

**РАЗРАБОТКА СПОСОБА МОДИФИКАЦИИ ГЕНА
БЕТА-ЛАКТОГЛОБУЛИНА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/Cas9**

Колоскова Е.М., Езерский В.А.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных –
филиал ФНЦ животноводства – ВИЖ им. ак. Л.К. Эрнста,
Боровск Калужской обл., Российская Федерация*

Бета-лактоглобулин – основной белок молочной сыворотки почти у всех млекопитающих, кроме грызунов и приматов. Регуляторные районы гена бета-лактоглобулина (*BLG*) овец, коз и крупного рогатого скота применяют в составе генетических конструкций. Цель данной работы – создание плазмиды, содержащей 5'- и 3'- плечи гомологии к гену бета-лактоглобулина крупного рогатого скота. Фрагмент, содержащий ген биологически активного белка, может быть встроен в полученную плазмиду по сайту для рестриктазы *EagI* на стыке плечей гомологии. Полученная ДНК-матрица предназначена для сайт-специфичной интеграции гомологичной рекомбинацией в ген бета-лактоглобулина крупного рогатого скота при использовании CRISPR/Cas9 технологии.

Для подбора сайтов внесения двухцепочечных разрезов был определен полиморфный вариант гена *BLG* быка, сперму которого предполагается использовать для оплодотворения яйцеклеток коровы в условиях *in vitro*. Была разработана стратегия внесения двухцепочечных разрезов в ген *BLG* и получены четыре плазмиды *pX330*, кодирующие эндонуклеазу Cas9 и направляющие РНК, специфичные к последовательностям гена *BLG*. Плазида *pBLGcmvEGFP*, содержащая ген зеленого флуоресцентного белка под цитомегаловирусным промотором, предназначена для сайт-специфичной интеграции гомологичной рекомбинацией в ген бета-лактоглобулина для оценки эффективности сайт-специфической работы компонентов системы CRISPR/Cas9 в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: генетическая инженерия, плазмидные конструкции, гомологичная рекомбинация, бета-лактоглобулин крупного рогатого скота

Проблемы биологии продуктивных животных, 2020, 2: 43-56

Введение

Используемые обозначения и термины

АГ – агарозный гель; ГК – генные конструкции; ГМ – генная модификация; ДЦР – двухцепочечные разрезы: индели – делеции, инсерции; ПЦР – полимеразная цепная реакция; РБ – рекомбинантный белок; ТЖ – трансгенные животные; EGFP – улучшенный зелёный флуоресцирующий белок; HDR – прямая гомологичная рекомбинация; β -ЛГ – бета-лактоглобулин; *BLG* – ген бета-лактоглобулина.

Для постоянно растущего населения планеты вопросы медико-биологической и продовольственной безопасности в ближайшей перспективе неизбежно будут обостряться, что делает актуальным поиск и развитие эффективных средств решения возникающих проблем. Одним из важнейших направлений в разработке таких средств являются исследования в области генной инженерии. Возможность осуществления высокоточных молекулярно-генетических манипуляций в ближайшей перспективе должна ускорить разработку терапевтических биоматериалов для предупреждения и лечения заболеваний человека. Вторым перспективным направлением является внесение модификаций в геном сельскохозяйственных животных для увеличения объёмов

производства и получения продуктов питания человека с заданными свойствами (Tan et al., 2012; Bishop, Van Eenennaam, 2020).

Исторически сложилось так, что применение генной инженерии в животноводстве оказалось сложной задачей. Для получения генетически модифицированных (ГМ) животных в подавляющем большинстве работ использовали метод переноса ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer – SCNT), но его эффективность оказалась недостаточной. В последнее десятилетие были достигнуты значительные успехи в разработке инструментов редактирования генома: ZFN (zinc-finger nucleases – нуклеазы «цинковых пальцев»), TALEN (transcription activator-like effector nucleases – транскрипционные активатор-подобные эффекторные нуклеазы) и CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats – кластеризованные регулярно чередующиеся короткие палиндромные повторы). Эти инструменты основываются на генерации двухцепочечного разрыва (ДЦР) ДНК, за которым следует один из двух путей репарации – негомологичное соединение концов (non-homologous end joining, NHEJ) или гомологичная направленная репарация (homology directed repair, HDR). По сравнению с традиционными подходами, эти инструменты значительно сокращают время и усилия, необходимые для создания ГМ-животного. Еще одним преимуществом использования новых инструментов редактирования генома является применение прямой инъекции (микроинъекции, МИ) в развивающиеся эмбрионы для индуцирования целевых мутаций, что позволяет избежать недостатков SCNT. Новые технологии редактирования генома значительно повысили эффективность создания крупных малоплодных ГМ-животных как для биомедицинских, так и для сельскохозяйственных целей (Ларкина и др., 2018). Технологии геномного редактирования, особенно варианты CRISPR технологии, могут совершить настоящий прорыв для повышения производства животноводческой продукции, с точки зрения повышения эффективности, снижения воздействия сельского хозяйства на окружающую среду, усиления борьбы с вредителями, сохранения здоровья животных. Эпоха редактирования генома уже наступила, что требует серьезной оценки потенциальных возможностей и угроз, выгод и рисков, этических и научных взглядов, правового регламентирования (Menchaca et al., 2020).

Применение эндонуклеазных технологий с использованием механизма HDR – эффективный метод изменения состава молока замещением генов эндогенных молочных белков у сельскохозяйственных животных с целью улучшения потребительских качеств молока, использования молочной железы животного как биореактора для продукции гетерологичных белков (Шепелев и др., 2018). Можно исключить из состава молока какой-либо белок, заменить его белком фармакологического или диагностического назначения, модифицировать молочные белки с целью повышения их питательной ценности и усвояемости, для переработки в разные молочные продукты или получения из них биологически активных пептидов в качестве вакцин (Whitelaw et al., 2016).

Промоторные области генов тканеспецифичных молочных белков – казеинов и сывороточных белков (α -лактальбумин, β -лактоглобулин) давно с переменным успехом использовали в составе ГК для создания трансгенных животных-продуцентов биологически активных белков с молоком. Концентрация β -лактоглобулина (β -ЛГ) в молоке КРС составляет в среднем 4,6 мг/мл. Регуляторные районы гена *BLG* овец, коз и КРС давно применяют в составе генных конструкций (ГК) при получении ТЖ по методу классического трансгенеза (Трубицина и др., 2018). Например, экспрессия альфа-1-антитрипсина человека в молоке трансгенных овец достигала 5 мг/мл (Wright et al., 1991) при использовании в составе генной конструкции промотора гена *BLG* овцы.

