



Использование гена зеленого флуоресцентного белка для сайт-специфической интеграции в локус гена кислого сывороточного протеина кролика.

Езерский В.А., Колоскова Е.М.

Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста».



Генно-модифицированные (ГМ) организмы становятся неотъемлемыми компонентами не только научных и биомедицинских исследований, но и агропромышленного комплекса во всем мире.

Применение в генной инженерии эндонуклеазных технологий ZFN, TALEN и особенно CRISPR/Cas9 – эффективный метод изменения состава молока сельскохозяйственных (с/х) животных замещением генов эндогенных молочных белков с целью улучшения потребительских качеств молока, для использования молочной железы животного как биореактора для продукции рекомбинантных белков.

Трансгенные с/х животные, в том числе кролики, перспективны в качестве биореакторов для продукции рекомбинантных белков фармакологического назначения с молоком или кровью.

Кролик, как одно из самых маленьких с/х животных, не только хорошая модель для испытания и отработки новых геномных технологий, но и легко возобновляемый продуктивный источник ценных рекомбинантных белков в экспериментальном и промышленном масштабе.

Сывороточный Кислый Протеин (Whey acidic protein - WAP) был впервые обнаружен в молоке мыши, позднее - в молоке крысы, кролика, свиньи, верблюда, валлаби, опоссума, ехидны и утконоса. Поскольку в молоке всех этих видов отсутствует β -Lg, считалось, что эти белки являются взаимоисключающими. Но свиное молоко, содержащее β -Lg, также содержит WAP (см. Saidi et al., 2007). В женском молоке отсутствуют и β -Lg, и WAP.

У людей и жвачных животных ген WAP является псевдогеном.

WAP функционирует как ингибитор протеиназы, участвует в терминальной дифференцировке в молочной железе и обладает антибактериальной активностью (обзоры см. Simpson and Nicholas, 2002; Hajjoubi et al., 2006; Martin et al., 2011).

MW WAP составляет 14-30 КДА (вариации могут быть обусловлены различиями в гликозилировании).

Уровень WAP в молоке кролика достигает 15 г/л, что делает ген WAP перспективным кандидатом для замены геном целевого белка для технологии CRISPR/Cas9.

Последовательность гена WAP кролика была взята из базы данных GenBank:

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Gene

Create RSS Save search Advanced Help

Name/Gene ID	Description	Location
☐ WAP ID: 100009255	whcy acidic protein [<i>Oryctolagus cuniculus</i> (rabbit)]	Chromosome 10, NC_013678.1 (45322775..45324498, complement)

WAP whcy acidic protein [*Oryctolagus cuniculus* (rabbit)]

Gene ID: 100009255, updated on 24-Jun-2020

Summary

Gene symbol	WAP
Gene description	whcy acidic protein
See related	Ensembl ENSOCUG00000022314
Gene type	protein coding
RefSeq status	PROVISIONAL
Organism	Oryctolagus cuniculus
Lineage	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Lagomorpha; Leporidae; Oryctolagus

Genomic context

Location: chromosome: 10

See WAP in [Genome Data Viewer](#)

Exon count: 4

Annotation release	Status	Assembly	Chr	Location
102	current	OryCun2.0 (GCF_000003625.3)	10	NC_013678.1 (45322775..45324498, complement)



GenBank ▾

Send to: ▾

Oryctolagus cuniculus breed Thorbecke inbred chromosome 10, OryCun2.0, whole genome shotgun sequence

NCBI Reference Sequence: NC_013678.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#) ▾

LOCUS NC_013678 1724 bp DNA linear CON 23-JUN-2016

DEFINITION Oryctolagus cuniculus breed Thorbecke inbred chromosome 10, OryCun2.0, whole genome shotgun sequence.

ACCESSION [NC_013678](#) REGION: complement(45322775..45324498)

VERSION NC_013678.1

DBLINK BioProject: [PRJNA42933](#)
BioSample: [SAMN02953624](#)
Assembly: [GCF_000003625.3](#)

KEYWORDS WGS; RefSeq.

