

УДК 636.2: 591.39: 576.5

ПОЛУЧЕНИЕ КЛОНИРОВАННОГО ПОТОМСТВА И РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

© 2021 г. Г. Н. Сингина^{1,*}, П. В. Сергиев^{2,3,4}, А. В. Лопухов¹, М. П. Рубцова⁴, Н. П. Тарадайник¹, Н. В. Равин⁵, Е. Н. Шедова¹, Т. Е. Тарадайник¹, И. А. Полежаева⁶, А. В. Доцев¹, иностранный член РАН Г. Брем⁷, академик РАН О. А. Донцова^{3,4,8,9}, академик РАН Н. А. Зиновьева¹

Поступило 10.10.2020 г.

После доработки 20.10.2020 г.

Принято к публикации 21.10.2020 г.

Методом клонирования ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer, SCNT) впервые в России получено жизнеспособное потомство крупного рогатого скота. Полногеномное SNP-генотипирование подтвердило полную идентичность генотипа клонированного теленка и линии фибробластов, используемых для SCNT. С использованием системы CRISPR/Cas9 выполнен нокаут генов бета-лактоглобулина (*PAEP*) и бета-лактоглобулин подобного белка (*LOC100848610*) в вышеназванной клеточной линии. Эффективность геномного редактирования (gene editing, GE) обоих генов составила 4.4%. Получены клоны индивидуальных фибробластов с нокаутом генов *PAEP* и *LOC100848610*, которые будут использованы для получения GE-потомства крупного рогатого скота с дефицитом бета-лактоглобулина.

Ключевые слова: *Bos taurus*, соматическое клонирование, редактирование генома, нокаут бета-лактоглобулина

DOI: 10.31857/S2686738921010212

Технология геномного редактирования (gene editing, GE) в сочетании с методом клонирования ядер соматических клеток (somatic cell nuclear

transfer, SCNT) 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, в геноме которых инактивирован ген β-лактоглобулина (*BGL*), и их трансплантация животным-реципиентам ожидаемо позволит получить коров, способных производить молоко с пониженными аллергенными свойствами [3]. Использование системы на основе CRISPR/Cas9 в качестве инструмента редактирования генома соматических клеток следует рассматривать как наиболее эффективный и инновационный подход, находящий все большее применение у домашних животных [4, 5]. Метод SCNT позволяет проводить отбор мутантных клеток перед началом дорогостоящих экспериментов на животных и гарантировать получение потомства с запланированными модификациями генов. Привлекательность системы на основе CRISPR/Cas9 определяется ее высокой эффективностью, простотой и малой трудоемкостью [6].

Целью исследований являлось конструирование SCNT-эмбрионов крупного рогатого скота с использованием эмбриональных фибробластов в качестве доноров ядер, оценка их развития до

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Московская обл., Подольск, Россия

² Институт функциональной геномики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологии, Сколково, Россия

⁴ Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ Институт биоинженерии, ФИЦ биотехнологии РАН, Москва, Россия

⁶ Отдел животноводства и ветеринарных наук, Государственный университет штата Юта, Логан, Юта, США

⁷ Департамент животноводства и генетики, Ветеринарно-медицинский университет, Вена, Австрия

⁸ НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁹ Институт биоорганической химии Российской академии наук имени академика М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

*e-mail: g_singina@mail.ru

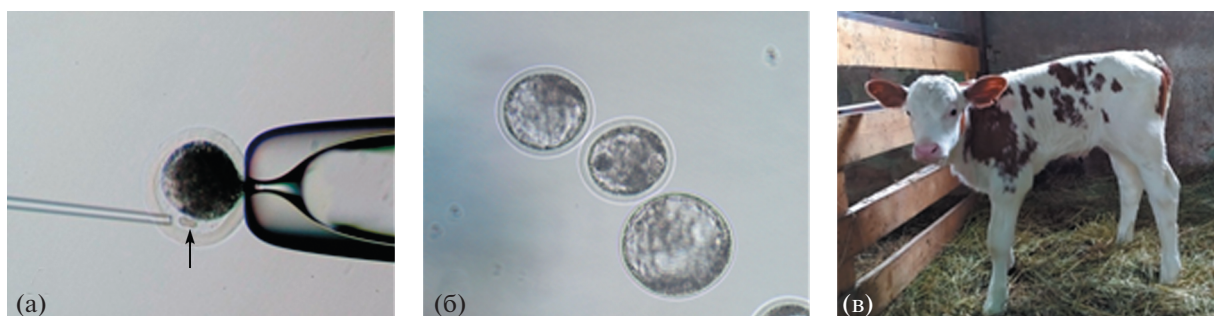


Рис. 1. Фотографии (а) процедуры переноса соматической клетки (показано стрелкой) в перивителлиновое пространство энуклеированного ооцита, (б) клонированных эмбрионов крупного рогатого скота, использованных для трансплантации животным-реципиентам, а также (в) клонированного теленка (полученного в России впервые).

