

Стратегия модификации гена бета-лактоглобулина крупного рогатого скота с использованием компонентов CRISPR/Cas9 системы в плазмидной форме

Часть 2

Езерский В.А., Колоскова Е.М.

*Всероссийский научно-исследовательский институт
физиологии, биохимии и питания животных – филиал
ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства –
ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста».*

Разведение КРС ведется в трех направлениях – мясное, молочно-мясное и молочное с целью получения продукции нужной категории.

За последние 30 лет были созданы трансгенные коровы для таких целей как

- экспрессия фармацевтических белков,
- увеличение доли бета- и каппа-казеина в молоке,
- повышение устойчивости к болезням,
- увеличение мясной продуктивности.

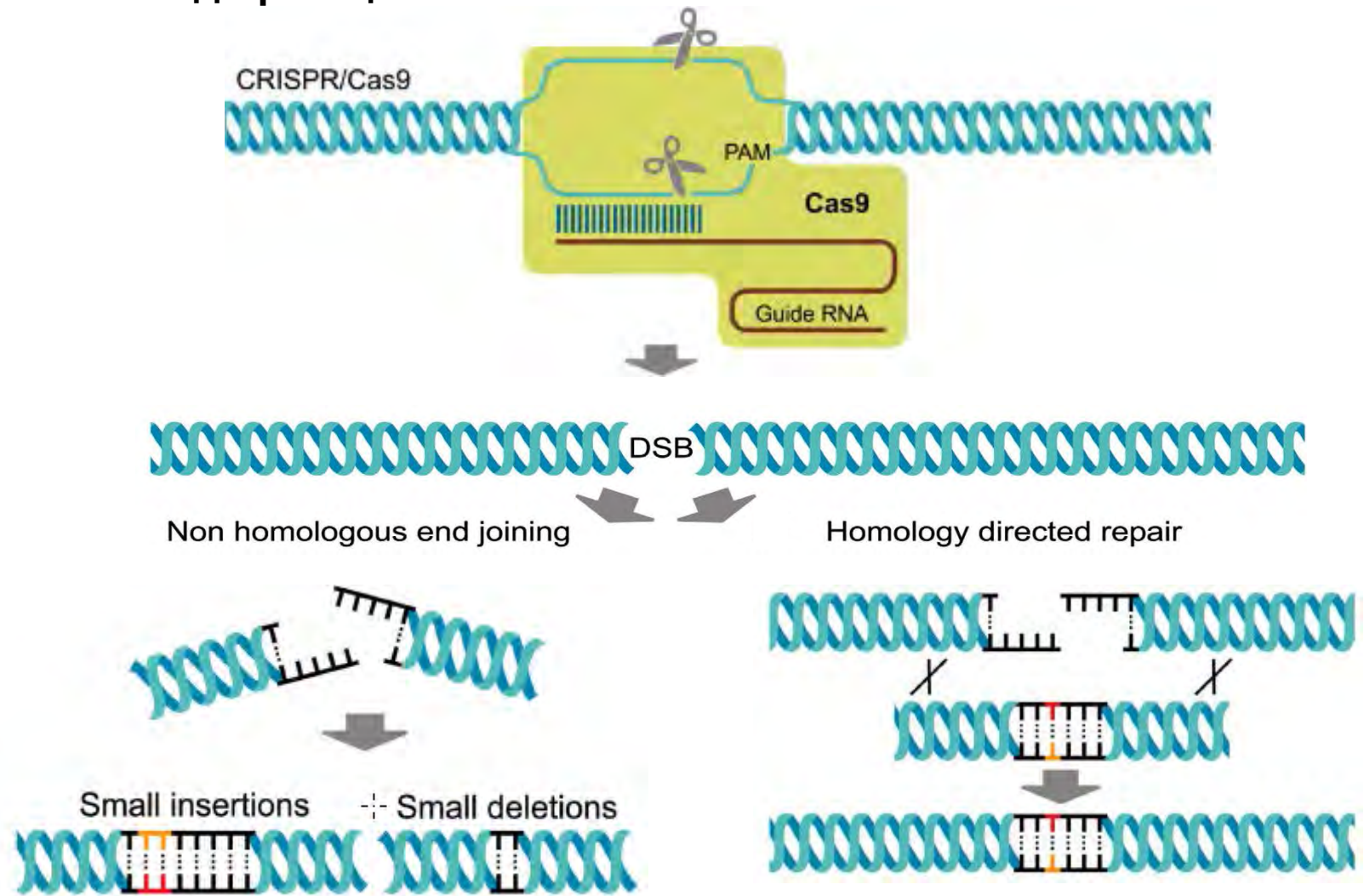
Основной молочный аллерген - белок молочной сыворотки **β -лактоглобулин (БЛГ)**.

