

Создание ДНК-матрицы для интеграции трансгена в локус гена бета- лактоглобулина крупного рогатого скота при использовании CRISPR/Cas9 технологии.

Часть 1

Колоскова Е.М., Езерский В.А.

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

Коровье молоко - распространенный пищевой аллерген.

Аллергия к молоку выявляется:

17,5 % детей младшего возраста,

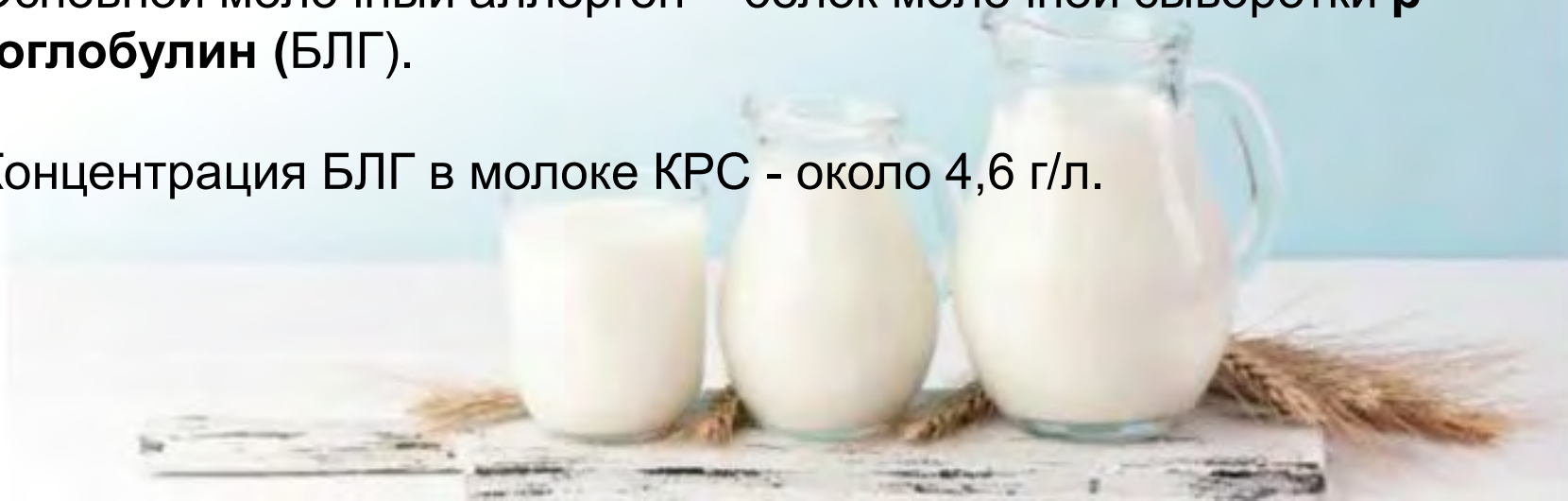
13,5 % – детей в возрасте от 5 до 16 лет,

4 % – взрослого населения [*Fiocchi et al.*, 2010].

Сенсибилизация к белкам молока является началом формирования ряда патологических процессов, таких как бронхиальная астма, крапивница, атопический дерматит, дисфункции желудочно-кишечного тракта. Пищевая аллергия в ряде случаев предшествует развитию выраженной пыльцевой аллергии [Restani et al., 2009].

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

Концентрация БЛГ в молоке КРС - около 4,6 г/л.



Регуляторные районы гена *BLG* овец, коз и КРС давно применяют в составе генных конструкций (ГК) при получении трансгенных животных классическим трансгенезом [Трубицина и др., 2018].