жизнеспособного потомства, а также в получение культуры индивидуальных фибробластов с нокаутом гена β -лактоглобулина.

Для SCNT выделенные *post mortem* ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК, $n = 1332$) 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 (ППТ, $n = 1088$). Эмбриональные фибробласты культивировали до сформированного монослоя, контактно ингибировали в течение 2 сут и к процедуре переноса в энуклеированный ооцит (рис. 1а) готовили в виде суспензии. Для объединения ооцитов и перенесенных в их перивителлиновое пространство клеток применяли два последовательных импульса постоянного тока напряжением 35 В продолжительностью 20 мкс (однократно или в случае отсутствия признаков объединения клеток – двукратно). Полученные цитогриды ($n = 422$, 44.5% от числа ооцитов с ППТ) активировали иономицином через 2 ч после слияния и культивировали до стадии бластоцисты (рис. 1б). С целью оценки полноценности и жизнеспособности полученных эмбрионов часть из них ($n = 81$) была пересажена синхронизированным по циклу реципиентам, оставшиеся бластоцисты были использованы для цитологического анализа состояния ядерного материала ($n = 16$, среднее число ядер 78.3). В качестве реципиентов использовали телок случного возраста в спонтанном и синхронизированном цикле. Перед трансплантацией проводили сакральную эпидуральную анестезию 2%-м раствором новокаина. Пересадку эмбрионов (1–6 эмбрионов на одно животное) проводили нехирургическим методом глубоко в рог матки.

Было установлено, что после активации 64.5% (272/422) цитогридов формируют 2-х клеточные эмбрионы и 23.0% (97/422) развивается до стадии бластоцисты. Доля стельных животных после трансплантации клонированных бластоцист 31 реципиенту составила 43.8% (14/31), доля рожденного живого потомства – 3.3% (1/31) (рис. 1в).

Для оценки происхождения полученного теленка проводили полногеномное SNP-генотипирование потомства и клеточной линии с использованием ДНК-чипа высокой плотности Bovine GGP HD (Neogen/Illumina Inc., США). Для оценки степени сходства проводили расчет значений дистанций IBS (идентичность по состоянию) с использованием программы PLINK 1.9. Значения IBS дистанций для пары теляток – клеточная линия составили 1.000, что подтверждает идентичность генотипа полученного теленка и клеточной линии (для сравнения, IBS-дистанции между не родственными животными симментальской породы варьируют от 0.731–0.763).

Учитывая, что в геноме крупного рогатого скота ген бета-лактоглобулина (*BLG*) дублирован и представлен двумя близкими паралогами, собственно *BLG (PAEP)* и *BLG* подобным геном (*LOC100848610*), нами была выбрана стратегия, предусматривающая инактивацию обоих генов-паралогов (рис. 2).

При создании генной конструкции на основе CRISPR в качестве основы для инактивации генов *PAEP* и *LOC100848610* был выбран вектор pX458 [7], содержащий гибридный ген Cas9 и зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP), кодирующие области которых отделены друг от друга последовательностью, кодирующей P2A пептид. Плазмида pX458 была разрезана эндонуклеазой рестрикции *BbsI*. С остовом плазмиды были лигированы гибридные олигонуклеотиды, содержащие последовательно-

(a)
 CTGCAGAGCTCAGAAGCGTGACC CCAGCTGCAGCCATGAAGTG CCTCCTGCTTGCCTTGGCCCTCACC
 TGTGGCG CCCAGGCCCTCATTGTCACCCAGACCATGAAGGGCCTGGATAT CCAGAAGGTCGAGGGT
 GCCCG

(б)
 ATGAAGTGCTTCCTGCTCGCCCTG GGCCTGGCCCTGTGG CATCCA GGCTGCCTACATCCCCA
 GATGGCAGGAGACCTGGACATTAGAAAGGTGTGGGGTCTGGGGTGGAGGGTGGGCGCCAGGGGCT
 GGGGTCCGGGGCTGAGAGGGGACAGGAAAGCCTGGACTG CAGAAGTCTAACGCGGGACCA

Рис. 2. Схема участков генов (а) *PAEP* (BLG) и (б) *LOC100848610* (BLG подобный белок) в геноме *Bos taurus*, выбранных в качестве мишени для геномного редактирования. Участки гибридизации праймеров для амплификации геномных фрагментов показаны голубой заливкой. Предполагаемые участки разрезания ДНК системой CRISPR/Cas9 показаны фиолетовой заливкой. Участки гибридизации гидовых РНК показаны желтой заливкой.

