
МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ И КЛЕТочНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 575:577.21

doi:10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2018.2.19-30

**ГЕНО-ИНЖЕНЕРНАЯ КОНСТРУКЦИЯ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ГЕНА
WAP МЫШИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ κДНК ЛАКТОФЕРРИНА
ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ HDR С ПРИМЕНЕНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR / Cas9**

Колоскова Е.М., Езерский В.А., Белова Н.В., Кутьин И.В., Рябых В.П.,
Трубицина Т.П., Максименко С.В.

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

По результатам рестриктоного анализа потенциальных компонентов генно-инженерной конструкции основным вектором-носителем была выбрана плазида *pJET1.2/blunt*. ПЦР-амплификат κДНК чЛФ клонировали в *pJET1.2/blunt* с получением плазмиды *pJET1.2hLf*. фрагменты 3'WAP и 5'WAP, вырезанные из полученных ранее промежуточных плазмид *pTZ5'WAP* и *pTZ3'WAP*, были последовательно клонированы в *pjet1.2hlf*.

Рестриктный и ПЦР-анализы подтвердили состав созданной плазмиды *PWAPHLF*. Линейная генная конструкция размером 4061 п.н. вырезается рестриктазами *EagI (NotI)* и *ClaI*, содержит 2136 п.н. κДНК чЛФ, левое и правое плечи гомологии гену кислого сывороточного белка мыши размером 945 и 980 п.н. соответственно. Полученную плазмиду (или линейаризованную генную конструкцию) предполагается использовать в качестве матрицы для замещения кодирующей последовательности гена *mWAP* на последовательность κДНК чЛФ по механизму прямой гомологичной рекомбинации с применением системы CRISPR/Cas9.

Ключевые слова: генно-инженерная конструкция, плазмиды, WAP мыши, лактоферрин человека, CRISPR/Cas9, HDR

Проблемы биологии продуктивных животных, 2018, № 2: 19-30

Введение

С появлением технологии CRISPR/Cas9 стали осуществимы одноступенчатые нокаут гена с возможностью его замены трансгеном, генерация мутаций в нескольких генах одновременно с участием одного или обоих аллелей (в том числе получение гомозиготных животных в F0 поколении), введение в геном сразу нескольких трансгенов.

Во всем мире, в том числе и в России, ожидается экспоненциальный рост количества трансгенных домашних животных (ТЖ), полученных по CRISPR/Cas9 технологии. Особенно актуально это для нашей страны: относительно низкая эффективность традиционного трансгенноза и высокие материальные затраты длительное время являлись лимитирующим фактором создания трансгенных сельскохозяйственных животных и животных-биомоделей.

Научные коллективы, добившиеся серьезных успехов в получении трансгенных животных-продуцентов рекомбинантных белков с молоком, заявили о планах применения новых технологий в своих исследованиях: почти одновременно появилось множество работ, посвященных осмыслению пройденного пути и эффективности полученных возможностей в решении сложных биотехнологических задач. Это работы ученых из США, около 10 лет посвятивших получению коз-продуцентов лизоцима человека (Cooper et al., 2015), Китая, получивших КРС с высокой экспрессией чЛФ и лизоцима с использованием ВАС-конструкции (Lu D et al., 2016), бразильско-российский коллектив, добившийся серьезного успеха в создании чГ-КСФ-продуцирующих коз (Freitas et al., 2014).

Применение новых эндонуклеазных технологий с использованием механизма прямой гомологичной рекомбинации (HDR) – эффективный метод гуманизации молока замещением генов эндогенных молочных белков (МБ) у сельскохозяйственных животных генами таких же белков молока человека для улучшения его потребительских качеств. Можно исключить из состава молока какой-либо белок; заменить его белком фармакологического или диагностического назначения; модифицировать сами МБ с целью повышения их питательной ценности и усвояемости или переработки в разные молочные продукты для получения из них биологически активных пептидов в качестве вакцин (Whitelaw et al., 2016).

Промоторные области генов тканеспецифичных МБ – казеинов и сывороточных белков уже давно с переменным успехом используют в составе генных конструкций для создания ТЖ – продуцентов БАВ. Основные белки молочной сыворотки – α -лактальбумин, β -лакто-глобулин и кислый сывороточный протеин (WAP) кодируются генами относительно небольшого размера, находящимися на разных хромосомах, тогда как гены казеинов имеют кластерную организацию на одной хромосоме. Промотор гена WAP мыши (*mWAP*) содержит два регуляторных региона: проксимальный (50-150 п.н.) и дистальный (530-630 п.н.) до начала сайта старта транскрипции, с которого начинается синтез РНК (Öztürk-Winder et al., 2002). Оба региона содержат ответственный за тканеспецифичную экспрессию гена WAP участок сайтов связывания семи факторов транскрипции (Li et al., 1995). Первые трансгенные мышь (Gordon et al., 1987) и коза (Ebert et al., 1991), были получены с применением ГИК, в составе которой была промоторная последовательность гена *mWAP* размером 2,5 т.п.н. Уровень рекомбинантного тканевого активатора плазминогена человека в молоке мыши был всего 300 нг/мл, в молоке козы – 3 мкг/мл. Использование в составе ГИК обеих фланкирующих областей гена *mWAP* (5'- и 3'- соответственно до 2,6 и 1,3 т.п.н.) существенно не изменило ситуацию: содержание Г-КСФ человека в молоке трансгенных мышей не превышало 250 нг/мл (Lu et al., 1999).

