

**БИЦИСТРОННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ ДЛЯ ИНТЕГРАЦИИ
ТРАНСГЕНА В ГЕНОМ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО CRISPR/Cas9
МЕХАНИЗМУ С НОКАУТОМ СОБСТВЕННОГО ГЕНА β -ЛАКТОГЛОБУЛИНА**

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

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

С появлением новых эндонуклеазных технологий стала возможной одноступенчатая генерация мутаций в нескольких генах одновременно, с участием одного или обоих аллелей (в том числе для получения гомозиготных животных в F₀ поколении), введение в геном сразу нескольких трансгенов, нокаут собственного гена с заменой его трансгеном. По востребованности применения новых технологий в настоящее время лидирует получение животных-биомоделей с генами человека для проведения биомедицинских исследований, но не менее актуальной задачей является получение животных, продуцирующих биологически активные белки с молоком.

Цель данного исследования – создание генетической конструкции для совместной интеграции трансгена кДНК лактоферрина человека и зеленого флуоресцентного белка по CRISPR/Cas HDR механизму в локус бета-лактоглобулина крупного рогатого скота (*b β Lg*) с одновременным его нокаутом на бластоцистах микроинъекцированных зигот КРС. На основе ранее созданных авторами плазмид *p β LghLf* и *p β LghLfcmvEGFP* получена генетическая конструкция, включающая в себя последовательности кДНК чЛФ и гена зеленого флуоресцентного белка (EGFP) в качестве репортерного, фланкированные плечами гомологии 5'- и 3'- регуляторным областям *b β Lg*. Конструкцию предполагается использовать для получения эмбрионов КРС, трансгенных по *hLf* и/или нокаутных по *β Lg*.

Ключевые слова: генно-инженерные конструкции, рекомбинантные белки, CRISPR/Cas9, β -лактоглобулин крупного рогатого скота, лактоферрин человека

Проблемы биологии продуктивных животных, 2018, № 4: 45-55

Введение

Используемые сокращения: ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ПЦР – полимеразная цепная реакция; РБ – рекомбинантные белки; БМ – белки молока; МЖ – молочная железа; ГИК – генно-инженерные конструкции; *hLf* – ген лактоферрина человека; ЛФ – белок лактоферрина человека; UTR – нетранслируемые области; *b β Lg* – ген β -лактоглобулина КРС; *o β Lg* – ген β -лактоглобулина овцы; *g β Lg* – ген лактоглобулина козы; TALEN (transcription activator-like effector nuclease) – эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции, CRISPR/Cas (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats) – короткие палиндромные повторы, расположенные группами, равномерно удаленными друг от друга; SCNT (somatic cell nuclear transfer) – перенос ядер соматических клеток; HDR (homology directed repair) – гомологически направленная репарация повреждений структуры ДНК.

В начале 21-го века исследователи стали создавать эффективные генетические конструкции, всё более похожие на изначальный, природный вариант; в качестве

структурного гена в составе конструкции стали использовать полноразмерный ген со всеми экзонами и интронами. Типичный пример – эффективно работающая VAC-hLf размером 150 т.п.н., содержащая 90 т.п.н. 5'- и 30 т.п.н. 3'-нетранслируемые области (UTR) с полноразмерным геном лактоферрина человека (чЛФ) (Liu et al., 2004). При невозможности использования целого гена из-за его огромных размеров, кДНК целевого белка клонируют в первый экзон гена молочного белка (Разин и др., 2000).

Наиболее эффективные экспрессионные векторы для продукции рекомбинантных белков (РБ) в молочной железе (МЖ) содержат протяженную 5'-область белка молока (БМ), состоящую из промотора, тканеспецифичных энхансеров, первых некодирующих экзонов и расположенных между ними интронов. Для накопления целевого белка в молоке кодирующая часть гена должна содержать последовательность сигнального пептида, необходимого для секреции (Максименко и др., 2013). В генно-инженерные конструкции (ГИК) включают 3'-UTR гена БМ, содержащую последние некодирующие экзоны и интроны, сайт полиаденилирования и прилежащие последовательности, потенциально способные усиливать терминацию транскрипции. К настоящему времени накоплен огромный фактический материал получения и использования трансгенных животных (ТЖ) для экспрессии РБ в МЖ. Тканеспецифичность экспрессии трансгена обеспечивается включением регуляторных областей генов основных БМ (казеинов и сывороточных белков молока) в ГИК. Бета-лактоглобулин (β -ЛГ) – основной сывороточный белок молока почти у всех млекопитающих, кроме грызунов и приматов (Pervaiz et al., 1985). Концентрация β -ЛГ в молоке КРС составляет 4,6 мг/мл (Caffin et al., 1985).

Регуляторные районы гена β -лактоглобулина (β Lg) овец, коз и крупного рогатого скота, наряду с промоторными областями генов других основных белков молока, часто используются в создании ГИК. Первые мыши с трансгеном β Lg овцы экспрессировали β -ЛГ только в молоке на уровне 3-23 мг/мл (Simons et al., 1987). Было показано, что для успешной экспрессии β Lg с молоком мыши нужны только первые 406 п.н. 5'-области и 1,9 т.п.н. 3'-области гена β Lg овцы (Whitelow et al., 1992). Линии трансгенных по β Lg мышей экспрессировали РБ в концентрациях от 7 до 33 мг/мл (McClenaghan et al., 1991).

