

**Бицистронная конструкция, содержащая гены
целевого и маркерного белков, для интеграции в
локус гена β -лактоглобулина крупного рогатого скота
с использованием CRISPR/Cas9 технологии**

Белова Надежда
аспирант, м.н.с. лаборатории
клеточной и генной инженерии,
ВНИИФБиП животных, г.Боровск

Выполнено в соответствии с тематикой ГЗ Создание генно-инженерных конструкций, экспрессирующих биологически активные вещества человека в молочной железе млекопитающих (0626-2014-0010)



Человеческие
белки

Ферменты

Факторы
роста

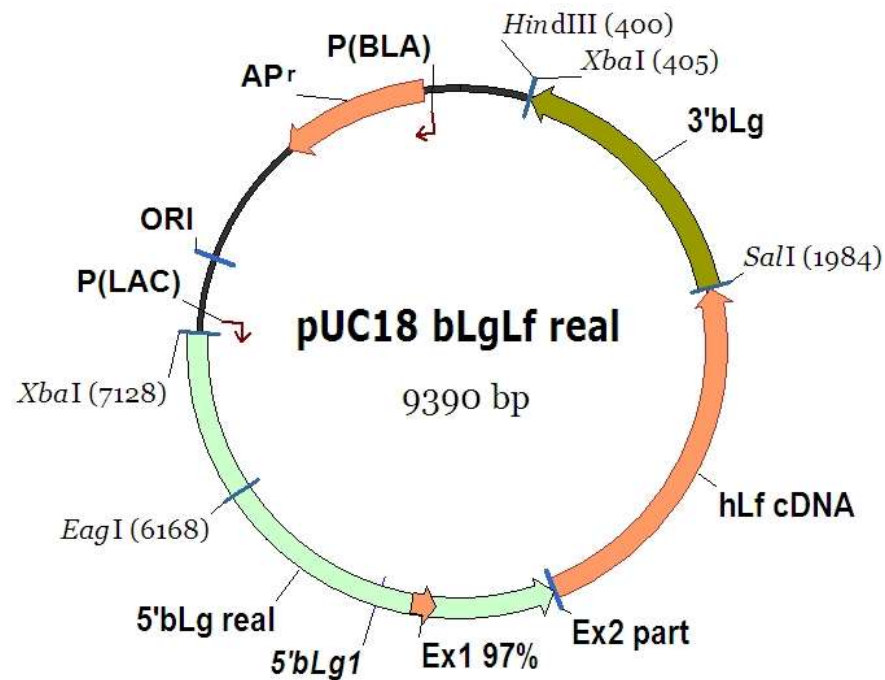
Гормоны



*Трансгенное
животное*



Белки	Козье молоко	Коровье молоко
К а з е и н ы		
Альфа-казеин	нет	13,7 (альфа-S ₁ -казеин)
Бета-казеин	22,8	6,2
Гамма-казеин	нет	1,2
Каппа-казеин	нет	3,7
Итого	22,8	24,8
С ы в о р о т ч н ы е		
Бета-лактоглобулин	2,6	3,0
Альфа-лактоальбумин	4,3	0,7
Иммунный глобулин	нет	0,6
Серум альбумин	нет	0,3
Всего	29,7	29,4