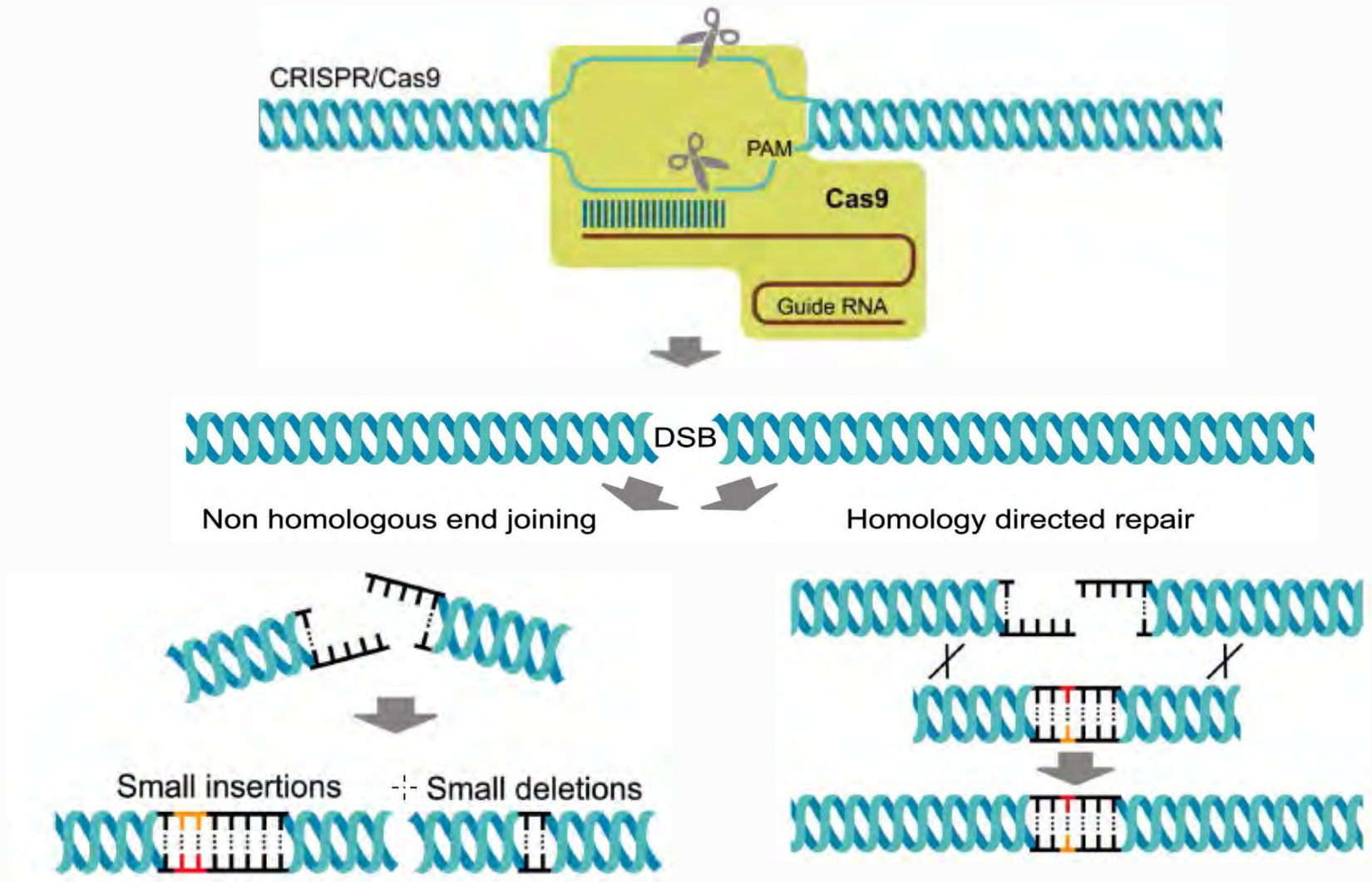
*Например, экспрессия альфа-1-антитрипсина человека в молоке трансгенных овец достигала 5 мг/мл при использовании в составе генной конструкции промотора гена *BLG* овцы [Wright et al., 1991].*

Ген *bBLG* - перспективная мишень как для **нокаута** (Knock-out) гена с целью получения гипоаллергенного молока, так и для **замены** геном гетерологичного белка (Knock-in) при использовании новых технологий редактирования генома.

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

Технология CRISPR/Cas9 с использованием механизма прямой гомологичной рекомбинации (HDR) – эффективный метод изменения и коррекции состава молока замещением или нокаутом генов эндогенных молочных белков у сельскохозяйственных животных.