С использованием промоторной области β Lg овцы в составе генной конструкции получили овец, экспрессирующих с молоком α_1 -антитрипсин человека (до 35 мг/мл) (Wright et al., 1991), и кроликов, у которых уровень рекомбинантного кальцитонина лосося в молоке составлял 2,1 г/л (McKee et al., 1998).

У мышей, трансгенных по $b\beta$ Lg, экспрессия РБ в молоке достигала 1-2 мг/мл и оставалась стабильной в ходе двух лактаций (Nyttinen et al., 1998). Регуляторные элементы $b\beta$ Lg применяли в ГИК с геном эритропоэтина человека для получения трансгенных мышей и кроликов (Korhonen et al., 1997). Хороший уровень экспрессии рекомбинантного чЛФ был достигнут в культуре клеток секреторного эпителия МЖ коровы при использовании конструкции, состоящей из 5'-фланговой области $b\beta$ Lg (1149 п.н.: промотор + 1-й экзон + 1-й интрон), кДНК чЛФ (2259 п.н.), сигнал полиаденилирования SV40 (Shu et al., 2007).

До недавнего времени основным способом получения ТЖ с нужным местом нокаута, внесения мутаций или встраивания трансгена был метод гомологичной рекомбинации с использованием эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Модифицированные ЭСК инъецировали в бластоцисты реципиентов с получением потомства химерных животных, с последующим выведением линий, содержащих нужную генетическую модификацию (Sapich, 2005). Это надежный способ получения генно-модифицированных животных, но очень трудоёмкий и длительный, выполнение которого недоступно для многих лабораторий.

С появлением новых эндонуклеазных технологий, среди которых лидирует CRISPR/Cas9, стала возможной одноступенчатая 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, нокаут собственного гена с заменой его трансгеном. По востребованности применения новых

технологий в настоящее время лидирует получение животных-биомоделей с генами человека для проведения биомедицинских исследований (Torres-Ruiz et al., 2015; Whitelaw et al., 2016), но и по созданию ТЖ-продуцентов биологически активных белков с молоком с использованием новых технологий уже получены впечатляющие результаты.

Для получения «гуманизованного» козьего молока с улучшенными пищевыми характеристиками китайские ученые на фетальных фибробластах козы с использованием TALEN-технологии интегрировали *hLf* в эндогенный ген β -лактоглобулина (*gBLg*). В качестве матрицы для гомологичной рекомбинации брали плазмиду *pBLG-hLF-neo*, содержащую кДНК чЛФ с сигналом PolyA бычьего гормона роста на 3'конце (2,4 тпн), флуксированный ген *Neo* и *BLg*-плечи гомологии (877 и 780 п.н). Методом SCNT были получены 7 *gBLg^{+/-}* и 3 *gBL^{+/hLF}* козлёнка. Экспрессия β ЛГ в молоке моноаллельных коз F0 *gBLg^{+/-}* была значительно меньше, чем у коз дикого типа. В молоке коз *gBL^{+/hLF}* содержание чЛФ было 2,3-2,4 г/л. Молоко позднее полученных *gBLg^{-/-}* и *gBLg^{-/hLF}* коз не содержало β -лактоглобулин, а уровень чЛФ составлял 3,2 г/л. Приобретенные качества наследовались по менделевскому типу (Cui et al., 2015; Zhu et al., 2016).

Огромный плюс нового CRISPR/Cas9 метода – время получения линейных животных сократилась с нескольких лет до нескольких месяцев. С использованием CRISPR/Cas9-системы можно решать самые разнообразные задачи, связанные с разными областями фундаментальной и прикладной биологии, биотехнологии, медицины. Это такие возможности, как:

- исследование роли отдельных генов в функционировании клеток и организма в целом;
- получение модельных организмов для исследований в области биологии развития, иммунологии, изучения заболеваний человека и животных;
- одновременное введение в клетки несколько генетических конструкций, направленных на разные участки генома, т.е. воздействие на работу одновременно нескольких генов, чтобы исследовать взаимоотношения между ними и их участие в нормальных и патологических процессах жизнедеятельности;
- создание новых пород скота, а также сельскохозяйственных культур растений, высокоурожайных и устойчивых к неблагоприятным условиям;
- получение линий животных или растений, способных синтезировать биологически активные белки.

Необходимость освоения CRISPR/Cas9 технологии с целью эффективного получения трансгенных животных-биореакторов биологически активных белков человека чрезвычайно актуальна.

