

УДК 636.2:591.39:576.5

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТИВНОСТИ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ДОМАШНЕЙ КОРОВЫ В НАПРАВЛЕНИИ НОКАУТА ГЕНА В-ЛАКТОГЛОБУЛИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9**Г.Н. Сингина¹, П.В. Сергеев², М.П. Рубцова², Н.В. Равин³, А.В. Лопухов¹, Т.А. Ворожбит¹,
Е.Н. Шедова**¹ *Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Московская обл., Подольск, Россия*² *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*⁴ *Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия*

Технология геномного редактирования в сочетании с репродуктивными биотехнологиями, такими как соматическое клонирование имеет широкие перспективы применения для решения задач, направленных на создание новых генотипов, в том числе с измененными хозяйственно – полезными признаками [1–2]. В частности, получение клонированных эмбрионов с использованием эмбриональных фибробластов отредактированных в направлении нокаута гена β – лактоглобулина (BLG) и их трансплантация животным-реципиентам ожидаемо позволит получить коров способных производить молоко с пониженными аллергенными свойствами [3]. В качестве инструментов геномного редактирования в работах на домашних животных все большее применение находит система на основе CRISPR/Cas9 [4]. В представляемой работе была проведена оценка эффективности данной системы геномного редактирования для получения эмбриональных фибробластов крупного рогатого скота с нокаутом гена BLG. Для этого первоначально была получена культура фибробластов плодов крупного рогатого скота известной селекции. Выделенные на 55 день стельности *post mortem* от 4 телок симментальской породы матки, доставляли в лабораторию, рог маток, содержащий плод, обрабатывали 70 % этиловым спиртом, вскрывали и извлеченные плоды освобождали от головы, конечностей и внутренних органов. Полученную плодную ткань (каждый плод индивидуально) многократно отмывали в фосфотно-солевом буфере (ФСБ), протирали через сито с диаметром пор 100 мкм (ферментативная обработка плодной ткани была полностью исключена на этапе выделения первичной культуры), после чего клеточную суспензию отмывали центрифугированием в ФСБ и культивировали в 100 мм чашках Петри с ростовой средой до образования монослоя. Первичную культуру размножали путем однократного пассирования 1:4, после чего клетки замораживали в среде ДМЕМ с 40 % ФБС и 10 % ДМСО и хранили в криобирках по 1 мл при -196оС до использования. Результаты генотипирования плодов с использованием двух пар праймеров, подобранных к 6 экзону гена *Amel1f* крупного рогатого скота: *Amel1f* CAG CCA AAC CTC CCT CTG C и *Amel2r* CCG CTT GGT CTT GTC TGT TGC показали, что генотип XX имели три плода и генотип XV – 1 плод.

Учитывая, что в геноме крупного рогатого скота ген бета-лактоглобулина дублирован и представлен двумя близкими паралогами, собственно BLG (PAEP) и BLG подобным геном (LOC100848610), нами была выбрана стратегия, предусматривающая инактивацию обоих генов-паралогов.

При создании генной конструкции на основе CRISPR в качестве основы для инактивации генов PAEP и LOC100848610 был выбран вектор pX458, содержащий гибридный ген Cas9 и зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP), кодирующие области которых отделены друг от друга последовательностью, кодирующей Р2А пептид. Плазмида pX458 была разрезана эндонуклеазой рестрикции *VbsI*. С остовом плазмиды были лигированы гибридные олигонуклеотиды, содержащие последовательности гидовых РНК. После лигирования и трансформации компетентных клеток *E. coli* JM109 выросшие колонии были использованы для наращивания биомассы и выделения плазмид, которые на основании подтверждения успешного клонирования конструкций секвенированием были использованы для трансфекции фибробластов крупного рогатого скота. Трансфецированные соматические клетки, содержащие плазмиду кодирующую компоненты системы CRISPR/Cas9, были отделены от нетрансфецированных клеток при помощи высокопроизводительного клеточного сортера BD FACSAria III. Высокопроизводительное секвенирование ампликонов целевых участков генов PAEP и LOC100848610 в предварительно отсортированной популяции эмбриональных фибробластов показало наличие, соответственно, 12 и 7.5 % мутантных последовательностей, содержащих делеции и вставки нуклеотидов в местах предполагаемых разрывов.

