

receptor gene (*LHCGR*) with superovulation traits in Chinese Holstein heifers / Y. Yu, Y. Pang, H. Zhao, X. Xu, Z. Wu, L. An, J. Tian // *Journal of animal science and biotechnology*. – 2012. – V. 3. – P.35. 10. Babii, A. V. A *TaqMan* PCR assay for detection of *DGAT1* K232A polymorphism in cattle / A. V. Babii, A. L. Arkhipova, I. N. Andreichenko, A. V. Brigida, S. N. Kovalchuk // *AIMS Agriculture and Food*. – 2018. – V. 3. – N. 3. – P. 306-312.

УДК 602.6

ОПЫТ ПОДБОРА ЦЕЛЕВЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОВЕЦ С НОКАУТИРОВАННЫМ ГЕНОМ *MSTN* И ФЕНОТИПОМ ДВОЙНОЙ МУСКУЛАТУРЫ

Криворучко А.Ю., Яцык О.А.

ФГБНУ «Северо-Кавказский ФНАЦ», г. Михайловск, Россия

*В статье приводятся сведения об опыте подбора целевых последовательностей при конструировании системы CRISPR/Cas9 для редактирования гена *MSTN* овец с использованием инструментов биоинформатического анализа, размещенных в свободном доступе. Для снижения риска получения низкоэффективных редактирующих конструкций при подборе целевых последовательностей рекомендуем использовать сразу несколько ресурсов для комплексной оценки специфичности и предварительного прогноза эффективности гомологичных направляющих РНК. **Ключевые слова:** миостатин, CRISPR/Cas9, геномное редактирование, целевая последовательность, овца.*

EXPERIENCE IN THE SELECTION OF TARGET SEQUENCES IN THE DESIGN OF THE CRISPR/CAS9 SYSTEM FOR OBTAINING SHEEP WITH KNOCKED OUT *MSTN* GENE AND DOUBLE MUSCLE PHENOTYPE

Krivoruchko A.Yu., Yatsyk O.A.

North Caucasian Federal Scientific Agrarian Center, Mikhailovsk, Russia

*The article provides information on the experience of selecting target sequences when constructing a CRISPR / Cas9 system for editing the sheep *MSTN* gene using publicly available bioinformatics analysis tools. To reduce the risk of obtaining low-efficiency editing constructs when selecting target sequences, we recommend using several resources at once for a comprehensive assessment of the specificity and preliminary prediction of the effectiveness of homologous guide RNAs. **Keywords:** myostatin, CRISPR / Cas9, genomic editing, target sequence, sheep.*

Введение. Ген миостатина (*MSTN*, *GDF-8*) – один из ключевых регуляторов мышечного роста, ограничивающий дифференцировку и пролиферацию миосателлитов, миобластов и некоторых других видов клеток. При блокировании белкового продукта гена *MSTN* наблюдается увеличение мышечной массы и повышение силовых характеристик скелетных мышц (A. Ahad et al., 2017). Животные нуль-мутанты по гену *MSTN*, как правило, имеют фенотип двойной мускулатуры и отличаются высоким уровнем мясной продуктивности. В связи с этим для сельского хозяйства, в том числе овцеводческой отрасли, большой интерес представляет разведение продуктивных животных с нокаутом гена миостатина. С развитием технологий геномного редактирования появилась возможность направленного получения животных с нокаутом гена *MSTN* (Aiello et al., 2018). Как показывает мировая практика, наиболее перспективной, относительно простой и экономически выгодной является стратегия редактирования генома сельскохозяйственных животных с использованием системы CRISPR/Cas9 (Lino et al., 2018).

При работе с системой CRISPR/Cas9, в частности, при работе с системой, направленной на нокаут гена путем специфичного внесения двухцепочечного разрыв, крайне важным является проведение предварительного биоинформатического анализа (Немудрый et al., 2014). На сегодняшний день существует большое количество инструментов, позволяющих анализировать эукариотические геномы с целью подбора целевых сайтов для направленного редактирования и дизайна необходимым исследователю олигонуклеотидов. При этом преобладающая часть этих инструментов расположена на web-платформах с режимом свободного доступа (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/wereview/crisprtools>). Предлагаемые инструменты позволяют подобрать подходящую целевую последовательность с прилегающим РАМ-мотивом, оценить ее специфичность, произвести предварительный прогноз эффективности редактирования и рассчитать вероятность нецелевых эффектов.

В данной статье приводятся сведения об опыте подбора целевых последовательностей при конструировании системы CRISPR/Cas9 для редактирования гена *MSTN* овец с использованием инструментов биоинформатического анализа, размещенных в свободном доступе.

Материалы и методы исследований. Целевые последовательности подбирали с использованием ресурсов <https://chopchop.cbu.uib.no> и <https://horizondiscovery.com>, находящихся в открытом доступе. Поиск целевых последовательностей осуществлялся в области первого экзона гена миостатина овец, координаты по сборке Oar_v.3.1 – 2: 118144443 – 118144815. Длина искомым целевых последовательности, без учета РАМ-мотива составляла 20 нуклеотидов.

Результаты исследований. В ходе биоинформатического анализа экзона 1 гена *MSTN* овец с использованием инструментов Chopchop и Horizon discovery было обнаружено 40 возможных вариантов целевых последовательностей с прилегающим РАМ-мотивом для CRISPR/Cas9 редактирования. Согласно полученным результатам, два используемых инструмента совершенно по-разному оценивают предлагаемые целевые последовательности (таблица 1). На web-платформе Chopchop целевые сайты ранжируются в соответствии с комплексной оценкой эффективности и вероятности нецелевых эффектов, самокомплементарности, GC составом, расположением в гене. В первой половине таблицы в порядке очередности приведены целевые последовательности 1-3 ранга, рекомендуемые, как наиболее перспективные. В тоже время, по результатам оценки инструментов Horizon discovery они имеют низкую и среднюю эффективность при очень высокой специфичности.