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



[Wei et al., 2018]

Точное встраивание трансгена в составе генной конструкции, содержащей плечи гомологии к гену *bBLG*, обеспечит его экспрессию под управлением полноразмерных эндогенных регуляторных последовательностей.

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*.

Материал и методика исследований. Последовательность гена BLG крупного рогатого скота (*Bos taurus*) была взята из базы данных GenBank, запись X14710.

Геномная ДНК была выделена из спермы быка черно-пестрой породы по кличке Мороз (племенное хозяйство «Быково»).

Для промежуточного клонирования ПЦР-продуктов использовали *pTZ57R/T* и *T4 DNA* лигазу набора *InsTAclone PCR Cloning Kit* (*Thermo Scientific*). Все праймеры, олигонуклеотиды, сиквенс плазмидных ДНК заказывали в ЗАО «Синтол» [<http://www.syntol.ru>](http://www.syntol.ru).

Процедуру ПЦР проводили на амплификаторе ДНК «Терцик». Трансформацию компетентных клеток *E.coli Dh5 α* , *TG1* проводили по методике и с реагентами набора *Transform-Aid Bacterial Transformation Kit* с нашими модификациями. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* с нашими модификациями и классическим методом щелочного лизиса. Качество и количество ДНК оценивали визуально в УФ свете после электрофореза в агарозном геле. ДНК из агарозного геля выделяли с помощью набора *Gene JET Gel Extraction Kit*. Подбор праймеров, конструирование рекомбинантной ДНК, рестриктный анализ проводили в программе Vector NTI.

<https://oaohcr.ru/>

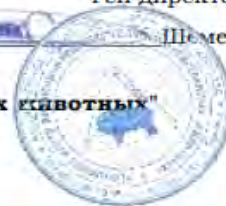
"Утверждаю"

Ген директор АО "ГЦВ"

Шметюк С. А.

ЦЕНА НА СПЕРМУ

быков - производителей АО "Головной центр по воспроизводству с/х животных" на 24.08.2020 года.



Кличка быка	Р	- Бык генетически комольный
Кличка быка	П	- Сперма только в пайеттах
Кличка быка	Гр	- Сперма только в гранулах

Кличка и № быка	Происхождение	Линия	K-Cas	Бетта-казеин	Продуктивность матери				Продуктивность дочерей				Дочери +/-сверстницы				
					№ лакт.	Удой, кг.	% жира	% белка	Кол-во доч.	Удой, кг.	% жира	м.жир, кг	% белка	Удой, кг.	% жира	м.жир, кг	% белка
ПОРОДА ЧЕРНО-ПЕСТРАЯ																	
Алмаз 39 Гр	RUS	М.Чифтэйн	AB	A1A2	7	11175	4,27	3,31	30	5514	3,98	219,5		-79	+0,10	+2,45	
Альянс 7418 Гр	RUS	М.Чифтэйн	AB		2	10122	4,45	3,69	29	6859	4,51	309,3	3,31	-82	+0,21	+10,88	+0,00
Бостон 37 Гр	RUS	В.Б.Айдиал	AA	A2A2	1	9011	4,19	3,41									
Варенец 993 Гр	RUS	М.Чифтэйн	AA	A1A2	1	9648	4,54	3,01	38	7680	3,79	291,1	3,05	+694	+0,04	+29,1	-0,00
Ветерок 9546 Гр	RUS	Посейдон	AA	A1A1	6	10090	3,98		35	5154	4,33	223,2		-137	-0,25	-19,16	
Герм 1026	RUS	В.Б.Айдиал	AA	A1A2	3	9114	4,12	2,92	46	6081	3,75	228,0	3,31	+124	-0,06	+1,0	+0,00
Голак 430	RUS	В.Б.Айдиал	AB	A1A2	3	9740	3,92	3,04	83	5576	3,90	217,5	3,29	-149	+0,11	+0,5	+0,00
Диггер 191 Гр	RUS	С.Т.Рокит	AB	A1A2	3	11568	4,33	3,32									
Доллар 693	RUS	С.Т.Рокит	AB	A1A2	2	9235	4,92	3,21	16	7154	3,72	265,8	3,18	+300	+0,01	+11,8	
Мавр 166 Гр	RUS	А. Адема	AA		2	9012	3,89	3,38	50	4594	3,89	178,7		+63	+0,06	+4,70	
Магриб 2873 Гр	RUS	А. Адема	AA	A1A2	3	11049	4,24	3,36									200,00
Монблан 2801 Гр	RUS	А. Адема	AA	A1A2	2	11854	3,93	3,24									200,00
Мобил 2812 Гр	RUS	А. Адема	AA	A1A2	2	9568	3,95	3,35									200,00
Мороз 637 Гр	RUS	Р. Совер.	AA	A1A1	5	10954	4,20	3,05	253	6292	4,19	263,6	3,17	+139	+0,00	+5,8	-0,01 A2 235,00
Причал 541 Гр	RUS	М.Чифтэйн	AB		4	11859	3,74	3,00	17	7379	3,83	282,6	3,05	+327	+0,10	+19,39	-0,04 A2B2 235,00
Туман 3122 Гр	RUS	В.Б.Айдиал	AB		3	9425	4,20	3,62	21	6569	4,17	273,9	3,29	+92	-0,02	+2,55	- 170,00
Шико 6933 Гр	RUS	В.Б.Айдиал	AB	A1A2	2	10108	4,45	3,63	637	5976	3,92	234,1	3,04	-90	+0,01	-2,90	



