

**Всероссийский Научно-Исследовательский Институт
Физиологии, Биохимии и Питания животных – филиал
Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Федеральный научный центр
животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста**

ГЕНО-ИНЖЕНЕРНАЯ КОНСТРУКЦИЯ ДЛЯ

САЙТСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИНТЕГРАЦИИ КДНК ЛАКТОФЕРРИНА

ЧЕЛОВЕКА В ГЕН КИСЛОГО СЫВОРОТОЧНОГО БЕЛКА МЫШИ С

ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ *CRISPR/CAS9*.

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

Государственное задание 0600-2018-0017: исследование молекулярно-биологических аспектов биоинженерных технологий для совершенствования генетических ресурсов и создания новых сельскохозяйственных животных и птицы

ПОЧЕМУ : МЫШИ, ГЕН WAP И КДНК

WAP (whey acidic protein) является основным белком сыворотки молока мыши и других грызунов (до 15 г/л молока).

кДНК чЛФ был выбран как модельный экзогенный белок для данной работы .

Мыши линий C57BL/6J, CBA/J и их гибриды.

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

анализ гена mWAP

Проверка используемых
линий мышей на
возможный полиморфизм
гена mWAP

Проведение рестриктоного
анализа компонентов ГИК
и потенциальных плазмид
на роль вектора-носителя

Поиск Таргетных
последовательностей для
gRNA в выбранных
участках гена mWAP

ПЛАН СОЗДАНИЯ ГИК

Клонирование
5' mWAP -
получение
промежуточной
плазмиды
pTZ 5' WAP

Клонирование
кДНК ЧЛФ,
получение
плазмиды-вектора
pJET1.2hLf

Клонирование
3' mWAP -
получение
промежуточной
плазмиды
pTZ 3' WAP

получение
плазмиды
pWAPhLf

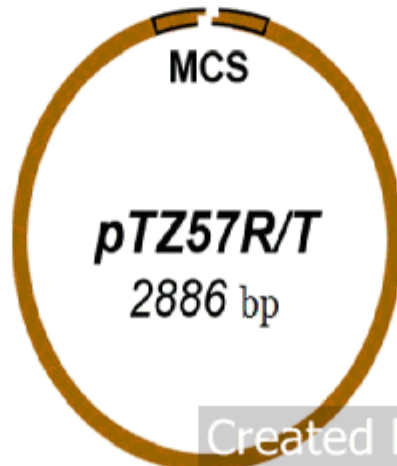
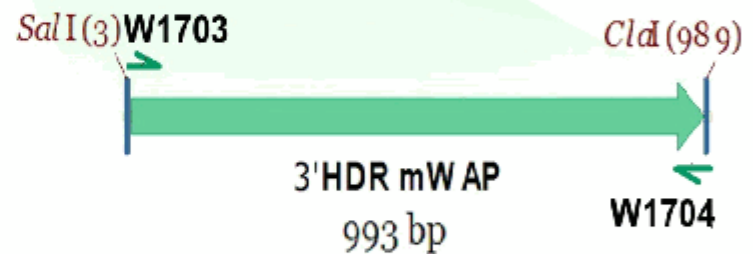
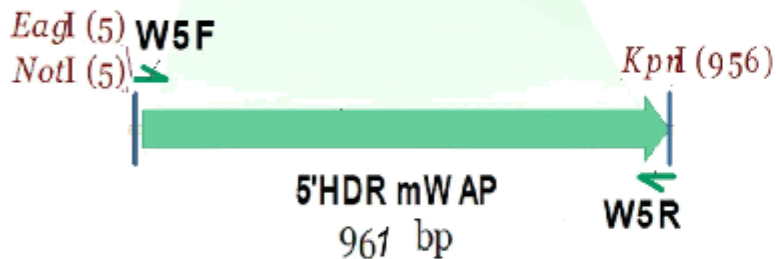
Ген WAP (Whey Acidic Protein)

Mus musculus strain C57BL/6J
chromosome 11, GRCm38.p4 C57BL/6J



ПЦР-амплификация с праймерами W5F(NotI)/W5R(KpnI)

ПЦР-амплификация с праймерами W1703(SalI)/W1704(ClaI)