Коровье молоко – полноценный продукт питания, содержащий белки, жиры, углеводы и минеральные вещества, однако оно нередко вызывает аллергические реакции и снижает использование питательных веществ молочных продуктов. Основным молочным аллергеном является белок молочной сыворотки β -ЛГ. Для снижения его аллергенности используют различные методы: нагрев, высокое давление, ферментативный гидролиз, гликирование (неферментативное гликозилирование). Эти методы в разной степени уменьшают аллергенность β -ЛГ, но при этом нарушаются структура и функции других молочных белков, что значительно влияет на питательную ценность молока. Нокаут гена *BLG* с помощью технологии геномного редактирования полностью

решает проблему, имеющую большое значение для создания гипоаллергенных молочных продуктов. Ген *BLG* – перспективная мишень как для его нокаута с целью получения гипоаллергенного молока, так и для замены геном гетерологичного белка при использовании эндонуклеазных редакторов. Точное встраивание трансгена в составе генной конструкции, содержащей плечи гомологии к *BLG*, обеспечит его экспрессию под управлением полноразмерных эндогенных регуляторных последовательностей.

Известны работы по направленным модификациям гена *BLG* КРС с использованием ZFN и TALEN технологий, но не с использованием системы CRISPR/Cas9. У первой ГМ клонированной коровы (SCNT), полученной в 2011 году с использованием ZFN метода редактирования, была создана биаллельная модификация гена *BLG* с небольшой делецией без сбоя рамки считывания и без образования функциональных нокаутных аллелей (Yu et al., 2011). Позже этим же методом была получена корова, не содержащая в молоке β -ЛГ (Sun et al., 2018).

В экспериментах на зиготах КРС была показана высокая эффективность сайт-специфических мутаций гена *BLG* с использованием ZFN-метода (30-80% эмбрионов). Для точной модификации использовали одноцепочечные ДНК-матрицы с плечами гомологии, фланкирующими интегрируемую последовательность. Анализ микроинъекцированных эмбрионов показал эффективность сайт-специфических модификаций до 33% для ZFN и 46% для TALEN бластоцист. Секвенирование показало, что модификация целевого аллеля *BLG* может достигать 100%. Это означает, что благодаря использованию метода геномного редактирования с микроинъекцией зигот КРС, можно уже в F0-поколении получить немозаичное животное с заранее разработанными биаллельными модификациями (Wei et al., 2015). В 2018 году микроинъекцией зигот с использованием редактора TALEN были получены бык и корова с нокаутом гена *BLG* за счет преднамеренной делеции девяти нуклеотидов в самом начале синтеза белка β -ЛГ и сгенерированного стоп-кодона, что и стало причиной нокаута гена (Wei et al., 2018).

С использованием TALEN-технологии, применённой к фетальным фибробластам, был получен КРС, трансгенный по сывороточному альбумину человека (HSA) с нокаутом гена *BLG*. Концентрация HSA, синтезированного вместо эндогенного β -лактоглобулина, в молоке моноаллельных коров достигала 2,3 г/л, белок имел правильный фолдинг. Содержание HSA в молоке гомозиготных коров было значительно выше – 3,3-3,5 г/л (Luo et al., 2016). Были получены и козы не только с нокаутом гена *BLG*, но и с интегрированными в его локус генами белков молока человека – лактоферрина (Cui et al., 2015; Song et al., 2016) и альфа-лактальбумина (Zhu et al., 2016). Сообщений о получении КРС с модифицированным геном *BLG* с применением системы CRISPR/Cas9 пока не найдено. *BLG*-нокаутные козы были созданы в 2017 году посредством микроинъекции зигот CRISPR/Cas9-компонентами (Zhou et al., 2017).

Цель данной работы – создание ГК, содержащей ген зелёного флуоресцирующего протеина (EGFP) под цитомегаловирусным промотором (CMV) для интеграции гомологичной рекомбинацией в локус *BLG* крупного рогатого скота при совместной микроинъекции с сайт-специфичными компонентами системы CRISPR/Cas9. Точное встраивание (замещение) трансгена, имеющего относительно короткие (до 1 т.п.н.) плечи гомологии к гену *BLG*, обеспечит его работу под управлением полноразмерных эндогенных регуляторных последовательностей.

Для достижения поставленной цели требовалось подобрать последовательности направляющих РНК (нРНК) и разработать систему ПЦР-анализа возможных вариантов внесённых изменений для конкретного аллельного варианта *BLG* для осуществления его модификаций (нокаут гена локальными инделями или крупной делецией).

Материал и методы

Все работы были выполнены на базе ВНИИФБиП животных в рамках госзадания 2019 года по теме 0445-2019-0030. Последовательность гена β -лактоглобулина крупного рогатого скота (*Bos taurus*) была взята из базы данных GenBank, запись X14710 X14710 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/48,127>>, и <http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Transcript/Summary?db=core;g=ENSBTAG00000014678;r=11:103255824-103264276;t=ENSBTAT00000019538>. Геномная ДНК была выделена из спермы быка черно-пестрой породы по кличке Мороз (племенное хозяйство «Быково») фенол-хлороформным

методом. Подбор праймеров, конструирование рекомбинантной ДНК, рестриктный анализ проводили в программе Vector NTI.

В работе использовали ферменты и реактивы: *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase*, рестриктазы *EagI* (аналог – *BseX31*, СибЭнзим), *BglII*, *BamHI*, *BsmBI* с соответствующими буферами. Для промежуточного клонирования ПЦР-продуктов использовали *pTZ57R/T* и *T4 DNA* лигазу из набора *InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific)*. При проведении ПЦР использовали смесь dNTP (2 мМ) (Fermentas), Taq-полимеразу (5 ед/мкл), 10×Taq-буфер (с 25 mM MgCl₂), Pfu-ДНК-полимеразу (5 ед/мкл) (Силекс). Временные и температурные параметры ПЦР были подобраны в зависимости от структуры праймеров. Последовательности и описание праймеров, использованных для создания ГК, приведены в табл. 1. Процедуру ПЦР проводили на амплификаторе ДНК «Терцик» («ООО ДНК-Технология», Москва).

Таблица 1. *Праймеры, использованные для создания генной конструкции*

Обозначение	5'-3' последовательность	Введённый сайт рестрикции
S5-F	gagctcgacctgaaccccat	-
S5-R	cctccaggggtaccagga	-
S3-F	ggacgacgagccctggagaaatt	-
S3-R	gctctccgcatcatgtggccaa	-
BLG51	gctctaga aaccccaggcccaaggata	<i>XbaI</i>
BLG52	aaagtcgaccggccg	<i>Sall</i> , <i>EagI</i>
	ccacctggggaggagaccttgagct	
BLG31	tacggccg agcagtgccacatctaggtgag	<i>Eag I</i>
BLG32	gaagtcgacagatct tgccgactccctacctgggt	<i>Sall-BglIII</i>

Трансформацию компетентных клеток *E. coli Dh5α*, *TG1* 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%-ный агар. 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 ЛБ-Am⁺ среде. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* с нашими модификациями (Колоскова, Езерский, 2019) и классическим методом щелочного лизиса. Качество и количество ДНК оценивали визуально в УФ свете после электрофореза в агарозном геле (АГ). ДНК из АГ выделяли с помощью набора *Gene JET Gel Extraction Kit*. Концентрацию плазмидной ДНК определяли после рестрикции (x1), методом последовательного разведения аликвоты, электрофорезом в агарозном геле с бромистым этидием (*EBr*). В качестве стандарта брали линейаризованную плазмиду известной концентрации в аналогичных разведениях. Электрофорез проводили в горизонтальном АГ в ×0,5 TBE буфере, pH 8,0, с *EBr*, используя набор оборудования фирмы Hoeffer (США). Препаративный электрофорез проводили в ×1 TAE буфере, pH 8,0, *EBr*. Размер фрагментов ДНК в АГ оценивали, используя в качестве стандарта DNA Ladder Mix (Fermentas).

