

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ
ГЕНА КИСЛОГО СЫВОРОТОЧНОГО ПРОТЕИНА КРОЛИКА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА CRISPR/Cas9**

Езерский В.А., Колоскова Е.М.

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

Высокое содержание кислого сывороточного протеина в молоке кролика делает ген этого белка перспективным кандидатом для замены геном биологически активного белка с использованием системы CRISPR/Cas9. Цель исследования – создание плазмиды, содержащей 5'- и 3'- плечи гомологии к областям гена WAP кролика, в которую можно будет интегрировать ДНК-последовательность целевого белка. На основе плазмиды *pTZ57R/T* была создана плазида *pTZrbWAPha*, в место стыка плечей гомологии которой был введен сайт для эндонуклеазы рестрикции *EagI*, позволяющий клонировать ДНК целевого белка в плазмиду. Состав созданной плазмиды был подтвержден сиквенсом её фрагментов. Генетическая конструкция, содержащая ген зелёного флуоресцентного белка под *cmv* промотором, была встроена по сайту *EagI* в *pTZrbWAPha*. Была разработана стратегия внесения двухцепочечных разрезов в ген *rbWAP* и получены четыре плазмиды *pX330*, кодирующие эндонуклеазу Cas9 и направляющие РНК. Плазида *prbWAPcmvEGFP*, содержащая фрагмент *cmvEGFP*, предназначена для сайт-специфичной интеграции ДНК-вставки гомологичной рекомбинацией в ген *rbWAP* для оценки эффективности работы подобранных компонентов системы CRISPR/Cas9 в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: генетическая конструкция, плазмиды, CRISPR/Cas9, кролик, кислый сывороточный протеин, зелёный флуоресцирующий белок

Проблемы биологии продуктивных животных, 4: 23-35

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; WAP – кислый сывороточный белок.

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 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). Трансгенные сельскохозяйственные животные, в том числе кролики, перспективны в качестве биореакторов для продукции биологически активных

белков с молоком или кровью (Bosze et al., 2003). Кролик – самое маленькое животное, из которого могут быть получены рекомбинантные белки (РБ) в экспериментальном и в промышленном масштабе. Например, одобренный к применению FDA рекомбинантный ингибитор С1 эстеразы человека (производство Pharming BV) для лечения пациентов с наследственным ангионевротическим отеком, получают из молока трансгенных кроликов (Kues, Niemann, 2011). Содержание кислого сывороточного протеина в молоке кролика составляет около 15 г/л (Baranyi et al., 1995), что делает ген WAP перспективным кандидатом для замены геном биологически активного белка при использовании технологии CRISPR/Cas9. Промоторные области генов тканеспецифичных молочных белков – казеинов и сывороточных белков давно с переменным успехом использовали в составе ГК для создания ГЖ – продуцентов биологически активных белков. Основные белки молочной сыворотки – α -лактальбумин, β -лактоглобулин и WAP кодируются генами относительно небольшого размера, находящимися на разных хромосомах, тогда как гены казеинов имеют кластерную организацию на одной хромосоме.

Первые трансгенные мышь (Gordon et al., 1987) и коза (Ebert et al., 1991) были получены с применением ГК, содержащей промоторную последовательность гена WAP мыши. Едва ли не с большей эффективностью в составе ГК стали применять 5'-область гена WAP кролика (*rbWAP*); у ТГ мышей содержание РБ в молоке достигало 10-20 мг/мл (Devino et al., 1991, 1994; Thépot et al., 1995; Vichoff et al., 1992).

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.

Цель данной работы – создание плазмиды, содержащей плечи гомологии к областям гена WAP кролика с тем чтобы в неё можно было интегрировать ДНК-последовательность целевого белка.

Материал и методы

Для решения поставленной задачи на настоящем этапе в качестве ДНК-вставки был выбран фрагмент *cmvEGFP*. Предполагалось, что *cmvEGFP*-последовательность, встроенная в ГК между 5' и 3' плечами гомологии к гену *rbWAP*, 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. Кроме того, для осуществления генных модификаций гена *rbWAP* (нокаут гена инделями небольшого размера или крупной делецией) требовалось подобрать последовательности направляющих РНК (*sgRNA*) и разработать систему ПЦР-анализа возможных ГМ.

К настоящему времени нами не обнаружено публикаций о модификации гена WAP кролика с использованием системы CRISPR/Cas9. Новизна исследований заключается в создании генной конструкции, содержащей репортерный ген, и получении компонентов системы CRISPR/Cas9 для оценки на эмбриональном уровне в условиях *in vitro* эффективности сайт-специфической интеграции трансгена.

Последовательность гена кислого сывороточного протеина кролика была взята из базы данных GenBank, запись NC_013678. Геномная ДНК была выделена из кончика уха кролика калифорнийской породы фенол-хлороформным методом (Маниатис и др., 1984). В работе использовали ферменты и реактивы: FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 ед/мкл), рестриктазы *EagI* (аналог – *BseX31*(СибЭнзим)), *BglIII*, *BamHI*, *BsmBI* (10 ед/мкл) с соответствующими буферами. Для промежуточного клонирования ПЦР-продуктов использовали плазмиду *pTZ57R/T* и Т4 DNA лигазу (5 ед/мкл) из набора InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific). Праймеры получены в ЗАО «Синтол» <<http://www.syntol.ru>>.