Нокаут гена БЛГ с помощью технологий генного редактирования полностью решает проблему создания гипоаллергенных молочных продуктов.

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-компонентов [Zhou et al., 2017].

Рисунок 1. Схема работы редактора генома CRISPR/Cas9 для введения целевых модификаций в геном



[Wei et al., 2018]

Получение генно-модифицированных коз (ген BLG) с помощью микроинъекции **CRISPR/Cas9** компонентов (из мировой практики).

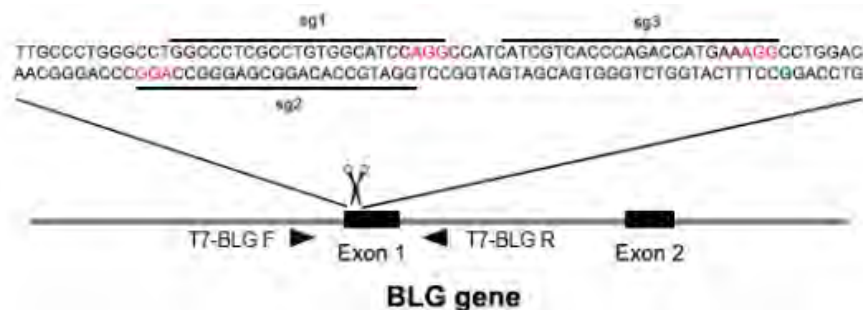
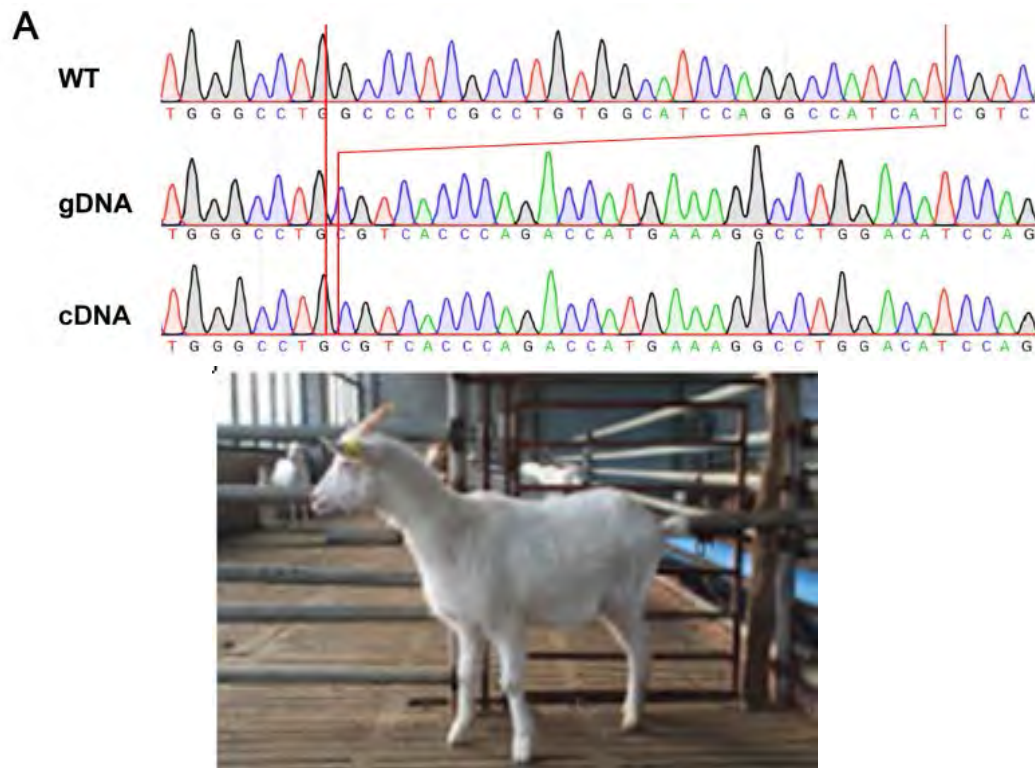


Схема конструкция
sgRNA для локуса BLG
козы.

sgRNA(ng/μL)	Cas9 mRNA (ng/μL)	Injected embryos/ Transferred embryos	Recipients/ Pregnancies	Newborns	Targeted (%)
sg1(10)	20	36/27	10/5	8	1 (12.5%)
sg2(10)		48/29	10/5	7	0 (0%)
sg2+sg3 (25+25)	100	59/15	15/3	4	1 (25.0%)
sg2+sg3* (50+50)	200	50/32	32/5	7	2 (28.6%)