АО «Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных»

КАТАЛОГ быков-производителей



Быково 2020 год

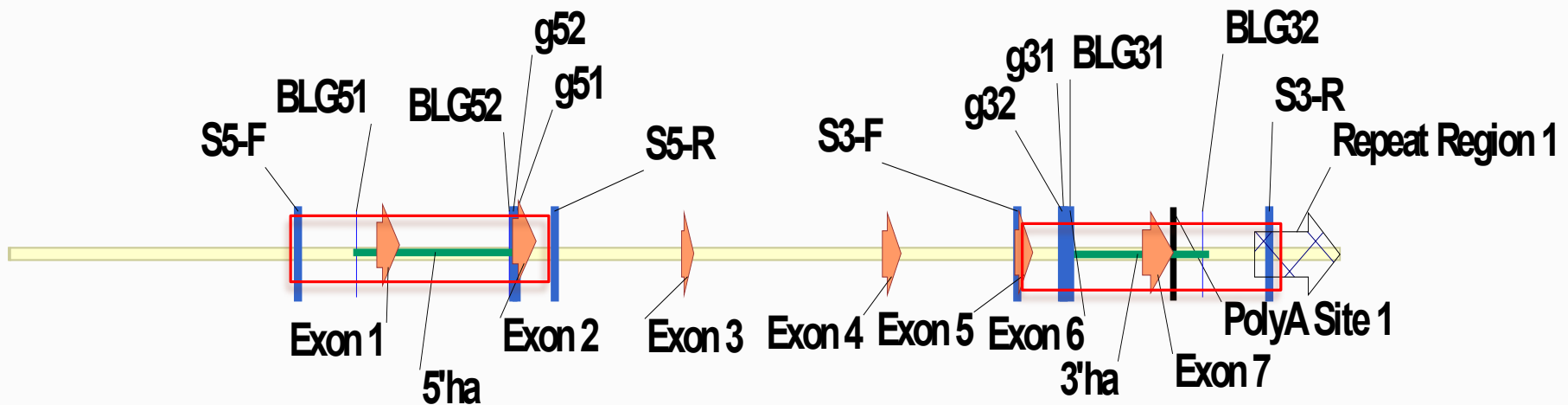
Быки АО «ГЦВ»,
оцененные по качеству потомства

МОРОЗ 637		ПРОИСХОЖДЕНИЕ				ОЦЕНКА ПО ПОТОМСТВУ		
Порода	Черно-пестрая	М	РОЗА 409	О	МЭЙСОН CAN 5091	Показатели	Дочери	Доч.+/-свер.
Линия	Рефлекшн Соверинг 198998		5 305 10954 4,20 3,05			Голов	253	
Родился	02.05.02 Россия	ММ	1617	МО	Р.РОЙЯЛТИ КОРА USA 13156423	Удой, кг	6292	+139
Категория	A2		1 312 5852 3,90		4 305 22730 4,00 3,50	Жир, %	4,19	0,00
K-Cas, B-Cas	AA, A1A1	ОМ	РОДЖЕР 18	ОО	Ш. МЭЙСОН CAN 5279989	Жир, кг	263,6	+5,8
Отелы	на телок		Линия Рефлекшн Соверинг		ветвь: Валиант 1650414	Белок, %	3,17	-0,01