Клонирование в pTZ57R/T

Клонирование в pTZ57R/T

Промежуточная pTZ5'WAP

Промежуточная pTZ3'WAP

ПОДГОТОВКА ФРАГМЕНТОВ 5'WAP И 3'WAP

Получение фрагментов mWAP
(плечей гомологии в ГИК) ПЦР- амплификацией

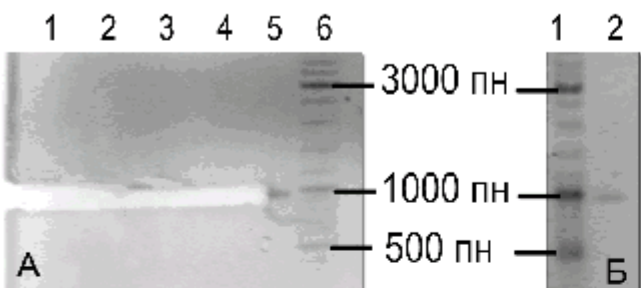
Очистка амплификатов
и клонирование в *pTZ57R/T*

Проверка на наличия
вставки

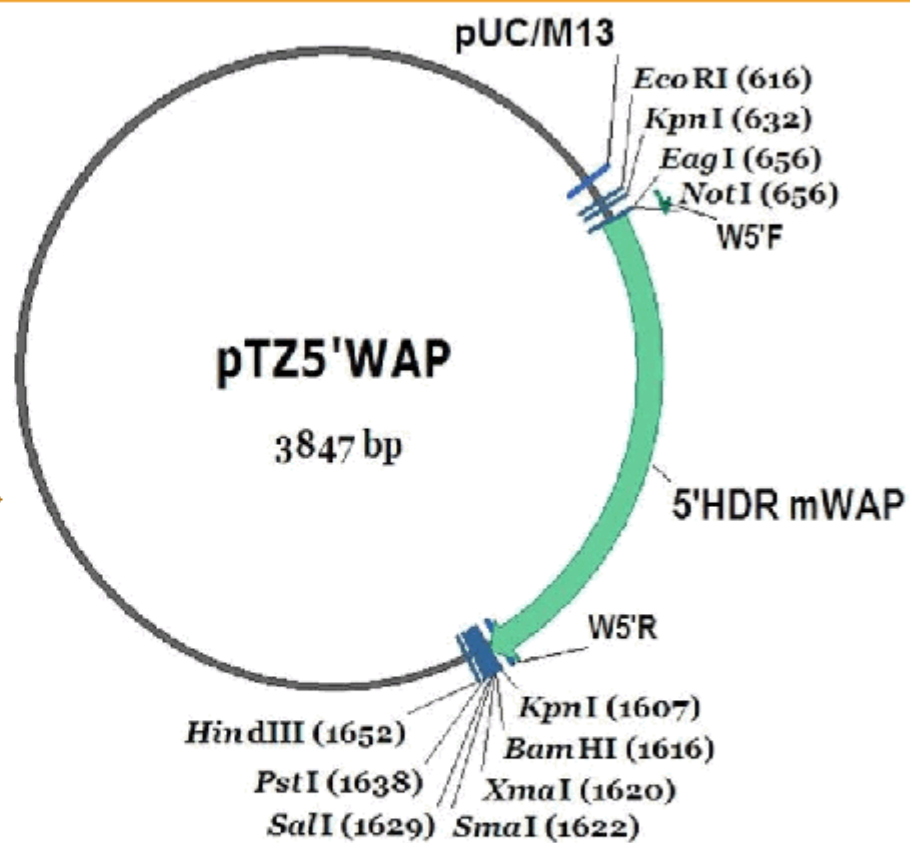
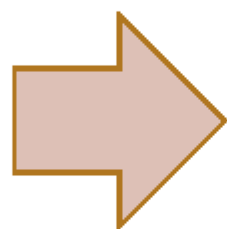
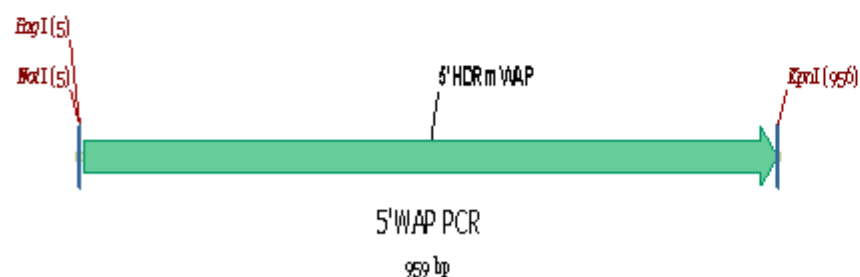
Наработка положительных
клонов