Для получения GE-клонов фетальных фибробластов коровы была проведена электропорация эмбриональных фибробластов второго пассажа смесью плазмид, кодирующих Cas9 и гРНК, направленные на инактивацию генов PAEP и LOC100848610. Трансфецированные соматические клетки, содержащие плазмиду, кодирующую компоненты системы CRISPR/Cas9, были отделены от нетрансфецированных клеток как описано выше.

После сортировки общий пул клеток, экспрессирующих гены компонентов системы CRISPR/Cas9, растили в течение 2 суток, после чего клетки высевали индивидуально в 96-ти луночные планшеты и культивировали до получения колоний и формирования ими 80–90 % монослоя. Доля сформированных колоний составила 20.8 % от общего числа клеток (380/1824). Одна часть каждой колонии была заморожена для возможного дальнейшего использования, а другую часть использовали для выделения ДНК и анализа на наличие мутаций. С этой целью, проводили амплификацию фрагментов генов PAEP и LOC100848610, содержащих целевые области, с последующим секвенированием по Сэнгеру. В 4 из 380 полученных колоний индивидуальных фибробластов был установлен нокаут генов PAEP и LOC100848610, что соответствует эффективности геномного редактирования 1.05 %. Полученные клоны будут использованы для получения методом соматического клонирования GE-эмбрионов и потомства женского пола с отсутствием синтеза бета – лактоглобулина.

Литература

1. Salamone D., Baraño L., Santos C., et al. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow // Journal of Biotechnology. 2006. Vol. 124, N2. P. 469–472.
2. Wang J., Yang P., Tang B., et al. Expression and characterization of bioactive recombinant human alpha-lactalbumin in the milk of transgenic cloned cows // Journal of Dairy Science. 2008. Vol. 91, N12. P. 4466–4476.
3. Yu S., Luo J., Song Z., et al. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle // Cell Research. 2011. 21. P. 1638–1640.
4. Зиновьева Н.А., Волкова Н.А., Багиров В.А. Геномное редактирование: современное состояние исследований и применение в животноводстве // Биотехнология. 2018. Т.34, № 3. С. 9–22.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18–29–07089) и Министерства науки и высшего образования РФ

УДК 573.6.086.83+577.2

ТЕСТ-РЕАКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ИЗВЕСТКОВАНИЕ КИСЛЫХ ПОЧВ

Е.А. Прищепенко, И.А. Дегтярева

*Татарский научно-исследовательский институт агрохимии и почвоведения – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский
научный центр РАН, Казань, Россия*

Введение. В последнее время мировым приоритетом является производство органической продукции. Значимой остается проблема плодородия почв, поскольку это напрямую связано с продовольственной безопасностью всех стран мира. Способность экосистемы почва – микроорганизмы – растение улавливать и накапливать солнечную энергию в виде фитомассы является плодородием почвенного покрова – основой гетеротрофной жизни в целом и человека в особенности. Благодаря неисчерпаемому метаболическому потенциалу микроорганизмы используются человеком для решения многих экологических проблем. По микробному генофонду почва – самый богатый природный субстрат, который выполняет функции биологического поглотителя, разрушителя, нейтрализатора различных загрязнений.

Одной из главных причин низкого плодородия почв и недостаточной эффективности удобрений является снижение значений водородного показателя [1]. Для развития многих растений оптимальное значение pH составляет от 5,5 до 7,5. Поэтому известкованию кислых почв принадлежит важное место в комплексе мер, направленных на повышение продуктивности земледелия, так как в Российской Федерации более 75 млн га кислых почв. Изучением агрохимических свойств различных типов почв в условиях агрогенеза занимаются многие исследователи [2–4].