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 в работе, приведены в табл. 1. Процедуру ПЦР проводили на амплификаторе ДНК «Терцик» («ООО ДНК-Технология», Москва).

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* Dh5a, TG1 проводили по методике и с реагентами набора Transform-Aid Bacterial Transformation Kit с нашими модификациями. 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 пересевали 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 с нашими модификациями и классическим методом щелочного лизиса.

Качество и количество ДНК выделенных плазмид и фрагментов рестрикции оценивали визуально в УФ свете после электрофореза в агарозном геле. Электрофорез проводили в горизонтальном АГ в $\times 0,5$ ТВЕ буфере, pH 8,0, с бромистым этидием, используя набор оборудования фирмы Hoeffer (США). Препаративный электрофорез проводили в $\times 1$ ТАЕ буфере, 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).

Таблица 1. Праймеры, использованные для создания генной конструкции.

Обозначение	5'-3' последовательность	Введенный сайт рестрикции	Назначение
W5-1	agatctctgcgaggagctctgtgcct	<i>Bgl</i> III	Сиквенс 5' utr
W5-2	agacacaggtccactgcaggagcag	-	Сиквенс 5' интрон 1
W5HA-2	tacggccg gatgagacagcgcgatgg	<i>Eag</i> I	3' конец 5'HA
W3-1	atgctgtcccagttgtgtgaggagc	-	Сиквенс 3' экзон 3
W3-2	ggatccagatct tctctgcgaggccctctgtgcacc	<i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> III	Сиквенс 3'utr
W3HA-1	ttcggccg tgtgtccaccagctgtg	<i>Eag</i> I	5' конец 3'HA
M13-F	gta aaa cga cgg cca gtg	-	Сиквенс, специф.
M13-R	cag gaa aca gct atg ac	-	<i>pTZ57RT</i>
EGFP1	agccataggtgagcaagggcgaggagctgtt	<i>Nde</i> I	Детекция EGFP
EGFP2	agactcgagcggccgcttactgtacagctc	<i>Xho</i> I	

ДНК из агарозного геля выделяли с помощью набора Gene JET Gel Extraction Kit. Подбор праймеров, конструирование рекомбинантной ДНК, рестриктный анализ проводили с использованием программы Vector NTI.

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). Последовательности олигонуклеотидов и их описание приведены в табл. 2. Последовательности праймеров для оценки делеций различного размера и встраивания ГК гомологичной рекомбинацией, их описание приведены в табл. 3.

Все праймеры и олигонуклеотиды, сиквенс плазмидной ДНК заказывали в ЗАО «Синтол» <<http://www.syntol.ru>>.

Таблица 2. Олигонуклеотиды для создания компонентов CRISPR/Cas9 системы.

Обозначение	5'-3' последовательность	Назначение
G51F	CACCGcctacctggagcgatgaatt	<i>pX330-51</i>
G51R	AAACaattcatcgctccaggtaggC	
G511F	CACCGcccccaattcatcgctcc	<i>pX330-511</i>
G511R	AAACggagcgatgaattgggggc	
G31F	CACCGtatcggaggagtgaaggtt	<i>pX330-31</i>
G31R	AAACaaccttcgactcctccgataC	
G33R	AAACgatagcgcgatggcgcagcggC	<i>pX330-33</i>
G33F	CACCGccgctgcgcatgcgctatc	

Таблица 3. Праймеры для ПЦР-анализа модификаций гена *rbWAP*.

Обозначение	5'-3' последовательность	Положение, назначение
P51F	Gagtgaggaaggcagctgg	1-й интрон начало
P51R	tctcatcagcctggccct	1-й экзон
P31F	ggaatatgcaggccacagct	3-й интрон
P31R	gatctgagagggagtgcagc	3-й интрон
P33F	gggagggctcaggacacata	3-й интрон начало
P33R	tgtgccaacgacatcgagtg	
rHA5F	tgtggaaccacaaggagc	5'utr < 5'HA, для HDR
rHA5R	atagcaggcatgctgggat	3' конец bGH polyA для HDR
rHA3F	cgtaagttagtaacgcggaactcc	5' конец cmv для HDR
rHA3R	ccatgacctagctgctctccatta	3'utr > 3'HA, для HDR

Результаты и обсуждение

1. Ген *WAP* кролика, выбор последовательностей для клонирования плечей гомологии (HA).

Последовательность гена кислого сывороточного протеина кролика (*Oryctolagus cuniculus* – европейский кролик, единственный одомашненный вид) была взята из базы данных GenBank, запись NC_013678 (добавлено по 1000 н. по 5'- и 3'-флангам кДНК <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_013678.1?report=genbank&from=45322775&to=45324498&strand=true>, или запись из базы данных Ensembl:ENSOCUG00000022314 <https://www.ensembl.org/Oryctolagus_cuniculus/Gene/Summary?g=ENSOCUG00000022314>.

Ген находится на 10-й хромосоме, содержит 4 экзона и кодирует белок из 127 аминокислот (из них 19 – сигнальный пептид). Был отмечен точечный полиморфизм в первом экзоне и некодирующей части кДНК (Theriot et al., 1990).