Выделение промежуточной плазмид
pTZ5'WAP и *pTZ3'WAP*

ФРАГМЕНТ 5'-WAP

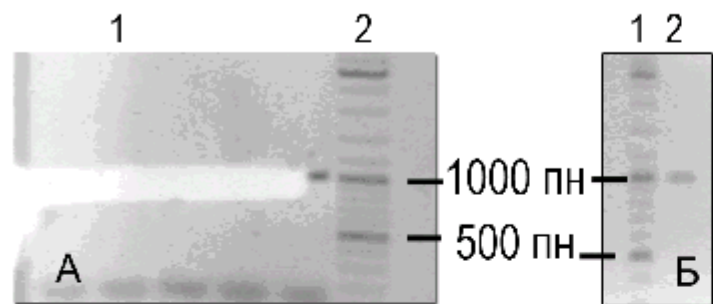


Препаративный электрофорез ПЦР-амплификата фрагмента 5'WAP (А) и выделенный из агарозного геля фрагмент *EagI*-5'WAP-*KpnI* (Б)

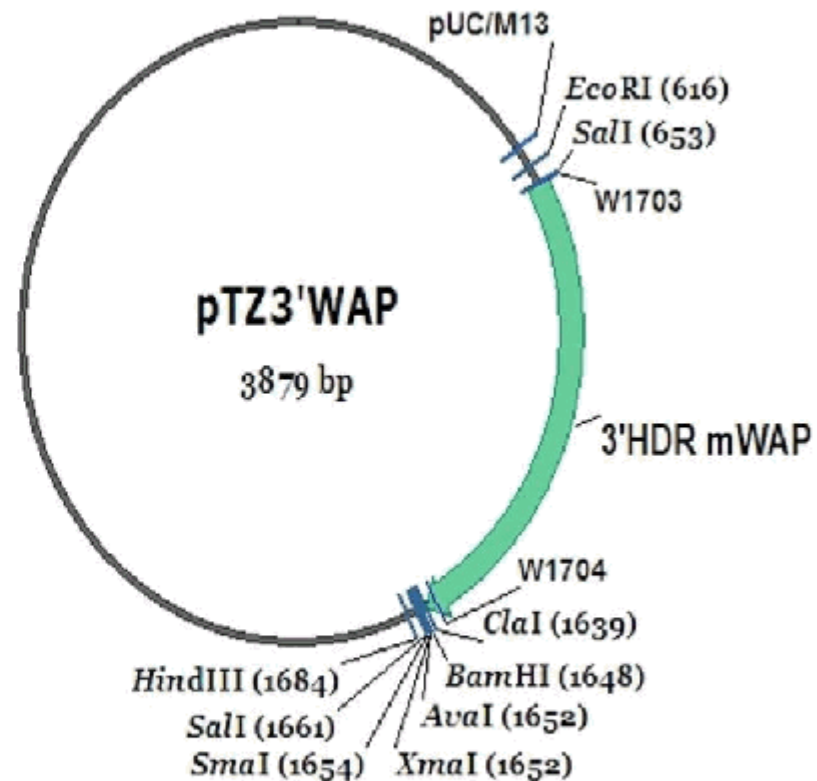
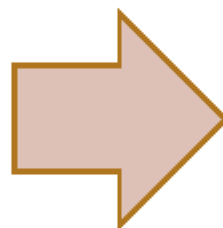
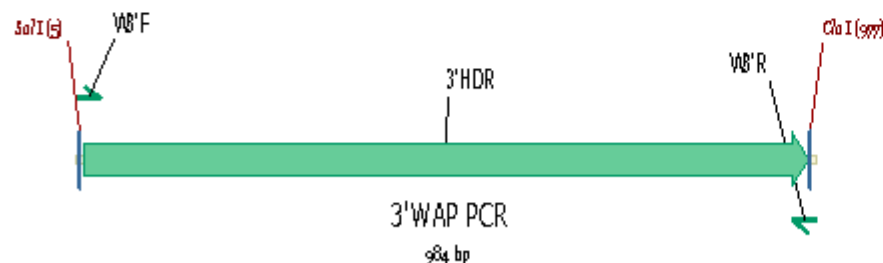


Промежуточная pTZ5'WAP, содержащая 5'WAP фрагмент для HDR. Указаны основные рестриктные сайты и сайты связывания используемых праймеров

