохранения последних интронов генов для их нормального функционирования (как содержащих в себе некоторые регуляторные последовательности), 3'WAP амплификат делали в области 3-го интрона гена *mWAP*. На рис. 1 изображено расположение в гене *mWAP* 5'- и 3'-WAP плечей гомологии, выбранных для осуществления гомологичной рекомбинации.

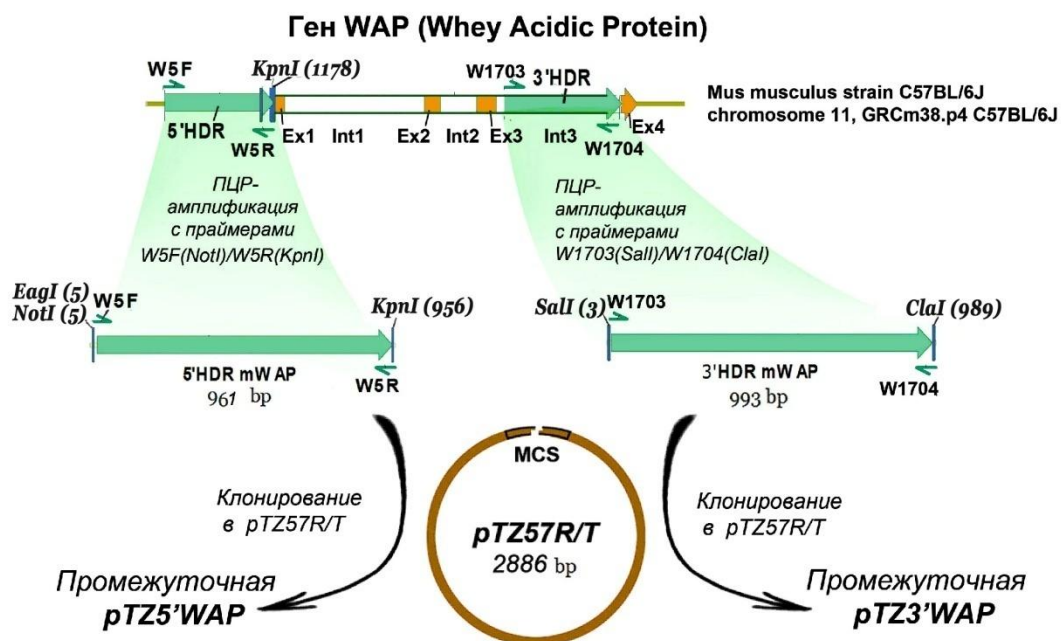


Рис. 1. ПЦР-амплификация 5' и 3' плечей гомологии гена *mWAP* для использования в CRISPR/Cas9 системе, обусловленной HDR с участием ГИК, содержащей 5' и 3' плечи гомологии. Получение промежуточных плазмид *pTZ5'WAP* и *pTZ3'WAP*, содержащих 5'WAP и 3'WAP фрагменты. Указаны сайты для уникальных рестриктаз, сайты связывания используемых праймеров, размеры клонированных фрагментов.

Последовательность первого экзона *mWAP* (внутри которого для имеющихся РАМ будет подобрана первая gRNA) была проанализирована на возможный полиморфизм с целью подбора таргетных участков, общих для мышей линий C57BL/6J, CBA/J и их гибридов (наиболее часто используемых в нашей практике). Отличия в ДНК-последовательностях первого

экзона не обнаружены. Как видно из рис. 2, только на матричной ДНК гена (нити) *mWAP* в области первого экзона (72 п.н.) имеется 6, а на комплементарной - 7 РАМ-мотивов.

Transcript: MGP_CBAJ_T0027702.1	
Description whey acidic protein [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98943]	
Location Chromosome 11: 4,310,241-4,313,268 reverse strand.	
Gene This transcript is a product of gene MGP_CBAJ_G0017758	
1	CCTGACACCGGTACC
60	ATGCGTTGCCCTCATCAGCCTTGTCTTGGCCTGCTGGCCCTGGAG
15	ATGCGTTGCCCTCATCAGCCTTGTCTTGGCCTGCTGGCCCTGGAG
15	-M--R--C--L--I--S--L--V--L--G--L--L--A--L--E--

Рис. 2. Фрагмент транскрипта, содержащего первый экзон гена *mWAP*. ATGCGT – чередующиеся кодоны. Двойной линией обозначены стыки экзона. **NGG** – потенциальные РАМ-мотивы на матричной нити ДНК, **CCN** – потенциальные РАМ – мотивы комплементарной нити ДНК

1.1. Клонирование 5'*mWAP*, получение плазмиды ptz5'*WAP*

Обратный праймер для 5'*mWAP* на 100% соответствовал выбранной предстартовой последовательности, содержащей уникальный сайт рестрикции для *KpnI*: прямой праймер подбирали к заведомо взятой последовательности обратного праймера W5'R.