Таблица – Целевые последовательности

Целевая последовательность	Координаты мишени	Chopchop			Horizon discovery			
		эффективность	ММ		функциональность	специфичность		
Целевые последовательности, имеющие наивысшую оценку по параметрам Chopchop								
1.	CTACCACGTTACGACGGAAA	2:118144772-118144794	59,69	0	0	0	Низкая	Очень высокая
2.	TGACCGTTTCCGTCGTAACG	2:118144775-118144797	69,18	0	0	1	Средняя	Очень высокая
3.	CGATGACTACCACGTTACGA	2:118144766-118144788	74,25	0	0	2	Низкая	Очень высокая
Целевые последовательности, имеющие наивысшую оценку по параметрам Horizon								
4.	TGTTCTCATTCAGATCCACT	2:118144499-118144521	62,17	0	3	15	Очень высокая	Высокая
5.	TGATGTTAGGAGCTGTTTCC	2:118144637-118144659	28,63	0	0	17	Очень высокая	Высокая
6.	GCAGAАСТАСТСАСТССG	2:118144807-118144829	65,37	0	1	3	Очень высокая	Очень высокая

Примечание: ММ1, ММ2 и ММ3 – количество возможных нецелевых транскриптов (с 1, 2, 3-мя нуклеотидными несовпадениями, соответственно) с которыми может связываться направляющая РНК вне целевого гена; жирным шрифтом выделены последовательности, используемые в дальнейшей работе.

На платформе Horizon discovery целевые последовательности не ранжируются по комплексу признаков, но сортируются по отдельным параметрам, в частности по параметрам функциональность и специфичность. Целевые последовательности, предложенные данным сервисом, как наиболее подходящие, представлены во второй половине таблицы. Согласно оценке Chorghor, направляющие последовательности РНК, гомологичные двум предложенным последовательностям, несмотря на высокую оценку специфичности инструментами Horizon discovery, имеют крайне высокий риск нецелевых эффектов при ошибочном спаривании 2-3 нуклеотидов. Существенно различаются также данные по прогнозу работоспособности направляющих РНК. У всех предложенных целевых последовательностей заявлена высокая функциональность, однако эффективность редактирования при этом по оценке Chorghor для одной из последовательностей является довольно низкой и составляет всего лишь 28,63.

В результате работы для дальнейших экспериментов по редактированию гена *MSTN* у овец нами отобрано три целевых последовательности: №1 – последовательность с самой высокой специфичностью и минимальным риском нецелевых эффектов, №3 – последовательность с самой высокой предварительной оценкой эффективности редактирования; №6 – последовательность, имеющая по совокупности оценок двух платформ хорошую эффективность, функциональность и специфичность.

Заключение. Для подбора целевых последовательностей при конструировании системы CRISPR/Cas9 целесообразно использовать несколько ресурсов для комплексной оценки специфичности и предварительного прогноза эффективности гомологичных направляющих РНК.

Литература. 1. Ahad, A. W. Applications of Myostatin (*MSTN*) Gene in the Livestock Animals and Humans: A Review / W. A. Ahad, M. Andrabi, S. A. Beigh, R. A. Bhat, R. A. Shah // *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* – 2017. – №6. – P. 1807-1811. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.609.222>. 2. Aiello, D. The myostatin gene: an overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals / D. Aiello, K. Patel, E. Lasagna // *Anim. Genet.* – 2018. – Т. 49, № 6. – P. 505-519. <https://doi.org/10.1111/age.12696>. 3. Lino, C. A. Delivering crispr: A review of the challenges and approaches / C. A. Lino, J. C. Harper, J. P. Carney, J. A. Timlin // *Drug Deliv.* – 2018. – Т. 25, №1. – P. 1234-1257. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>. 4. Немудрый, А. А. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR / Cas – инструменты открытий / А. А. Немудрый, К. Р. Валетинова, С. П. Медведев, С. М. Закиян // *Acta Naturae.* – 2014. – №3. – P. 20-42.

УДК 636.2.034:575.113.2

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА КАППА-КАЗЕИНА У КОРОВ РАЗНЫХ ПОРОД В УКРАИНЕ

Митиогло И.Д.

Институт разведения и генетики животных имени М.В. Зубца Национальной академии аграрных наук Украины, г. Киев, Украина

Целью исследования было определение полиморфизма гена каппа-казеина и его ассоциации с признаками молочной продуктивности у коров разных пород. Полиморфизм гена каппа-казеина исследовали у коров украинской красно-рябой молочной, украинской черно-рябой молочной, й монбельярдської пород и кроссбредних коров. Генотипы AA и AB обнаружено во всех исследованных группах коров, генотип BB – у коров монбельярдської породы с частотой 0,366. Самый высокий надой за 305 дней первой лактации обнаружено в кроссбредних коров с генотипом AB (7029 кг), самый низкий – в кроссбредних животных с генотипом AA (6359 кг). Результаты исследований генотипов и аллелей гена каппа-казеина является дополнительной генетической характеристикой животных, дает возможность создания стад с желательными признаками молочной продуктивности. **Ключевые слова:** каппа-казеин, полиморфизм, крупный рогатый скот, ПЦР ПДРФ.