Полиморфизм гена *bBLG* может стать причиной низкой эффективности работы компонентов CRISPR/ Cas9: на мясокомбинатах яичники КРС отбирают от коров разных пород. В экспериментах *in vitro* оплодотворение яйцеклеток, как правило, производится спермой одного быка.

Рисунок 2. Схема гена BLG КРС: подбор плечей гомологии для создания ДНК-матрицы гомологичной рекомбинации.

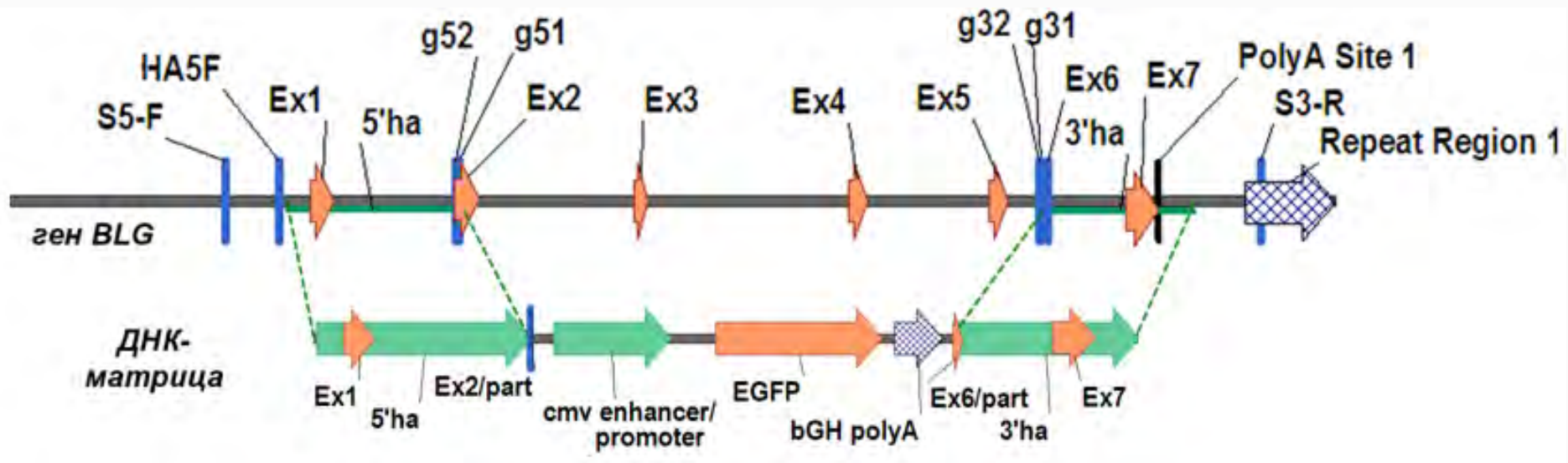


Указаны сайты связывания используемых праймеров, локализация протоспейсерных последовательностей.
Красными рамками выделены последовательности для секвенирования.

Генетическая конструкция

Цель: Создать генетическую конструкцию, содержащую ген GFP под CMV промотором для интеграции гомологичной рекомбинацией в локус **гена BLG KPC** при совместной микроинъекции с сайт-специфичными компонентами системы CRISPR/Cas9.

Рисунок 3. **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.

