

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-57

ПОЛУЧЕНИЕ КРОЛИКА С НОКАУТОМ ГЕНА CSN2 (β -CAS)***PRODUCTION OF A RABBIT WITH A KNOCKOUT OF THE CSN2 GENE (β -CAS)**

Д. Г. Воронина, Е. А. Патраханов, В. М. Покровский,
Д. Н. Сушкова, А. В. Дейкин, М. В. Корокин

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

D. G. Voronina, E. A. Patrakhanov, V. M. Pokrovsky,
D. N. Sushkova, A. V. Deykin, M. V. Korokin

Belgorod State National Research University

✉ diana0085@inbox.ru

Аннотация

Создание кролика с нокаутом гена CSN2 (β -cas) представляет собой важную задачу в области генетических технологий. Ее достижение позволит использовать таких животных в качестве фоновой линии для получения продуцентов человеческих терапевтических белков, что значительно повысит эффективность производства рекомбинантных препаратов. Основная цель исследования заключалась в нокаутировании указанного гена и расширении биомоделей ГМ — животных.

Abstract

The creation of a rabbit with a knockout of the CSN2 gene (β -cas) represents an important goal in the field of genetic technology. Its achievement will make it possible to use such animals as a background line for obtaining producers of human therapeutic proteins, which will significantly increase the efficiency of the production of recombinant drugs. The main goal of the study was to knock out this gene and expand biomodels of GM animals.

Изучение генетической модификации сельскохозяйственных животных ведется уже 36 лет [1]. За это время произошел значительный прогресс в технологиях геной инженерии, расширив спектр возможностей для модификации генома животных. Особое внимание в настоящее время уделяется методам геного редактирования, которые считаются одним из наиболее перспективных направлений современной биоинженерии.

Молоко — неотъемлемая часть рациона человека, однако его белковый состав может вызывать аллергические реакции. В частности, пептид β -казоморфин, являющийся продуктом ферментативного расщепления β -казеина в процессе переваривания молока в желудке, обладает иммуносупрессивными свойствами и может являться одним из факторов риска развития сахарного диабета 2-го типа [2].

β -казеины являются преобладающими белками молока в массовом соотношении к другим белкам и существуют в двух основных генетических вариантах: A1 и A2. Следует понимать, что A1-подобные типы β -казеина вызывают воспаление в кишечнике, а также являются возможной причиной усиления воспалительной реакции для расстройств различной этиологии [3]. Следовательно, снижение содержания β -казеина в молочных продуктах обусловлено потребностью получения гипоаллергенных молочных продуктов.

На сегодняшний день все чаще используются трансгенные и нокаутные животные в качестве биореакторов, т. е. продуцентов биологически активных терапевтических белков человека.

Цель исследования заключалась в нокаутировании гена кролика CSN2 (β -cas), а также в расширении биомоделей генно-модифицированных животных.

Материалы и методы

Животные. Эксперимент по созданию кролика с нокаутом гена CSN2 (β -cas) проводился на 251 кролике породы «Хиколь», массой тела 2900–3100 г.

Создание генетической конструкции. Создание нокаута гена кролика осуществлялось методом CRISPR/Cas. Ген CSN2 локализуется на 15-й хромосоме и имеет 9 экзонов. С помощью инструмента онлайн-поиска СНОРСНОР была отобрана sgRNA.

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-1346). Разработка автоматизированной системы проводилась при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № FZWG-2021-0016).

Микроинъекция эмбрионов. Микроинъекцию проводили через пневматический микроинжектор с помощью гидравлических микроманипуляторов под визуальным контролем через инвертированный исследовательский микроскоп. Микроинъекции производились в одно и то же время суток, одним оператором.

Трансплантация эмбрионов. После проведения микроинъекции эмбрионов оценивали их целостность и отделяли живые эмбрионы от погибших. Трансплантация эмбрионов осуществлялась самкам-реципиентам с визуализируемой копулятивной пробкой после ссаживания с вазэктомированным самцом. Эмбрионы помещались в воронку яйцевода как в правый, так и в левый рог [4].

Генетический анализ. Для проведения генетического анализа потомства с целью изучения изменения генома в гене интереса CSN2 полученных после проведения микроинъекции эмбрионов было произведено секвенирование по Сенгеру согласно протоколу. Анализ образцов проводился с помощью интернет-ресурса Syntego.

Результаты

В результате проведения серии экспериментов по созданию кролика с нокаутом в гене CSN2 методом CRISP/CAS 9 было подготовлено 200 самок доноров, получено 2110 эмбрионов, из которых 1987 эмбрионов характеризовали как нормальные и 123 — как абнормальные. После микроинъекций было получено 640 живых клеток, которые были пересажены 32 самкам-реципиентам. В ходе серии экспериментов было получено 19 особей от самок-реципиентов.

По результатам анализа потомства с помощью секвенирования Reverse последовательности было выделено четыре образца: 177, 178, 182, 183.

№ 177 является мозаиком. По результатам программы возможно 8 вариантов редактирования генома, из которых 6 вариантов делеция и 2 инсерции.

№ 178 является мозаиком с четырьмя вариантами нокаута гена в организме: в одном случае — инсерция одного нуклеотида после векторной последовательности, в остальных трех случаях — делеция на 38, 27, 35 нуклеотидов соответственно.

№ 182 имеет вставку одного нуклеотида, что может говорить о высокой вероятности сдвига рамки считывания.

№ 183 является мозаиком с шестью вариантами изменения генома в соматических клетках: в трех случаях — инсерция в размере 18, 17, 1 нуклеотид и в трех случаях — делеция в размере 28, 19, 2 в области гайдовой последовательности.

Таким образом, было получено четыре первичных мутанта с измененным генетическим кодом в области интересующего гена.

Литература

1. Максименко О. Г., Дейкин А. В., Ходарович Ю. М., Георгиев П. Г. Использование трансгенных животных в биотехнологии: перспективы и проблемы // Acta Naturae. 2013. № 1 (16). С. 33–46.
2. Pereira M. A., Jacobs D. R., van Horn L. et al. Dairy consumption, obesity, and the insulin resistance syndrome in young adults: the CARDIA Study // JAMA. 2002. Vol. 287, No. 16. P. 2081–2089.
3. Ul Haq M. R., Kapila R., Sharma R., Saliganti V., Kapila S. Comparative evaluation of cow β -casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut // Eur. J. Nutr. 2014. Vol. 53, No. 4. P. 1039–1049.
4. Patrakhanov E. A., Pokrovsky V. M., Karagodina A. Yu. et al. Development of Murine Stem Cells with Conditional Knockout of Humanized Snca Gene // Pharmacy Pharmacology. 2022. Vol. 10 (6). P. 525–535.