Схема выбора плечей гомологии и фрагментов для секвенирования представлена на рис. 1. Поскольку эффективность работы CRISPR/Cas9 компонентов зависит от качества подбора последовательностей-мишеней sgRNA, при их подборе большое значение имеет возможный полиморфизм гена в области потенциальных двухцепочечных разрезов (ДЦР).

С использованием пары праймеров W5-1/W5-2 был получен ПЦР-амплификат 5' области гена *rbWAP* размером 1194 п.н., содержащий 5'HA и последовательность расположения потенциальных ДЦР, ограниченную праймерами W5HA-2 и W5-2.

С использованием пары праймеров W3-1/W3-2 был получен ПЦР-амплификат 3' области размером 1042 п.н., содержащий последовательность расположения потенциальных ДЦР, ограниченную праймерами W3-1 и W3HA-1, и 3'HA.

Условия проведения ПЦР с целью получения амплификатов с геномной ДНК для клонирования в *pTZ57R/T* представлены в табл. 4. Режим амплификации: денатурация 94°C – 45 сек (в первом цикле – 3 мин.), отжиг праймеров 62°C – 30 с., элонгация 72°C – 3 мин. (в последнем цикле – 3 мин); всего 30 циклов.

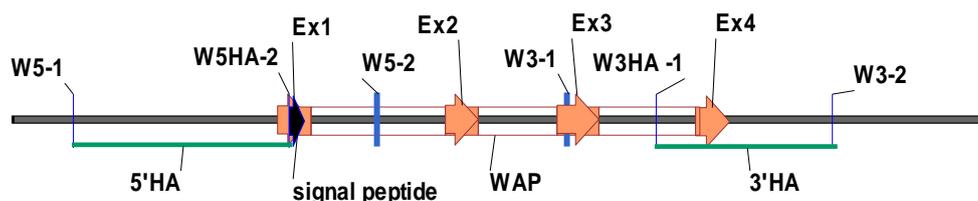


Рис. 1. Схема выбора плечей гомологии гена *rbWAP* для создания ДНК-матрицы гомологичной рекомбинации. Плечо 5'HA размером 840 п.н. включает в себя некодирующую часть 1-го экзона и 15 п.н. последовательности сигнального пептида; 3'HA размером 697 п.н. содержит фрагмент 3-го интрона и 4-й экзон (14 кодирующих из 130 п.н.). Указаны сайты связывания праймеров.

После препаративного электрофореза ПЦР-амплификаты очистили из агарозного геля и клонировали в *pTZ57R/T* (лигазные смеси 5'-*rbWAP* и 3'-*rbWAP*). Выросшие на селективной среде клоны трансформированных лигазной смесью 5'-*rbWAP* компетентных клеток *E. coli* Dh 5a проверили ПЦР-анализом на наличие соответствующей вставки с использованием праймеров W5-1/W5-2. Сиквенс выделенной плазмиды *pTZ 5'rbWAP* с использованием стандартных праймеров M13-F/M13-R полностью совпал с опубликованной последовательностью.

Лигазной смесью 3'-*rbWAP* трансформировали компетентные клетки *E. coli* TG1. Выросшие клоны проверили ПЦР-анализом на наличие соответствующей вставки с использованием праймеров W3-1/W3-2. Один из положительных клонов использовали для выделения *pTZ 3'rbWAP*.

Плечи гомологии 5'HA и 3'HA получали ПЦР-амплификацией с использованием праймеров W5-1/W5HA-2 и W3HA-1/W3-2 с соответствующих плазмид (табл. 4). Режим амплификации: денатурация 94°C - 45 сек (в первом цикле – 3 мин.), отжиг праймеров 64°C – 30 с., элонгация 72°C – 1 мин. (в последнем цикле – 3 мин); всего 27 циклов.

Таблица 4. Состав препаративных ПЦР-смесей для получения амплификатов 5'- и 3'-последовательностей гена *WAP* кролика.

Компоненты	5'- <i>rbWAP</i>	3'- <i>rbWAP</i>	5'HA <i>rbWAP</i>	3'HA <i>rbWAP</i>
	Объём, мкл			
Тaq buf ×10	12	12	12	12
dNTP ×10 (2 мМ)	9	9	9	9
W5-1 (3 пМ/мкл)	6	-	6	-
W5-2 (3 пМ/мкл)	6	-	-	-
W3-1 (3 пМ/мкл)	-	6	-	6
W3-2 (3 пМ/мкл)	-	6	-	-
W5HA-2 (3 пМ/мкл)	-	-	6	-
W3HA-1 (3 пМ/мкл)	-	-	-	6
ТaqPol (5 ед/мкл)	1,8	1,8	1,8	1,8
ДНК кролика (≈20 нг/мкл)	6	6	-	-
<i>pTZ 5'rbWAP</i> (50 нг/мкл)	-	-	6	-
<i>pTZ 3'rbWAP</i> (30 нг/мкл)	-	-	-	6
H ₂ O	79,2	79,2	79,2	79,2
Итого	120	120	120	120

2. Создание плазмиды *pTZrbWAPha*, содержащей плечи гомологии к гену *WAP* кролика.