Хорошие результаты были получены с применением в ГИК промотора гена WAP кролика (*rbWAP*): у мышей, трансгенных по гену гормона роста человека под промотором *rbWAP* размером 6,3 т.п.н., содержание рекомбинантного белка (РБ) в молоке было 4-22 мг/мл (Devinoy et al 1994). Уровень РБ в молоке трансгенных мышей в аналогичном эксперименте с использованием гена бычьего гормона роста, был сопоставим: 1-16 мг/мл (Thépot et al., 1995). Но эритропоэтин человека в подобной конструкции оказался токсичным для трансгенных кроликов: смертность животных была высокой, следы гормона были найдены в крови независимо от возраста и пола, а содержание ЭПО в молоке не превышало 50 мкг/мл (Massoud et al., 1996). С использованием в составе ГИК промотора *rbWAP* размером 17,6 т.п.н. были получены мыши с содержанием α 1-антитрипсина человека в молоке до 10 мг/мл (Bichoff et al., 1992).

Более высокая эффективность работы промотора *rbWAP*, по сравнению с использованным ранее промотором *mWAP* размером 2,6 т.п.н., объясняется наличием мощного энхансера в положении 5,5 т.п.н. до начала точки транскрипции (Devinoy et al., 1991; Millot et al., 2001). Эффективность работы любого промотора может быть связана и со слитым с ним трансгеном, в составе интронов которых могут содержаться регуляторные последовательности, способствующие экспрессии.

Все это применимо и к *mWAP* промотору. Традиционной микроинъекцией гибридного гена *mWAP-hLF* были получены трансгенные мыши с очень высоким уровнем экспрессии чЛФ: 16.7-29.8 мг/мл молока у пяти линий (Shi et al., 2009). В ГИК геномная кодирующая последовательность *mWAP* была замещена полноразмерным геном лактоферрина человека (*hLF*) от стартового до стоп-кодона, при этом величины 5'- и 3'-*mWAP* составляли 13 и 8 т.п.н.

Эффективность работы любой новой технологии, генной конструкции в первую очередь оценивается в работе с мышами-моделями, после чего планируется их использование на более крупных животных. WAP – основной белок сыворотки молока мыши и кролика: при

среднем содержании белка около 125 г/л молока у мышей линии C57BL/6J доля WAP составляет 12% общего белка, или около 15 г/л (Boumahrou et al., 2009), столько же – у кролика (Baranyi et al., 1995). Ген кислого сывороточного белка, следовательно, перспективный кандидат для замены геном фармакологически активного белка при использовании системы CRISPR/Cas9: точное встраивание (замещение) трансгена, имеющего относительно короткие (до 1 т.п.н.) плечи гомологии к гену WAP, обеспечит его работу под управлением полноразмерных эндогенных регуляторных последовательностей.

Материал и методы

В работе использовали следующие ферменты и реактивы: *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase*, 1 ед/мкл; рестриктазы *KpnI*, *Bsu15I (ClaI)*, *NotI*, *Sall*, *EagI* (10 ед/мкл); *10×Buffer Y⁺/Tango*, *10×Buffer O*; *T4 DNA Ligase* (5 ед/мкл), *10×T4 DNA Ligase Buffer* (Fermentas, ThermoScientific).

При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали смесь *dNTP* 2 мМ раствор (Fermentas), Taq-полимеразу 5 ед/мкл, *10×Taq-буфер* с 25 мМ $MgCl_2$, Pfu-ДНК-полимеразу, 5 ед/мкл (Силекс). Временные и температурные параметры ПЦР были подобраны в зависимости от структуры праймеров. Последовательности и описание праймеров, использованных в работе, приведены в табл. 1. Праймеры заказывали и синтезировали в ЗАО «Синтол» <<http://www.syntol.ru>>. Процедуру ПЦР проводили на амплификаторе ДНК «Терцик» («ООО ДНК-Технология», Москва).

ПЦР-амплификат кДНК чЛФ клонировали в *pJET1.2/blunt* из набора *CloneJET PCR Cloning Kit* согласно рекомендациям поставщика. Все использованные наборы - фирмы Fermentas (ThermoScientific) <<http://www.thermoscientific.com/fermentas>>.

Трансформацию компетентных клеток *E.coli Dh5a* проводили по методике и с реагентами набора *Transform-Aid Bacterial Transformation Kit*. Трансформированные клетки высевали по 10-25 мкл на среду Лурия-Бертани (ЛБ), содержащую 100 мкг/мл ампициллина (Am^+) и 1,5% агара. Выросшие клоны пересеивали на такую же агаризованную ЛБ- Am^+ среду. ДНК из клонов для ПЦР-анализа выделяли с помощью лизирующей смеси с протеиназой К. Подходящий клон нарабатывали в 100 мл ЛБ- Am^+ среды. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* или классическим методом щелочного лизиса.

Таблица 1. Последовательности и свойства использованных в работе праймеров

Праймер	5'-3' последовательность	Направление	Введенный сайт рестрикции
Lf1701 (LfF)	ATGGTACC ATGAACTTGTCTTCCTCGTCCT	F	KpnI
Lf1702 (LfR):	GTTCGAC TTACTTCCTGAGGAATTCACA	R	Sall
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	F	
W5'R	CATGGTACC GGTGTCAGGCAAGTGAAGT	R	KpnI
W1703	GTTCGAC TGCATCAGATCCAAGTGCAGATACAATGTG	F	Sall
W1704	ATCGAT TCACCTCTGCTTCTAGCCTAGTCAG	R	ClaI

Качество и количество выделенных плазмид и фрагментов рестрикции оценивали визуально в УФ свете после электрофореза образцов в агарозном геле (АГ). Электрофорез проводили в горизонтальном АГ в $\times 0,5$ Трис-боратном буфере (ТВЕ), pH 8,0, с бромистым этидием, используя набор оборудования фирмы Hoeffer (США). Препаративный электрофорез проводили в $\times 1$ Трис-ацетатном буфере (ТАЕ), pH 8,0, с бромистым этидием. ДНК из агарозного геля выделяли с помощью набора Gene JET Gel Extraction Kit. Размер фрагментов ДНК в АГ оценивали, используя в качестве стандарта DNA Ladder Mix (Fermentas). Расщепление плазмидной ДНК рестриктазами проводили стандартными методами с учетом

активности и условий работы каждого фермента, описанных в сертификатах анализа или справочных каталогах (“Fermentas”, “Invitrogen”).