ФРАГМЕНТ 3'-WAP

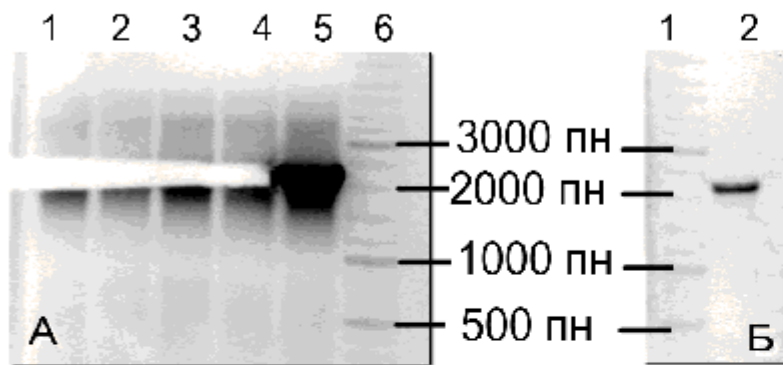


Препаративный электрофорез ПЦР-амплификата фрагмента 3'WAP (А) и выделенный из агарозного геля фрагмент 3'WAP (Б).

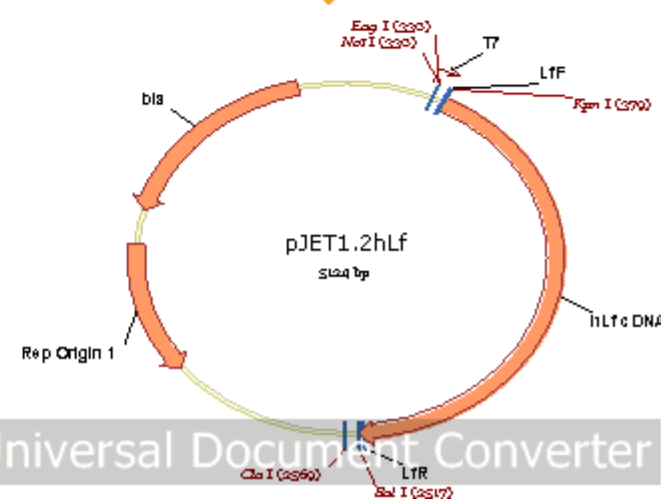
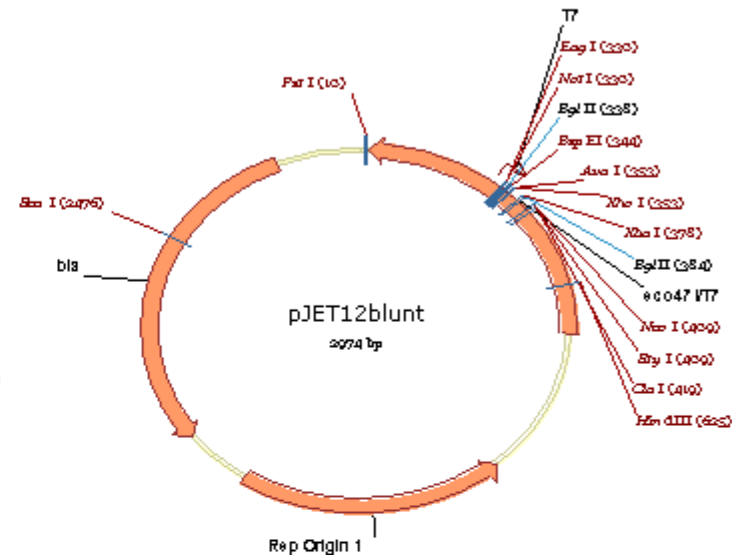
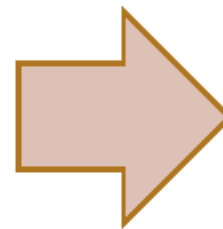
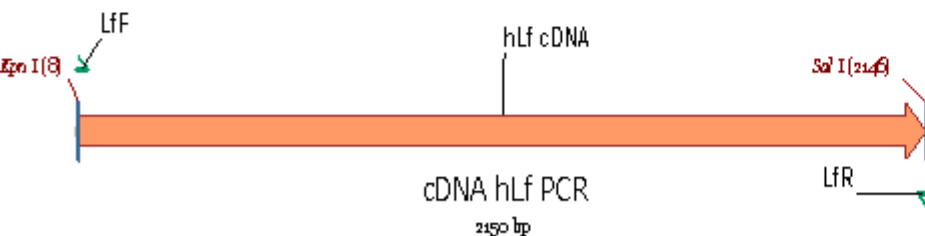


Промежуточная рТЗ 3'WAP, содержащая 3'WAP фрагмент для HDR. Указаны основные рестриктные сайты и сайты связывания используемых праймеров