Очищенные из АГ после электрофореза в ТАЕ-буфере ПЦР-амплификаты W5-1/W5HA-2 и W3HA-1/W3-2 клонировали в *pTZ57R/T* (лигазные смеси 5'-*HArbWAP* и 3'-*HArbWAP*). Лигажными смесями трансформировали компетентные клетки *E. coli* TG1. Выросшие клоны проверили ПЦР-анализом на наличие соответствующих вставок с использованием пар праймеров W5-1/W5HA-2 и W3HA-1/W3-2. Положительные клоны проверили на ориентацию вставки *5'HArbWAP* с использованием праймеров M13--F/W5HA-2.

Один из клонов, содержащих плазмиду с правильно ориентированной вставкой, наработали, выделили и очистили *pTZ5'HArbWAP* (рис. 2). Один из положительных клонов *E. coli* TG1, содержащих *pTZ3'HArbWAP*, наработали, выделили и очистили плазмиду.

Промежуточные плазмиды *pTZ5'HArbWAP* и *pTZ3'HArbWAP* последовательно обработали рестриктазами *EagI* и *BamH1* (табл. 5). После обработки рестриктазой *EagI* разрезанные плазмиды очищали от *Eco52I* буфера на колонке, предварительно добавив к рестриктной смеси 3 объёма высокосолевого раствора (5М гуанидин: HCl) и подкислив раствор 4,8 М ацетатом калия. Линеаризованную плазмиду - акцептор *BamH1_pTZ5'HArbWAP_EagI* (3731 п.н.) дополнительно обработали щелочной фосфатазой и очистили на колонке с использованием высокосолевого раствора. Фрагмент-донор *EagI_TZ3'HArbWAP_BamH1* (709 п.н.) выделили из АГ после разделения рестриктной смеси электрофорезом.

Таблица 5. *Препаративная рестрикция плазмид pTZ5'HArbWAP и pTZ3'HArbWAP.*

Компоненты	Смесь для 5'WAP Объем, мкл	Смесь для 3'WAP Объем, мкл
<i>pTZ5'HArbWAP</i> (20 нг/мкл)	87	-
<i>pTZ3'HArbWAP</i> (20 нг/мкл)	-	115
<i>EagI</i> (<i>Eco52I</i>) (10 ед/мкл)	2	2
10× Буфер <i>Eco52I</i>	11	13
Вода	10	-
Итого:	110 мкл	130 мкл
Инкубировали при 37°C	16 ч	16 ч
Очистка на колонке для смены буфера		
<i>TZ5'HArbWAP_EagI</i> , 20 нг/мкл)	45	-
<i>EagI_TZ3'HArbWAP</i> (20 нг/мкл)	-	80
10× Tango буфер	5,1	9,3
<i>BamH1</i> (10 ед/мкл)	1	3
Инкубация при 37°C	2 часа	2 часа

После лигирования фрагментов и трансформирования клеток *E. coli* Dh 5α лигазной смесью, выросшие клоны проверили ПЦР-анализом на наличие соответствующих вставок с использованием праймеров M13-F/M13-R. Два клон с обнаруженным ПЦР-амплификатом размером 1700 п.н. наработали, выделили и очистили плазмиду *pTZHArbWAP* (рис. 2). В результате обработки *pTZHArbWAP* рестриктазой *EagI* получили линеаризованную ДНК размером ≈4500 п.н., что соответствует размерам плазмиды. Плазида *pTZHArbWAP* содержит уникальный сайт для *EagI*, который можно использовать для клонирования ДНК целевого белка (рис. 3).

3. Создание плазмиды *prbWAPcmvEGFP*, содержащей плечи гомологии к гену *WAP* кролика и ген зелёного флуоресцирующего белка под *cmv* промотором.

Применение в составе ГК репортерных систем, подтверждающих наличие трансгена в эмбрионе на предимплантационной стадии, помогает существенно удешевить процесс получения как мелких, так и крупных малоплодных ТЖ. В настоящее время наиболее эффективны репортерные системы для отбора с использованием флуоресцентных белков, например, GFP. Он термостабилен, устойчив к действию протеаз, не токсичен при использовании его в качестве селекционного маркера у предимплантационных эмбрионов кроликов (Chrenek, Makarevich, 2011) и КРС (Iqbal et al., 2009). В качестве потенциального репортерного маркера в составе HDR-матрицы с использованием CRISPR/Cas9 компонентов, использовали ген EGFP под *cmv* промотором. Фрагмент *NotI-cmvEGFP-bGHpolyA-NotI* вырезали с использованием рестриктазы *NotI* из плазмиды *pGEMTcmvEGFP*, полученной ранее (Езерский и др., 2008); рестрикция *BsmBI* (*Esp3I*) даёт *NotI* (*EagI*) липкие концы