В 2006 г. в нашей лаборатории была создана ГИК *β LgLf*, в которой кДНК чЛФ фланкирована 5'- и 3'-последовательностями гена *bBLg* (Езерский и др., 2006). На её основе была создана конструкция, включающая в себя маркерный ген зелёного флуоресцентного белка: *β LgLfcmvEGFP* (Езерский, Шевченко, 2008). И первая, и вторая конструкции уже содержат плечи гомологии к соответствующим областям гена *bBLg*, первая после небольшой коррекции может быть использована в качестве ssДНК-шаблона для HDR репарации при осуществлении сайт-специфических разрезов. Вторая, при перемещении *cmvEGFP*-фрагмента во внутреннюю область конструкции, приобретёт внешние плечи гомологии к *bBLg*.

Целью создания плазмиды, содержащей 5'- и 3'-фланкирующие плечи гомологии *bBLg*, кДНК лактоферрина человека и ген *EGFP*, является отработка методики интеграции трансгена по CRISPR/Cas HDR механизму в локус *bBLg* с одновременным его нокаутом на микроинъектированных бластоцистах КРС. Экспрессия зелёного белка и ПЦР-анализ ДНК бластоцист позволят оценить эффективность метода для получения КРС с генотипом *hLf⁺/BLg⁻*.

Материал и методы

В работе использовали следующие ферменты и реактивы: термочувствительная щелочная фосфатаза *FastAP*, 1 ед/мкл; рестриктазы *HindIII*, *SalI*, *XbaI*, *NaeI*, *SmaI*, *BsmBI* (*Esp3I*), *EagI* (10 ед/мкл); *10×Buffer Y⁺/Tango*, *10×Buffer O*. Для промежуточного клонирования ПЦР-продуктов использовали T4 DNA Ligase (5 ед/мкл), *10×T4 DNA Ligase Buffer*, *pTZ57R/T* набора *InsTAclone PCR Cloning Kit*, *pJET1.2/blunt* набора *CloneJET PCR Cloning Kit* <<http://www.thermoscientific.com/fermentas>>. Для электрофореза использовали агарозу (Biotechnology Grade), Amresco США (Хеликон, <<https://helicon.ru/catalog/>>).

При проведении ПЦР использовали смесь *dNTP* 2 мМ (Fermentas), Taq-полимеразу 5 ед/мкл, *10×Taq-буфер* с 25 мМ $MgCl_2$, Pfu-ДНК-полимеразу, 5 ед./мкл (Силекс), масло минеральное (Molecular Biology Grade), ICN США (Хеликон). 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 в ЗАО «Синтол» <<http://www.syntol.ru>>. Процедуру ПЦР проводили на амплификаторе ДНК «Терцик» («ООО ДНК-Технология», Москва).

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 ампициллин (Am^+), 100 мкг/мл и 1,5%-ый 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 100 мл ЛБ- Am^+ среды. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* или классическим методом щелочного лизиса.

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 АГ 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. Последовательности и свойства использованных в работе праймеров

Праймер	5'-3' последовательность	Направление	Введенный сайт рестрикции
5'bLg1	TCTAGACCTACTTCTGGGGCCTACCA	F	<i>XbaI</i>
Lf-R	GTCTGACTTACTTCCTGAGGAATTCACAG	R	<i>SalI</i>
BLGM1	GGCTGCAGCCGGCAAGTGCCTCCTGCTTGC	F	<i>NaeI</i>
BLGM1-R	GCAAGCAGGAGGCACTTGCCGGCTGCAGCC	R	<i>NaeI</i>
BLGM2	ATCGTCACCCAGCCCGGAAGGGCCTGGATA	F	<i>SmaI</i>
BLGM2-R	TATCCAGGCCCTTCCCCTGGGTGACGAT	R	<i>SmaI</i>
Lf0-F	CTTGGCCATGAACTTGTCTTCC	F	
Lf0-R	GTTTCATGGCCAAGGAGTACCAAG	R	
TKPA-F	GTCTGACCCCAACCTGCCATCACGATTTTCGATTCC	F	<i>SalI</i>
TKPA-R	GTCTGACCCGCGG AACTCACGTTAAGGGATTTTGGTC	R	<i>SalI</i> , <i>EagI</i>
Lf11	TAC GGC TAC ACT GGG GCT TT	F	
β IgE5	CAAGCT TCT AGAAGGGCTACAGTCCATGGGTC	R	<i>Hind III</i> , <i>Xba I</i>
β IgE4	TAGTCGACGAGCAGTGCCACATCTAGGTG	F	<i>SalI</i>
GFP E2	AGACTCGAGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTC	R	

Результаты и обсуждение

В качестве источника, содержащего кДНК лактоферрина человека с регуляторными областями *bβLg*, была использована плаزمида *pUC18_bLGhLF*, созданная в нашей лаборатории на основе плазмиды *pUC18* (Езерский и др., 2007) (рис.1).

Для амплификации с плазмиды *pUC18_bLGhLF* фрагмента, включающего часть 5'-фланговой области *bβLg* и кДНК ЧЛФ (до стоп-кодона) были подобраны праймеры 5'bLg1 и Lf-R, в которые ввели сайты для рестриктаз *XbaI* и *SalI* соответственно.