В прямой праймер W5'F ввели сайт для *EagI* (*NotI*). Из предложенных программой Vector NTI 9 пар выбрали следующую:

#7: Product of length **959** (из них **945** – для HDR) (rating: **162**)
 Contains region of the molecule from 233 to 1181
 Sense Primer: W5'F GAGCGGCCGC AATGTAGAAACAGAGCAGAGAGGTGGT
 Antisense Primer: W5'R CATGGTACCGGTGTCAGGCAAGTGA CTG
 Tm Difference: 1.9 GC Difference: 0.4

Были подобраны следующие условия для проведения амплификации: денатурация ДНК 94°C – 45 сек (в первом цикле – 3 мин.), отжиг праймеров 64°C – 60 сек., элонгация 72°C – 1 мин (в последнем цикле -3 мин). Всего 26 циклов.

Таблица 1. Состав препаративной ПЦР-смеси для получения амплификата 5'*mWAP*

	Компонент	Объем, мкл
1	Taq buf x10	16
2	dNTP x10 (2 мМ)	12
3	W5'F (3 пМ/мкл)	8
4	W5'R (3 пМ/мкл)	8
5	Геномная ДНК мыши (≈30 нг/мкл)	8
6	TaqPol (5 ед/мкл)	2,4
7	H ₂ O	105,6
	Итого	160

Получили ПЦР-амплификат размером 961 п.н. (с учетом А-нуклеотидов на 3'-концах в результате работы *Taq*-полимеразы) содержащий фрагмент 5'*WAP* размером 945 п.н.

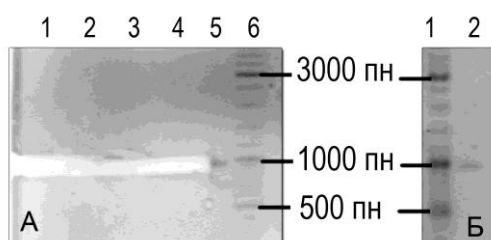


Рис. 3. Препаративный электрофорез ПЦР-амплификата *mWAP* (А1-5) и выделенный из агарозного геля фрагмент *EagI*-5'WAP-*KpnI* (Б2). 0,8% агарозный гель, $\times 0,5$ ТБЕ. А6, Б1 – маркер размеров ДНК

Очищенный препаративным электрофорезом и выделенный из АГ с помощью набора амплификат 5'WAP клонировали в *pTZ57R/T* (рис. 3). Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli Dh5a* и выросшие на селективной среде клоны проверили на наличие вставки (рис. 4). Положительный клон нарабатывали и выделяли *pTZ5'WAP* стандартной процедурой с помощью набора.

Таблица 2. Состав лигазной смеси

	Компонент	Объем, мкл
1	<i>pTZ57R/T</i> (55 нг/мкл или 0,17 пмоль/концов)	1
2	5× лигазный буфер	4
3	5'WAP ПЦР-амплификат (≈ 30 нг/мкл)	10
4	H ₂ O	4
5	T4 ДНК-лигаза (5 ед/мкл)	1
	Итого:	20

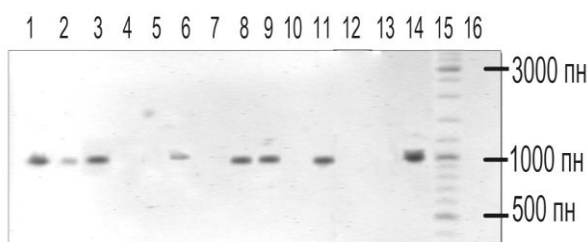


Рис.4. Проверка бактериальных клонов праймерами W5'F и W5'R. 0,8% агарозный гель, $\times 0,5$ ТБЕ.
1-13 – клоны 1-13,
14 – лигазная смесь,
15 – маркер размеров ДНК,
16 – H₂O