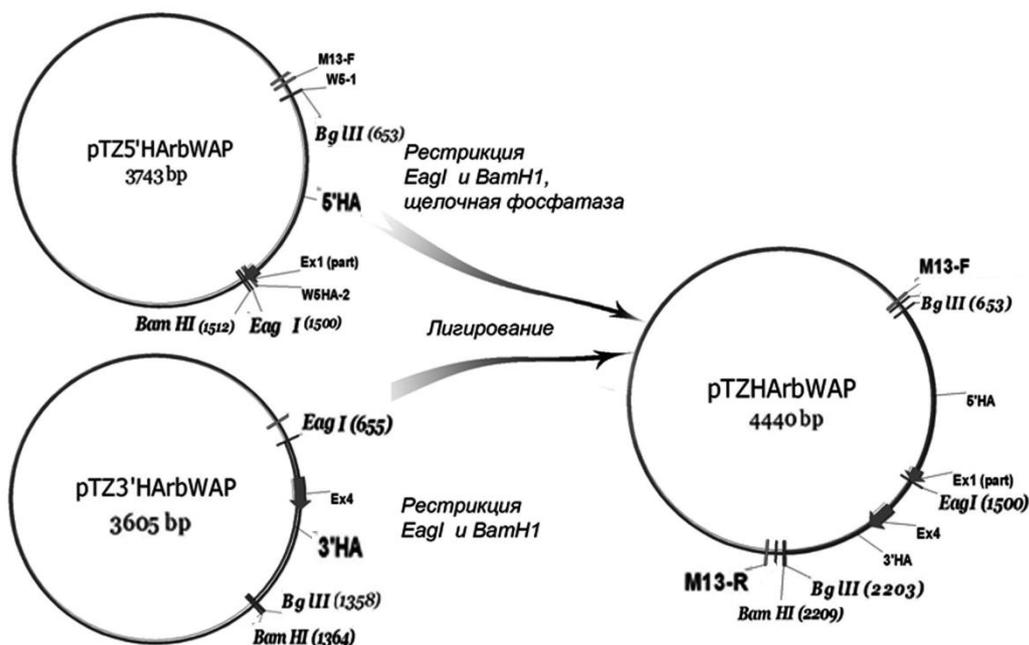


Рис. 2. Схема получения *pTZHArbWAP*, содержащей 5' и 3' плечи гомологии к гену *rbWAP*. Указаны основные рестриктные сайты и сайты связывания используемых праймеров.

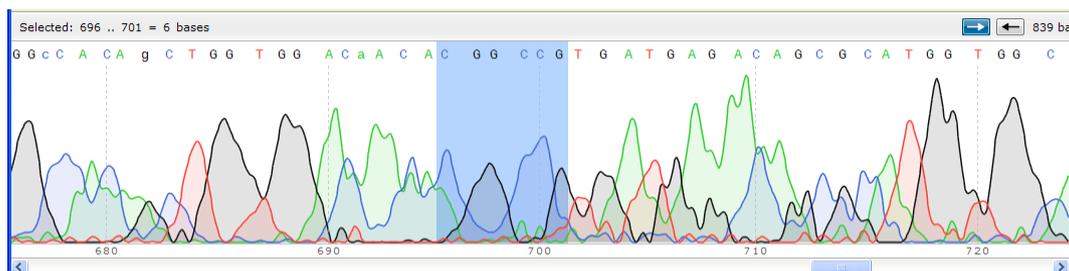


Рис. 3. Фрагмент секвенированной последовательности *pTZHArbWAP*, содержащий участок соединения 5'- и 3'- плечей гомологии к гену *rbWAP*. Выделена последовательность сайта рестрикции *EagI*.

Плазмиду *pTZHArbWAP* разрезали рестриктазой *EagI*, обрабатывали щелочной фосфатазой, очищали и лигировали с очищенным фрагментом *NotI-cmvEGFP-bGH polyA-NotI*. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* Dh 5 α . Выросшие на селективной среде клоны проверили на наличие вставки ПЦР-анализом с праймерами EGFP1/EGFP2 (размер амплификата 737 п.н.). Положительные клоны № 14 и № 33, содержащие предположительно плазмиду *prbWAPcmvEGFP*, наработали, выделили и очистили плазмидную ДНК, провели рестриктный анализ (табл. 6, рис. 4).

В случае с плазмидой, выделенной из клона № 14, по результатам рестриктного анализа был обнаружен очень редкий вариант клонирования: в плазмиду-акцептор встроились сразу две копии *cmvEGFP-bGHpolyA*. В случае симметричных липких концов плазмиды-акцептора и фрагмента-донора в данном случае могло получиться четыре варианта встраивания, которым бы соответствовали четыре варианта фрагментов рестрикции с использованными ферментами. В нашем случае был получен вариант, в котором в *pTZHArbWAP* по сайту *EagI* были последовательно встроены обратно ориентированные два фрагмента *cmvEGFP-bGH polyA*: *prbWAP(cmvEGFPprev)2*.

Таблица 6. Рестриктивный анализ плазмиды *prbWAPcmvEGFP*, выделенной из клонов 14 и 33.

Рестриктазы	Размеры фрагментов рестрикции, п.н.		
	Ожидаемые	Фактические для клона 14 (рис. 1А)	Фактические для клона 33 (рис. 1В)
<i>Bgl</i> II	2890 + 3353	≈3000 + 5000	≈3000 + 3300
<i>Eag</i> I	6243	≈6200 + 1800	
<i>Eag</i> I+ <i>Bgl</i> II	2890+2358+995	3000+1100+1800+2200	

Полученная плазида может быть использована в экспериментах по трансгенезу в следующих целях: 1) исследование эффективности интеграции HDR-матрицы, содержащей вставки разного размера; 2) изучение уровня экспрессии рекомбинантного белка и влияние его на организм в зависимости от копииности трансгена.