Поскольку 1-й экзон *bβLg*, входящий в состав 5'-фланговой области, содержит два триплета ATG, а кДНК ЧЛФ содержит последовательность, кодирующую собственный сигнальный пептид, были подобраны промежуточные праймеры, вносящие мутации по ATG и оригинальные сайты рестрикции с сохранением рамки считывания. Введенные сайты рестрикции на этапе работы с эмбрионами КРС облегчат проведение анализа гомологичной рекомбинации генной конструкции.

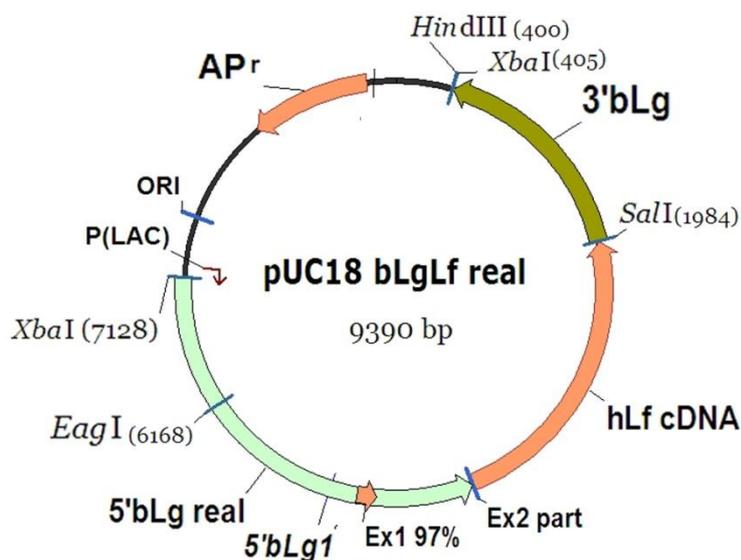


Рис. 1. Плазмида *pUC18_bLGhLF*, созданная на основе вектора *pUC18*, содержит кДНК лактоферрина человека (2136 п.н.) с регуляторными областями гена β -лактоглобулина крупного рогатого скота. 5'-Регуляторная область размером 3002 п.н. включает в себя промоторную область, 1-е экзон и интрон, часть 2-го экзона гена β -лактоглобулина, с сохранением рамки считывания; размер 3'-последовательности – 1573 п.н.

CCTCCACTCCCTGCAGAGCTCAGAAGCGTGATCCC GGCTGCAGCC**ATG**AA
GTGCCTCCTGCTTGCCCTGGCCCTCACCTGTGGCGCCCAGGCCCTCATCGT
CACCCAGACC**ATG**AAGGGCCTGGATATCCAGAAG

Рис. 2. Последовательность 1-го экзона гена *bLg*, входящая в состав 5'-регуляторной области конструкции. Выделены ATG - триплеты, подлежащие замене.

С использованием мутантных праймеров прямых BLGM1, BLGM2, обратных BLGM1-R, BLGM2-R и праймеров 5'bLg1, Lf-R, Lf0-F, Lf0-R с плазмиды *pUC18_bLGhLF* был получен ПЦР-амплификат, отличающийся от матрицы двумя оригинальными сайтами рестрикции (отдельный материал по получению фрагмента с введенными мутациями готовится к печати).

Очищенный препаративным электрофорезом и выделенный из АГ с помощью набора амплификат *XbaI-5'BLGhLF-SalI* клонировали в *pJET1.2/blunt*. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli Dh5a* и выросшие на селективной среде клоны проверяли на наличие вставки. Положительный клон нарабатывали и выделяли *pJET_5'BLGhLF*.

В качестве вектора для сборки конструкции использовали плазмиду *pUC18*. Из *pJET_5'BLGhLF* рестриктазами *XbaI* и *SalI* вырезали фрагмент *XbaI-5'BLGhLF-SalI*,

который переклонировали в обработанную этими же рестриктазами и щелочной фосфатазой *pUC18*. Выросшие на селективной среде клоны трансформированных компетентных клеток *E.coli Dh 5a* проверяли ПЦР-анализом с праймерами Lf-R/Lf11 (амплификат размером 507 п.н.) и 5' bLg1/Lf0-R (амплификат размером 1049 п.н.).

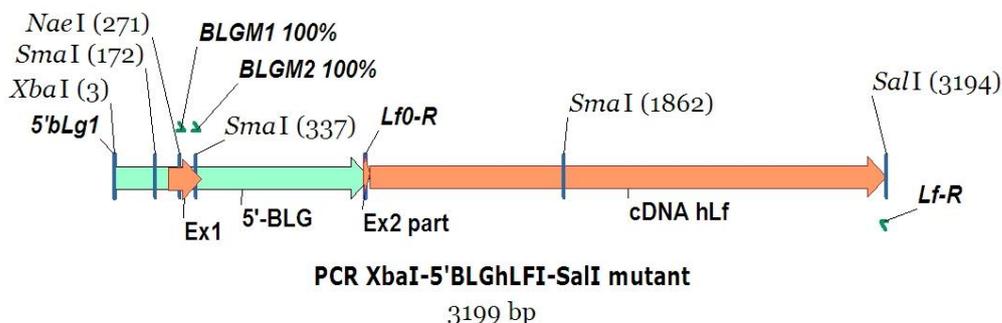


Рис. 3. ПЦР амплификат *XbaI-5'BLGhLF-SalI*, содержащий введенные вместо триплетов ATG сайты рестрикции для *NaeI* и *SmaI* в первом экзоне β Lg.