1.2. Клонирование 3'mWAP для HDR, получение плазмиды *ptz3'WAP*

В прямой и обратный праймеры W1703 и W1704 ввели сайты для *SalI* и *ClaI* соответственно. Из предложенных программой Vector NTI 9 вариантов пар праймеров выбрали следующий:

#1: Product of length 991 (из них 980 – для HDR) (rating: 171)

Contains region of the molecule from 3157 to 4135

Sense Primer: W1703 GTCGAC TGCATCAGATCCAAGTGCAGATACAATGTG

Antisense Primer: W1704 ATCGAT TCACCTCTGCTTCTAGCCTAGTCAG

Tm Difference: 2.7

GC Difference: 1.2

ПЦР-амплификацию, выделение и очистку 3'WAP фрагмента проводили как при получении 5'WAP (рис.5). 3'WAP размером 993 п.н. (из них для HDR - 980 пар нуклеотидов) клонировали в *pTZ57R/T*. Все дальнейшие процедуры проводили как при получении (рис. 6). Положительный клон нарабатывали и выделили *pTZ3'WAP* (рис. 5).

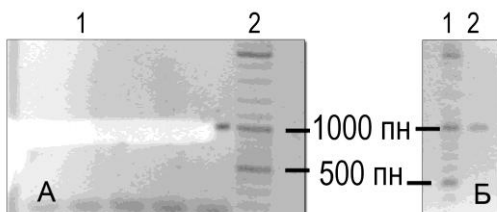


Рис. 5. Препаративный электрофорез ПЦР-амплификата фрагмента 3'WAP (А1) и выделенный из агарозного геля фрагмент *SalI*-3'WAP-*ClaI* (Б2). 0,8% агарозный гель, $\times 0,5$ ТБЕ А2, Б1 – маркер размеров ДНК

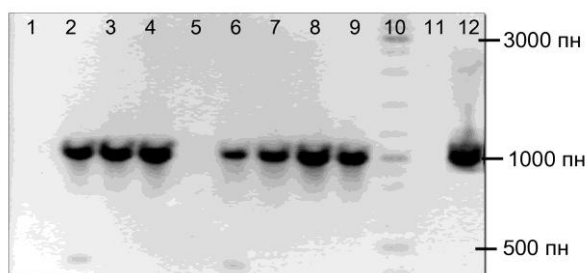


Рис. 6. Проверка бактериальных клонов праймерами W1703 и W1704. 0,8% агарозный гель, $\times 0,5$ ТБЕ
1-9 – клоны 1-9,
10 - маркер размеров ДНК,
11 - H_2O ,
12 – лигазная смесь