Направляющие РНК подбирали с использованием on-line программ CHOPCHOP <<http://chopchop.cbu.uib.no/>>, CRISPR direct <<http://crispr.dbcls.jp/>>, CRISPOR v.4.8. <<http://crispor.tefor.net/>>. Для получения CRISPR/Cas9 компонентов использовали плазмиду pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene plasmid # 42230) (Cong et al., 2013). Последовательности олигонуклеотидов и их описание, последовательности праймеров для оценки делеций различного размера и встраивания ГК гомологичной рекомбинацией, их описание приведены в табл. 2. Все праймеры и олигонуклеотиды, сиквенс плазмидной ДНК заказывали в ЗАО «Синтол» <<http://www.syntol.ru>>.

Таблица 2. *Олигонуклеотиды для создания компонентов CRISPR/Cas9 системы и праймеры для ПЦР-анализа модификаций*

Обозначение	5'-3' последовательность	Назначение
bg51f	caccggagatgtcgctggccgcca	pX330-51b
bg51r	aaactggcggccagcgacatctcc	

Продолжение таблицы 2

Обозначение	5'-3' последовательность	Назначение
bg52f	caccgacttggtactccttggcca	pX330-52b
bg52r	aaactggccaaggagtaccaagtc	
bg31f	caccgatcctgacgctccccgcca	pX330-31b
bg31r	aaactggcgggggagcgtcaggatc	
bg32f	caccggggagcgtcaggatgggac	pX330-32b
bg32r	aaacgtcccatcctgacgctcccc	
T5L	tcctaatgttgccacgtgtg	
T5R	ataagcagccttgggtggac	
T3L	ggccctggagaaattcgaca	
T3R	gaaccctaccccatgtgtg	
HA5F	cttgccctgaatggaagaa	5'utr < 5'HA, для HDR
HA5R	tggaagtccatttggcgt	5' конец cmv для HDR
HA3F	ttgtctgagtaggtgtcatt	3' конец bGH polyA для HDR
HA3R	gactgaacactccaagttaa	3'utr > 3'HA, для HDR

Результаты и обсуждение

1. Создание плазмиды pBLGcmvEGFP.

1.1. Генотипирование гена BLG KPC.

Ген *BLG KPC* находится на 10-й хромосоме, содержит 4 экзона и кодирует белок из 127 аминокислот (из них 19 – сигнальный пептид). Схема выбора плечей гомологии и фрагментов для секвенирования представлена на рис. 1. Поскольку эффективность работы CRISPR/Cas9 компонентов зависит от качества последовательностей-мишеней sgRNA, при их подборе большое значение имеет возможный полиморфизм гена в области потенциальных двухцепочечных разрезов.

Полиморфизм гена *BLG* может стать причиной низкой эффективности работы компонентов CRISPR/Cas9: яичники KPC отбирают на мясокомбинатах от коров разных пород. В экспериментах *in vitro* оплодотворение яйцеклеток, как правило, производится спермой одного быка. ПЦР амплификаты с геномной ДНК быка «Мороз» 5' и 3' областей гена *BLG* (около 1,5 т.п.н. каждый), сделанные с использованием пар праймеров S5-F/ S5-R и S3-F/ S3-R, были клонированы в *pTZ57R/T* вектор с целью получения последовательностей выбранных фрагментов для секвенирования (рис. 1).



Рис. 1. Схема выбора плечей гомологии гена *BLG KPC* для создания ДНК-матрицы гомологичной рекомбинации. 5'-Плечо гомологии (5'ha) размером 929 п.н. включает в себя 1-й экзон и 8 п.н. второго экзона. 3'HA размером 805 п.н. содержит фрагмент 6-го экзона и 7-й экзон. Указаны сайты связывания используемых праймеров, локализация протоспейсерных последовательностей (g52 и т.п.).

Классический способ генотипирования гена *BLG KPC* – использование методики Медрано, (Medrano and Aguilar-Cordova, 1990), позволяющей найти полиморфизм в 4-м экзоне. По методике (Гладырь, 2001) анализируется область 1-го экзона и интрона, что позволяет определить полиморфизм гена *BLG* из ДНК быка «Мороз» с использованием одной из пар наших праймеров и рестриктазы *PvuII* (табл. 3).

Геномную ДНК денатурировали при 94°C 4 мин., проводили 35 циклов амплификации в следующем режиме: 94°C – 1 мин., отжиг праймеров при 62°C – 1 мин., элонгация при 72°C – 1,5 мин. Конечный этап синтеза проводили при 72°C в течение 4 мин. ПЦР смесь (10 мкл) обрабатывали

эндонуклеазой рестрикции *PvuII* (5 ед.) в соответствующем буфере при 37 °С в течение 3 ч. После обработки продуктов ПЦР рестриктазой *PvuII* появляются аллель-специфичные фрагменты: 774 и 474 п.н. соответствуют А-аллелю и 774, 297 и 177 п.н. – В варианту.

Таблица 3. *Определение полиморфизма гена BLG быка «Мороз»*

	По методике Гладырь	Наши праймеры
Праймеры	Праймер1/Праймер2	BLG51/S5-R
ПЦР-амплификат, п.н.	1248	1195
<i>PvuII</i> для А-аллеля	774, 474	743, 452
<i>PvuII</i> для В-аллеля	774, 297, 177	155, 297, 743

Сиквенс и рестриктный анализ клонированных последовательностей гена *BLG* быка «Мороз» черно-пестрой породы показал А-аллель (табл. 3), тогда как опубликованные в базе данных GenBank записи X14710 и Z48305 (*B. taurus* gene for beta-lactoglobulin variant B) соответствуют В-аллелю.

1.2. Создание плазмиды-матрицы *pTZHABLG*

В праймеры для ПЦР-амплификации 5' и 3' плечей гомологии (5'НА и 3'НА) были введены последовательности для рестриктаз *XbaI*, *EagI* и рестриктаз *EagI*, *BglII* соответственно (табл.1). Фрагмент 5'НА содержал 1-й экзон гена *BLG* с последовательностью сигнального пептида β-ЛГ, 1-й интрон. ПЦР-амплификаты клонировали в *pTZ57R/T* вектор с получением промежуточных плазмид *pTZ5'HABLG* и *pTZ3'HABLG*.

Из плазмиды *pTZ5'HABLG* рестриктазами *XbaI*, *EagI* вырезали фрагмент-вставку *XbaI_5'HABLG_EagI* и после очистки клонировали в предварительно обработанную такими же рестриктазами и щелочной фосфатазой плазмиду-акцептор *XbaI_pTZ3'HABLG_EagI*. После лигирования фрагментов была получена плазида *pTZHABLG*, на стыке плечей гомологии имеющая уникальный сайт для рестриктазы *EagI*, который можно использовать для клонирования ДНК целевого белка (рис. 2, 3).