Результаты секвенирования BLG-модифицированных козлят

Cas9: 20ng/μL sgRNA: 10ng/μL	#B1-2	GCCCTGGGCTGGCCCTCGCCTGTGGCATCCAGGCCATCATCGTCACCCAGACCATGAAAGGCCTGGA GCCCTGGGCTG-----CGTCACCCAGACCATGAAAGGCCTGGA	WT -29bp, 12/12
Cas9: 100ng/μL sgRNA: 25ng/μL	#B2-10	GCCCTGGGCTGGCCCTCGCCTGTGGCATCCAGGCCATCATCGTCACCCAGACCATGAAAGGCCTGGA GCCCTGGGCTGGCCCTCGCCTGTGGCATCCAGGCCA-----GCCTGGA	WT +2bp, -24bp, +11bp, 4/12
Cas9: 200ng/μL sgRNA: 50ng/μL	#B2-4	GCCCTGGGCTGGCCCTCGCCTGTGGCATCCAGGCCATCATCGTCACCCAGACCATGAAAGGCCTGGA -----TGTGGCATCCAGGCCATCATCGTCACCCAGACCATGAAAGGCCTGGA	WT -49bp, 4/13
		GC----- TTG	-138bp, +3bp, 2/13
	#B2-6	GCCCTGGGCTGGCCCTCGCCTGTGGCATCCAGGCCATCATCGTCACCCAGACCATGAAAGGCCTGGA GCCCTGGCCTG-----TGGCATCCAGGCCATCATCGTCACCCAGACCATGAAAGGCCTGGA	WT -11bp, 2PM, 5/15

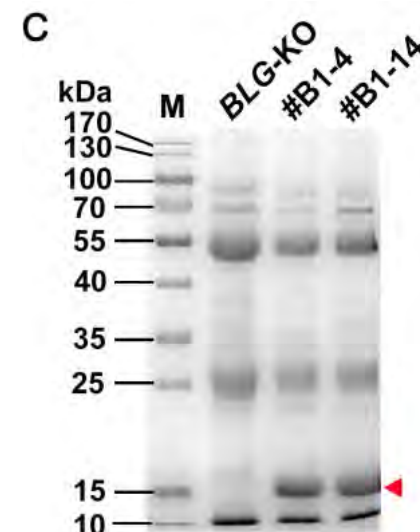
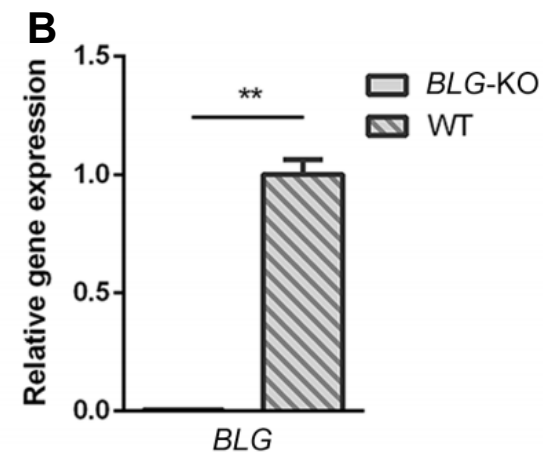


Анализ генотипа и экспрессии BLG в молоке и молочной железе.

А) сравнение целевой области gDNA в молочных железах коз BLG KO (#B1-2) и WT, а также кДНК BLG KO. Красные линии указывают на делецию 29 пн в локусе BLG.

В) анализ экспрессии BLG при индуцированной лактации.

С) анализ сывороточного белка из гормонально индуцированного козьего молока. Красный треугольник - WT BLG.



Цель работы:

Создание плазмиды, содержащей плечи гомологии к областям гена *BLG* КРС с тем, чтобы в нее можно было интегрировать ДНК-последовательность целевого белка.

С учетом полиморфизма гена *bBLG*, для осуществления его модификаций (нокаут гена локальными инсерциями или делециями, крупной делецией) подобрать последовательности направляющих РНК (нРНК) и разработать систему ПЦР-анализа возможных вариантов внесенных изменений для конкретного аллельного варианта *bBLG*.

Для достижения цели требовалось:

- подобрать последовательности направляющих РНК (нРНК) к гену BLG

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

- разработать систему ПЦР-анализа возможных вариантов внесенных изменений для конкретного аллельного варианта BLG для осуществления его модификаций (нокаут гена локальными инделями или крупной делецией)

*Подбор протоспейсерных последовательностей для создания направляющих 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/> с учетом секвенированной последовательности (**А-аллеля гена BLG**).*

Рисунок 4. Фрагменты 5'- (вверху) и 3'-последовательностей (внизу) двухцепочечной ДНК BLG (скриншот окна программы Vector NTI).