Положительный клон, содержащий плазмиду *pUC18_5'BLGhLF*, наработали, провели проверочную рестрикцию выделенной плазмиды рестриктазами *SmaI*, *NaeI*, *XbaI* и *SalI*. Плазмиду *pUC18_5'BLGhLF* (рис. 4, слева) использовали далее для клонирования других компонентов ГИК.

Плазмиду *pUC18_bLGhLF* обработали рестриктазами *SalI* и *HindIII*, рестриктную смесь разделили в агарозном геле. Из вырезанной полосы геля, соответствующей 1573 п.н., выделили фрагмент *SalI-3'bLG-HindIII* и клонировали в обработанную этими же ферментами и щелочной фосфатазой *pUC18_5'bLGhLF-mut*. Выросшие из трансформированных лигазной смесью клеток *E. coli Dh5a* клоны проверили на наличие вставки ПЦР с праймерами β lgE5/ β lgE4 (амплификат размером 1594 п.н.). Положительный клон наработали и выделили плазмиду, обозначенную *pUC18_bLGhLF-mut* (рис. 4, справа).

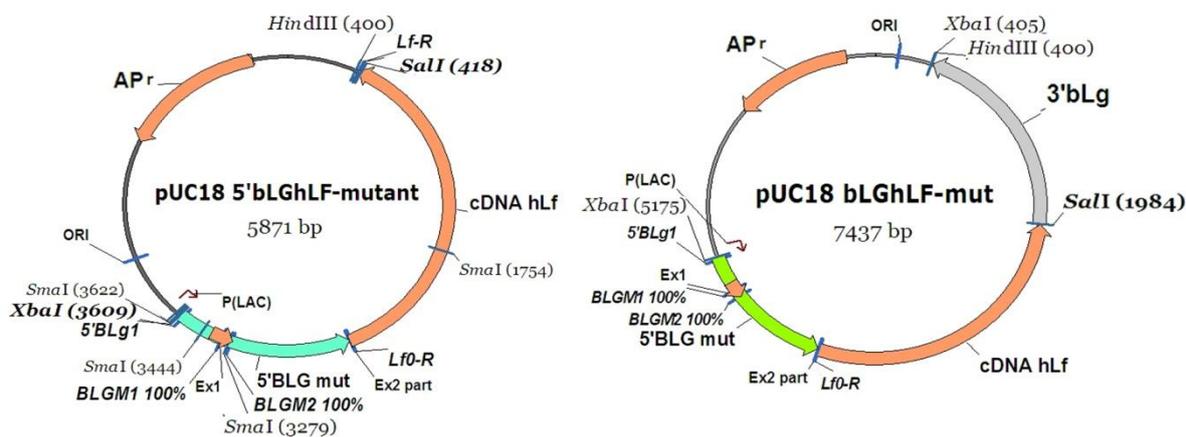


Рис. 4. Промежуточные плазмиды. Слева: плазмиды *pUC18_5'BLGhLF*, содержащая кДНК лактоферрина человека (2136 п.н.) и 5'-плечо гомологии (1049 п.н.) к β Lg. Справа: плазмиды *pUC18_bLGhLF*, содержащая кДНК лактоферрина человека, 5'- и 3'-плечи гомологии (1049 п.н. и 1573 п.н. соответственно) к β Lg.

Для амплификации фрагмента сигнала полиаденилирования тимидинкиназы вируса простого герпеса (*Herpes simplex virus (HSV) thymidine kinase (TK) polyadenylation signal*) с плазмиды *pTurboRFP-N* (Евроген), который в конечной конструкции должен работать как сигнал полиаденилирования цистронной единицы, содержащей кДНК чЛФ, использовали праймеры ТКРА-F и ТКРА-R.

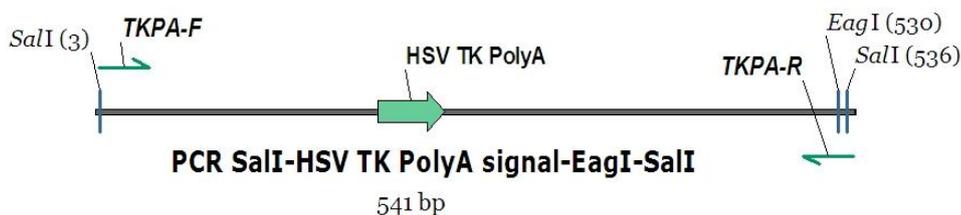


Рис. 5. ПЦР амплификат фрагмента сигнала полиаденилирования HSV TK.

Очищенный препаративным электрофорезом и выделенный из АГ с помощью набора амплификат *SalI- HSV TK PolyA-EagI-SalI* (рис. 5) клонировали в *pTZ57R/T*. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli Dh5α* и выросшие на селективной среде клоны проверяли на наличие вставки с праймерами ТКРА-F и ТКРА-R. Положительный клон нарабатывали и выделяли плазмиду *pTZ_HSV TK PolyA*.