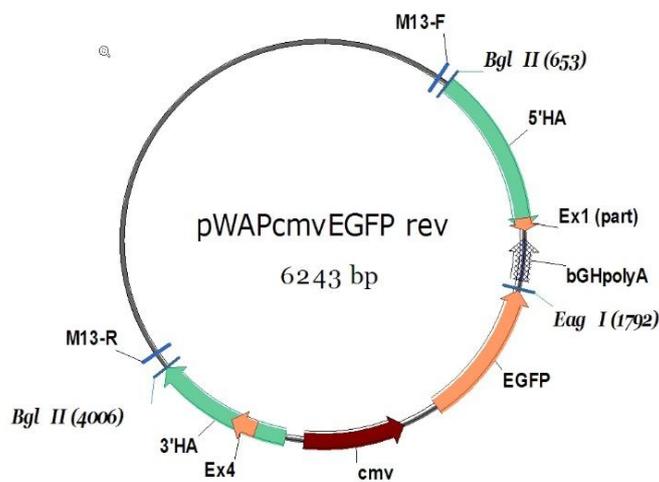
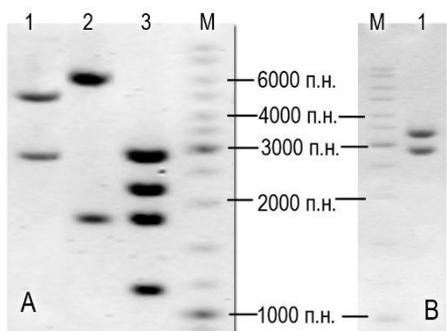


Рис. 5. Схема плазмиды *pWAPcmvEGFP*, содержащей *cmvEGFP-bGHpolyA*, 5'*rbWAP* (5'HA) и 3'*rbWAP* (3'HA) плечи гомологии к гену *rbWAP*. Указаны основные элементы конструкции и сайты рестрикции.

Плазида, выделенная из клона № 33, содержала одну копию обратно ориентированной вставки *cmvEGFP-bGHpolyA*. Ориентация вставки была определена ПЦР-анализом с использованием пар праймеров M13-R/EGP1 (1830 п.н. для прямой ориентации), M13-R/EGP2 (2310 п.н. для обратной ориентации); размер амплификата ≈ 2300 п.н. Ориентация вставки в вектор для *cmvEGFP-bGHpolyA* не имеет значения, поскольку клонированный фрагмент имеет собственный промотор и сигнал полиаденилирования,

необходимые для экспрессии зелёного флуоресцентного белка. Из плазмиды *pWAPcmvEGFP* линейную конструкцию вырезали рестриктазой *Bgl*III, разделяли препаративным электрофорезом, очищали, оценивали концентрацию ДНК.

Выбор сайтов-мишеней. Последовательности-мишени для gRNA с целью ДЦР в 5'-области гена *rbWAP* подбирали в области, ограниченной праймерами W5HA-2 и W5-2, а именно: для анализа брали 200 нуклеотидов, начиная с кодона ATG (рис. 6).

Последовательности-мишени в 3'-области гена *rbWAP* подбирали в области, ограниченной праймерами W3-1 и W3HA-1: для анализа брали 300 нуклеотидов (рис. 7).



Рис. 6. Фрагмент 5'-последовательности двухцепочечной ДНК *rbWAP* для поиска сайтов ДЦР. Серый фон – область поиска, 200 п.н.. Фрагмент 5'HA подчеркнут. PAM-мотивы (5'-20b-NGG-3') для выбранных мишеней обозначены черными блоками: для *gRNA511* – AGG на верхней цепи, для *gRNA51* – TGG на нижней цепи ДНК. Потенциальная делеция для пары *gRNA51* – *gRNA511* составляет 7 п.н.

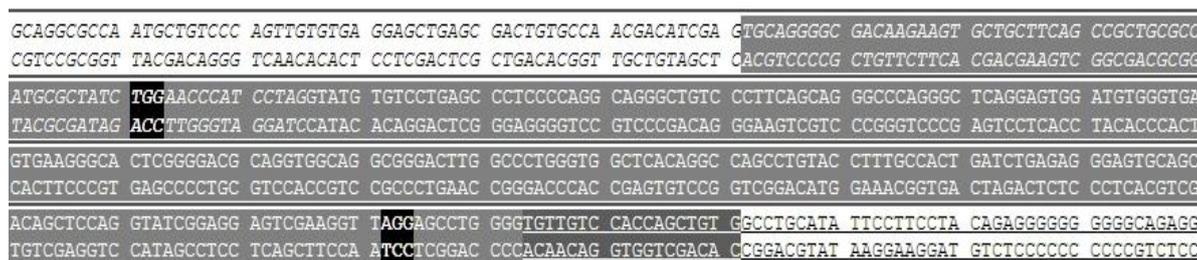


Рис. 7. Фрагмент 3'-последовательности двухцепочечной ДНК для поиска сайтов ДЦР. Серый фон – область поиска, 300 п.н.. Фрагмент 3'HA подчеркнут. PAM-мотив для *gRNA31* – AGG и для *gRNA33* находятся на верхней цепи ДНК. Курсивом выделена часть 3-го экзона. Потенциальная делеция для пары *gRNA31* – *gRNA33* составляет 221 п.н.