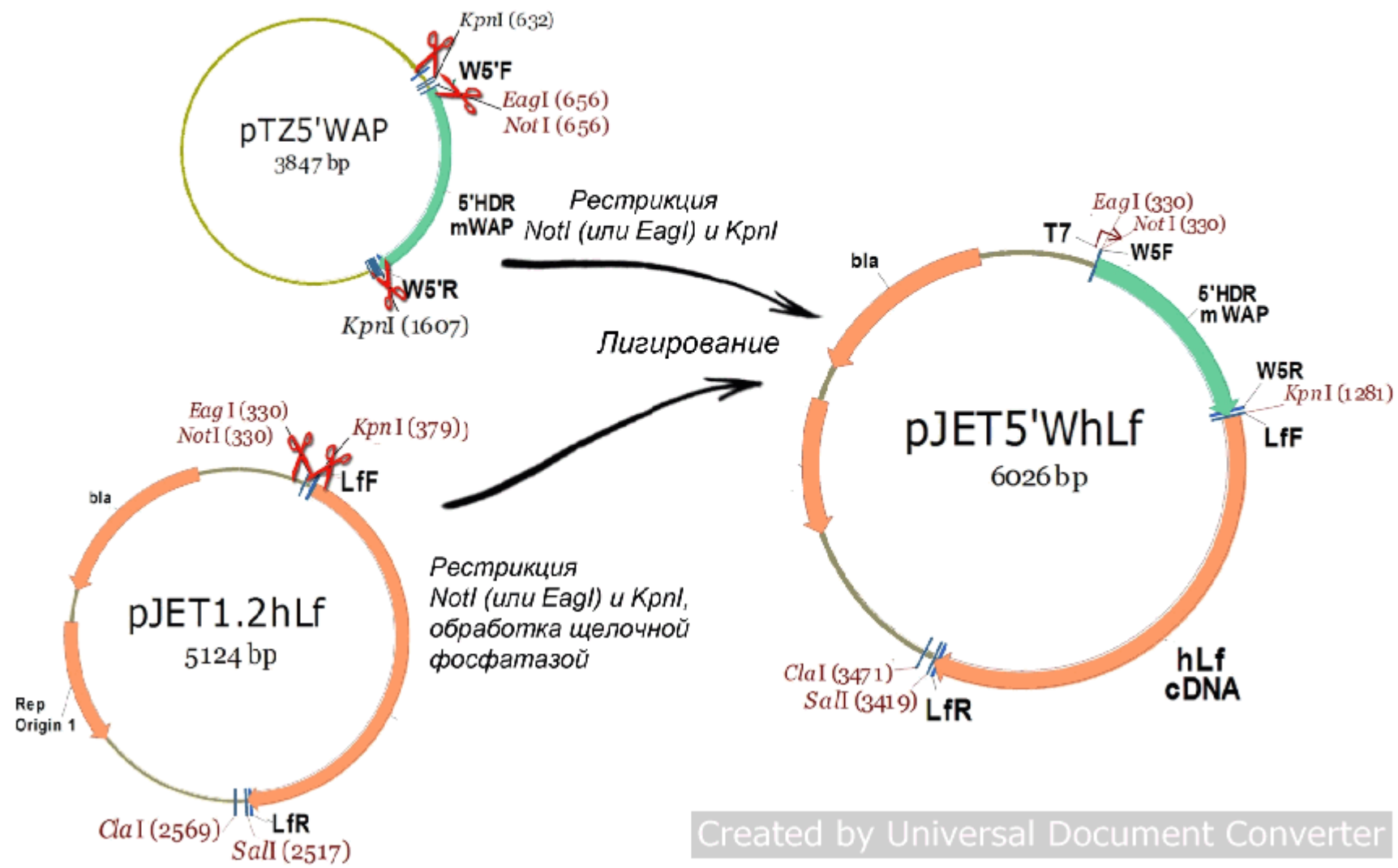
Клонирование кДНК чЛФ, получение плазмиды pJET1.2hLf