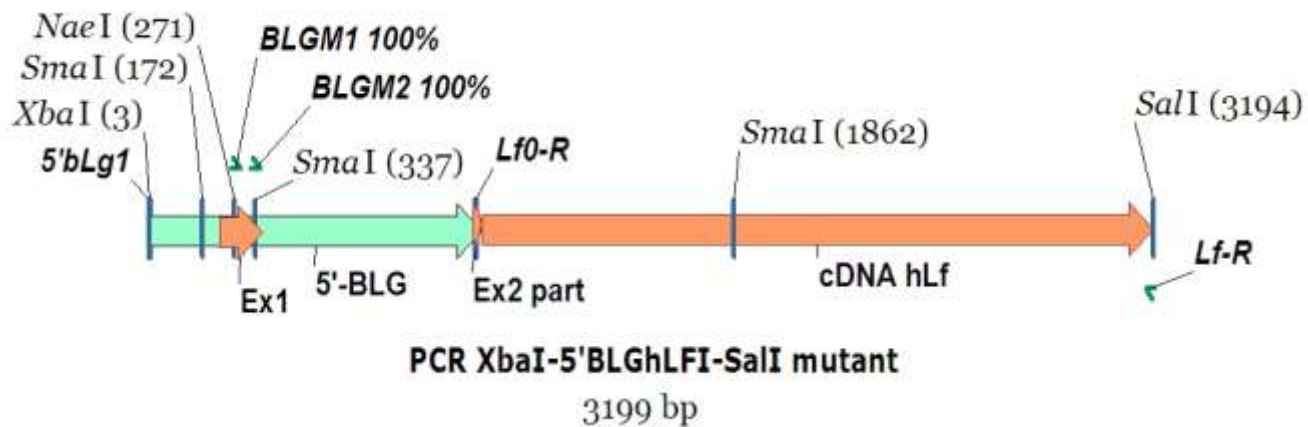


Плазмида *pUC18_bLGhLF*, созданная на основе вектора *pUC18*, содержит кДНК лактоферрина человека (2136 п.н.) с регуляторными областями гена β -лактоглобулина крупного рогатого скота. 5'-Регуляторная область размером 3002 п.н. включает в себя промоторную область, 1-е экзон и интрон, часть 2-го экзона гена β -лактоглобулина, с сохранением рамки считывания; размер 3'-последовательности – 1573 п.н.

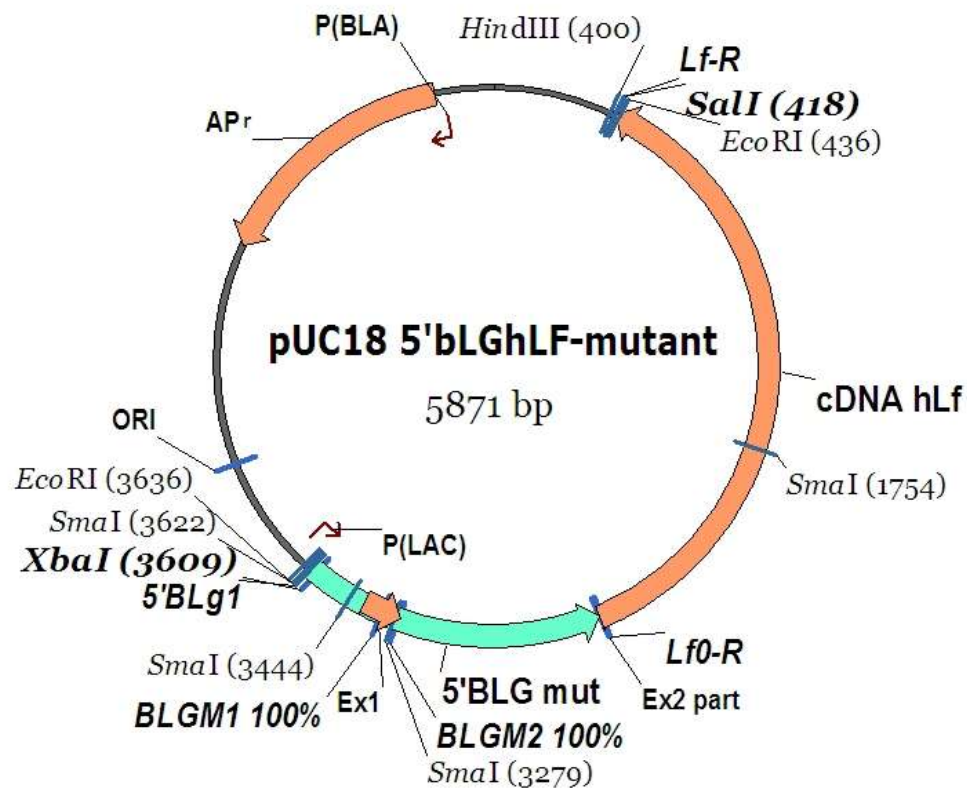


CCTCCACTCCCTGCAGAGCTCAGAAGCGTGATCCCGGCTGCAGCC
ATGAAGTGCCTCCTGCTTGCCCTGGCCCTCACCTGTGGCGCCCAG
GCCCTCATCGTCACCCAGACCATGAAGGGCCTGGATATCCAGAAG