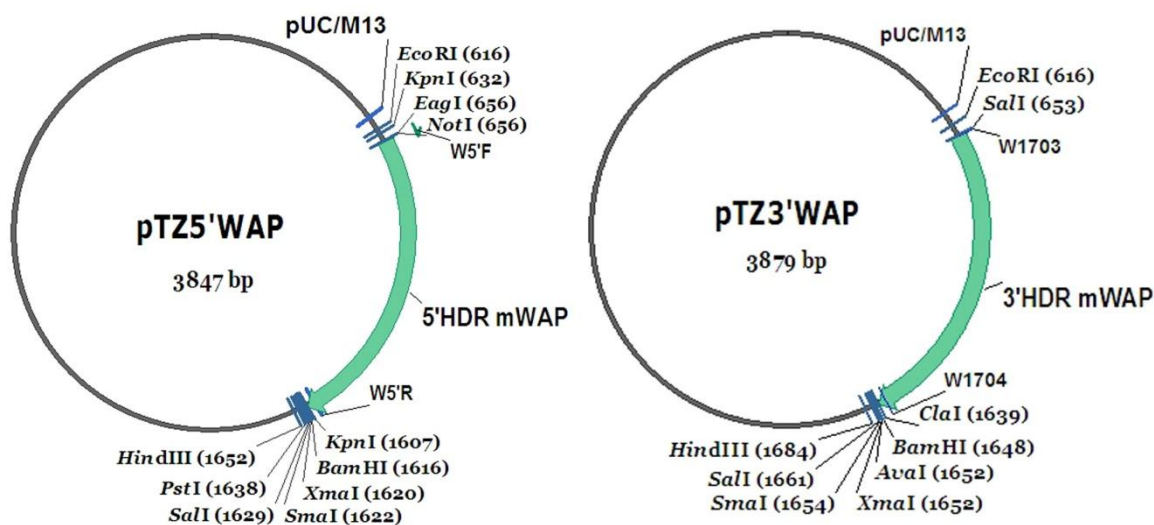


Рис. 7. Полученные промежуточные плазмиды *pTZ5'WAP* и *pTZ3'WAP*, содержащие 5'- и 3'-WAP фрагменты для HDR. Указаны основные рестриктивные сайты и сайты связывания используемых праймеров.

1.3. Секвенирование клонированных последовательностей

Наработанные и очищенные положительные клоны *pTZ5'WAP1* и *pTZ3'WAP2* секвенировали с двух сторон с использованием стандартных праймеров.

После проведения секвенса клонированные последовательности были сравнены с опубликованной в базе данных GenBank с помощью пакета программ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Как оказалось, клонированная 3'WAP-последовательность 100% соответствует выбранной из GenBank NC_000077.6 (*Mus musculus strain C57BL/6J chromosome 11, GRCm38.p4 C57BL/6J*) (

У клонированной 5'WAP-последовательности из 945 нуклеотидов обнаружена однонуклеотидная замена в положении 494 (рис.8). Наличие этой замены может быть объяснено как ошибкой синтеза полимеразы, так и действительно существующим полиморфизмом генов. Идентичность выбранной последовательности с таковой у опубликованной матрицы составляет 99,89%. Последовательность соответствует записи NC_000077.6 для *Mus musculus* линии C57BL/6J, опубликованной в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Поскольку замена находится в некодирующей области, клон может быть использован в дальнейших работах.

Query	1	AATGTAGAAACAGAGCAGAGAGGTGGTTGCCAAGGTCTGGGGGCTCAGAGGACAAGCAAG	60
Sbjct	6639568		6639509
Query	61	AGGCGCGGCTTTCCTTTGGGGCTGGCATGAAAGGAAATATCGAGGTTACAGCCTGAGAGG	120
Sbjct	6639508		6639449
Query	121	GCTTCCCCTGACACTTCGTATTCAAAGAGGCCATGGGCCACCAAGTGAAGACAAAGGAGTA	180
Sbjct	6639448		6639389
Query	181	TGGCCTGCACCACAGGCTGGCGCTGACAGTCAGTAAGCACACAGTCACCTCTGGGTCATCC	240
Sbjct	6639388		6639329
Query	241	CATCCCCCTCCTTGCAAGAGAAATCAAGGAAATGTCCCGAGAACAATGGGGCACAGTGCC	300
Sbjct	6639328		6639269
Query	301	CAGCAGGACATCTCTTCTGCCCATGACACCTTTGGCACAGTATGGGCCCTTCTGGGAAG	360
Sbjct	6639268		6639209
Query	361	TGGCCTTCCAATGTGCTCTGCACAGGCAGCTCCTTTTCAATGTATGCCCGACACTCTCTA	420
Sbjct	6639208		6639149
Query	421	CATGGAGCAAGCGCCTCCACACTCTTAGAAGAATTTTAGAAAACCTCCAGAAAAGCACCA	480
Sbjct	6639148		6639089
Query	481	GGAGAAGTCACCCGAGATGTAGCCCGGACTCGAGCCTTGCTCAAAACCTCCTGTCTTGT	540
Sbjct	6639088		6639029
Query	541	TTTCTATGTGACTGTACAAATTTGGAGCTCAGAATTGCCTTTGTCTGTGATGGGTCCAA	600
Sbjct	6639028		6638969
Query	601	CCCAACCACTCAAAGTGACACTTGTACATTTGTCACTGATCCTATTTCTCTTTTCTG	660
Sbjct	6638968		6638909
Query	661	CTCCTTCATTTTCTCCGCTTTTATAATAACAAGTATTACTTTTAAAGTGGGGGAAAAA	720
Sbjct	6638908		6638849
Query	721	TGACCACCTTACAAAGGACTTTTTAAAAATGGCCTCCATTGTGGCCCTTGTTCCTGGCA	780
Sbjct	6638848		6638789
Query	781	GCCTGGGCTGCTCTCTGTGTGGCCAAGAAGGAAGTGTGTAGCCCATCTAGAGCTGT	840
Sbjct	6638788		6638729
Query	841	GCCAGCCTCTTCCCCACCCACCCCAAAGTCTTCCTCCTGTGGGTCTTTAAATGCAT	900
Sbjct	6638728		6638669
Query	901	CCCAGACACTCAGACAGCCATCAGTCACCTTGCTGACACCGGTAC	945
Sbjct	6638668		6638624