SOURCE Oryctolagus cuniculus (rabbit)

ORGANISM [Oryctolagus cuniculus](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Lagomorpha;
Leporidae; Oryctolagus.

REFERENCE 1 (sites)

AUTHORS Lowe, T.M. and Eddy, S.R.

TITLE tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence

JOURNAL Nucleic Acids Res. 25 (5), 955-964 (1997)

PUBMED [9023104](#)

REMARK This is the methods paper for tRNAscan-SE.

COMMENT [REFSEQ INFORMATION](#): The reference sequence is identical to [CM000799.1](#).

Assembly Name: OryCun2.0

The genomic sequence for this RefSeq record is from the whole genome assembly released by the Broad Institute of MIT and Harvard as OryCun2.0 in August 2009 (see <http://www.broadinstitute.org/science/projects/mammals-models/rabbit/rabbit-genome-sequencing-project>). The original whole genome shotgun project has the accession AAGW00000000.2.



Location: 10-45-322-775-46-324-498

Gene: ENSOCUG00000022314

Gene-based displays

Summary

- Splice variants
- Transcript comparison
- Gene alleles

Sequence

- ### Secondary Structure

📖 Comparative Genomics

- Genomic alignments
- Gene tree
- Gene gain/loss tree
- Orthologues
- Paralogues
- Ensembl protein families

24 Ontologies

- GO: Molecular function
- GO: Cellular component
- GO: Biological process

Phenotypes

- Variant table
- Variant image
- Structural variants

- Gene expression

- Pathway

- Regulation

- External references

- Supporting evidence

ID History

- Gene history

 [Configure this page](#)

 Custom tracks

 Download sequence[Share this page](#)

 [Bookmark this page](#)

Gene: ENSOCUG00000022314

Description

Oryctolagus cuniculus whey acidic protein (WAP), mRNA. [Source RefSeq mRNA Acc: [NM_001002390.4](#)]

Location

Chromosome 10 45,322,775-45,324,498 reverse strand

OryCun2.0:CM000799.1

About this gene

This gene has 2 transcripts (splice variants), 58 orthologues, 6 paralogues and is a member of 1 Ensembl protein family

Transcripts

[Show transcript table](#)

Marked-up sequence ②

Download sequence

Exons ENSOCLG000000022314 exons All exons in this region

Markup loaded

```
>chromosome: DryCup2.0:10:45321775:45325498:-1
```

[illegible]

Стратегия модификации гена WAP (для CRISPR/Cas9)