Результаты и обсуждение

Рестриктный анализ компонентов генно-инженерной конструкции и потенциальных плазмид для сборки.

В качестве потенциальных векторов-носителей для сборки ГИК рассматривали *pTZ57R/T* и *pJET1.2/blunt*. В результате рестриктоного анализа их сайтов мультиклонирования и компонентов конструкции (5'- и 3'WAP, κДНК hLf) в качестве основной плазмиды для клонирования была выбрана *pJET1.2/blunt*.

1.1. Клонирование κДНК чЛФ, получение плазмиды *pJET1.2hLf*

ПЦР-амплификат κДНК чЛФ получали с плазмиды *pas1Lf* (Езерский и др., 2004). В праймер *Lf1702* ввели сайт для рестриктазы *Sall*, в праймер *Lf1701* – сайт для *KpnI*. Был получен ПЦР-амплификат размером 2150 п.н. (из них 2136 – κДНК чЛФ).

Таблица 2. Состав препаративной ПЦР-смеси для получения амплификата κДНК чЛФ

	Компоненты	Объем, мкл
1	Taq buf ×10	16
2	dNTP ×10 (2 мМ)	12
3	Lf1701 (3 пМ/мкл)	8
4	Lf1702 (3 пМ/мкл)	8
5	pas1Lf (20 нг/мкл)	8
6	TaqPol (5 ед/мкл)	2,4
7	H ₂ O	105,6
	Итого	160

Режим амплификации: денатурация 94°C - 45 сек (в первом цикле – 3 мин.), отжиг праймеров 62°C – 60 с., элонгация 72°C – 2 мин. 30 с. (в последнем цикле – 3 мин); всего 26 циклов. После препаративного электрофореза ПЦР-амплификат очистили из агарозного геля (рис. 1), обработали blunting-экзонуклеазой и клонировали в *pJET1.2/blunt*. Выросшие на селективной среде клоны трансформированных компетентных клеток *E.coli Dh 5α* проверили ПЦР-анализом с праймерами *T7* и *LfR* (рис. 2).

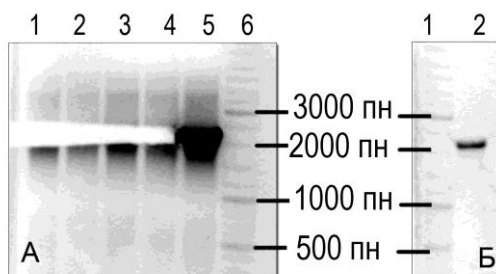


Рис. 1. Препаративный электрофорез ПЦР-амплификата κДНК hLf (дор. А1-5); 0,8% агарозный гель, ×1 TAE (А6), маркер размеров ДНК (Б1); выделенный из агарозного геля фрагмент *KpnI-hLf-Sall* (Б2).

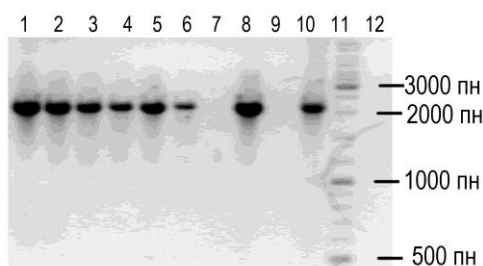


Рис. 2. Проверка бактериальных клонов праймерами T7 и LfR. 0,8% агарозный гель, $\times 0,5$ ТБЕ; дор. 1-10 – клоны 1-10 соответственно, дор. 11 – маркер размеров ДНК, 12 – H_2O

Положительный клон, содержащий плазмиду *pJET1.2hLf* в правильной ориентации, наработали и провели проверочную рестрикцию выделенной плазмиды рестриктазами *KpnI* и *SalI* (рис. 3). Схема получения *pJET1.2hLf* представлена на рис. 4; *pJET1.2hLf* использовали далее для клонирования других компонентов ГИК.

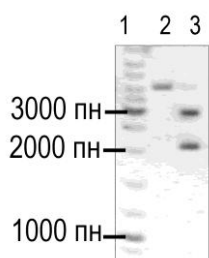


Рис. 3. Проверочная рестрикция *pJET1.2.hLf*. 0,8% агарозный гель, $\times 0,5$ ТБЕ 1 – маркер размеров ДНК; 2 – *pJET1.2.hLf*; 3 – *pJET1.2.hLf* + *KpnI* + *SalI*