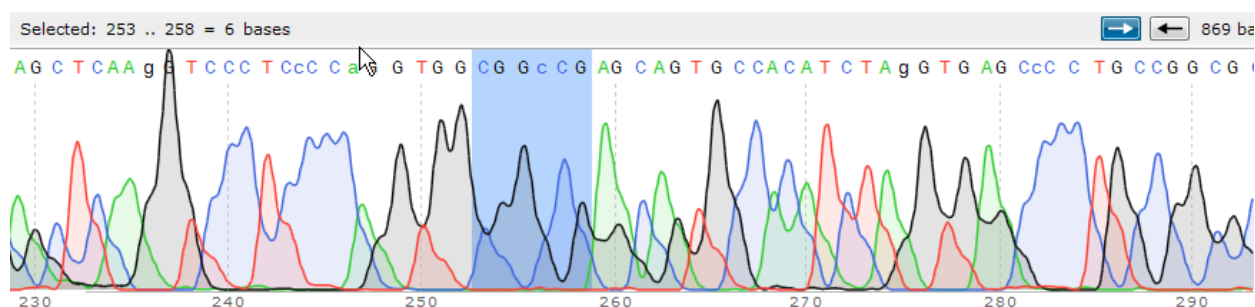


Рис. 2. Фрагмент секвенированной последовательности *pTZhaBLG*, содержащий участок соединения 5'- и 3'- плечей гомологии к гену *BLG*. Выделена последовательность введенного сайта рестрикции *EagI*.

1.3. Создание плазмиды *pBLGcmvEGFP*

Гены флуоресцентных цветных белков часто используются к качестве репортерных при создании генетических конструкций: экспрессия белка в случае интеграции трансгена в геном может служить надёжным индикатором успешного трансгенеза (Kato et al., 1999). Предполагалось, что *cmvEGFP*-последовательность, встроенная в ГК между 5' и 3' плечами гомологии к гену *BLG*, в случае гомологичной рекомбинации при использовании CRISPR/Cas9 технологии, обеспечит в условиях *in vitro* экспрессию зелёного флуоресцирующего белка, что станет эффективным маркером для оценки HDR события. В качестве ДНК-вставки был выбран фрагмент *cmvEGFP*.

Из ранее созданной нами плазмиды, *pBLgLfcmvEGFP* (Езерский, Шевченко, 2008), рестриктазой *NotI* был вырезан и очищен фрагмент *cmvEGFP-bGHpolyA* с образованием *EagI* липких концов. Вставку клонировали в подготовленную плазмиду *pTZHABLG* по сайту *EagI*. Была получена плазида *pBLGcmvEGFP*, которую в циркулярном или в линейном виде (вырезав генную

конструкцию рестриктазами *EcoRI* и *BglII*) можно использовать в качестве ДНК-матрицы для гомологичной рекомбинации с геном *BLG* с применением CRISPR/Cas9-компонентов (рис. 3).

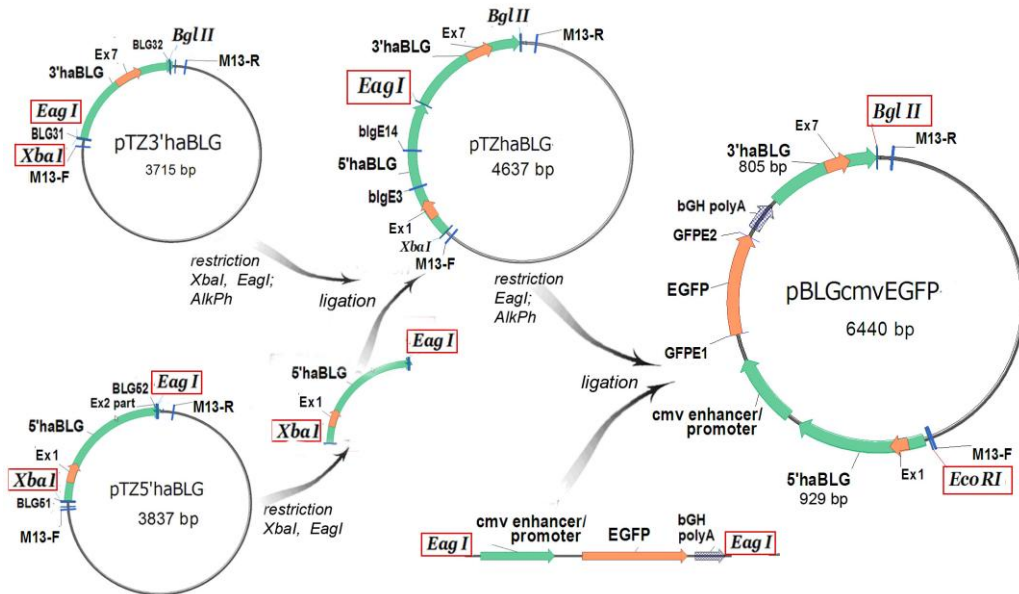


Рис.3. Схема получения плазмид pTZHABLG и pBLGcmvEGFP, содержащих 5' и 3' плечи гомологии к гену *BLG*. Указаны основные сайты рестрикции (в рамках) и связывания используемых праймеров.

2. Выбор сайтов-мишеней в гене *BLG* KPC

Для осуществления генных модификаций гена *BLG* (нокаут локальными инделями или крупной делецией) были подобраны последовательности направляющих РНК (*sgRNA*) и разработана система ПЦР-анализа возможных ГМ.

Последовательности-мишени для *gRNAs* с целью ДЦР в 5'-области гена *BLG* подбирали в участке, ограниченном праймерами BLG52 - S5-R: для анализа брали 120 нуклеотидов после 5' плеча гомологии. Этот фрагмент полностью входит в состав 2-го экзона. Последовательности-мишени в 3'-области гена *BLG* подбирали в участке, ограниченном праймерами S3-F_BLG31: брали 120 нуклеотидов в конце 5-го интрона – начале 6-го экзона (рис. 4).