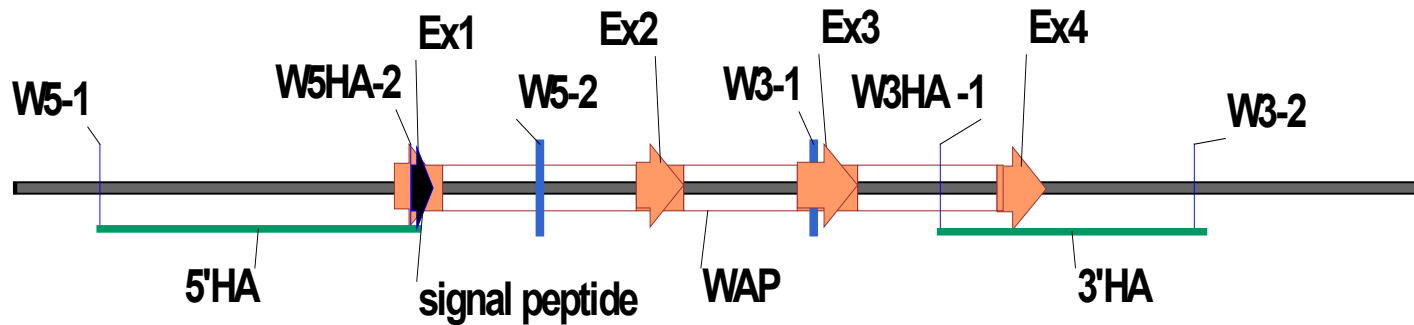


Схема выбора плечей гомологии гена *rbWAP* для создания ДНК-матрицы. 5'HA размером 840 п.н. включает в себя некодирующую часть 1-го экзона и 15 п.н. последовательности сигнального пептида. 3'HA размером 697 п.н. содержит фрагмент 3-го интрона и 4-й экзон (14 кодирующих из 130 п.н.). Указаны сайты связывания используемых праймеров.

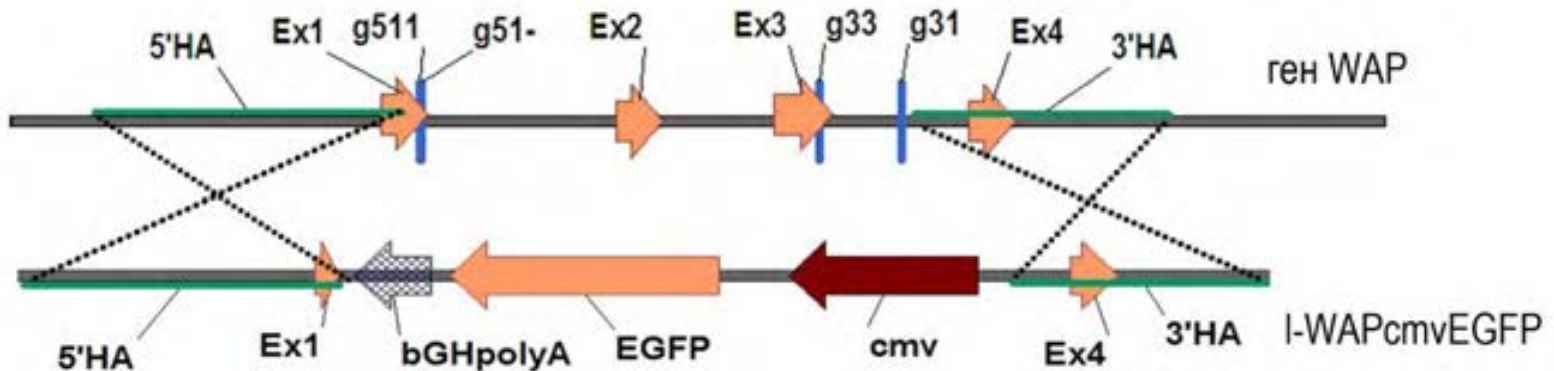


Схема гомологичной рекомбинации генной конструкции WAPcmvEGFP с геном *rbWAP*

Примечание. *G511*, *g51-*, *g31*, *g33* – мишени нРНК; 5'HA и 3'HA - плечи гомологии; показаны структурные элементы гена и конструкции.

2. Создание генной конструкции (HDR-матрица)