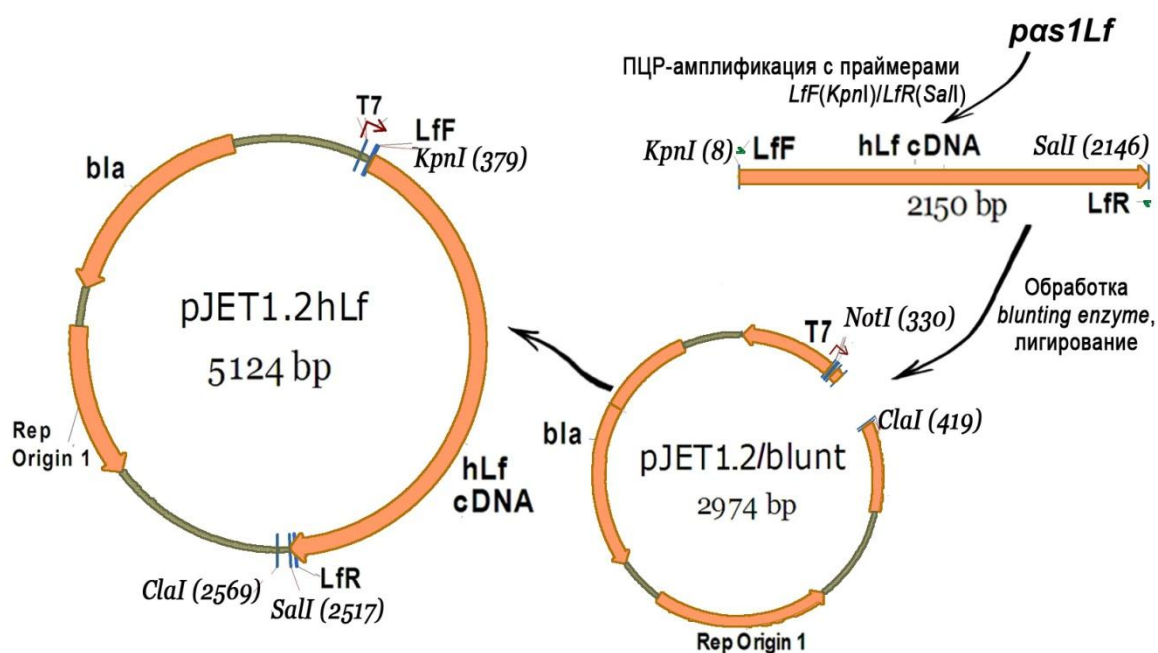


Рис. 4. Схема получения плазмиды *pJET1.2.hLf*, содержащей кДНК чЛФ. Указаны основные рестриктные сайты для клонирования следующих фрагментов ГИК (сайт для рестриктазы *NotI* содержит последовательность для *EagI*), сайты связывания используемых праймеров.

1.2. Клонирование 5'WAP и 3'WAP; получение плазмиды PWAPHLF

Ранее нами были созданы промежуточные 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 (Езерский и др., 2018). Один из клонов *pTZ5'WAP* по результатам секвенирования имел однонуклеотидную замену в положении 494, что соответствует записи NC_000077.6 для *Mus musculus* линии C57BL/6J, опубликованной в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) на 99,89%. Поскольку замена находится в некодирующей области, использовали этот клон, поскольку в другом секвенированном клоне была найдена однонуклеотидная делеция в РНК-кодирующей последовательности. В последовательности 3'WAP отличий не обнаружили. Препаративную рестрикцию *pTZ5'WAP* и *pTZ3'WAP* проводили в условиях и в порядке, представленном в табл. 3.

Таблица 3. Препаративная рестрикция *pTZ5'WAP* и *pTZ3'WAP*

Компонент	Смесь для 5'WAP Объем, мкл	Смесь для 3'WAP Объем, мкл
<i>pTZ5'WAP</i> (50 нг/мкл)	60	
<i>pTZ3'WAP</i> (60 нг/мкл)		30
10× Tango буфер *	15	10
<i>KpnI</i> (10 ед/мкл)	5	-
<i>ClaI</i> (10 ед/мкл)	-	2,5
вода	70	52
Итого:	150 мкл	100 мкл
Инкубировали при 37°C	3 часа	3 часа
10× Tango буфер **	19	13
<i>EagI</i> (10 ед/мкл)	3	-
<i>SalI</i> (10 ед/мкл)	-	3
Инкубировали при 37°C	1,5 часа	3 часа

Примечания: * в буфере 1×Tango активность *KpnI*: 20-50% , *ClaI*: 100% ; ** в буфере 2×Tango активность *EagI*: 20-50%, *SalI*: 50-100%.

Рестриктные смеси разделяли в агарозном геле. Из вырезанных полос геля, соответствующих 1000 п.н. выделили фрагменты *EagI*-5'WAP-*KpnI* и *SalI*-3'WAP-*ClaI* (рис. 5).

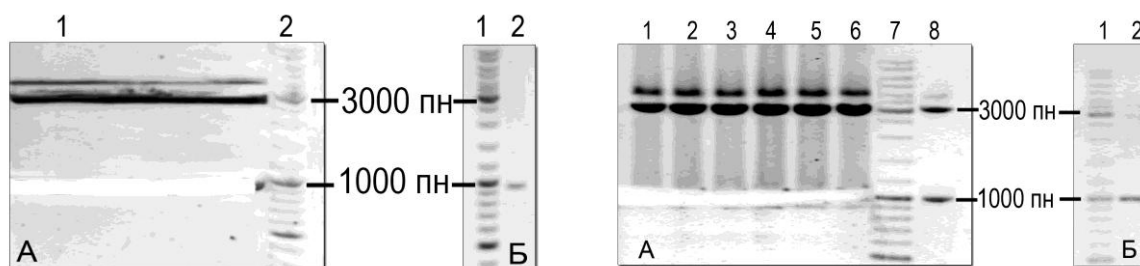


Рис. 5. Препаративный электрофорез рестриктных смесей (А) и выделенных из агарозного геля фрагментов (Б). Слева: *pTZ5'WAP*+*EagI*+*KpnI*, *EagI*-5'WAP-*KpnI*. Справа: *pTZ3'WAP*+*ClaI*+*SalI*, *SalI*-3'WAP-*ClaI*; 0,8% агарозный гель, TAE; Б1 – маркер размеров ДНК. На уровне 4000 п.н. – недорезанные плазмиды.