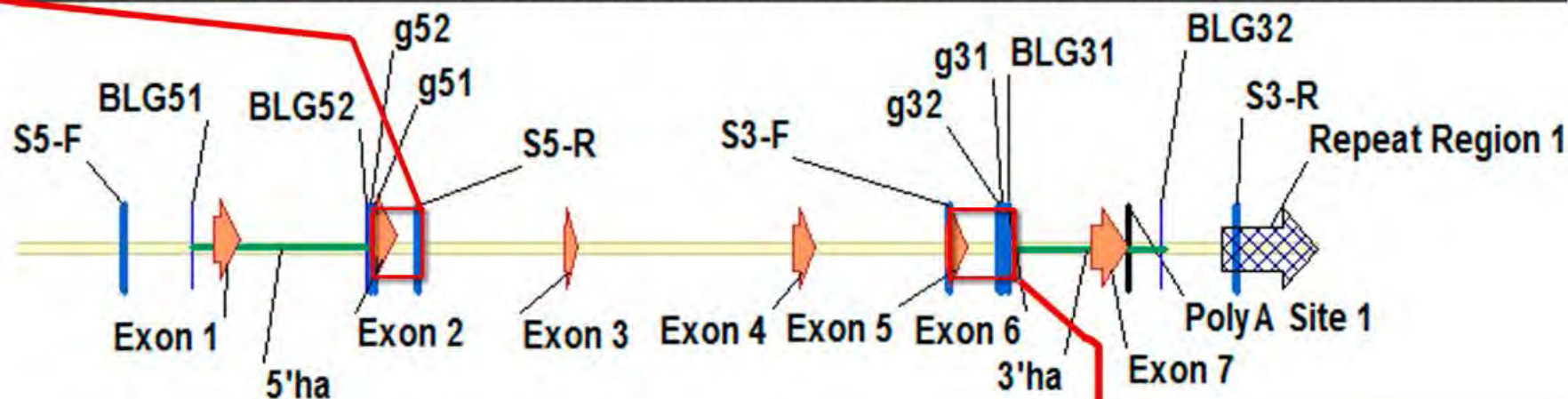
РАМ для g52

РАМ для g51

```

GTGGGACAGA GAGCCCACTG TGGGGCTGGG GGCCCCCTTC CGCCCCCTGGA GTGCAGCTCA AGGTCCCTCC CCAGGTGGCG GGGAACTTGGT ACTCCTTTGCC
CAGGCTGCTCT CTGGGGTGAC ACCCCGACCC CCGGGGAAGG GCGGGGACCT CACGTCGAGT TCCAGGGAGG GGTCCACCCG CCTGAACCA TGAGGAACCG
CATGGCGGCC AGCGACATCT CCCTGCTGGA CGCCAGAGT GCCCCCTGA GAGTGTATGT GGAGGAGCTG AAGCCACCC CTGAGGGCGA CCTGGAGATC
GTACCGCCGG TCGCTGTAGA GGGACGACCT GCGGGTCTCA CCGGGGGACT CTCACATACA CCTCCTCGAC TTCGGGTGGG GACTCCCGCT GGACCTCTAG
CTGCTGCAGA AATGGTGGGC GTCCCCCCCC AAAAAGCAT GGAACCCCCA CTCCCAGGG ATATGGACCC CCGGGGTGG GGTGCAGGAG GGACCAGGGC
GACGACGTCT TTACCACCCG CAGGGGGGGT TTTTTCGTA CCTTGGGGGT GAGGGGTCCC TATACCTGGG GGGCCCCACC CCACGTCCTC CCTGGTCCCG

```



```

CCGGCCCAGG ACCACCTCCT CCCATGGTGA CCCCCAGCTC CCCAGGCCTC CCGGGAGGAT GGAGACGGGG TGCAGGGCCC CGAGGTGGCC CCCTCCCCAC
GGCCGGGTCC TGGTGGAGGA GGGTACCACT GGGGGTCGAG GGGTCCGGAG GGCCCTCCTA CCTCTGCCCC ACGTCCCGGG GCTCCACCGG GGGAGGGGTG
CCCTCCCCA GCTCCCTCTG TCCTGGGGTG TCCAGTCCCA TCCTGACGCT CCCCCGCCAC GGCTCTCCCT CCCCCACAGA GCAGTGCCAC ATCTAGGTGA
GGGAGGGGT CGAGGGAGAC AGGACCCAC AGGTCAGGAT AGGACTGCCA GGGGGCGGTG CCGAGAGGGA GGGGGTGTCT CGTCACGGTG TAGATCCACT