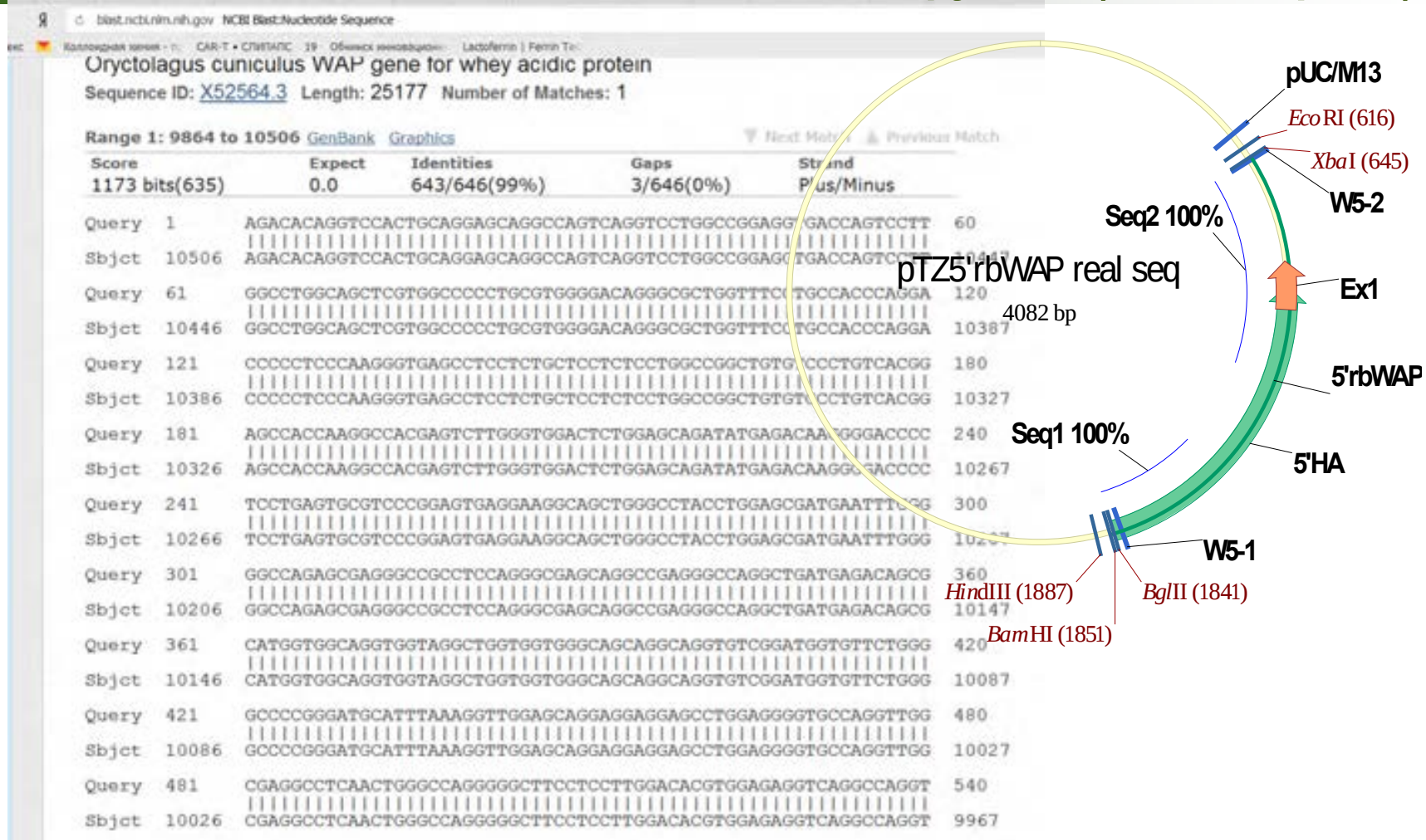