Фрагмент *EagI*-5'WAP-*KpnI* клонировали в предварительно подготовленную плазмиду *pJET1.2hLf*. Выросшие из трансформированных лигазной смесью клеток *E.coli Dh5α* клоны проверили на наличие вставки ПЦР с праймерами T7 и W5'R. Положительный клон, содержащий плазмиду, обозначенную как *pJET5'WhLf*, наработали. Фрагмент *SalI*-3'WAP-*ClaI* клонировали в предварительно подготовленную плазмиду *pJET5'WhLf*.

Таблица 4. Состав лигазных смесей для последовательного клонирования фрагментов 5'WAP и 3'WAP

Компоненты	5'WAP	3'WAP
	Объем, мкл	Объем, мкл
1 <i>pJEThLf/EagI/KpnI/AlkPh</i> (≈ 50 нг/мкл)	1,5	-
2 <i>pJET5'WhLf/SalI/ClaI/AlkPh</i> (≈ 15 нг/мкл)	-	1,5
3 5 × лигазный буфер	4	4
4 <i>EagI</i> -5'WAP- <i>KpnI</i> (≈ 40 нг/мкл)	6	-
5 <i>SalI</i> -3'WAP- <i>ClaI</i> (≈ 50 нг/мкл)	-	4
6 H ₂ O	7,5	9,5
7 T4 ДНК-лигаза (5 ед/мкл)	1	1
Итого:	20	20

Выросшие клоны проверили ПЦР с праймерами W1703-W1704 и LfF-LfR (рис. 6).

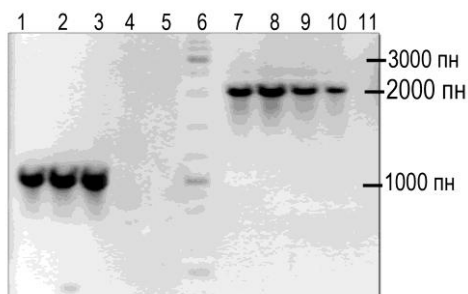


Рис. 6. Проверка трансформированных бактериальных клонов ПЦР с праймерами W1703- W1704 (1-5) и LfF-LfR (7-11), 0,8% агарозный гель, $\times 0,5$ ТБЕ. Дор. 1-4, 7-10 – клоны 1, 2, 4, 5 соответственно; 5 и 11 - H₂O; 6 – маркер размеров ДНК,

Таблица 5. Рестриктивный анализ *pWAPhLf*, выделенной из клонов 1и 2

Рестриктазы	Размеры фрагментов рестрикции <i>pWAPhLf</i> , п.н.	
	Ожидаемые	Фактические
1 <i>EagI</i> + <i>ClaI</i>	2885+4061	≈ 3000 ; ≈ 4000
2 <i>KpnI</i> + <i>SalI</i>	2138+4808	≈ 2000 ; ≈ 5000

Клон №1 наработали и выделили *pWAPhLf*, из которой HDR-конструкция вырезается рестриктазами *EagI* (или *NotI*) и *ClaI* (рис. 7). Схема получения плазмиды *pWAPhLf* представлена на рис. 8.

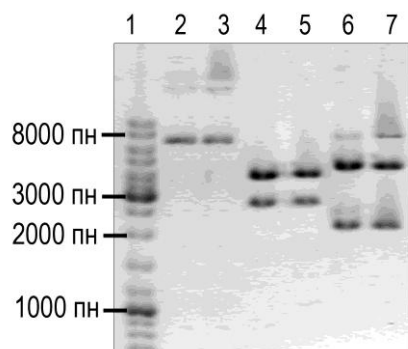


Рис. 7. Рестриктивный анализ клонов *pWAPhLf*, 0,8% агарозный гель, $0,5 \times$ ТБЕ. 1 – маркер размеров ДНК; 2 – *pWAPhLf*/1; 3 – *pWAPhLf*/2; 4 – *pWAPhLf*/1 + *EagI*+ *ClaI*; 5 – *pWAPhLf*/2 + *EagI*+ *SalI*; 6 – *pWAPhLf*/1 + *KpnI* +*SalI*; 7 – *pWAPhLf*/2 + *KpnI* +*SalI*; На дор. 6,7 присутствует недорезанная плаزمида.