Из плазмиды *pTZ_HSV TK PolyA* рестриктазой *SalI* вырезали фрагмент *SalI- HSV TK PolyA-EagI-SalI*, очищали препаративным электрофорезом и выделенный фрагмент клонировали в предварительно обработанный этой же рестриктазой и щелочной фосфатазой вектор *pUC18_bLGhLF mut*. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli Dh5α* и выросшие на селективной среде клоны проверяли на наличие правильно ориентированной вставки ПЦР-анализом с использованием праймеров ТКРА-R/Lf11 (размер амплификата 1040 п.н.). Положительный клон нарабатывали и выделяли плазмиду *pUC18_bLGhLF-modif* (рис. 6).

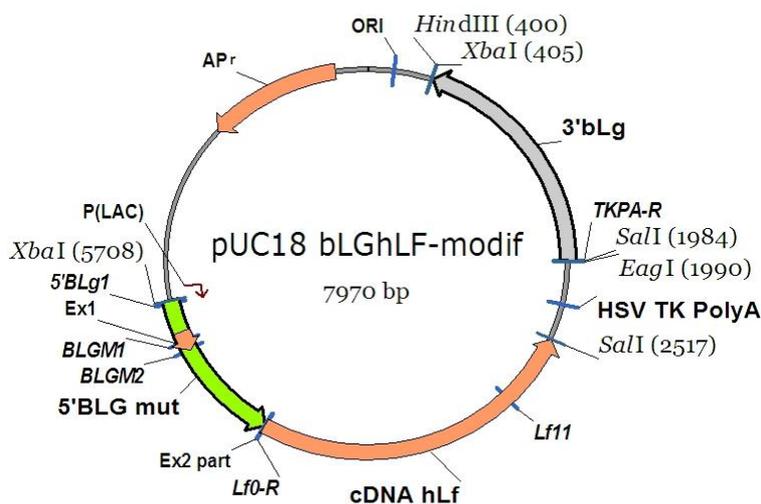


Рис. 6. Плазмида *pUC18_bLGhLF-modif*, содержащая кДНК лактоферрина человека (2136 п.н.), 5'- и 3'-плечи гомологии (1049 п.н. и 1573 п.н. соответственно) к *bβLg* и сигнал полиаденилирования HSV TK.

В плазмиду *pUC18_bLGhLF-modif*, обработанную рестриктазой *EagI* и щелочной фосфатазой, клонировали фрагмент *NotI-cmvEGFP-bGH polyA-NotI*, вырезанный рестриктазой *NotI* из плазмиды *pGEMTcmvEGFP*, полученной в 2006 году (Езерский и др., 2006). Обработка этой плазмиды рестриктазой *BsmBI (Esp3I)* дает *NotI (EagI)* липкие

концы. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli Dh5α* и выросшие на селективной среде клоны проверяли на наличие правильно ориентированной вставки *cmvEGFP* ПЦР-анализом с использованием праймеров GFP E2/Lf11 (размер амплификата 2560 п.н.).

Положительный клон нарабатывали и выделяли конечную плазмиду *pUC18_BLghLfEGFP_HDR* (рис. 7).

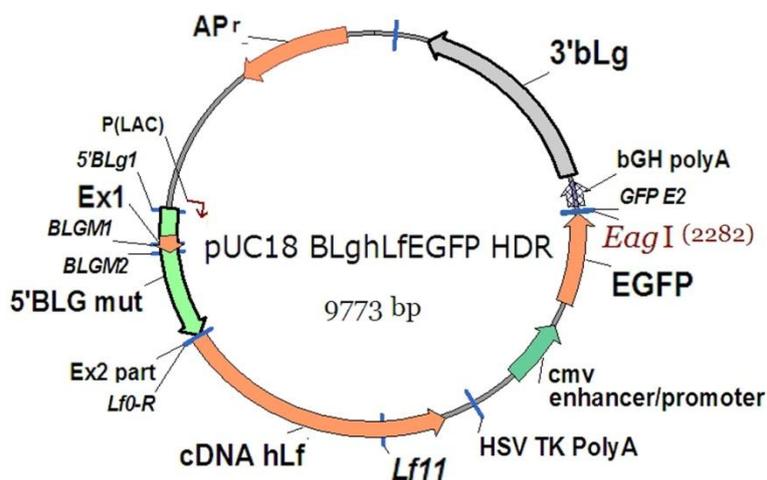


Рис. 7. Плазмида *pUC18_BLghLfEGFP_HDR*, содержащая кДНК лактоферрина человека, сигнал полиаденилирования HSV TK, 5'- и 3'-плечи гомологии к *bβLg* и цистронную единицу маркерного гена (*EGFP*).