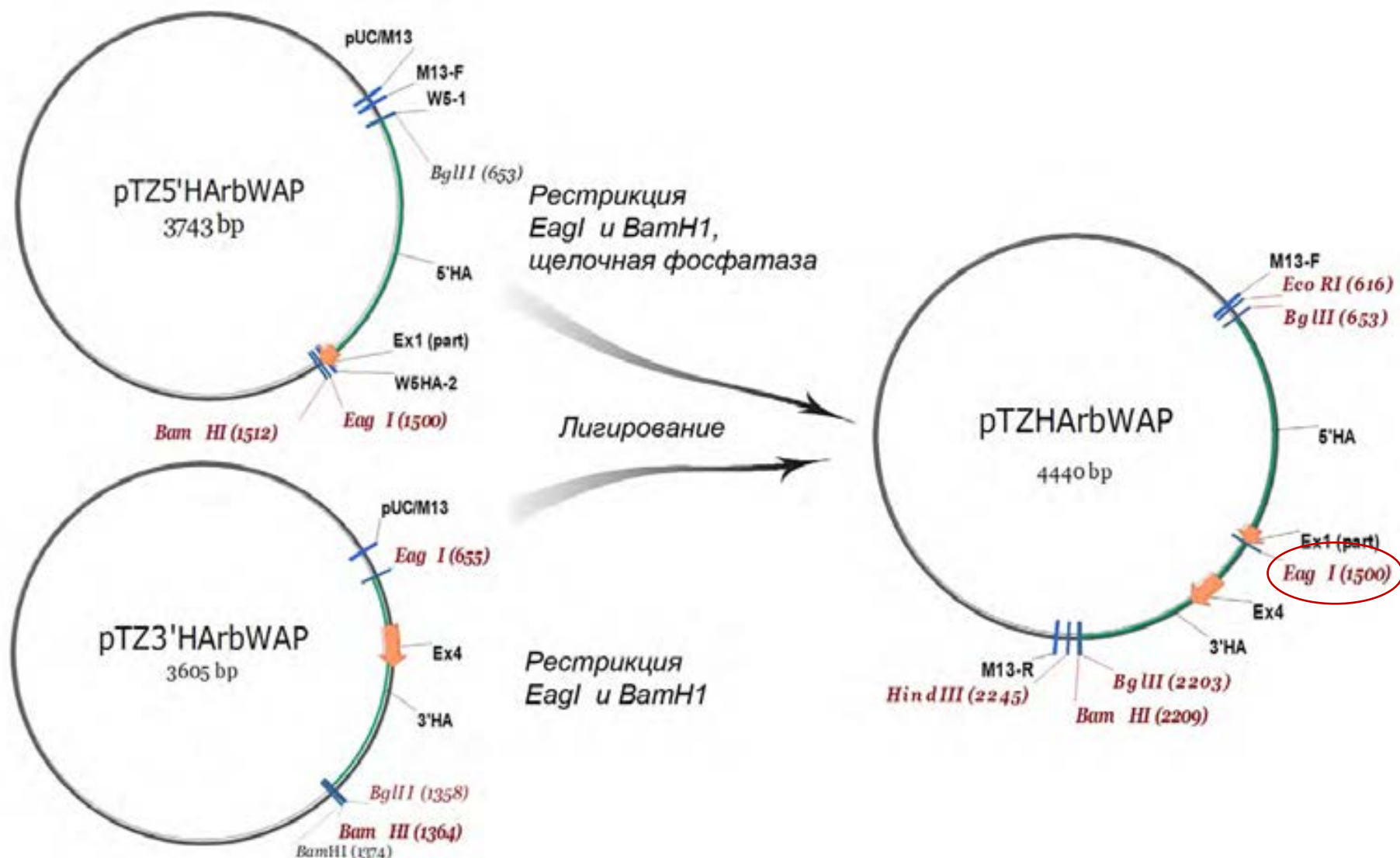