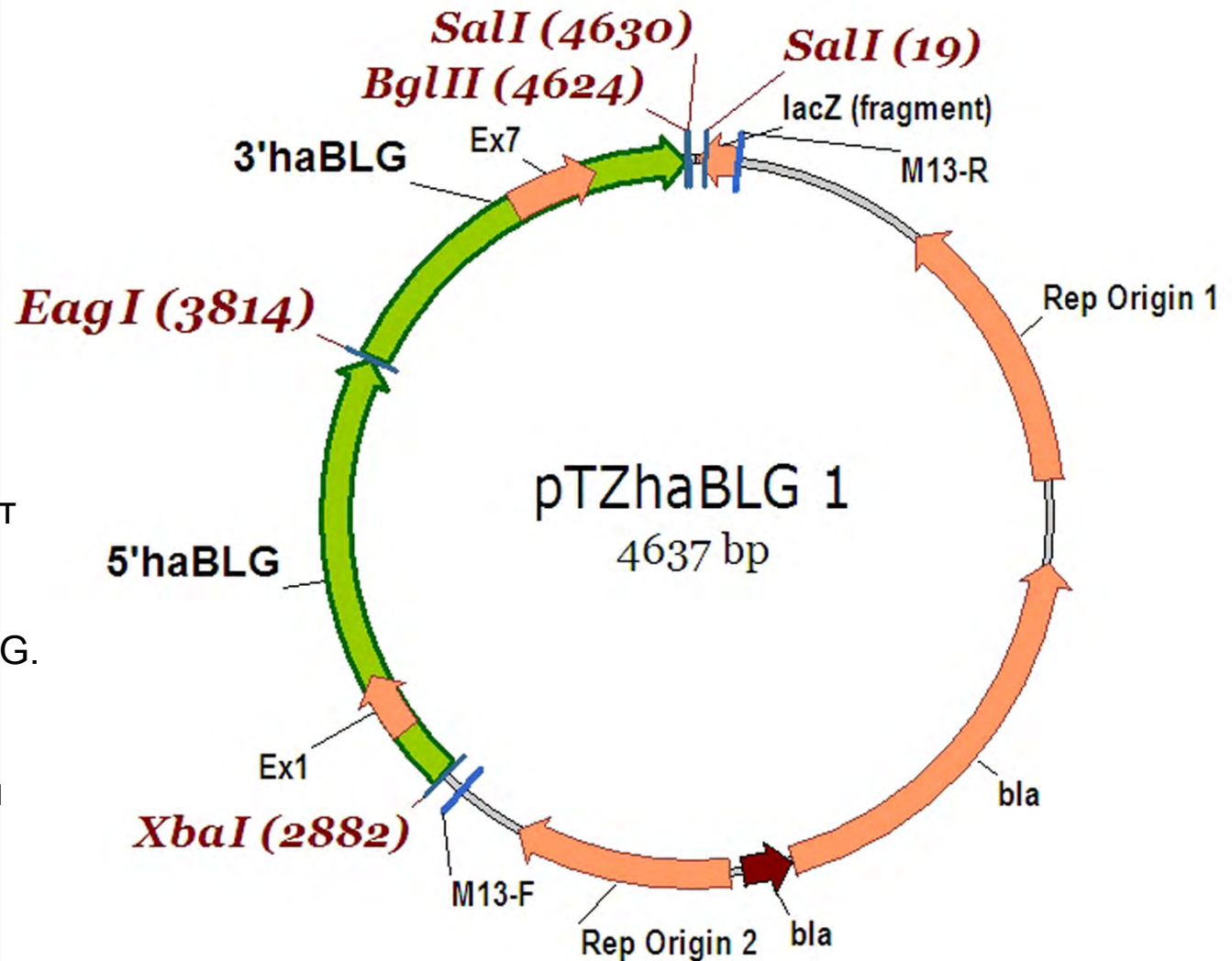
Классический способ генотипирования гена BLG KPC – поиск полиморфизма в 4-м экзоне [Medrano and Aguilar-Cordova, 1990], в области 1-го экзона и интрона [Гладырь, 2001].

Полиморфизм гена BLG геномной ДНК быка «Мороз» определяли с использованием одной из пар наших праймеров и рестриктазы RvuII (таблица 1). ПЦР-амплификат размером 1195 п.н. после обработки RvuII на электрофореze в агарозном геле показывал два фрагмента, соответствующие 743, 452 п.н.