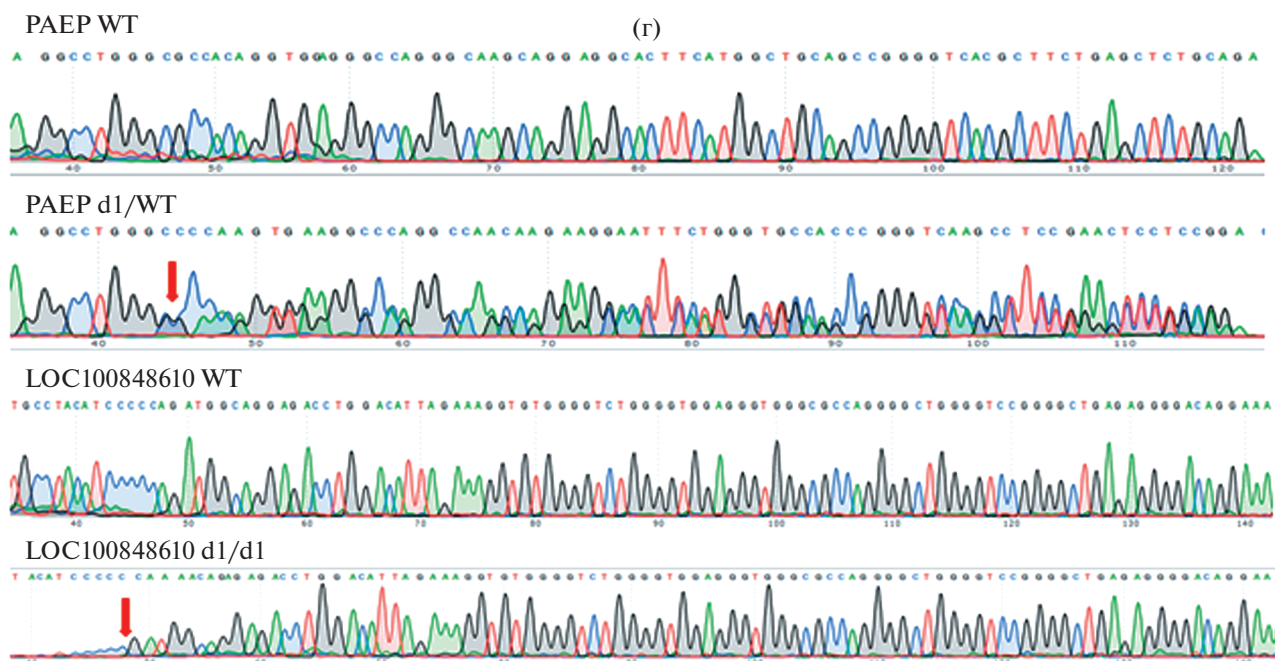
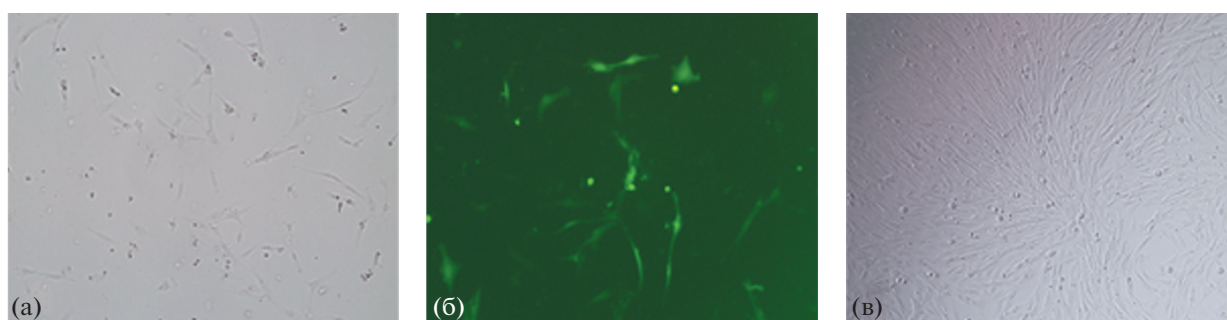