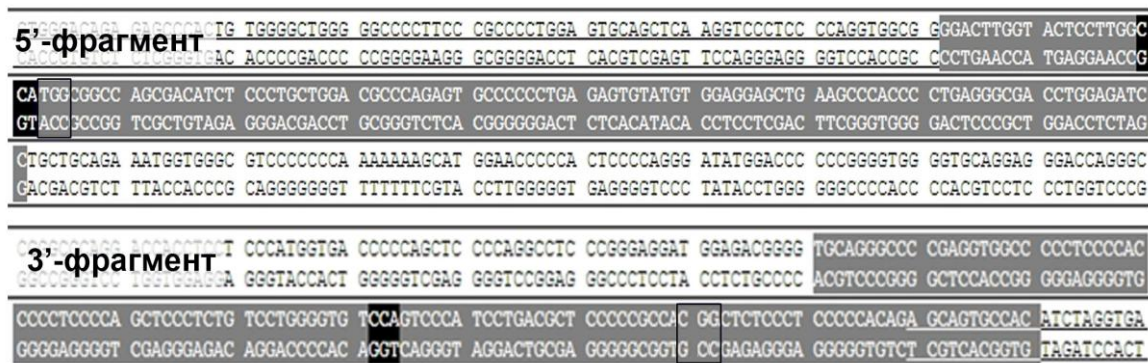


Рис. 4. Фрагменты 5'- и 3'-последовательностей двухцепочечной ДНК *BLG* (скриншот окна программы Vector NTI). Серый фон – область поиска, 120 п.н. Фрагменты 5'НА и 3'НА - подчеркнуты. РАМ-мотивы (5'-20b-NGG-3') для выбранных мишеней обозначены: черным блоком – для *gRNA51*, *gRNA32* (TGG на нижней цепи ДНК); выделены рамкой – для *gRNA52* (TGG) и *gRNA31* (CGG) на верхней цепи). Потенциальная делеция для пары *gRNA51*–*gRNA52* составляет 6 п.н. для пары *gRNA31* – *gRNA32* – 19 п.н.

3. Получение плазмид *pX330-b51*, *pX330-b52*, *pX330-b31* и *pX330-b32*, кодирующих *Cas9* и *gRNA* к соответствующим сайтам гена *BLG*.

Олигонуклеотиды для получения *gRNA* были обработаны по протоколу (Мензоров и др., 2016) с некоторыми модификациями и клонированы в плазмиду *pX330*.

Протокол клонирования

1. Все олигонуклеотиды (табл. 2) развели водой (деионизованная вода, с удельным сопротивлением более 18 МОм·см) в объеме, указанном в паспорте для каждого из них до концентрации 100 пМ/мкл.
2. Получение короткой двухцепочечной вставки с липкими концами (табл. 5)

Таблица 5. Состав смесей для образования двухцепочечных вставок с липкими концами

№	Компонент	Смесь для образования вставки, мкл			
		bg51	bg52	bg31	bg32
1	Вода	13	13	13	13
2	bg51f	2	-	-	-
3	bg51r	2	-	-	-
4	bg52f	-	2	-	-
5	bg52r	-	2	-	-
6	bg31f	-	-	2	-
7	bg31r	-	-	2	-
8	bg32f	-	-	-	2
9	bg32r	-	-	-	2
10	T4PNK	1	1	1	1
11	10x T4 DNA ligase buffer	2	2	2	2
12	Масло минеральное	20	20	20	20
	Итого:	40	40	40	40

Смеси готовили в пробирках для ПЦР. Инкубировали при 37°C 40-50 минут, выдерживали при 95°C 5 минут и медленно остужали до комнатной температуры.

3. Реакция рестрикции-лигирования. Готовили смеси следующего состава (табл. 6):

Таблица 6. Состав лигазных смесей для получения плазмид на основе pX330

№	Компоненты (конц.).	Смеси для образования плазмид, мкл			
		pX330-b51	pX330-b52	pX330-b31	pX330-b32
1	Вода	9	9	9	9
2	5x T4 DNA ligase buffer	4	4	4	4
3	БСА* (10 мг/мл)	1,5	1,5	1,5	1,5
4	pX330 (150 нг/мкл)	2	2	2	2
5	BbsI (10 ед/мкл)	1	1	1	1
6	T4 DNA ligase	1	1	1	1
7	bg51	1,5	-	-	-
8	bg52	-	1,5	-	-
9	bg31	-	-	1,5	-
10	bg32	-	-	-	1,5
11	Масло минеральное	20	20	20	20
	Итого:	40	40	40	40

* БСА – бычий сывороточный альбумин

Реакцию рестрикции-лигирования проводили в ПЦР-амплификаторе при следующем режиме: 1) 37°C (рестрикция) – 5 минут; 2) 20°C (лигирование) – 5 минут: итого 38 циклов.

4. Трансформированные лигазной смесью клетки *E. coli Dh5α* высевали на твердую среду ЛБ-Ам⁺. Выросшие клоны пересевали.

5. Для ПЦР-анализа ДНК из трансформированных клонов выделяли с помощью лизирующей смеси с протеиназой К. Составы ПЦР-смесей приведены в табл. 7.

Таблица 7. Состав ПЦР-смесей для скрининга плазмид, полученных на основе pX330 (на одну пробирку)

№	Компоненты, (конц.).	ПЦР-смеси для анализа плазмид, мкл			
		pX330-b51	pX330-b52	pX330-b31	pX330-b32
1	Taq buf ×10	2	2	2	2
2	dNTP ×10 (2 мМ)	1,8	1,8	1,8	1,8
3	ENH-R (3 пМ/мкл)	1	1	1	1
4	bg51f (3 пМ/мкл)	1	-	-	-
5	bg52f (3 пМ/мкл)	-	1	-	-
6	bg31f (3 пМ/мкл)	-	-	1	-
7	bg32f (3 пМ/мкл)	-	-	-	1
8	H ₂ O	12,9	12,9	12,9	12,9
9	ДНК из соотв. клона.	1	1	1	1
10	TaqPol (5 ед/мкл)	0,3	0,3	0,3	0,3
11	Масло минеральное	20	20	20	20
	Итого:	40	40	40	40

Условия ПЦР-амплификации: денатурация 94°C – 30 сек (в первом цикле – 2 мин.), отжиг праймеров 62°C – 30 с., элонгация 72°C – 1 мин. (в последнем цикле – 3 мин); всего 27 циклов.

6. Подходящий клон нарабатывали, выделяли плазмидную ДНК, определяли концентрации плазмиды после ее линеаризации рестриктазой *Xba*I.

В результате были получены плазмиды pX330-b51, -b52, -b31 и -b32, кодирующие Cas9 и gRNA к соответствующим сайтам гена *BLG*.

4. Анализ модификаций гена *BLG*

Плазмиду pBLGcmvEGFP в циркулярном или в линейном виде (вырезав генную конструкцию рестриктазами *Eco*RI и *Bgl*II) можно использовать в качестве ДНК-матрицы для гомологичной рекомбинации с геном *BLG* с применением CRISPR/Cas9-компонентов (рис. 5).