```

РАМ для g32

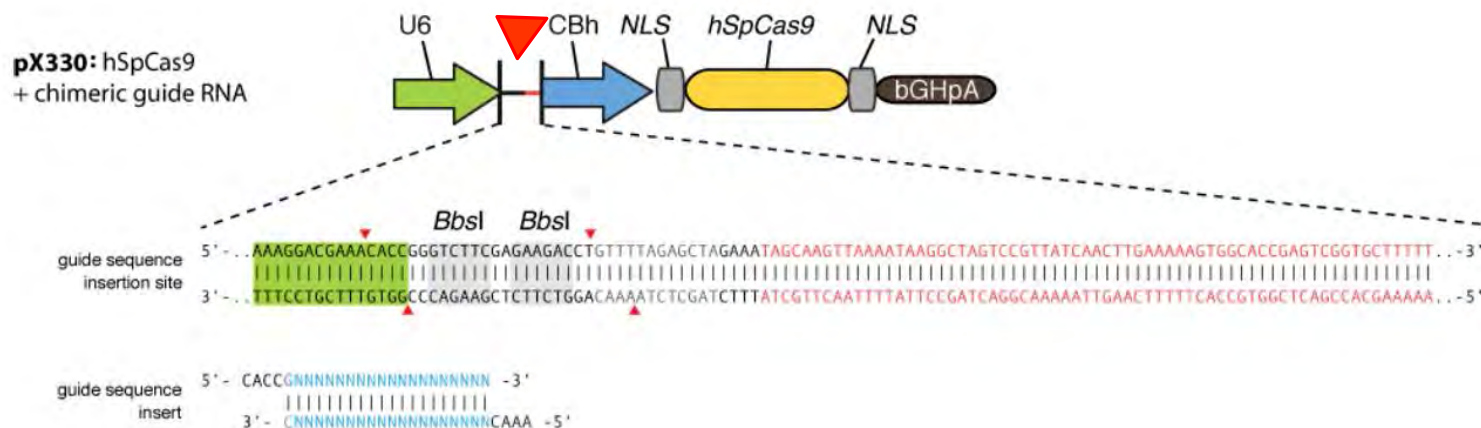
РАМ для g31

Потенциальная теоретическая делеция для пары gRNA51– gRNA52 составляет 6 п.н., для пары gRNA31 – gRNA32 - 19 п.н.

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

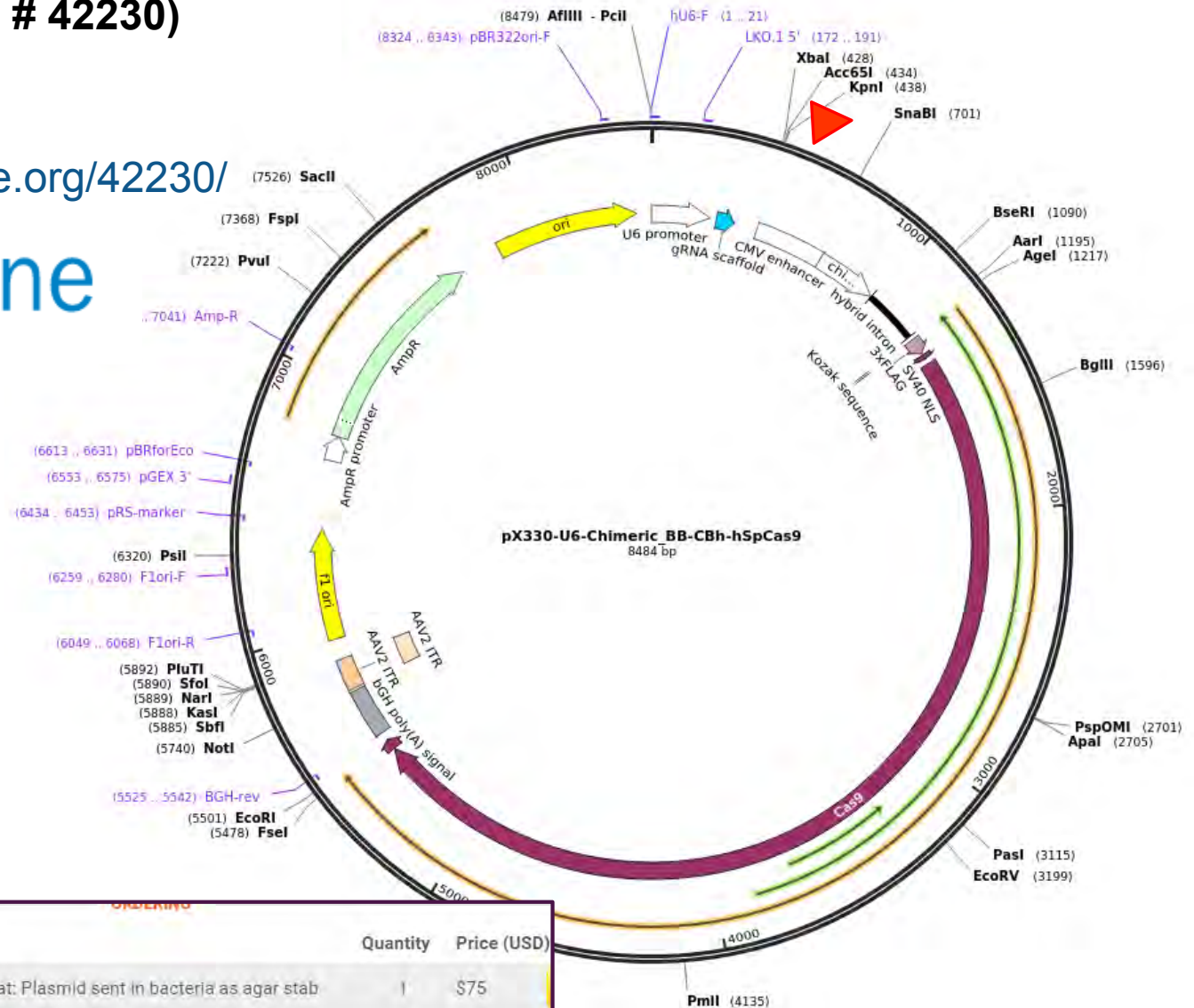
Обозначение	5'-3' последовательность	Назначение
bg51f	cacc ggagatgtcgctggccgcca	pX330-51b
bg51r	aaac ggcggccagcgacatctcc	
bg52f	cacc gacttggtactccttgcca	pX330-52b
bg52r	aaac tgccaaggagtagccaagtc	
bg31f	cacc gacacctgacgctccccgcca	pX330-31b
bg31r	aaac ggcgggggagcgtcaggatc	
bg32f	cacc ggggagcgtcaggatgggac	pX330-32b
bg32r	aaac gtcccatcctgacgctcccc	