Таблица 1 . **Определение полиморфизма гена BLG быка «Мороз»)**

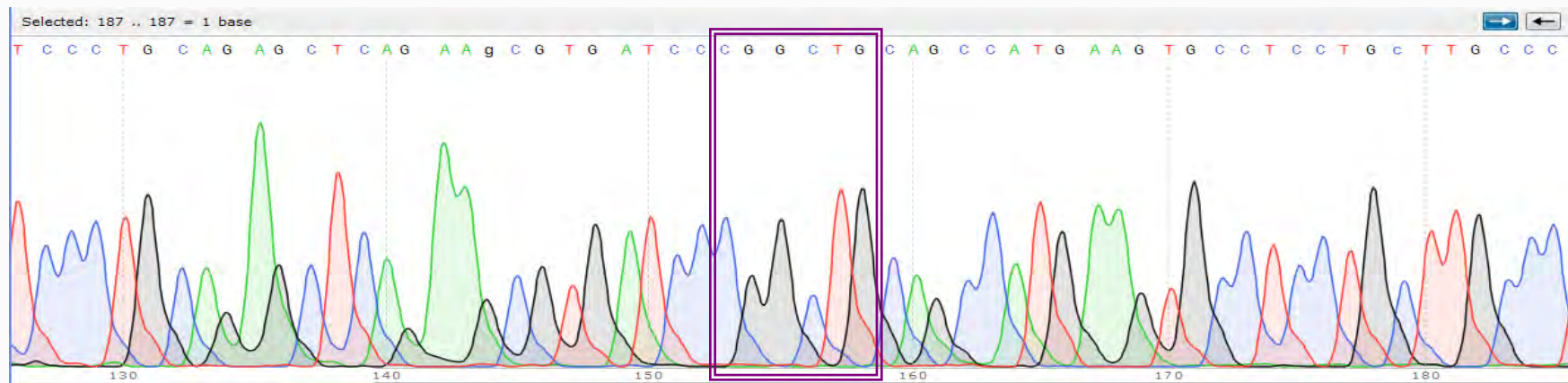
Фрагменты	Размеры фрагментов, п.н.	
	Праймер1/Праймер2 [из: Гладырь, 2001]	BLG51/S5-R (использовали)
ПЦР-амплификат	1248	1195
RvuII рестрикты для A -аллеля	774, 474	743, 452
RvuII рестрикты для B -аллеля	774, 297, 177	155, 297, 743

Рисунок 4. Схема плазмиды pTZhaBLG, созданной на основе pTZ57R/T.



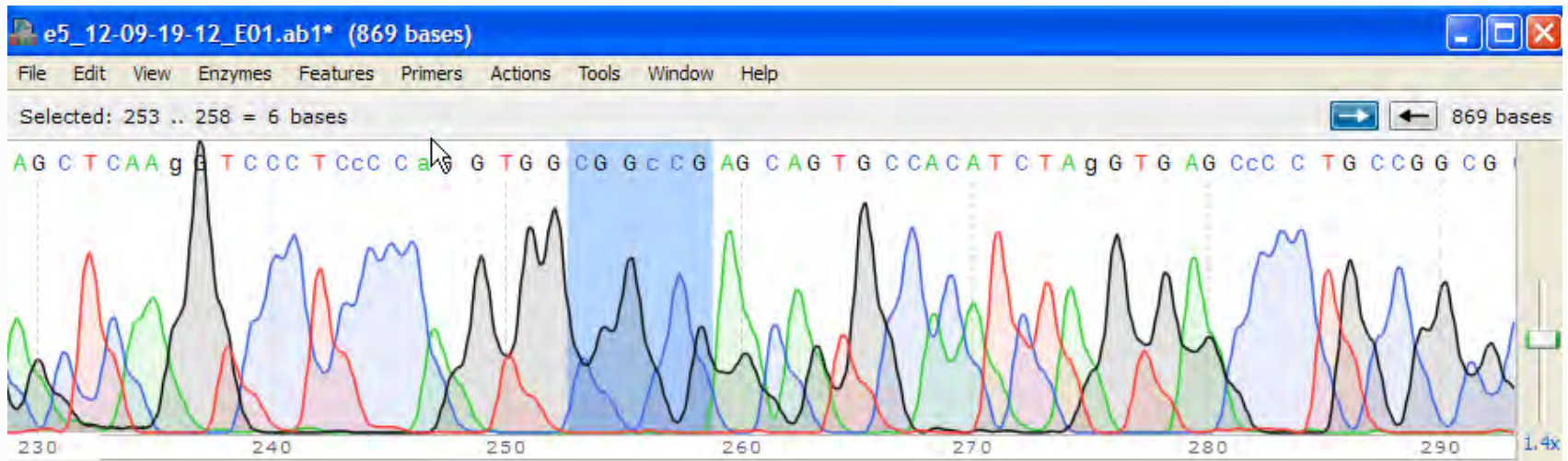
Плазмида содержит плечи гомологии к гену BLG KPC: 5'haBLG и 3'haBLG. Указаны основные элементы конструкции, сайты рестрикции.