Рис. 3. Микрофотографии (а) общего пула трансфицированных фибробластов *Bos taurus* через 48 ч после электропорации смесью плазмид, кодирующих Cas9 и гРНК, направленных на инактивацию генов *PAEP* и *LOC100848610* и (б) клеток, экспрессирующих гены компонентов системы CRISPR/Cas9 и GFP (зеленое свечение). (в) культура индивидуальной колонии, трансфицированных клеток. (г) результаты секвенирования ампликона участка гена *PAEP* и гена *LOC100848610*. Видны микровставки и микроделеции в области разрезания гена системой CRISPR/Cas9. Генотипы подписаны. Места мутаций обозначены стрелками.

сти 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 индивидуальных колоний GE-фибробластов коровы была проведена электропорация фибробластов ранних пассажей смесью плазмид, кодирующих Cas9 и гРНК, направленных на инактивацию генов *PAEP* и *LOC100848610* (рис. 3а).

После сортировки (как описано выше, рис. 3б) общий пул клеток, экспрессирующих гены компонентов системы CRISPR/Cas9, растили в течение 2–3 сут, после чего клетки высевали индивидуально в 96-ти луночные планшеты и культивировали до получения колоний (рис. 3в) и формирования ими 80–90% монослоя. Доля сформированных колоний составила 21.3% от общего числа клеток (90/389). 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 (рис. 3г). В 4 из 90 полученных колоний индивидуальных фибробластов был установлен нокаут генов *PAEP* и *LOC100848610*, что соответствует эффективности геномного редактирования 4.4%.

Таким образом, в результате проведенных исследований подтверждена компетентность линии фетальных фибробластов крупного рогатого скота к развитию до жизнеспособного потомства методом SCNT, впервые с использованием системы CRISPR/Cas9 получена линия эмбриональных фибробластов с нокаутом генов *PAEP* и *LOC100848610*. Полученная клеточная линия будет использована для получения GE-потомства крупного рогатого скота с отсутствием синтеза бета-лактоглобулина.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Salamone D., Baraňao 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. V. 124. № 2. 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 // *Jornal of Dairy Science*. 2008. V. 91. № 12. 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. V. 21. P. 1638–1640.
4. *Zhou W., Wan Y., Guo R., et al.* Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9 // *PLoS ONE*. 2017. V. 12. № 10. e0186056.
5. *Cong L., Ran F.A., Cox D., et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems // *Science*. 2013. V. 339. № 6121. P. 819–823.
6. *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.
7. *Ran F., Hsu P., Wright J. et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nature protocols*. 2013. V. 8. P. 2281–2308.

PRODUCTION OF A CLONED OFFSPRING AND CRISPR/CAS9 GENOME EDITING OF EMBRYONIC FIBROBLASTS IN CATTLE

G. N. Singina^{a, #}, P. V. Sergiev^{b, c, d}, A. V. Lopukhov^a, M. P. Rubtsova^d, N. P. Taradajnic^a, N. V. Ravin^e, E. N. Shedova^a, T. E. Taradajnic^a, I. A. Polejaeva^f, A. V. Dozev^a, G. Brem^g,
academician of the RAS O. A. Dontsova^{c, d, h, i}, and academician of the RAS N. A. Zinovieva^a

^a L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Podolsk, Russian Federation

^b Institute of Functional Genomics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^c Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Russian Federation

^d *Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

^e *Research Center of Biotechnology, Moscow, Russian Federation*

^f *Department of Animal, Dairy and Veterinary Sciences, Utah State University, Logan, UT, USA*

^g *Department of Animal Breeding and genetics, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria*

^h *A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

ⁱ *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: g_singina@mail.ru*

Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) technique was used to produce the first viable cloned cattle offspring in Russia. Whole genome SNP genotyping confirmed that the cloned calf was identical to the fibroblast cell line that was used for SCNT. CRISPR/Cas9 approach was subsequently used to knock out genes for beta-lactoglobulin gene (*PAEP*) and the beta-lactoglobulin-like protein gene (*LOC10084810*) in the fibroblast cells. Gene editing (GE) efficiency was 4.4% for these genes. We successfully obtained single-cell-derived fibroblast colonies containing *PAEP* and *LOC10084810* knockouts, which will be used to produce beta-lactoglobulin deficient cattle.

Keywords: *Bos taurus*, somatic cloning, gene editing, beta-lactoglobulin knock-out