Рис.2. Сиквенс клонированных фрагментов (последовательность Seq2 на схеме). Поиск соответствия в программе Blast.

Сиквенс клонированной 5' области гена WAP кролика показал 100% совпадение последовательности с опубликованной

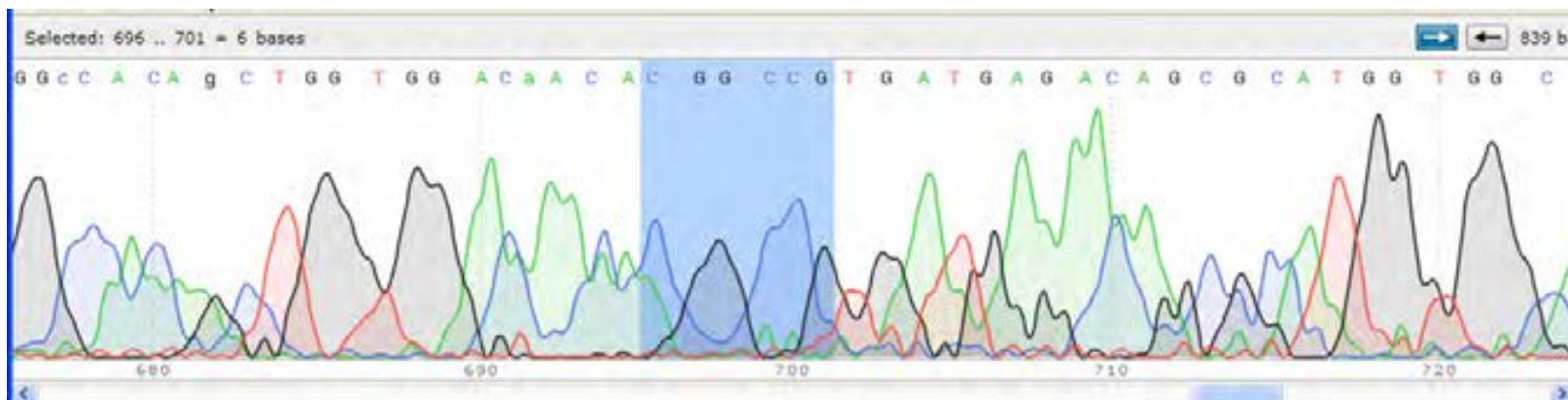
Создание генной конструкции (HDR-матрица)



С использованием коммерческой плазмиды pTZ57R/T была создана плазмида-матрица с уникальным сайтом рестрикции EagI, содержащая 5'- и 3'- плечи гомологии к гену WAP кролика.

Создание генной конструкции (HDR-матрица)

В место стыка плечей гомологии был введен сайт для рестриктазы *EagI* для клонирования ДНК целевого белка в плазмиду. Состав созданной плазмиды был подтвержден сиквенсом ее фрагментов:



Фрагмент секвенированной последовательности *pTZHArbWAP*, содержащий участок соединения 5'- и 3'- плечей гомологии к гену *rbWAP*. Выделена последовательность сайта рестрикции *EagI*.

Плазмида *pTZHArbWAP* предназначена для клонирования ДНК целевого фармакологически активного белка с перспективой получения трансгенных кроликов, продуцирующих рекомбинантные белки с молоком вместо кислого сывороточного протеина

Создание генной конструкции для HDR. Ген репортерного белка.