4. Стратегия анализа модификаций гена *rbWAP*, внесённых компонентами CRISPR/Cas9.

Для оценки делеций различного размера и встраивания генетической конструкции гомологичной рекомбинацией в ген *rbWAP*, были подобраны соответствующие пары праймеров (табл. 7). Схема гомологичной рекомбинации генной конструкции *WAPcmvEGFP* с геном *rbWAP* в результате работы CRISPR/Cas9 компонентов показана на рис. 8.

С использованием on-line программ CHOPCHOP, CRISPR direct, CRISPOR v.4.8, на каждый фрагмент из нескольких предложенных десятков были выбраны по две последовательности gRNA, имеющие достаточно высокий рейтинг в каждой из программ (рейтинги в программах различались): *gRNA51*-, *gRNA511*, *gRNA31* и *gRNA33*. Последовательности олигонуклеотидов для формирования двухцепочечного фрагмента-вставки в плазмиду *pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9* (Addgene plasmid # 42230) были сгенерированы программой CRISPOR (табл. 2). Олигонуклеотиды для получения gRNA были обработаны по протоколу и клонированы в плазмиду *pX330* (Мензоров и др., 2016). В результате были получены плазмиды *pX330-511*, *-51*-, *-33* и *-31*, кодирующие Cas9 и gRNA к соответствующим сайтам.

Таблица 7. ПЦР-анализ возможных модификаций гена *rbWAP*, полученных с использованием компонентов системы CRISPR/Cas9 и HDR-матрицы.

Пара	ПЦР-амплификат, п.н.		Примечания
	WT	ГМЖ (модификация)	
<i>P51R/P51F</i>	99	<99 ($\Delta G51^1$; $\Delta G511$; $\Delta G51^1/G511$)	ПААГ
<i>P31R/P31F</i>	94	<94 ($\Delta G31$)	ПААГ
<i>P33R/P33F</i>	103	<103 ($\Delta G33$)	ПААГ
<i>P33R/P31F</i>	331	≤ 331 ($\Delta G31$, $\Delta G33$) ≈ 100 ($\Delta G31/G33$)	
<i>P51R/P31F</i>	1420	≈ 100 для $\Delta G511(G51^1)/G31$; ≈ 300 для $\Delta G511(G51^1)/G33$	
<i>W5-1/W3-2</i>	2937	≈ 1600 для $\Delta G511(G51^1)/G31$; ≈ 1800 для $\Delta G511(G51^1)/G33$	
<i>P51R/W5-2</i>	355	≤ 355 ($\Delta G51^1$, $\Delta G511$)	
<i>rHA5F/rHA5R</i>		981 - 5'HA для HDR (с учетом обратной ориентации <i>cmvEGFP</i>)	
<i>rHA3F/rHA3R</i>		968 - 3'HA для HDR (с учетом обратной ориентации <i>cmvEGFP</i>)	

Примечания: WT – животное (эмбрион) дикого типа; ГМЖ – генно-модифицированное животное (эмбрион); ΔGXX – делеция, возникшая в результате работы соответствующей gRNA и Cas9.

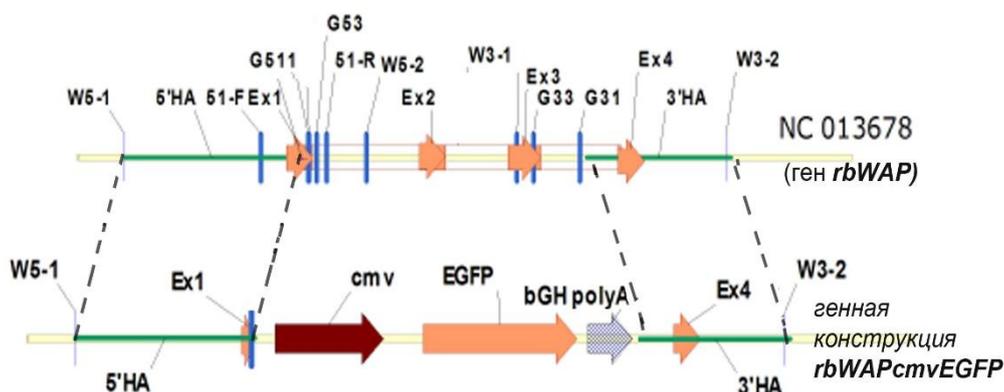


Рис. 8. Схема гомологичной рекомбинации генной конструкции *WAPcmvEGFP* с геном *rbWAP* в результате работы CRISPR/Cas9. Показаны G511, G511, G31, G33 - мишени для gRNA, плечи гомологии 5'HA и 3'HA, структурные элементы гена и конструкции, праймеры.

Заключение

Получена плаزمида *pWAPcmvEGFP*, которую в циркулярном или линейном виде (при вырезании генной конструкции рестриктазой *BglII*) можно использовать в качестве ДНК-матрицы для гомологичной рекомбинации с геном *rbWAP* с применением CRISPR/Cas9-компонентов. Использование гена репортерного белка под *cmv* промотором в составе ДНК-матрицы, фланкированной плечами гомологии к фрагментам гена *WAP*, предназначенной для сайт-специфичной интеграции гомологичной рекомбинацией, может быть моделью для оценки эффективности сайт-специфической работы компонентов системы CRISPR/Cas9 в условиях *in vitro*.

