

**ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОМАТИЧЕСКОГО КЛОНИРОВАНИЯ
И РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

Г.Н. Сингина¹, П.В. Сергиев², А.В. Лопухов¹, Е.Н. Шедова¹, Т.Е. Тарадайник¹

¹ *ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Московская обл., Подольск, Россия*

² *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 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 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 находят применение системы ДНК-транспозонов и сайт-специфических нуклеаз, таких как ZFN, TALEN и системы на основе CRISPR/Cas9 [4]. ZFN и TALEN были с успехом использованы для редактирования геномов сельскохозяйственных животных, главным образом, на начальных этапах развития технологий на основе сайт-специфических нуклеаз. Однако вследствие высокой трудоемкости конструирования рекомбинантных векторов были практически полностью вытеснены системами на основе CRISPR/Cas9 [5,6]. В отличие от ZFN и TALEN, сборка которых требует несколько последовательных шагов клонирования, в основе конструирования систем CRISPR/Cas9 лежит использование короткого олигомера. Благодаря своей высокой эффективности, а также простоте и малой трудоемкости, система CRISPR/Cas9 находит все более широкое применение в технологии геномного редактирования [4].

Получение потомства млекопитающих с использованием технологий геномного редактирования требует проведения модификации на уровне генеративных клеток. При этом наиболее предпочтительным способ привнесения CRISPR/Cas9-обусловленных модификаций является SCNT (технология переноса ядер соматических клеток, somatic cell nuclear transfer) с использованием генетически модифицированных клеток. Метод SCNT позволяет проводить отбор мутантных клеток перед началом дорогостоящих экспериментов на животных и гарантировать получение потомства с запланированными модификациями генов. Однако в мировой практике эффективность соматического клонирования с точки зрения получения отредактированных эмбрионов высокого качества остается низкой, высока частота аномального эмбрионального развития, а рожденное потомство менее жизнеспособно, что сдерживает внедрение данной технологии в практическое животноводство. К лимитирующим факторам следует отнести неадекватность условий получения клонированных эмбрионов, а также процедуры выращивания клонов индивидуальных соматических клеток.

В этой связи в рамках представляемой работы была поставлена цель оценить эффективность клонирования с использованием эмбриональных фибробластов крупного рогатого скота с точки зрения параметров активации и объединения энуклеированного ооцита (цитопласта) и перенесенного в его перивителлиновое пространство соматической клетки (кариопласта). Изучали влияние продолжительности воздействия цитоплазмы ооцита на донорское ядро до активации и повторного электрослияния цитопласта и кариопласта на формирование клонированных эмбрионов и их развитие до стадии бластоцисты. Кроме того, проведено моделирование условий получения культуры индивидуальных эмбриональных фибробластов с нокаутом гена β -лактоглобулина.

Для SCNT выделенные post mortem ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) созревали в среде ТС-199, дополненной 10 % фетальной бычьей сыворотки, 10 мкг/мл фолликулостимулирующего и 10 мкг/мл лютеинизирующего гормонов. Через 20–24 ч созревания ОКК обрабатывали 0,1 % раствором гиалуронидазы, механически удаляли кумулюсные клетки и отбирали ооциты с первым полярным тельцем. Эмбриональные фибробласты культивировали до сформированного монослоя, контактно ингибировали в течение 2 сут и готовили к процедуре переноса в энуклеированный ооцит в виде суспензии. Микрохирургические манипуляции (группами по 15–20 ооцитов) проводились в каплях среды объемом 20 мкл, нанесенных на дно чашек Петри, покрытых слоем легкого минерального масла

с использованием инвертированного микроскопе совмещенного с микроманипуляционной техникой Narishige (Япония).

В процессе реконструирования ооциты фокусировали с помощью удерживающей пипетки в поле зрения микроскопа в положении позволяющего четко визуализировать первого полярного тельца (ППТ) в перивителлиновом пространстве ооцита на 1 или 5 часов условного циферблата. Микропипетку для биопсии (внутренний диаметр 13–15 мкм) подводили вплотную к оболочке ооцитов, прокалывали зону пеллюцида в месте локализации ППТ и хромосомы яйцеклетки удаляли в слепую аспирацией ППТ и 10–20 % прилежащей цитоплазмы. Соматическую клетку вводили в перивителлиновое пространство зафиксированного ооцита микропипеткой, используемой ранее для биопсии ППТ, через отверстие, сформированное в процессе энуклеации. Для объединения ооцитов и перенесенных в их перивителлиновое пространство клеток применяли два последовательных прямоугольных импульса постоянного тока при напряжении 35 В продолжительностью 20 мкс (однократно или в случае отсутствия признаков объединения клеток двукратно). Полученные цитогибриды активировали иономицином через 1,0 или 2,0 ч после слияния и культивировали до стадии бластоцисты. Доля раздробившихся ооцитов не различалась между экспериментальными группами и варьировала от 60,7 до 70,4 %. Также не различалась доля развития бластоцист, когда использовалось однократное или двукратное слияние (соответственно 29,4 и 22,8 % соответственно). При интервале между слиянием и активацией 1,0 ч выход бластоцист составлял 17,4 %. Удлинение продолжительности указанного периода до 2,0 ч достоверно повышало этот показатель ($p < 0,05$). Таким образом, показано, что эффективность клонирования зависит от интервала между слиянием и активацией. Оптимальным параметром применительно к описанному нами протоколу и использованным соматическим клеткам является 2 ч. Также очевидно, что повторное электрослияние энуклеированного ооцита и соматической клетки не оказывает отрицательного воздействия на качество образовавшихся цитогбридов, а, следовательно, может быть использовано в рамках процедуры получения клонированных эмбрионов у крупного рогатого скота.

Для получения индивидуальных колоний с нокаутом гена β -лактоглобулина проведена электропорация эмбриональных фибробластов коровы ранних пассажей смесью плазмид, кодирующих Cas9 и гРНК, направленных на инактивацию генов PAEP и LOC100848610. После сортировки общий пул клеток, экспрессирующих гены компонентов системы CRISPR/Cas9, растили в течение 2–3 суток, после чего клетки высевали индивидуально в 96-ти или 48-ми луночные планшеты и культивировали до формирования ими монослоя. Доля жизнеспособных колоний на один 96-луночный планшет составляла в среднем 21,4 % и была выше, чем в случае их культивирования в 48-ми луночном планшете (15,4 %). Рекомендовано использовать 96-луночные планшеты в последующей работе по получению культуры индивидуальных фибробластов с нокаутом гена β -лактоглобулина. Одна часть каждой полученной колонии после однократного пересева была заморожена для возможного дальнейшего использования при получении клонированных эмбрионов, а другую часть для выделения ДНК и анализа на наличие соответствующих мутаций.

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

ЛИТЕРАТУРА

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Zhou W., Wan Y., Guo R., et al. Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9. PLoS ONE. 2017; 12(10):e0186056.
- Cong L., Ran F.A., Cox D., et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. Science. 2013; 339(6121):819–23.