Поскольку в полученной плазмиде фрагмент *cmv_EGFP_polyA-BGH* сохраняет свою цистронную структуру, экспрессия GFP на ранних стадиях развития послужит маркером при отборе трансгенных эмбрионов. Конструкцию предполагается использовать в качестве матрицы для замещения кодирующей последовательности бычьего гена *βLG* на последовательность кДНК *hLf* и гена *EGFP* посредством механизма гомологичной рекомбинации с использованием CRISPR/Cas9 технологии для отработки методики получения эмбрионов КРС, трансгенных по гену *hLF* и/или нокаутных по гену *βLG*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Езерский В.А., Иванова Л.Б., Шевченко В.Г. Создание генно-инженерной конструкции на основе регуляторных элементов гена β-лактоглобулина быка и структурного гена лактоферрина человека // Сб. науч. тр. ВНИИФБиП. – 2006. – Т. 45. – С. 121-137.
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. Максименко О.Г., Дейкин А.В., Ходарович Ю.М., Георгиев П.Г. Использование трансгенных животных в биотехнологии: перспективы и проблемы // Acta naturae. – 2013. – Т. 5. – № 1(16). – С. 33-47.
4. Разин С.И., Вербовая Л.В., Гольдман И.Л. Новые подходы к созданию трансгенных животных с высоким уровнем тканеспецифической экспрессии чужеродных генов: конструирование и реконструкция геномных доменов // Генетика. – 2000. – Т. 36. – № 11. – С. 1443-1453.
5. Caffin J.P., Poutrel B., Rainard P. Physiological and pathological factors influencing bovine alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin concentrations in milk // J. Dairy Sci. – 1985. – Vol. 68. – P. 1087-1094.
6. Saccechi M.R. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century // Nat. Rev. Genet. – 2005. – Vol. 6. – P. 507-512.
7. 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 // Scientific reports. – 2015. – Vol. 5. – P. 1-11. doi:10.1038/srep10482
8. Hyttinen J.M., Korhonen V.P., Hiltunen M.O., Myohanen S., Janne J. High-level expression of bovine beta-lactoglobulin gene in transgenic mice // J. Biotechnol. – 1998. – Vol. 13. – No. 3. – P. 191-198.

9. Korhonen V.P., Tolvanen M., Hyttinen J.M., Uusi-Oukari M., Sinervirta R., Alhonen L., Jauhiainen M., Janne O.A., Janne J. Expression of bovine beta-lactoglobulin/human erythropoietin fusion protein in the milk of transgenic mice and rabbits // *Eur. J. Biochem.* – 1997. – Vol. 15. – No. 2. – P. 482-489.
10. Liu Z., Zhao C., Fan B., Dai Y., Zhao Z. et al. Variable expression of human lactoferrin gene in mice milk driven by its 90 KB upstream flanking sequences // *Anim. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 15. – P. 21-31.
11. McClenaghan M., Springbett A., Wallace R. Secretory proteins compete for production in the mammary gland of transgenic mice // *Biochem. J.* – 1995. – Vol. 310. – P. 637-641.
12. McKee C., Gibson A., Dalrymple M., Emslie L., Garner I., Cottingham I., Production of biologically active salmon calcitonin in the milk of transgenic rabbits // *Nature Biotechnology.* – 1998. – Vol. 16. – No. 7. – P. 647-651.
13. Pervaiz S., Brew K. Homology of beta-lactoglobulin, serum retinol-binding protein, and protein HC // *Science.* – 1985. – Vol. 228. – P. 335-337.
14. Shu J.H., Zhang Y., Pan Z.F., Peng S.Y., Cao J.W., Li X.C. Construction of expression vector of human lactoferrin and its expression in bovine mammary epithelial cells // *Belg. J. Zool.* – 2007. – Vol. 137. – No. 2. – P. 231-237.
15. Simons J., McClenaghan M., Clarc A. Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice // *Nature.* – 1987. – Vol. 328. – P. 530-532.
16. Torres-Ruiz R., Rodriguez-Perales S. CRISPR-Cas9: A revolutionary tool for cancer modelling // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol.16. – P. 22151-22168. doi:10.3390/ijms160922151
17. Whitelaw C.B., Harris S., McClenaghan M., Simons J.P., Clark A.J. Position-independent expression of the ovine beta-lactoglobulin gene in transgenic mice // *Biochem. J.* – 1992. – Vol. 286. – P. 31-39.
18. 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.
19. Wright G., Carver A., Cottom D. et al. High-level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep // *Bio/Technol.* – 1991. – Vol. 9. – P. 830-834.
20. 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. – No. 6. doi: 10.1371/journal.pone.0156636