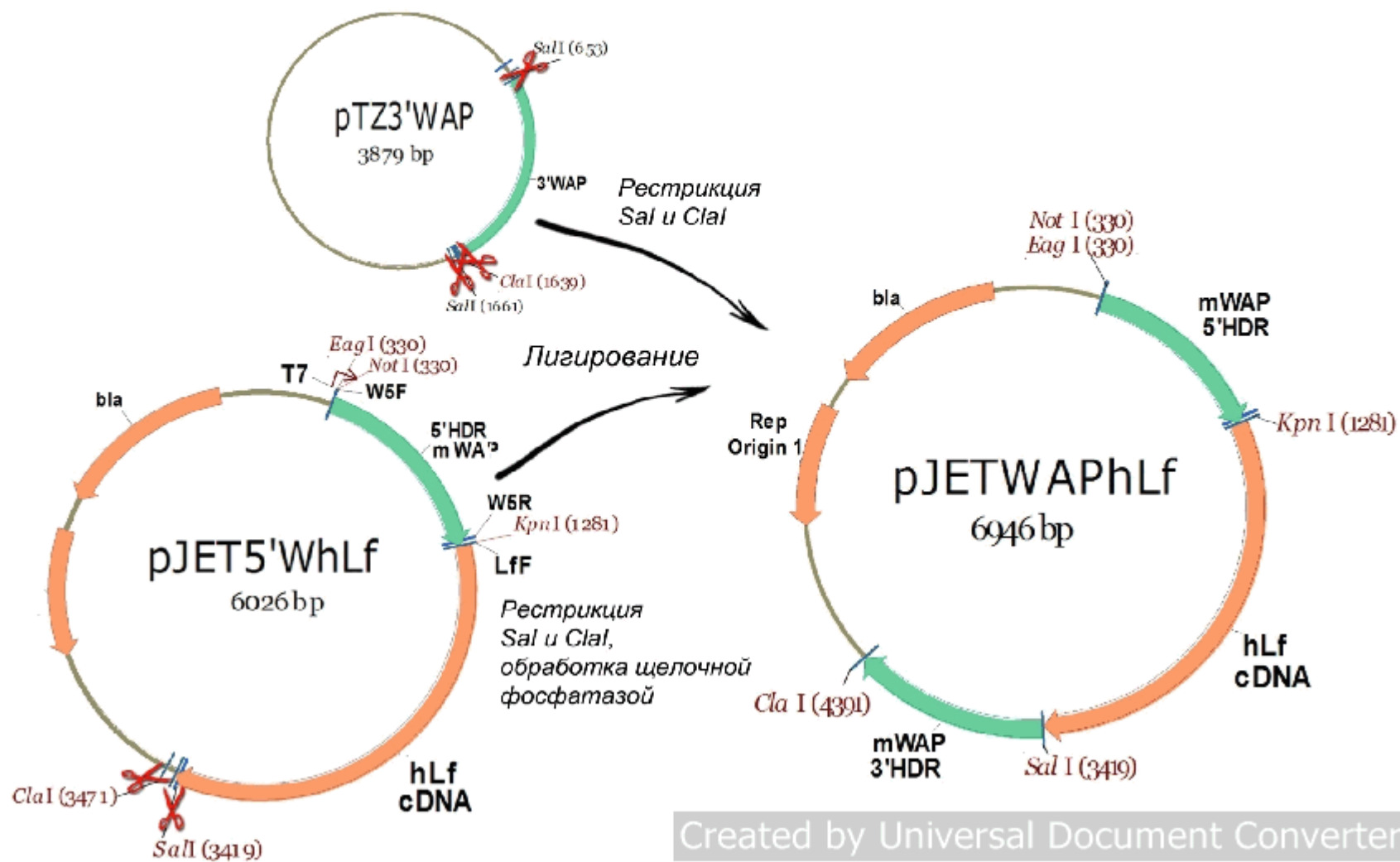
Препаративный электрофорез ПЦР-амплификата кДНК hLf и выделенный из агарозного геля фрагмент KpnI-hLf-SalI.



Получение рJET5'WAPhLf, содержащей кДНК чЛФ и 5'WAP плечо гомологии к гену mWAP.



Получение рJETWAPhLf, содержащей кДНК чЛФ, 5'WAP и 3'WAP плечи гомологии к гену mWAP.



Заключение

Созданная плаزمида будет использована как матрица для замещения гена *mWAP* механизмом гомологичной рекомбинации при получении с помощью CRISPR/Cas9 технологии трансгенных по ЧЛФ мышей.

Отработка технологии CRISPR/Cas9 на модельных животных позволит перейти на сельскохозяйственных животных.

Полученная плазмида *pWAPhLf* может быть использована в качестве кассеты для вставки по уникальным сайтам рестрикции *KpnI* и *Sall* ДНК других ценных белков (в случае отсутствия таковых сайтов во встраиваемой ДНК)