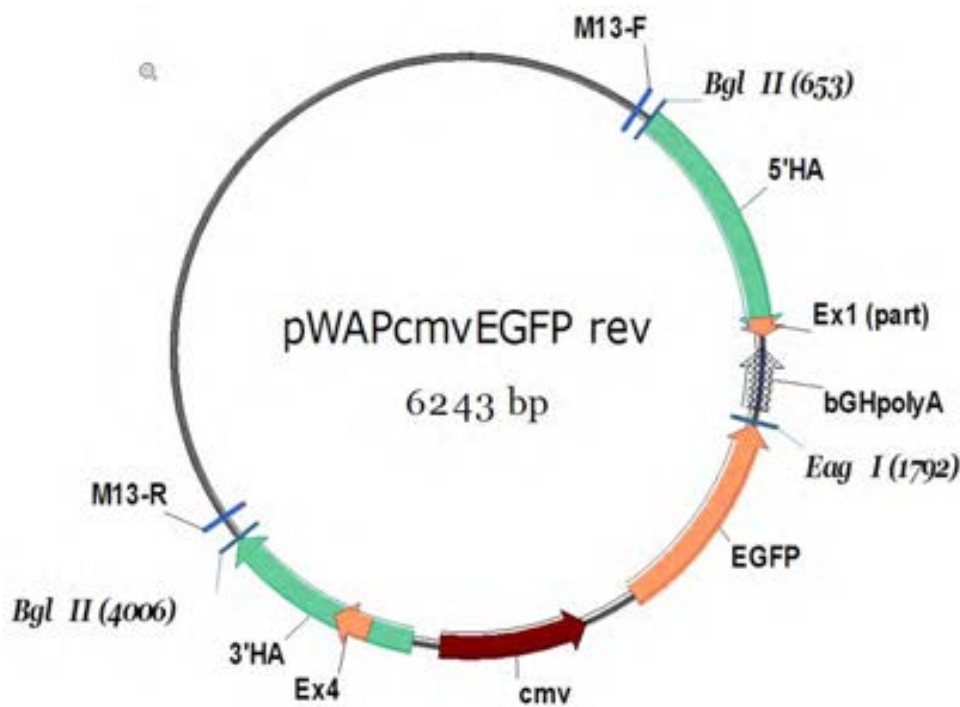
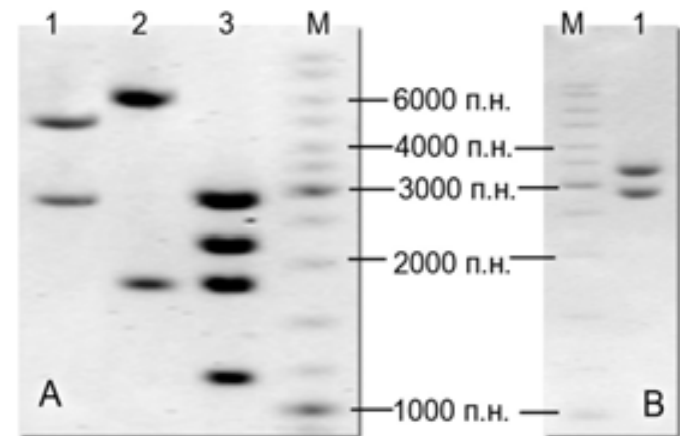


Схема плазмиды *pWAPcmvEGFP*, содержащей *cmvEGFP-bGHpolyA*, 5'*rbWAP* (5'HA) и 3'*rbWAP* (3'HA) плечи гомологии к гену *rbWAP*. Указаны основные элементы конструкции, сайты рестрикции.

Фрагмент *cmv-EGFP-bGHpolyA* с *EagI* липкими концами, вырезанный и очищенный из ранее созданной нами плазмиды, клонировали в подготовленную *pTZHArbWAP*.



Электрофореграмма рестриктных фрагментов плазмидной ДНК, выделенной из клонов 14 и 33.
1А - Плазмида клон 14 + *Bgl III*
2А - Плазмида клон 14 + *Eag I*
3А - Плазмида клон 14 + *Eag I* + *Bgl III*
1В - Плазмида клон 33 + *Bgl III*
М - маркер размеров ДНК

Праймеры, использованные для создания генной конструкции

Обозначение	5'-3' последовательность	Введенный сайт рестрикции	Назначение
W5-1	agatct ctgcgaggagctctgtgcct	BglII	Сиквенс 5'utr
W5-2	agacacaggtccactgcaggagcag	-	Сиквенс 5' интрон 1
W5HA-2	tac ggccg gatgagacagcgcacatgg	EagI	3' конец 5'HA
W3-1	atgctgtcccagttgtgtgaggagc	-	Сиквенс 3' экзон 3
W3-2	ggatcc agatct ttcttctgcgaggcctctgtgcacc	BamHI, BglII	Сиквенс 3'utr
W3HA-1	ttc ggccg tgtgtgccaccagctgtg	EagI	5' конец 3'HA
M13-F	gta aaa cga cgg cca gtg	-	Сиквенс,
M13-R	cag gaa aca gct atg ac	-	специф. рTZ57R/T
EGFP1	Agccat atggtgagcaagggcgaggagctgtt	NdeI	Детекция EGFP
EGFP2	agactcgagcggccgctttacttgtacagctc	XhoI	

В результате была получена плазмида pWAPcmvEGFP, которую в кольцевом или линейаризованном виде, вырезав генную конструкцию, можно использовать в качестве ДНК-матрицы для гомологичной рекомбинации с геном WAP с применением CRISPR/Cas9-компонентов.