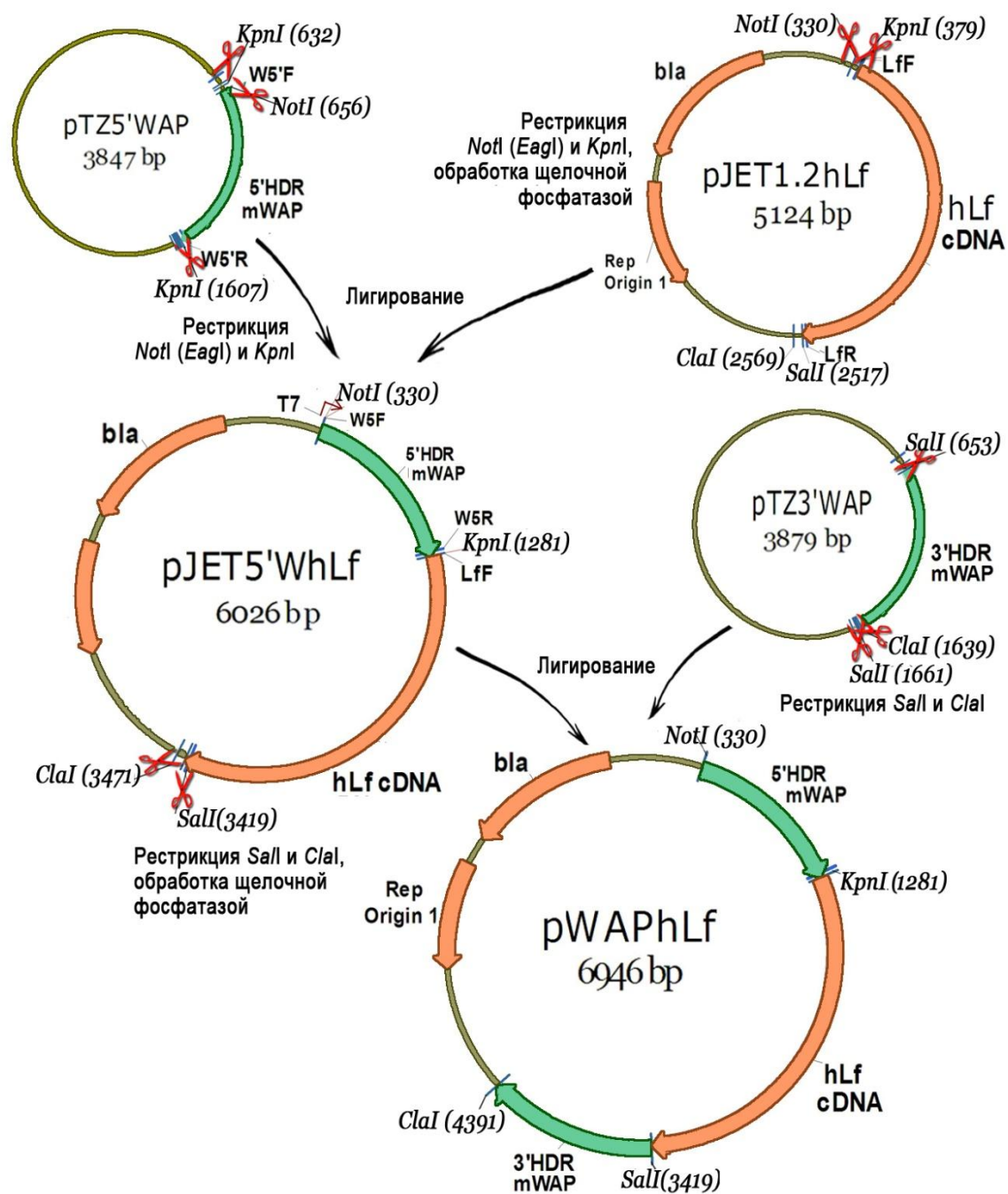


Рис. 8. Схема получения плазмиды *pWAPhLf*, содержащей кДНК чЛФ, 5'WAP и 3'WAP плечи гомологии к гену *mWAP*. Указаны основные сайты рестрикции.

Заключение

Создана плаزمида *pWAPhLf*, из которой рестриктазами *EagI* (*NotI*) и *ClaI* вырезается линейная ГИК размером 4061 п.н., содержащая 2136 п.н. кДНК чЛФ, левое и правое плечи гомологии гену кислого сывороточного белка мыши (*mWAP*) размером 945 и 980 п.н. соответственно. Полученная плазмиды (или вырезанная ГИК) может быть использована в

качестве матрицы для замещения кодирующей последовательности гена *mWAP* на последовательность кДНК чЛФ по механизму гомологичной рекомбинации в процессе репарации геномной ДНК эмбриона мыши, разрезанной эндонуклеазой Cas9 в сайтах гена *mWAP*, узанных gRNA(s) (компонентов CRISPR/Cas9 системы).

Плаزمиды *pWAPhLf* может быть использована в качестве кассеты для вставки любых других фрагментов ДНК по уникальным сайтам рестрикции *KpnI* и *SalI* (вместо кДНК чЛФ, в случае отсутствия таковых сайтов во встраиваемой ДНК).

ЛИТЕРАТУРА

1. Езерский В.А., Иванова Л.Б., Шевченко В.Г. Получение плазмиды, содержащей структурный ген лактоферрина человека под контролем регуляторных элементов гена *as1*-казеина быка // Сборник научных трудов ВНИИФБиП. – 2004. – Т. 43. – С. 52-67.
2. Езерский В.А., Колоскова Е.М., Белова Н.В., Кутьин И.В., Рябых В.П. Клонирование нуклеотидных последовательностей 5'- и 3'-областей гена кислого сывороточного белка мыши для использования в генно-инженерных конструкциях, создаваемых на основе системы CRISPR/Cas9 // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2018. – Т. 1. – С. 19-28
3. Baranyi M., Brignon G., Anglage P., Ribadeau-Dumas B. New data on the protein of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) milk // Comp. Biochem. Physiol. – 1995. – Vol. 111B. – P. 407-415.
4. Bichoff R., Degzuse E., Perraud F., Dalemans W., Ali-Hadji D., Thépot D., Devinoy E., Houdebine L.M., Pavirani A. A 17,6 kb region located upstream of the rabbit WAP gene direct high-level expression of a functional human protein variant in transgenic mouse milk // FEBS. – 1992. – Vol. 305. – P. 265-268.
5. Boumahrou N., Andrei S., Miranda G., Henry C., Panthier J.J., Martin P., Bellier S.. The major protein fraction of mouse milk revisited using proven proteomic tools // J. Physiol. Pharmac. – 2009. – Vol. 60. – Suppl. 3. – P. 113-118.
6. Cooper C.A, Maga E.A, Murray J.D. Production of human lactoferrin and lysozyme in the milk of transgenic dairy animals: past, present, and future // Transgenic Res. – 2015. – Vol. 24. – No. 4. – P. 605-614. doi: 10.1007/s11248-015-9885-5.
7. Devinoy E., Malienou-N'Gassa R., Thepot D., Puissant C., Houdebine L.M. Hormone responsive elements within the upstream sequences of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene direct chloramphenicol transferase (CAT) reporter gene expression in transfected rabbit mammary cells // Mol. Cell. Endocrin. – 1991. – Vol. 81. – P. 185-193.
8. Devinoy E., Thepot D., Stinnakre M.-G., Fontaine M.-L., Grabowski H., Puissant C., Pavirani A., Houdebine L.-M. High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland // Transg. Res. – 1994. – Vol. 3. – No. 2. – P. 79-89.
9. Ebert K.M., Tullio P.Di, Barry C.A., Schindler J.E., Ayres S.L., Smith T.E., Pellerin L.J., Meade H.M., Denman J., Roberts B.. Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats // Nature Biotechn. – 1994. – Vol. 12. – P. 699-702. doi:10.1038/nbt0794-699
10. Ebert K.M., Selgrath J.P., DiTullio P., Denman J., Smith T.E. et al. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression // Biotechnology (NY). – 1991. – Vol. 9. – P. 835-838.
11. Freitas V.J.F., Melo L.M., Batista R.I.T.P., Souza-Fabjan J.M.G., Teixeira D.I.A., Serova I.A., Andreeva L.E., Burkov I.A., Serov O.L. Goats (*Capra hircus*) as bioreactors for production of recombinant proteins interesting to pharmaceutical industry // Clon. Transgen. – 2014. – Vol. 3. – P. 130. doi:10.4172/2168-9849.1000130
12. Gordon K., Lee E., Vitale J.A., Smith A.E., Westphal H., Hennighausen L. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk // Nature Biotechn. – 1987. – Vol. 5. – P. 1183 - 1187. doi:10.1038/nbt1187-1183
13. Li S., Rosen J.M.. Nuclear factor I and mammary gland factor (STAT5) play a critical role in regulating rat whey acidic protein gene expression in transgenic mice // Mol. Cell Biol. – 1995. – Vol. 15. – P. 2063-2070.
14. Lu D., Liu S., Ding F., Wang H., Li J., Li L., Dai Y., Li N.. Large-scale production of functional human lysozyme from marker-free transgenic cloned cows // Sci. Rep. – 2016. – Vol. 6. – P.22947. doi: 10.1038/srep22947