Рис. 8. Поиск соответствия сиквенса клонированной 5'-области гена mWAP(Query) известным последовательностям генома мыши (Sbjct). В положении 494 (отсутствие вертикальной черты между нуклеотидами) – замена нуклеотида (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

Заключение

Созданы плазмиды *pTZ5'WAP* и *pTZ3'WAP*, содержащие 5'WAP и 3'WAP фрагменты (размером 945 и 980 п.н. соответственно) гена кислого сывороточного белка мыши. Эти последовательности предполагается использовать в качестве плечей гомологии в генно-инженерных конструкциях, содержащих ген или кДНК биологически активного белка человека. Такие ГИК могут быть использованы в качестве матрицы для замещения кодирующей последовательности гена *mWAP* новым структурным геном посредством механизма прямой гомологичной рекомбинации (HDR) в процессе репарации геномной ДНК мышиногo эмбриона, разрезанной эндонуклеазой Cas9 в сайтах гена *mWAP*, узанных gRNA(s) (компонентов CRISPR/Cas9 системы). Предполагается, что в результате будут получены мыши, продуцирующие с молоком вместо *mWAP* в равноценном количестве фармакологически ценный белок человека. Отработанная на мышах как на модельных животных технология впоследствии позволит перейти на сельскохозяйственных животных

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Езерский В.А., Шишиморова М.С., Тевкин С.И., Трубицина Т.П., Колоскова Е.М., Безбородова О.А., Якубовская Р.И., Максименко С.В., Рябых В.П. Интеграция и тканеспецифическая экспрессия гена лактоферрина человека в молочной железе трансгенных кроликов // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2013. – 4. – С. 32-52.
- 2 Закиян С.М., Медведев С.П., Дементьева Е.В., Власов В.В. (Ред.). Редактирование генов и геномов. – Новосибирск: Изд. СО РАН, 2016, 419 с.
- 3 Максименко О.Г., Дейкин А.В., Ходарович Ю.М., Георгиев П.Г. Использование трансгенных животных в биотехнологии: перспективы и проблемы // Acta naturae. – 2013. – Т. 5. – № 1. – С. 33-47.
- 4 Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas – инструменты открытий // Acta naturae. – 2014. – Т. 6. – № 3. – С. 20-42.
- 5 Capecchi M. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. – Nature Reviews | GENETICS. – 2005. – Vol. 6. – P. 507-512.
- 6 Maga E.A., J.D. Murray. Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk // Bio. Technology. – 1995. – Vol. 13. – P. 1452-1457.
- 7 Mashiko D., Fujihara Y., Satouh Y., Miyata H., Isotani A., Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA // Sci. Rep. – 2013. – Vol. 3. – P. 3355. doi:10.1038/srep03355.
- 8 Shi G., Chen H., Wu X., Zhou Y., Liu Z., Zheng T., Huang P. A mWAP-hLF hybrid gene locus gave extremely high level expression of human lactoferrin in the milk of transgenic mice // Transgenic Res. – 2009. – Vol. 18. – P. 573-582.
- 9 Singh P., Schimenti J.C., Bolcun-Filas E. A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications // Genetics: Early Online. – published on September 29, 2014 as 10.1534/genetics.114.169771.
- 10 Wall R.J., Pursel V.G., Shamayt A., Mcknight R.A., Pittiustt C.W., Hennighausen L. High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1991. – Vol. 88. – P. 1696-1700. doi: 10.1073/pnas.88.5.1696
- 11 Wall R.J., Kerr D.E., Bondioli K.R. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale // J. Dairy Sci. – 1997. – Vol. 80. – P. 2213-2224.