Рисунок 5. Фрагмент секвенированной последовательности pTZhaBLG, содержащий участок полиморфизма в области 1-го экзона гена BLG (выделен рамкой).



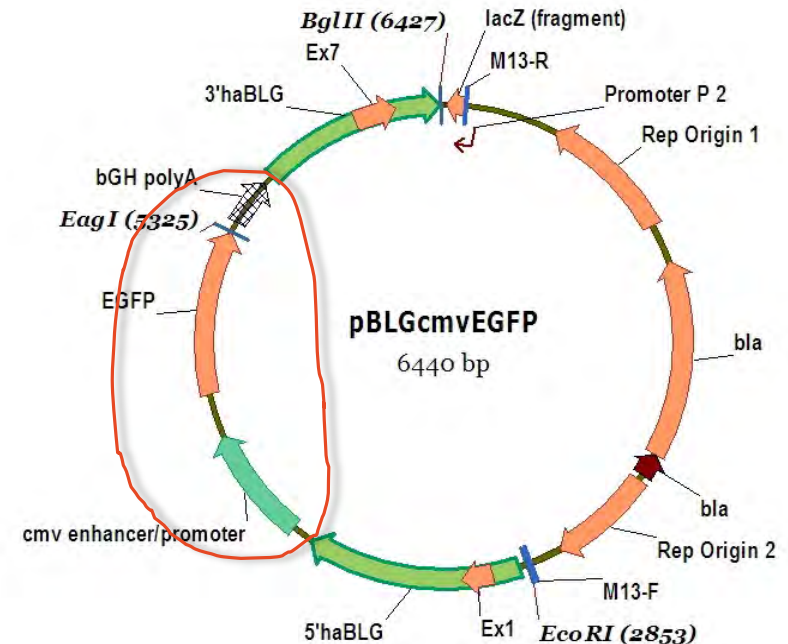
Сиквенс и рестриктивный анализ клонированных последовательностей гена *BLG* быка «Мороз» черно-пестрой породы показал А-аллель, тогда как опубликованные в базе данных GenBank записи X14710 и Z48305 (*B.taurus* gene for beta-lactoglobulin variant B) соответствуют В-аллелю.

Рисунок 6. Фрагмент секвенированной последовательности рTZhaBLG, содержащий участок соединения 5'- и 3'- плечей гомологии к гену BLG.



Плазмида **pTZhaBLG** содержит уникальный сайт для *EagI*, который можно использовать для клонирования ДНК целевого белка

Рисунок 7. Схема плазмиды pBLGcmvEGFP, созданной на основе рTZhaBLG.



Заключение

Рекомбинантная плазмида ***pTZhaBLG***, содержащая плечи гомологии к гену BLG крупного рогатого скота, может быть использована для клонирования по EagI сайту ДНК целевого биологически активного белка с перспективой получения трансгенного крупного рогатого скота, продуцирующего рекомбинантные белки с молоком вместо β -лактоглобулина - при использовании CRISPR/Cas9 технологии.



Цитированная литература

Гладырь Е.А. ДНК-диагностика вариантов генов каппа-казеина и бета-лактоглобулина у крупного рогатого скота: Автореф. дис. канд. биол. наук. Дубровицы, ВИЖ. - 2001. - 20 с.

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. № 3:15-34

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.

Medrano, J.F., and Aguilar-Cordova. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis // Anim. Biotechnol.- 1990.- 1:73.

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.

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

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.



Спасибо
за внимание!