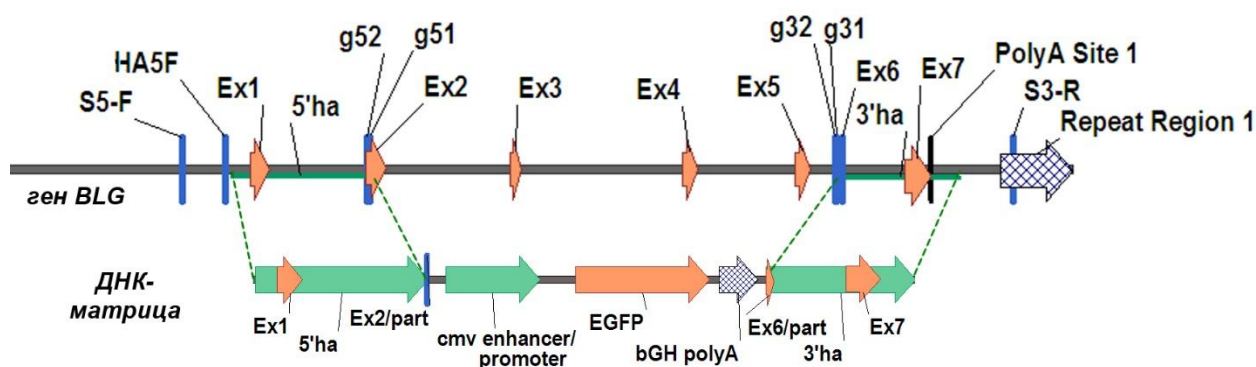


Рис. 5. Схема гомологичной рекомбинации генной конструкции BLGcmvEGFP с геном *BLG* в результате работы CRISPR/Cas9 системы. Показаны: g51, g52, g31, g32 – мишени для gRNAs; плечи гомологии 5'ha и 3'ha; структурные элементы гена и конструкции; праймеры.

В результате встраивания ГК локус гена *BLG* будет модифицирован, как показано на рис. 6. Для подтверждения факта гомологичной рекомбинации подобраны пары HA5F /HA5R и HA3F/ HA3R (табл. 3, рис. 6).

Другой вариант возможных генетических модификаций в результате работы созданных компонентов CRISPR/Cas9 системы – репарация ДЦР механизмом NHEJ (пример – рис. 7). Варианты детекции возможных мелких и крупных делеций представлены в табл. 8.

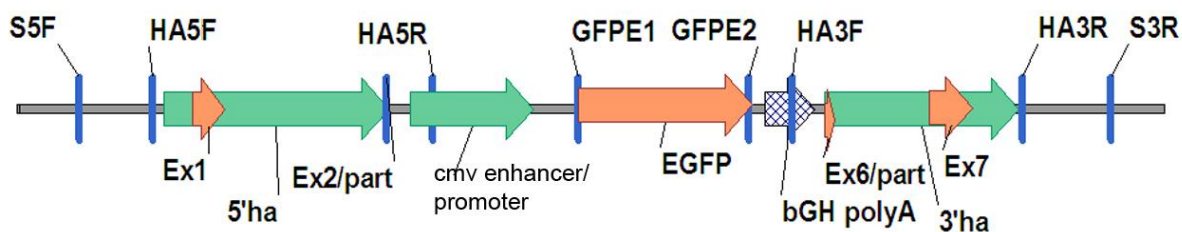


Рис. 6. Модифицированный в результате встраивания генной конструкции *BLGcmvEGFP* локус гена *BLG* по HDR пути. Показаны: структурные элементы гена и встроеной ГК; «гнездовые» праймеры для скрининга.

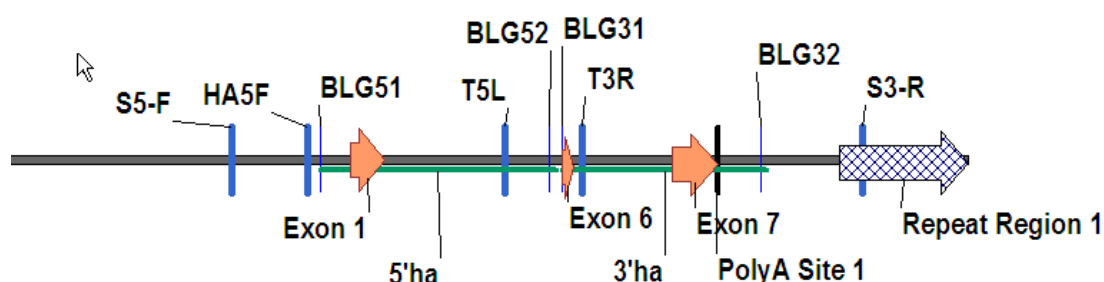


Рис.7. Вариант репарации гена *BLG* негомологичным соединением концов (NHEJ). Большая делеция g51-g32.

Таблица 8. ПЦР-анализ модификаций гена *BLG*, полученных с использованием компонентов CRISPR/Cas9 системы и HDR-матрицы

Пара	Размер ПЦР-амплификата, п.н.		Примечания, детекция
	WT	ГМЖ (модификация)	
T5L / T5R	490	< 490 (Δ G51/G52)	Мелкие делеции, ПААГ
T3L / T3R	397	< 397 (Δ G31/G33)	
T5L / T3R	3598	$\approx$ 320 для Δ G51(G52)/G31(G32)	Крупные делеции, АГ
HA5F/ HA3R	3621	$\approx$ 350 для Δ G51(G52)/G31(G32)	
HA5F /HA5R	-	1179 (5'HA для HDR)	
HA3F/ HA3R	-	972 (3'HA для HDR)	

Примечание: Δ – делеция.

Заключение

Метод переноса ядер соматических клеток до сих пор остаётся основным в получении генно-редактированных малоплодных с/х животных, хотя способ микроинъекции зигот считается более простым и надежным, особенно в сочетании с CRISPR/Cas9 технологией. Тем не менее, мы не обнаружили таких работ по получению генно-модифицированных КРС. Нами была создана рекомбинантная плазмида *pTZhaBLG*, содержащая 5' и 3' плечи гомологии (размером 929 п.н. и 805 п.н. соответственно) к гену *BLG* КРС, которая может быть использована для клонирования по *EagI* сайту ДНК целевого биологически активного белка с перспективой получения по CRISPR/Cas9 технологии трансгенного КРС, продуцирующего рекомбинантные белки с молоком вместо β -ЛГ. Получены плазмиды, кодирующие эндонуклеазу Cas9 и направляющие РНК к соответствующим сайтам гена *BLG*. Разработана система оценки потенциальных генетических модификаций гена *BLG* с использованием метода ПЦР и анализа его продуктов в агарозном и полиакриламидном гелях.

Кроме того, была создана плазмида *pBLGcmvEGFP*, содержащая фрагмент *cmvEGFP-bGHpolyA* (репортерный ген зелёного флуоресцирующего белка под цитомегаловирусным промотором), фланкированный плечами гомологии к последовательностям гена *BLG* для оценки эффективности интеграции трансгена в условиях культивирования *in vitro*.