REFERENCES

1. Capecchi M. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nature Reviews | GENETICS*. 2005, 6: 507-512.
2. Ezerskii V.A., Shishimorova M.S., Tevkin S.I., Trubitsina T.P., Koloskova E.M., Bezborodova O.A., Yakubovskaya R.I., Maksimenko S.V., Ryabykh V.P. [Integration and tissue-specific expression of the human lactoferrin gene in the mammary gland of transgenic rabbits]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology*. 2013, 4: 32-52.
3. Maga E.A., J.D. Murray. Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk. *Bio. Technology*. 1995, 13: 1452-1457.

4. Mashiko D., Fujihara Y., Satouh Y., Miyata H., Isotani A., Ikawa M. Generation of mutant mice by pro-nuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci. Rep.* 2013, 3: 3355, DOI:10.1038/srep03355.
5. Maksimenko O.G., Deikin A.V., Khodarovich Yu.M., Georgiev P.G. [The use of transgenic animals in biotechnology: perspectives and problems]. *Acta naturae.* 2013, 5(1): 33-47. (In Russian)
6. Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakiyan S.M. [Genome editing systems TALEN and CRISPR / Cas - discovery tools]. *Acta naturae.* 2014, 6(3): 20-42. (In Russian)
7. Shi G., Chen H., Wu X., Zhou Y., Liu Z., Zheng T., Huang P. A mWAP-hLF hybrid gene locus gave extremely high level expression of human lactoferrin in the milk of transgenic mice. *Transgenic Res.* 2009, 18: 573-582.
8. Singh P., Schimenti J.C., Bolcun-Filas E. A Mouse Geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics: Early Online.* Published on September 29, 2014 as 10.1534/genetics.114.169771
9. Wall R.J., Pursel V.G., Shamayt A., Mcknight R.A., Pittiust C.W., Hennighausen L. High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991, 88: 1696-1700. doi: 10.1073/pnas.88.5.1696
10. Wall R.J., Kerr D.E., Bondioli K.R. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. *J. Dairy Sci.* 1997, 80: 2213-2224.
11. Zakiyan S.M., Medvedev S.P., Dement'eva E.V., Vlasov V.V. (Eds). *Redaktirovanie genov i genomov* (Editing genes and genomes). Novosibirsk: Izd. SO RAN Publ., 2016, 419 p.

Cloning nucleotide sequences 5'- and 3'-domains of the gene for acidic mouse serum protein for the use in gene-engineering constructions, created on the basis of CRISPR / Cas9 system

Yezeresky V.A., Koloskova E.M., Belova N.V., Kutyn I.V., Ryabykh V.P.

*Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition, Borovsk
Kaluga Region, Russian Federation*

ABSTRACT. Based on the genomic sequence of the gene for acidic mouse serum protein (mWAP), primers were chosen for PCR amplification of 5' and 3'-flanking regions intended for the role of the right and left arms of homology in genetically engineered constructs (GIC) for the purpose of replacing mWAP with coding sequence of a biologically active human protein using the CRISPR / Cas9 system. The 5'WAP PCR amplification was done with the mouse genomic DNA, the promoter region of the mWAP gene, containing the site for the restriction enzyme KpnI immediately before the ATG codon. The reverse primer for PCR amplification contained a site for KpnI, and a site for EagI (NotI) was introduced into the forward primer. 3'WAP PCR amplification was done with the mouse genomic DNA: the region of the 3rd intron of the mWAP gene was chosen to amplify the 3'WAP fragment. In the forward and reverse primers for PCR amplification, sites for the restriction enzymes SalI and ClaI were introduced, respectively. As a result of cloning of the amplifications in pTZ57R / T, the plasmids pTZ5'WAP and pTZ3'WAP were obtained. The reliability of cloning is confirmed by the sequencing of cloned fragments.

Key words: genetic engineering, CRISPR/Cas9, mWAP, plasmids, biomodels, transgenic mice

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2018, 1: 19-28

Поступило в редакцию: 11.11.2017

Получено после доработки: 22.12.2017

Езерский Вадим Александрович, с.н.с.; 8(906)642-59-92;

Колоскова Елена Михайловна, к.б.н., с.н.с.; 8(910)590-92-83;

Белова Надежда Викторовна, м.н.с., 8(903)635-83-57;

Кутын Иван Владимирович, м.н.с., 8(953)332-86-47;

Рябых Владимир Павлович, д.б.н., зав. лаб., 8(484)386-64-31, vlt03@kaluga.ru