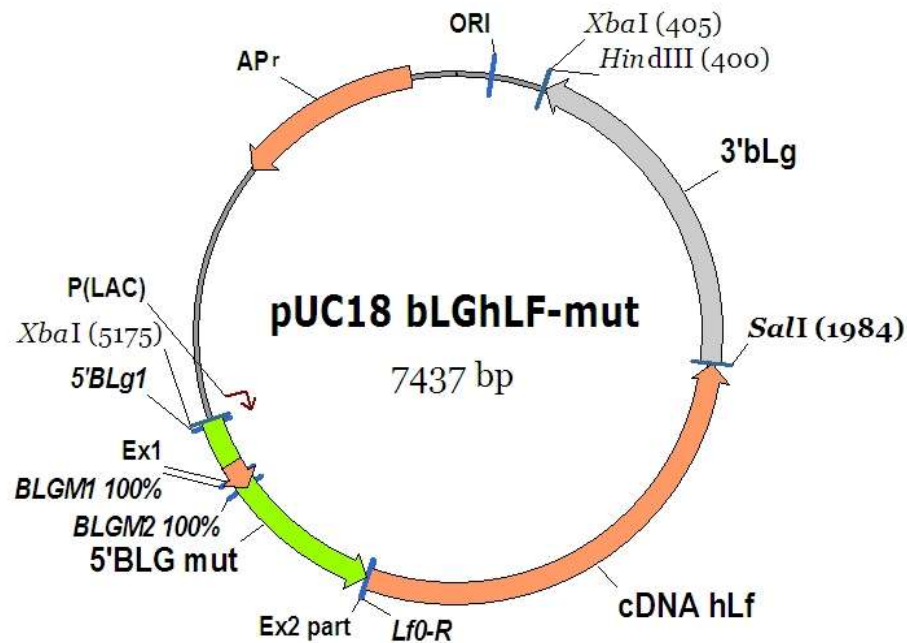
Последовательность 1-го экзона гена bLG, входящая в состав 5'- регуляторной области конструкции. Выделены ATG триплеты, подлежащие замене



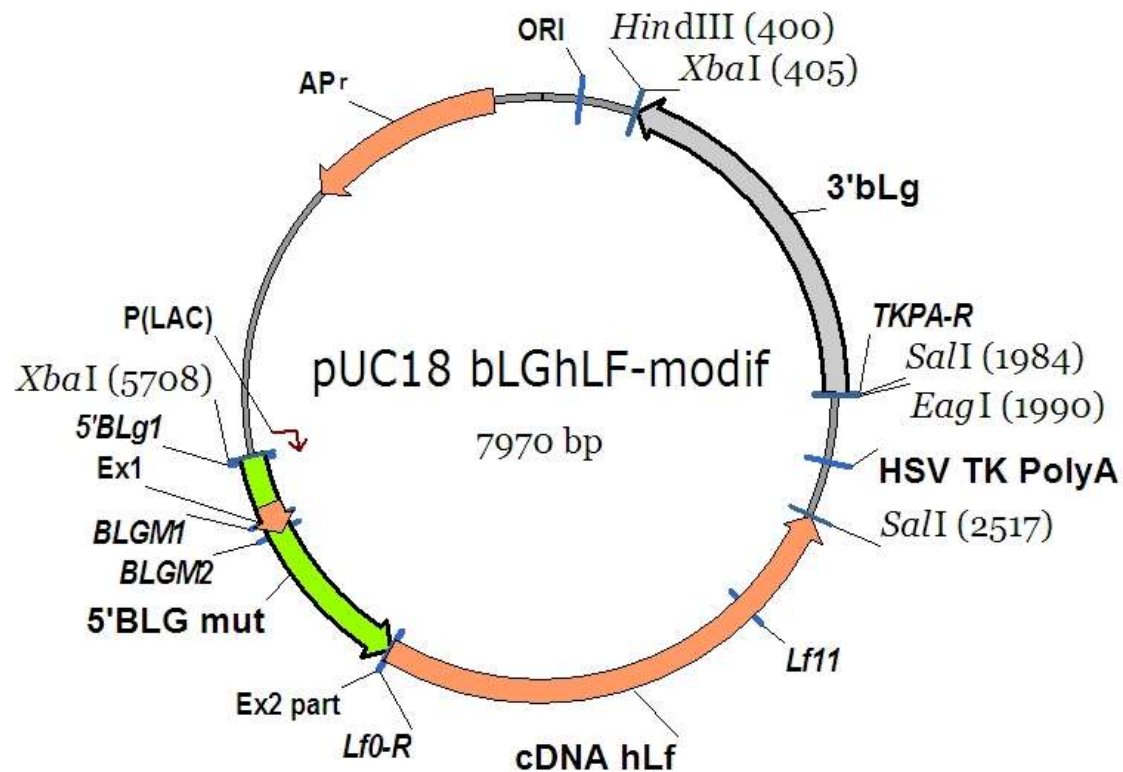
ПЦР амплификат *XbaI*-5'BLGhLF-SalI,
 содержащий введенные вместо триплетов ATG
 сайты рестрикции для *NaeI* и *SmaI* в первом
 экзоне β LG