Технологии редактирования генома позволят улучшить и вывести новые породы сельскохозяйственных животных с целью получения как полноценных продуктов питания,

обладающих новыми качествами, так и с целью получения из молока источника биологически активных белков фармакологического назначения. Применение CRISPR/Cas9 технологии способно резко ускорить получение таких животных. Наша работа даёт готовый набор CRISPR/Cas9-компонентов в плазмидной форме для микроинъекции в пронуклеус зигот КРС с целью нокаута гена *BLG*, а также стратегию анализа возможных его модификаций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ларкина Т.А., Крутикова А.А., Козикова Л.В. Редактирование генома сельскохозяйственных животных с помощью технологии CRISPR/Cas9 // Молочнохозяйственный вестник. – 2018. – № 3. – С. 24-35.
2. Езерский В.А., Шевченко В.Г. Создание генно-инженерной конструкции, содержащей структурный ген лактоферрина человека под контролем регуляторных элементов гена β -лактоглобулина крупного рогатого скота и репортерный ген GFP // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2008. – № 2. – С. 3-12.
3. Гладырь Е.А. ДНК-диагностика вариантов генов каппа-казеина и бета-лактоглобулина у крупного рогатого скота: автореф. дисс. ... к.б.н., Подольск-Дубровицы, ВИЖ, 2001. – 20 с.
4. Колоскова Е.М., Езерский В.А. Особенности выделения и очистки плазмидной ДНК из трансформированных штаммов *E.coli DH5 α* и *E.coli TG1* // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2019. – № 4. – С. 105-112.
5. Мензоров А.Г., Лукьянчикова В.А., Кораблев А.Н., Серова И.А., Фишман В.С. Практическое руководство по редактированию геномов системой CRISPR/Cas9 // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Т. 20. – № 6. – С.930-944. DOI 10.18699/VJ16.214
6. Трубицина Т.П., Рябых В.П., Колоскова Е.М., Езерский В.А., Максименко С.В. Использование гена β -лактоглобулина при получении рекомбинантных белков - от старых технологий трансгенеза к новым методам редактирования генома (обзор) // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2018. – № 3. – С. 15-34.
7. Шепелев М.В., Калининченко С.В., Дейкин А.В., Коробко И.В. Получение рекомбинантных белков из молока трансгенных животных: современное состояние и перспективы // ACTA NATURAE. – 2018. – Т. 10. – № 3. – С. 42-50.
8. Bishop T.F. and Van Eenennaam A.L. Genome editing approaches to augment livestock breeding programs // J. Exp. Biol. – 2020. – Vol. 223. - jeb207159. DOI:10.1242/jeb.207159
9. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems // Science. – 2013. – Vol. 339. – No. 819. DOI: 10.1126/science.1231143.
10. Cui C., Song Y., Liu J., Ge H., Li Q., Huang H., Hu L., Zhu H., Jin Y., Zhang Y. Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of β -lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk // Sci. Rep. – 2015. – Vol. 5. – P.10482. DOI:10.1038/srep10482
11. Kato M., Yamanouchi K., Ikawa M., Okabe M. Efficient selection of transgenic mouse embryos using EGFP as a marker gene // Mol. Reprod. Dev. – 1999. – Vol. 54. – P. 43-48.
12. Luo Y., Wang Y., Liu J., Cui C., Wu Y., Lan H., Chen Q., Liu X., Quan F., Guo Z., Zhang Y. Generation of TALE nickase-mediated gene-targeted cows expressing human serum albumin in mammary glands // Sci. Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 20657. DOI: 10.1038/srep20657.
13. Medrano J.F., Aguilar-Cordova E. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis // Anim. Biotechnol. – 1990. – Vol. 1. – P. 73-74. DOI:10.1080/10495399009525730.
14. Menchaca A., Dos Santos-Neto P.C., Mulet A.P., Crispo M. CRISPR in livestock: From editing to printing // Theriogenology. – 2020. – Vol. 150. – P. 247-254. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.063.
15. Song S., Zhu M., Yuan Y., Rong Y., Xu S., Chen S., Mei J., Cheng, Y. [BLG gene knockout and hLF gene knock-in at BLG locus in goat by TALENs] // Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. – 2016. – Vol. 32. – P. 329-338. [in Chinese]. DOI: 10.13345/j.cjb.150299
16. Sun Z., Wang M., Han S., Ma S., Zou Z., Ding F., Li X., Li L., Tang B., Wang H., Li N., Che H., Dai Y. Production of hypoallergenic milk from DNA-free beta-lactoglobulin (BLG) gene knockout cow using zinc-finger nucleases mRNA // Sci. Rep. – 2018. – Vol. 8. – 15430. DOI:10.1038/s41598-018-32024-x
17. Tan W.S., Carlson D.F., Walton M.W., Fahrenkrug S.C., Hackett P.B. Precision editing of large animal genomes // Adv. Genet. – 2012. – Vol. – 80. – P. 37-97. DOI: 10.1016/B978-0-12-404742-6.00002-8
18. Wei J., Wagner S., Lu D., Maclean P., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., Laible G. Efficient introgression of allelic variants by embryo-mediated editing of the bovine genome // Sci. Rep. – 2015. – Vol. 5. – P. 11735. DOI: 10.1038/srep11735

19. Wei J., Wagner S., Maclean P., Brophy B., Cole S., Smolenski G., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., Wells D.N., Laible G. Cattle with a precise, zygote-mediated deletion safely eliminate the major milk allergen beta-lactoglobulin // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8. – P. 7661. DOI:10.1038/s41598-018-25654-8
20. 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. DOI:10.1002/path.4648
21. Wright G., Carver A., Cottom D., Reeves D., Scott A., Simons P., Wilmut I., Garner I., Colman A. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep // *Biotechnology (N.Y.)*. – 1991. – Vol. 9. – P. 830-834.
22. Yu S., Luo J., Song Z., Ding F., Dai Y., Li N. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle // *Cell Res.* – 2011. – Vol. 21. – P. 1638-1164. DOI:10.1038/cr.2011.153
23. Zhou W., Wan Y., Guo R., Deng M., Deng K., Wang Z., Zhang Y., Wang F. Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9 // *PLoS One.* – 2017. – Vol.12. – No. 10. – e0186056. DOI: 10.1371/journal.pone.0186056
24. Zhu H., Liu J., Cui C., Song Y., Ge H., Hu L., Li Q., Jin Y., Zhang Y. Targeting human α -lactalbumin gene insertion into the goat β -lactoglobulin locus by TALEN-mediated homologous recombination // *PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 11. – e0156636. DOI:10.1371/journal.pone.0156636