15. Lu Y., Tian C., Deng J., Cheng X., Huang P. Establishment of La-tPA/G-CSF dual transgenic mice and expression in their mammary gland // *Science in China (Series C)*. – 1999. – Vol. 42. – No 3. – P. 330-336.
16. Massoud M., Attal J., Thépot D., Pointu H., Stinnakre M.G., Théron M.C., Lopez C., Houdebine L.M. The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits // *Reprod. Nutr. Dev.* – 1996. – Vol. 36. – P. 555-563.
17. Millot B., Fontaine M.L., Thepot D., Devinoy E. A distal region, hypersensitive to DNase I, plays a key role in regulating rabbit whey acidic protein gene expression // *Biochem. J.* – 2001. – Vol. 359. – P. 557-565.
18. Öztürk-Winder F., Renner M., Klein D., Müller M., Salmons B., Günzburg W.H. The murine whey acidic protein promoter directs expression to human mammary tumors after retroviral transduction // *Cancer Gene Ther.* – 2002. – Vol. 9. – P. 421-431.
19. 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.
20. Thépot D., Devinoy E., Fontaine M.L., Stinnakre M.G., Massoud M., Kann G., Houdebine L.M.. Rabbit whey acidic protein gene upstream region controls high-level expression of bovine growth hormone in the mammary gland of transgenic mice // *Mol. Reprod. Dev.* – 1995. – Vol. 42. – No. 3. – P. 261-267.
21. Whitelaw C.B.A., Sheets T.P., Lillico S.G., Telugu B.P. Engineering large animal models of human disease // *J. Pathol.* – 2016. – Vol. 238. – P. 247-256.

REFERENCES

1. Baranyi M., Brignon G., Anglage P., Ribadeau-Dumas B. New data on the protein of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) milk. *Comp. Biochem. Physiol.* 1995, 111B: 407-415.
2. Bichoff R., Degzuse E., Perraud F., Dalemans W., Ali-Hadji D., Thépot D., Devinoy E., Houdebine L.M., Pavirani A. A 17,6 kb region located upstream of the rabbit WAP gene direct high-level expression of a functional human protein variant in transgenic mouser milk. *FEBS*. 1992, 305: 265-268.
3. Boumahrou N., Andrei S., Miranda G., Henry C., Panthier J.J., Martin P., Bellier S.. The major protein fraction of mouse milk revisited using proven proteomic tools. *J. Physiol. Pharmac.* 2009, 60(Suppl. 3): 113-118.
4. Cooper C.A, Maga E.A, Murray J.D. Production of human lactoferrin and lysozyme in the milk of transgenic dairy animals: past, present, and future. *Transgenic Res.* 2015, 24(4): 605-614. doi: 10.1007/s11248-015-9885-5
5. Devinoy E., Malienou-N'Gassa R., Thepot D., Puissant C., Houdebine L.M. Hormone responsive elements within the upstream sequences of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene direct chloramphenicol transferase (CAT) reporter gene expression in transfected rabbit mammary cells. *Mol. Cell. Endocrin.* 1991, 81: 185-193.
6. Devinoy E., Thepot D., Stinnakre M.-G., Fontaine M.-L., Grabowski H., Puissant C., Pavirani A., Houdebine L.-M. High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland. *Transg. Res.* 1994, 3(2): 79-89.
7. Ebert K.M., Tullio P.Di, Barry C.A., Schindler J.E., Ayres S.L., Smith T.E., Pellerin L.J., Meade H.M., Denman J., Roberts B.. Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats. *Nature Biotechn.* 1994, 12: 699-702. doi:10.1038/nbt0794-699
8. Ebert K.M., Selgrath J.P., DiTullio P., Denman J., Smith T.E. et al. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology (NY)*. 1991, 9: 835-838.
9. Ezerskii V.A., Ivanova L.B., Shevchenko V.G. [The preparation of a plasmid containing a structural human lactoferrin gene under the control of the regulatory elements of the cows *as1*-casein]. *Sbornik nauchnykh trudov VNIIFBiP* (Collection of scientific papers VNIIFBiP). 2004, 43: 52-67. (In Russian)
10. Ezerskii V.A., Koloskova E.M., Belova N.V., Kut'in I.V., Ryabykh V.P. [Cloning of the nucleotide sequences of the 5'- and 3'-regions of the gene for the acidic mouse whey protein for the use in genetically engineered constructs based on the CRISPR / Cas9 system]. *Problemy biologii productivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology*. 2018, 1: 19-28. (In Russian)