[* по протоколу Мензоров и др., 2016]





Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. Science. 2013 Jan 3. 10.1126/science.1231143
[PubMed 23287718](#)



Item	Catalog #	Description	Quantity	Price (USD)
Plasmid	42230	Standard format: Plasmid sent in bacteria as agar stab	1	\$75
Cloning Grade DNA	42230-DNA.cg	2 µg of cloning grade DNA in Tris buffer More Information ↓	1	\$95

This material is available to academics and nonprofits only.

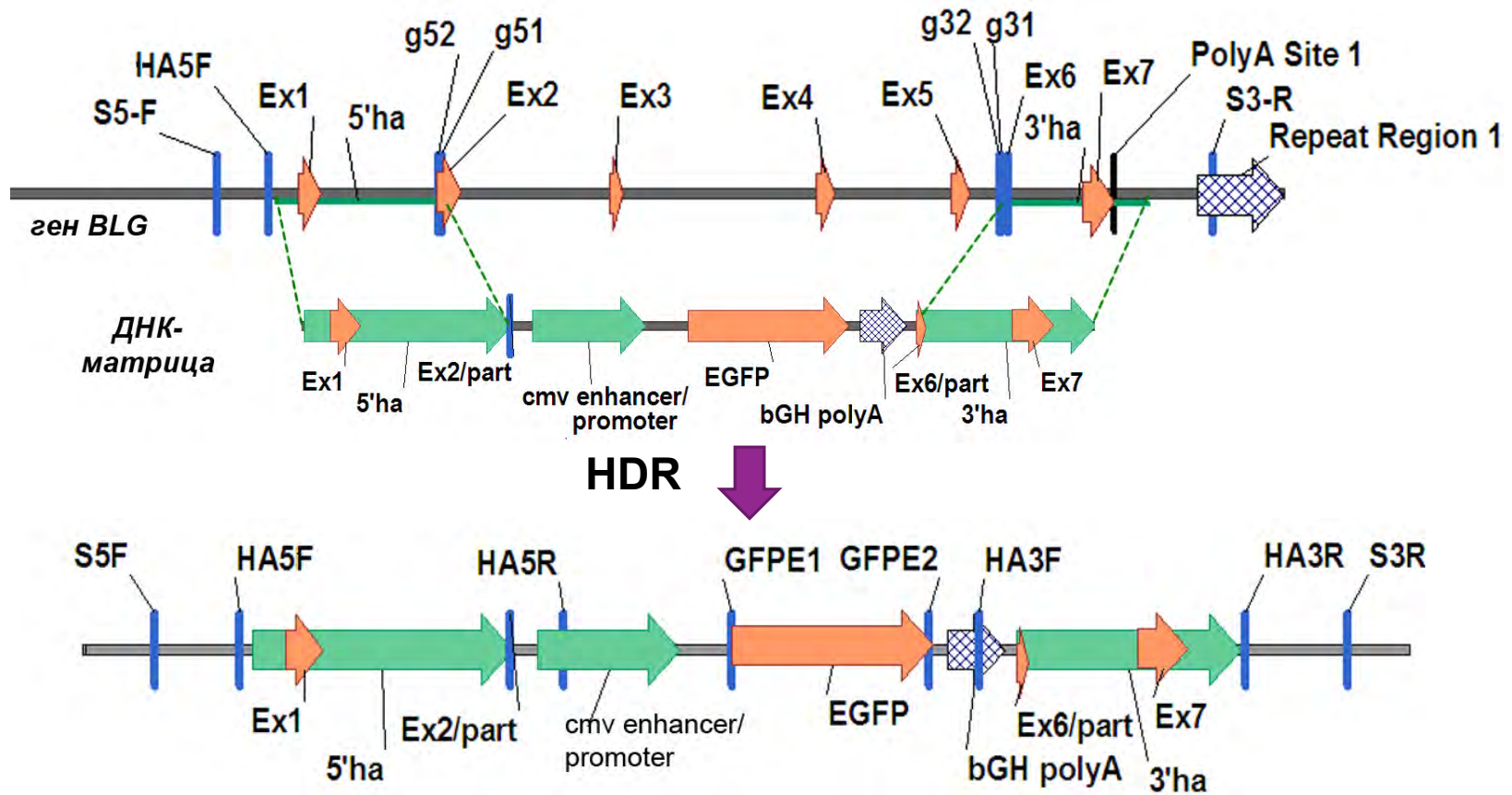
Таблица 5. Состав смесей для образования двухцепочечных вставок с липкими концами