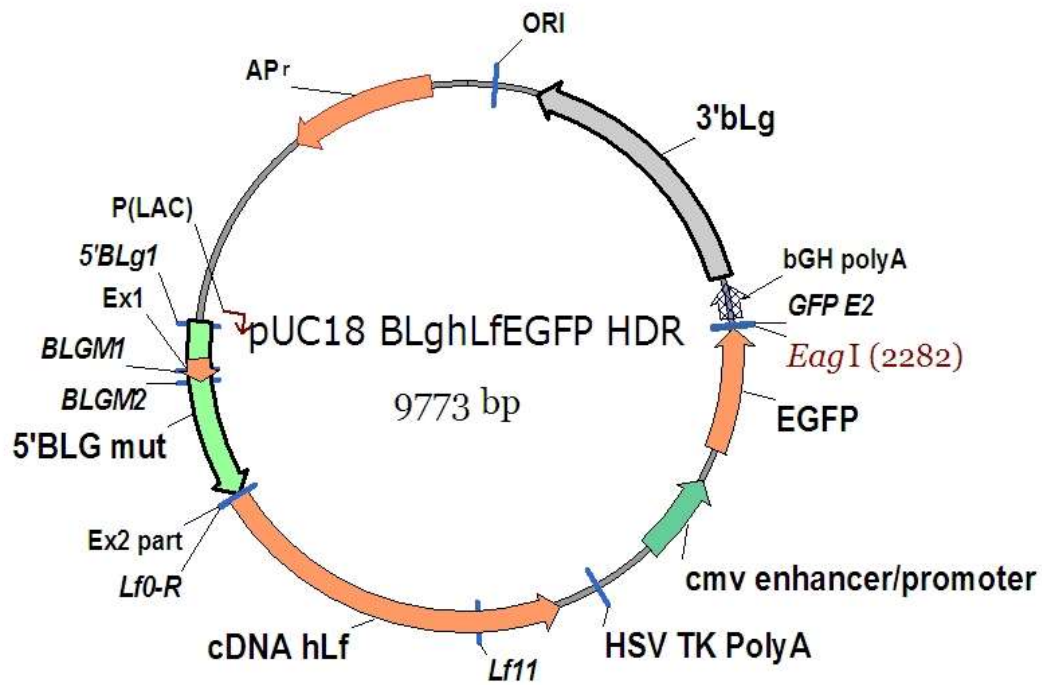
Плазмида *pUC18_5'bLGhLF*, содержащая кДНК лактоферрина человека (2136 п.н.) и 5'-плечо гомологии (1049 п.н.) к гену *BLG KPC*



Плазмида *pUC18_bLGhLF*, содержащая кДНК лактоферрина человека (2136 п.н.), 5'- и 3'-плечи гомологии (1049 п.н. и 1573 п.н. соответственно) к гену *BLG KPC*



Плазмида *pUC18_bLGhLF-modif*, содержащая кДНК лактоферрина человека (2136 п.н.), 5'- и 3'-плечи гомологии (1049 п.н. и 1573 п.н. соответственно) к гену *BLG* КРС и сигнал полиаденилирования *HSV TK*



Плазмида *pUC18_BLghLfEGFP_HDR*, содержащая кДНК лактоферрина человека, сигнал полиаденилирования HSV TK, 5'- и 3'-плечи гомологии к гену BLG KPC и цистронную единицу маркерного гена (EGFP)

*Спасибо за
внимание!*