REFERENCES

- 1 Bishop T.F. and Van Eenennaam A.L. Genome editing approaches to augment livestock breeding programs // *Journal of Experimental Biology.* 2020, 223: jeb207159. DOI:10.1242/jeb.207159
- 2 Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013, 339: 819. DOI: 10.1126/science.1231143.
- 3 Cui C., Song Y., Liu J., Ge H., Li Q., Huang H., Hu L., Zhu H., Jin Y., Zhang Y. Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of β -lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. *Sci. Rep.* 2015, 5: 10482. DOI:10.1038/srep10482
- 4 Ezerskii V.A., Shevchenko V.G. [Creation of a genetic engineering design containing the structural gene of human lactoferrin under the control of regulatory elements of the bovine β -lactoglobulin gene and the GFP reporter gene] *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology.* 2008, 2: 3-12. (In Russian)
- 5 Gladyr' E.A. *DNK-diagnostics variantov genov kappa-kazeina i beta-laktoglobulina u krupnogo rogatogo skota:* (DNA diagnostics of kappa-casein and beta-lactoglobulin gene variants in cattle) Extended Abstract of Diss. Cand. Sci. Biol., Dubrovitsy, VIZh. 2001, 20 p. (In Russian)
- 6 Kato M., Yamanouchi K., Ikawa M., Okabe M. Efficient selection of transgenic mouse embryos using EGFP as a marker gene. *Mol. Reprod. Dev.* 1999, 54: 43-48.
- 7 Koloskova E.M., Ezerskii V.A. [Method of an isolation and purification of plasmid DNA from transformed strains of *E. coli* DH 5 α and TG1]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology.* 2019, 4: 105-112 (In Russian)
- 8 Larkina T.A., Krutikova A.A., Kozikova L.V. [Editing the genome of farm animals using CRISPR/Cas9 technology]. *Molochnokhozyaistvennyi vestnik - Dairy Farming Journal*, 2018, 3(31): 24-35. (In Russian)
- 9 Luo Y., Wang Y., Liu J., Cui C., Wu Y., Lan H., Chen Q., Liu X., Quan F., Guo Z., Zhang Y. Generation of TALE nickase-mediated gene-targeted cows expressing human serum albumin in mammary glands. *Sci. Rep.* 2016, 6: 20657. DOI: 10.1038/srep20657.
- 10 Medrano J.F., Aguilar-Cordova E. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. *Anim. Biotechnol.* 1990, 1: 73-74. DOI:10.1080/10495399009525730.
- 11 Menchaca A., Dos Santos-Neto P.C., Mulet A.P., Crispo M. CRISPR in livestock: From editing to printing. *Theriogenology.* 2020, 150: 247-254. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.063.
- 12 Menzorov A.G., Luk'yanchikova V.A., Korablev A.N., Serova I.A., Fishman V.S. [A practical guide to genome editing system CRISPR/Cas9]. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii - Vavilov journal of genetics and plant breeding.* 2016, 20(6): 930-944. DOI 10.18699/VJ16.214 (In Russian)
- 13 Shepelev M.V., Kalinichenko S.V., Deikin A.V., Korobko I.V. [Production of recombinant proteins from milk of transgenic animals: current state and prospects]. *ACTA NATURAE.* 2018, 10(3): 42-50. (In Russian)
- 14 Song S., Zhu M., Yuan Y., Rong Y., Xu S., Chen S., Mei J., Cheng, Y. [BLG gene knockout and hLF gene knock-in at BLG locus in goat by TALENs]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2016, 32: 329-338.. DOI: 10.13345/j.cjb.150299 (in Chinese)

- 15 Sun Z., Wang M., Han S., Ma S., Zou Z., Ding F., Li X., Li L., Tang B., Wang H., Li N., Che H., Dai Y. Production of hypoallergenic milk from DNA-free beta-lactoglobulin (BLG) gene knockout cow using zinc-finger nucleases mRNA. *Sci. Rep.* 2018, 8: 15430. DOI:10.1038/s41598-018-32024-x
- 16 Tan W.S., Carlson D.F., Walton M.W., Fahrenkrug S.C., Hackett P.B. Precision editing of large animal genomes. *Adv. Genet.* 2012, 80: 37-97. DOI: 10.1016/B978-0-12-404742-6.00002-8
- 17 Trubitsina T.P., Ryabykh V.P., Koloskova E.M., Ezerskii V.A., Maksimenko S.V. [Using the β -lactoglobulin gene for recombinant proteins-from old transgenesis technologies to new genome editing methods (review)]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology.* 2018, 3: 15-34. (In Russian)
- 18 Wei J., Wagner S., Lu D., Maclean P., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., Laible G. Efficient introgression of allelic variants by embryo-mediated editing of the bovine genome. *Sci. Rep.* 2015, 5: 11735. DOI: 10.1038/srep11735
- 19 Wei J., Wagner S., Maclean P., Brophy B., Cole S., Smolenski G., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., Wells D.N., Laible G. Cattle with a precise, zygote-mediated deletion safely eliminate the major milk allergen beta-lactoglobulin. *Sci. Rep.* 2018, 8: 7661. DOI:10.1038/s41598-018-25654-8
- 20 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. DOI:10.1002/path.4648
- 21 Wright G., Carver A., Cottom D., Reeves D., Scott A., Simons P., Wilmut I., Garner I., Colman A. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology (NY).* 1991, 9: 830-834.
- 22 Yu S., Luo J., Song Z., Ding F., Dai Y., Li N. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res.* 2011, 21: 1638-1164. DOI:10.1038/cr.2011.153
- 23 Zhou W., Wan Y., Guo R., Deng M., Deng K., Wang Z., Zhang Y., Wang F. Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9. *PLoS One.* 2017, 12(10): e0186056. DOI: 10.1371/journal.pone.0186056
- 24 Zhu H., Liu J., Cui C., Song Y., Ge H., Hu L., Li Q., Jin Y., Zhang Y. Targeting human α -lactalbumin gene insertion into the goat β -lactoglobulin locus by TALEN-mediated homologous recombination. *PLoS ONE.* 2016, 11: e0156636. DOI:10.1371/journal.pone.0156636

Development of a method for modifying the bovine beta-lactoglobulin gene using CRISPR/Cas9 technology

Koloskova E.M., Ezerskiy V.A.

Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition, Branch of Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry; Borovsk, Kaluga oblast, Russian Federation

ABSTRACT. Beta-lactoglobulin is the main whey protein in almost all mammals except rodents and primates. Regulatory regions of the beta-lactoglobulin (BLG) gene of sheep, goats and cattle are used as part of genetic constructs. The goal of this work is to create a plasmid containing 5' - and 3' - arms of homology to the bovine beta-lactoglobulin gene, at their junction having a site for restriction of *EagI*. A plasmid was created containing 5' - and 3' - arms of homology to the bovine beta-lactoglobulin gene, at their junction having a site for restriction of *EagI*. A fragment containing a biologically active protein gene can be embedded at this site to produce a DNA matrix for site-specific integration by homologous recombination into BLG gene using CRISPR/Cas9 technology. To select double-stranded insertion sites, a polymorphic version of the bovine BLG gene was determined, the sperm of which is supposed to be used to fertilize cow eggs in vitro. A strategy for making double-stranded cuts in BLG gene was developed and four pX330 plasmids were obtained that encode Cas9 endonuclease and guide RNAs specific to BLG gene sequences. The pBLGcmvEGFP plasmid containing the green fluorescent protein gene under the cytomegalovirus promoter is intended for site-specific integration by homologous recombination into the BLG gene to evaluate the effectiveness of site-specific operation of the CRISPR/Cas9 system components under *in vitro* conditions.

Keywords: *genetic engineering, plasmid constructs, homologous recombination, bovine beta-lactoglobulin*

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology. 2020, 2: 43-56

Поступило в редакцию: 21.04.2020

Получено после доработки: 05.06.2020

Колоскова Елена Михайловна, к.б.н., с.н.с., тел. +7(910)590-92-83, heleko3@yandex.ru
Езерский Вадим Аркадьевич, м.н.с., тел. +7(906)642-59-92, ez.vadim@yandex.ru