11. Freitas V.J.F., Melo L.M., Batista R.I.T.P., Souza-Fabjan J.M.G., Teixeira D.I.A., Serova I.A., Andreeva L.E., Burkov I.A., Serov O.L. Goats (*Capra hircus*) as bioreactors for production of recombinant proteins interesting to pharmaceutical industry. *Clon. Transgen.* 2014, 3: 130. doi:10.4172/2168-9849.1000130
12. Gordon K., Lee E., Vitale J.A., Smith A.E., Westphal H., Hennighausen L. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Nature Biotechnol.* 1987, 5: 1183-1187. doi:10.1038/nbt1187-1183
13. Li S., Rosen J.M. Nuclear factor I and mammary gland factor (STAT5) play a critical role in regulating rat whey acidic protein gene expression in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 1995, 15: 2063-2070.
14. Lu D., Liu S., Ding F., Wang H., Li J., Li L., Dai Y., Li N. Large-scale production of functional human lysozyme from marker-free transgenic cloned cows. *Sci. Rep.* 2016, 6: 22947. doi: 10.1038/srep22947
15. Lu Y., Tian C., Deng J., Cheng X., Huang P. Establishment of La-tPA/G-CSF dual transgenic mice and expression in their mammary gland. *Science in China (Series C)*. 1999, 42(3): 330-336.
16. Massoud M., Attal J., Thépot D., Pointu H., Stinnakre M.G., Théron M.C., Lopez C., Houdebine L.M. The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reprod. Nutr. Dev.* 1996, 36: 555-563.
17. Millot B., Fontaine M.L., Thepot D., Devinoy E. A distal region, hypersensitive to DNase I, plays a key role in regulating rabbit whey acidic protein gene expression. *Biochem. J.* 2001, 359: 557-565.
18. Öztürk-Winder F., Renner M., Klein D., Müller M., Salmons B., Günzburg W.H. The murine whey acidic protein promoter directs expression to human mammary tumors after retroviral transduction. *Cancer Gene Ther.* 2002, 9: 421-431.
19. 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.
20. Thépot D., Devinoy E., Fontaine M.L., Stinnakre M.G., Massoud M., Kann G., Houdebine L.M. Rabbit whey acidic protein gene upstream region controls high-level expression of bovine growth hormone in the mammary gland of transgenic mice. *Mol. Reprod. Dev.* 1995, 42(3): 261-267.
21. Whitelaw C.B.A., Sheets T.P., Lillico S.G., Telugu B.P. Engineering large animal models of human disease. *J. Pathol.* 2016, 238: 247-256.

**Genetic engineered construction for substitution of mouse WAP gene
by cDNA of human lactoferrin by HDR method using CRISPR/Cas9 system**

Koloskova E.M., Ezerskii V.A., Belova N.V., Kutuin I.V., Ryabykh V.P.,
Trubitsina T.P., Maksimenko S.V.

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

ABSTRACT. The plasmid *pJET1.2/blunt* was chosen as the main carrier vector by the results of the restriction analysis of the potential components of the genetic engineering structure. The PCR amplification of *hLf* cDNA was cloned into *pJET1.2/blunt* to obtain plasmid *pJET1.2hLf*. Fragments 3'WAP and 5'WAP, cut from the previously obtained intermediate plasmids *pTZ5'WAP* and *pTZ3'WAP*, were sequentially cloned into *pJET1.2hLf*.

Restrictive and PCR assays confirmed the composition of the created plasmid *pWAPhLF*. Linear gene construction of 4061 bp is cut out by the restriction enzymes *EagI* (*NotI*) and *ClaI*, contains 2136 bp. cDNA *hLF*, left and right shoulders of homology to the mouse gene for acidic whey protein of the size 945 and 980 bp. respectively. The resulting plasmid (or linearized gene construct) is intended to be used as a template for replacing the coding sequence of the *mWAP* gene by the cDNA sequence of *hLf* by the direct homologous recombination mechanism using the CRISPR/Cas9 system.

Keywords: genetic engineering constructions, plasmids, mouse WAP, human lactoferrin, CRISPR/Cas9, HDR method

Problemy biologii produktivnykh zivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2018, 2: 19-30

Поступило в редакцию: 03.05.2018

Получено после доработки: 18.05.2018

Колоскова Елена Михайловна, к.б.н., с.н.с., тел. 9105909283, heleko3@yandex.ru
Езерский Вадим Александрович, с.н.с., тел. 9066425992, ez.vadim@yandex.ru
Белова Надежда Викторовна, асп., тел. 9534682694, navikbel@mail.ru
Кутуйн Иван Владимирович, асп., тел. 9533328647, kurookami@mail.ru
Рябых Владимир Павлович, д.б.н., зав. лаб., тел. 9605157960, vladimirryabykh@rambler.ru
Трубицина Татьяна Петровна, к.б.н., с.н.с., тел. 9066411572, trubitsina.tp@yandex.ru
Максименко Сергей Васильевич, к.б.н., с.н.с., тел. 9066450252, vx136@rambler.ru