REFERENCES

1. Caffin J.P., Poutrel B., Rainard P. Physiological and pathological factors influencing bovine alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin concentrations in milk. *J. Dairy Sci.* 1985, 68: 1087-1094.
2. Capecchi M.R. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat. Rev. Genet.* 2005, 6: 507-512.
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. *Scientific reports.* 2015, 5: P.1-11. doi:10.1038/srep10482
4. Ezerskii V.A., Ivanova L.B., Shevchenko V.G. [Creation of a genetically engineered construction based on the regulatory elements of the bull beta-lactoglobulin gene and the structural human lactoferrin gene]. *Proc. VNIIFBiP.* 2006, 45: 121-137. (In Russian)
5. Ezerskii V.A., Shevchenko V.G. [Creation of a genetically engineered construct containing the structural gene of human lactoferrin under the control of the regulatory elements of the bovine β -lactoglobulin gene and the reporter GFP gene]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology.* 2008, 2: 3-12. (In Russian)
6. Hyttinen J.M., Korhonen V.P., Hiltunen M.O., Myohanen S., Janne J. High-level expression of bovine beta-lactoglobulin gene in transgenic mice. *J. Biotechnol.* 1998, 13(3): 191-198.
7. Korhonen V.P., Tolvanen M., Hyttinen J.M., Uusi-Oukari M., Sinervirta R., Alhonen L., Jauhiainen M., Janne O.A., Janne J. Expression of bovine beta-lactoglobulin/human erythropoietin fusion protein in the milk of transgenic mice and rabbits. *Eur. J. Biochem.* 1997, 15(2): 482-489.
8. Liu Z., Zhao C., Fan B., Dai Y., Zhao Z. et al. Variable expression of human lactoferrin gene in mice milk driven by its 90 KB upstream flanking sequences. *Anim. Biotechnol.* 2004. 15: 21-31.
9. Maksimenko O.G., Deikin A.V., Khodarovich Yu.M., Georgiev P.G. [The use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems]. *Acta naturae.* 2013, 5(1): 33-47. (In Russian)
10. McClenaghan M., Springbett A., Wallace R. Secretory proteins compete for production in the mammary gland of transgenic mice. *Biochem. J.* 1995, 310: 637-641.

11. McKee C., Gibson A., Dalrymple M., Emslie L., Garner I., Cottingham I., Production of biologically active salmon calcitonin in the milk of transgenic rabbits. *Nature Biotechnology*. 1998, 16(7): 647-651.
12. Pervaiz S., Brew K. Homology of beta-lactoglobulin, serum retinol-binding protein, and protein HC. *Science*. 1985, 228: 335-337.
13. Razin S.I., Verbovaya L.V., Gol'dman I.L. [New approaches to the creation of transgenic animals with a high level of tissue-specific expression of foreign genes: the design and reconstruction of genomic domains]. *Genetika – Genetics*. 2000, 36(11): 1443-1453. (In Russian)
14. Shu J.H., Zhang Y., Pan Z.F., Peng S.Y., Cao J.W., Li X.C. Construction of expression vector of human lactoferrin and its expression in bovine mammary epithelial cells. *Belg. J. Zool.* 2007, 137(2): 231-237.
15. Simons J., McClenaghan M., Clarc A. Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice. *Nature*. 1987, 328: 530-532.
16. Torres-Ruiz R., Rodriguez-Perales S. CRISPR-Cas9: A revolutionary tool for cancer modeling. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16: 22151-22168. doi:10.3390/ijms160922151
17. Whitelaw C.B., Harris S., McClenaghan M., Simons J.P., Clark A.J. Position-independent expression of the ovine beta-lactoglobulin gene in transgenic mice. *Biochem. J.* 1992, 286: 31-39.
18. 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.
19. Wright G., Carver A., Cottom D. et al. High-level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Bio/Technol.* 1991, 9: 830-834.
20. 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(6). doi:10.1371/journal.pone.0156636

**Bicystron genetic construction for transgene integration
in the cattle genome by CRISPR/Cas9 mechanism with the knockout
of the own β -lactoglobulin gene**

Koloskova E.M., Yezerky V.A., Belova N.V., Kut'in I.V., Ryabykh V.P.

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

ABSTRACT. With the advent of new endonuclease technology, single-stage mutation in several genes became possible, with the participation of one or both alleles (including obtaining homozygous animals in the F0 generation), introduction of several transgenes into the genome, and own gene replacement by a transgene. According to the demand for the use of new technologies, the production of animal biomodels with human genes for biomedical research is currently leading, but no less urgent task is to obtain animals that produce biologically active proteins with milk.

The purpose of this study is to create a genetic construct for the integration of the human lactoferrin cDNA transgene by the CRISPR/Cas HDR technology into the bovine beta-lactoglobulin locus (*b β Lg*) with its simultaneous knockout on bovine microinjected zygotes. Based on the previously created plasmids *β -LghLf* and *β -LghLfcmvEGFP*, a genetic construct was obtained, including the cDNA sequences of *hLF* and the green fluorescent protein gene (*EGFP*) as a reporter, flanked by homology shoulders 5' and 3' to the regulatory regions of *b β Lg*. The design is supposed to be used to produce bovine embryos that are transgenic for *hLf* and/or *β Lg* knockout.

Keywords: genetically engineered constructs, recombinant proteins, CRISPR/Cas9, bovine β -lactoglobulin, human lactoferrin

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2018, 4:45-55

Поступило в редакцию: 5.10.2018

Получено после доработки: 24.10.2018

Колоскова Елена Михайловна, к.б.н., с.н.с., 8(910)590-92-83, heleko3@yandex.ru;

Езерский Вадим Александрович, с.н.с., 8(906)642-59-92, ez.vadim@yandex.ru;

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

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

Рябых Владимир Павлович, д.б.н., зав. лаб.