№	Компонент, (конц.).	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

**Таблица 6. Состав лигазных смесей для
получения плазмид на основе рХ330**

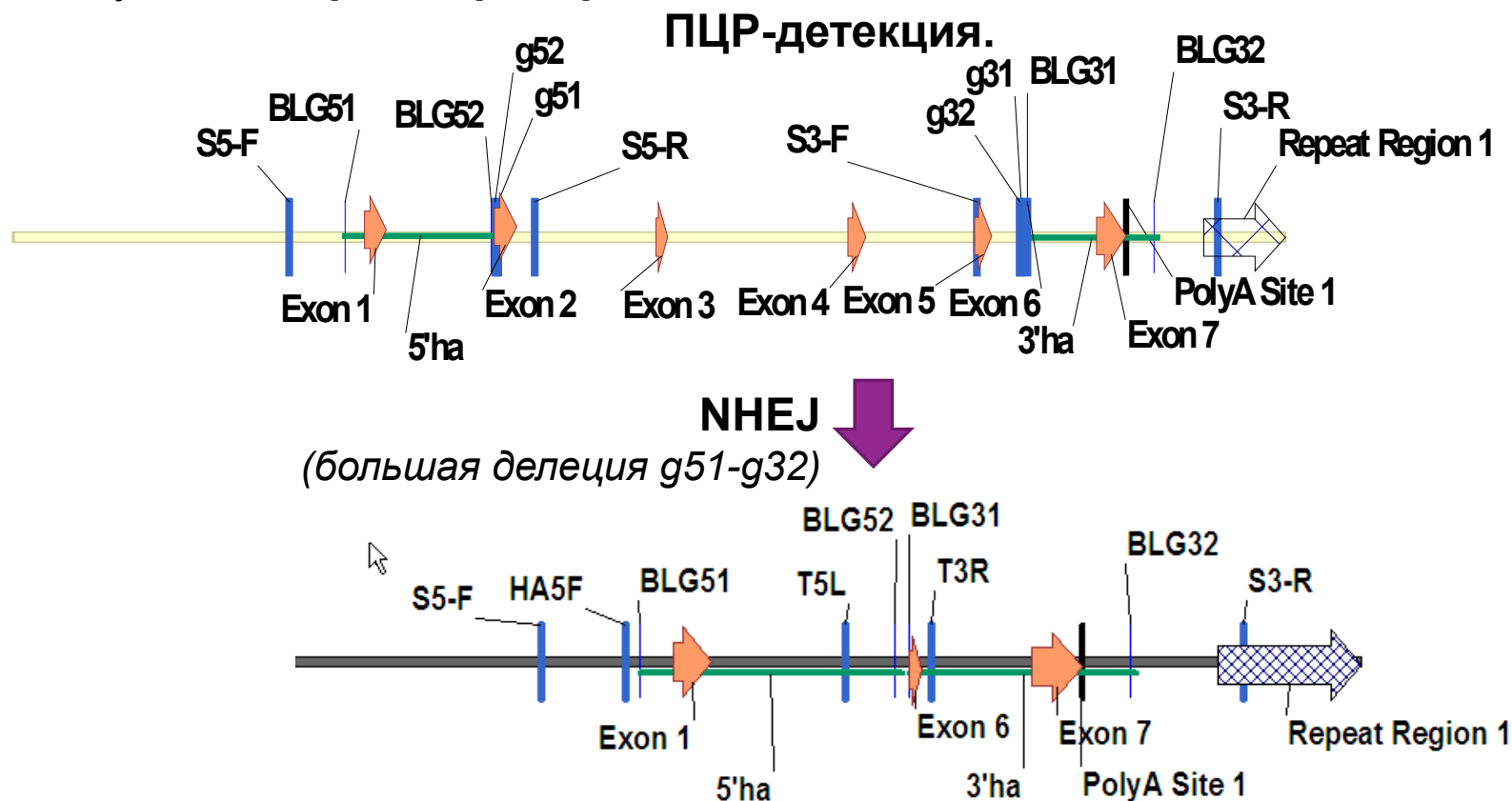
№	Компонент, (конц.).	Смесь для образования плазмид, мкл			
		рХ330- b51	рХ330- b52	рХ330- b31	рХ330- b32
1	Вода	9	9	9	9
2	5x T4 DNA ligase buffer	4	4	4	4
3	БСА* (10 мг/мл)	1,5	1,5	1,5	1,5
4	рХ330 (150 нг/мкл)	2	2	2	2
5	BbsI (10 ед/мкл)	1	1	1	1
6	T4 DNA ligase	1	1	1	1
7	bg51	1,5	-	-	-
8	bg52	-	1,5	-	-
9	bg31	-	-	1,5	-
10	bg32	-	-	-	1,5
11	Масло минеральное	20	20	20	20
	Итого:	40	40	40	40