Создана плазмида *pTZHArbWAP*, предназначенная для клонирования ДНК

ЛИТЕРАТУРА

1. 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. – Т. 2. – С. 3-12.
2. 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
3. Шепелев М. В., Калиниченко С. В., Дейкин А. В., Коробко И. В. Получение рекомбинантных белков из молока трансгенных животных: современное состояние и перспективы// АСТА NATURAE. – 2018. – Т.10. – № 3. – С. 42-50.
4. 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.
5. 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.
6. Bosze Z., Hiripi L., Carnwath J.W., Niemann H. The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins // *Transgenic. Res.* – 2003. – Vol. 12. – P. 541-553.
7. Chrenek P., Makarevich A.V. Analysis of transgenic rabbit vitrified embryos carrying EGFP gene // *Slovak J. Anim. Sci.* // 2011. – Vol. 44. – No. 1. – P. 1-5.
8. 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.
9. 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.
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. 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
12. Iqbal K., Barg-Kues B., Broll S., Bode J., Niemann H. and Kues W.A. Cytoplasmic injection of circular plasmids allows targeted expression in mammalian embryos // *BioTechniques.* – 2009. – Vol. 47. – P. 959-968. DOI: 10.2144/000113270
13. Kues W.A., Niemann H. Advances in farm animal transgenesis // *Prev. Vet. Med.* – 2011. – Vol. 102. – P. 146-156.
14. Thepot D., Devinoy E., Fontaine M.L., Hubert C. and Houdebine L.M. Complete sequence of the rabbit whey acidic protein gene // *Nucleic Acids Research.* – 1990. – Vol. 18. – No. 12. – P. 36-41
15. 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.
16. 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 mouse milk. *FEBS.* 1992, 305: 265-268.

3. Bosze, Z., Hiripi, L., Carnwath, J.W., and Niemann, H. The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins. *Transgenic. Res.* 2003, 12: 541-553.
4. Chrenek P., Makarevich A.V. Analysis of transgenic rabbit vitrified embryos carrying EGFP gene. *Slovak J. Anim. Sci.* 2011, 44(1): 1-5.
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., 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.
8. Ezerskii V.A., Shevchenko V.G. [Creation of a genetically engineered structure 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)
9. 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, 5: 1183-1187. DOI:10.1038/nbt1187-1183
10. Iqbal K., Barg-Kues B., Broll S., Bode J., Niemann H. and Kues W.A. Cytoplasmic injection of circular plasmids allows targeted expression in mammalian embryos. *BioTechniques*. 2009, 47: 959-968. DOI: 10.2144/000113270
11. Kues W.A., Niemann H. Advances in farm animal transgenesis. *Prev. Vet. Med.* 2011, 102: 146-156.
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 selektsii - 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.
14. Thepot D., Devinoy E., Fontaine M.L., Hubert C. and Houdebine L.M.. Complete sequence of the rabbit whey acidic protein gene. *Nucleic Acids Research*. 1990, 18(12): 36-41.
15. 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.
16. 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 construction for replacement of rabbit whey acidic protein gene using the CRISPR/Cas9 method

Ezerskii V.A., Koloskova E.M.

*Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition – branch of
L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry,
Borovsk, Kaluga oblast, Russian Federation*

ABSTRACT. The high content of whey acidic protein in rabbit milk makes the gene of this protein a promising candidate to replace the gene of biologically active protein using the CRISPR/Cas9 system. The aim of the study was to create a plasmid containing 5' and 3' arms of homology to regions of the WAP rabbit gene into which the DNA sequence of the target protein can be integrated. Based on the plasmid *pTZ57R/T*, the plasmid *pTZrbWAPha* was created, a site for restriction endonuclease *EagI* was introduced at the junction of the shoulder homology, allowing the DNA sequence of the target protein to be cloned into the plasmid. The composition of the created plasmid was confirmed by its sequence of fragments. A genetic construct containing a green fluorescent protein gene under the *cmv* promoter was embedded at the *EagI* site in the *pTZrbWAPha*. A strategy for introducing double-stranded cuts into the *rbWAP* gene was developed and four *pX330* plasmids encoding Cas9 endonuclease and guiding RNA were obtained.

The *prbWAPcmvEGFP* plasmid containing the *cmvEGFP* fragment is designed to evaluate site-specific DNA integration by homologous recombination into the *rbWAP* gene and the effectiveness of selected CRISPR/Cas9 system components under *in vitro* conditions.

Keywords: genetic construction, plasmids, CRISPR/Cas9, rabbit, whey acidic protein, green fluorescent protein

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2019, 4: 23-35

Поступило в редакцию: 10.10.2019

Получено после доработки: 25.10.2019

Езерский Вадим Александрович, с.н.с., тел. 8(906)642-59-92, ez.vadim@yandex.ru;
Колоскова Елена Михайловна, к.б.н., с.н.с., тел. 8(910)590-92-83, heleko3@yandex.ru