Рис. 4. Схема гомологичной рекомбинации генной конструкции BLGcmvEGFP с геном BLG. ПЦР-детекция.



Пара праймеров	Размер ПЦР-амплификата, п.н.		Примечания, детекция
	WT	ГМЖ (модификация)	
HA5F /HA5R	-	1179 (5'HA для HDR)	Крупные делеции АГ
HA3F/ HA3R	-	972 (3'HA для HDR)	

Рисунок 6. Вариант репарации негомولوجичным соединением концов.



Пара праймеров	Размер ПЦР-амплификата, п.н.		Примечания, детекция
	WT	ГМЖ (модификация)	
T5L / T5R	490	<490 ($\Delta G51/\Delta G52$)	Мелкие делеции, ПААГ
T3L / T3R	397	<397 ($\Delta G31/\Delta G33$)	
T5L / T3R	3598	≈ 320 для $\Delta G51(G52)/G31(G32)$	
HA5F/ HA3R	3621	≈ 350 для $\Delta G51(G52)/G31(G32)$	

Результаты

1. Разработана стратегия модификации гена *BLG* КРС для его нокаута и сайт-специфической интеграции гена маркерного белка с использованием технологии CRISPR/Cas9 .
2. Разработана стратегия анализа возможных генетических модификаций, возникших в результате работы компонентов системы CRISPR/Cas9 и ГИК, микроинъецированных в зиготы (NHEJ, HDR).

Получены генетические конструкции:

- **β LGcmvEGFP** для направленной интеграции рекомбинантного гена EGFP под контролем CMV промотора в геном КРС под контроль промотора гена бета-лактоглобулина (β LG).
- компоненты системы CRISPR/Cas9 **в плазмидной форме** на основе pX330, кодирующей Cas9 и гРНК для гена β LG КРС (по две плазмиды к его 5'- и 3'- областям. На основе этих плазмид могут быть созданы компоненты CRISPR/Cas9 в РНК форме.

Цитированная литература

1. *Fiocchi A., Brozek J., Schunemann H. et al. World Allergy Organization (WAO) diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA) guidelines // Pediatr. Allergy Immunol. – 2010 Suppl. 21 – P. 57–161.*
2. *Restani P., Ballabio C., Di Lorenzo C. et al. Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events // Anal. Bioanal. Chem. – 2009 Vol. 395 – P. 47–56.*
3. *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*
4. *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.18. No.8 (1):15430. doi: 10.1038/s41598-018-32024-x.*
5. *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*
6. *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*
7. *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]*
8. *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*
9. *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*



Спасибо
за внимание!