Рестриктный анализ плазмиды показал, что фрагмент cmvEGFP-bGHpolyA в ней обратно ориентирован: поскольку вставка представляет собой независимую кассету экспрессии, ее ориентация в данном случае имеет значение только для последующей ПЦР-детекции.

Для создания компонентов CRISPR/Cas9 использовали плазмиду pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene plasmid # 42230, далее - pX330) [5]. ПЦР-амплификаты 5' и 3' плечей гомологии (5'HA и 3'HA), полученные с использованием праймеров, содержащих соответствующие сайты рестрикции, клонировали в плазмиду-вектор pTZ57R/T. В результате стандартных процедур была получена плазида pTZHArbWAP, содержащая плечи гомологии 5'HA и 3'HA к гену WAP, на стыке которых интегрирован сайт для рестриктазы *EagI*.

Поиск PAM в выбранных последовательностях гена rbWAP

```

ATCCGACACC TGCCTGCTGC CCACCACCAG CCTACCACCT GCCACCATGC GCTGTCTCAT CAGCCTGGCC CTCGGCCTGC TCGCCCTGGA GGCGGCCCTC
TAGGCTGTGG ACGGACGACG GGTGGTGGTC GGATGGTGGG CGGTGGTACG CGACAGAGTA GTCGGACCGG GAGCCGGACG AGCGGGACCT CCGCCGGGAG
GCTCTGGCCC CCAAAATTCAT CGCTCCAGGT AGGCCCAGCT GCCTTCCTCA CTCCGGGACG CACTCAGGAG GGGTCCCTTT GTCTCATATC TGCTCCAGAG
CGAGACCGGG GGTTTAAGTA GCGAGGTCCA TCCGGGTCGA CGGAAGGAGT GAGGCCCTGC GTGAGTCCTC CCCAGGGGAA CAGAGTATAG ACGAGGTCTC
TCCACCCAAG ACTCGTGGCC TTGGTGGCTC CGTGACAGGG ACACAGCCGG CCAGGAGAGG AGCAGAGGAG GCTCACCTTT GGGAGGGGGT CCTGGGTGGC
AGGTGGGTTC TGAGCACCGG AACCACCGAG GCACTGTCCC TGTGTGGGCC GGTCTCTCTC TCGTCTCTCT CGAGTGGGAA CCCTCCCCCA GGACCCACCG
  
```

Фрагмент **5'-последовательности** двухцепочечной ДНК *rbWAP* для поиска сайтов ДЦР. Серый фон – область поиска, 200 п.н.. Фрагмент 5'НА- подчеркнут. PAM-мотивы (5'-20b-NGG-3') для выбранных мишеней обозначены черными блоками: для *gRNA511* – AGG на верхней цепи, для *gRNA51* - TGG на нижней цепи ДНК.

```

GCAGGCGCCA ATGCTGTCCC AGTTGTGTGA GGAGCTGAGC GACTGTGCCA ACGACATCGA GTGCAGGGGC GACAAGAAGT GCTGCTTCAG CCGCTGCGCC
CGTCCGCGGT TACGACAGGG TCAACACACT CCTCGACTCG CTGACACGGT TGCTGTAGCT CACGTCCCCG CTGTTCTTCA CGACGAAGTC GGCGACGCGG
ATGCGCTATC TGGAAACCAT CCTAGGTATG TGTCTGAGC CCTCCCCAGG CAGGGCTGTC CCTTCAGCAG GGCCAGGGC TCAGGAGTGG ATGTGGGTGA
TACGCGATAG ACCTTGGGTA GGATCCATAC ACAGGACTCG GGAGGGGTCC GTCCCGACAG GGAAGTCGTC CCGGGTCCCG AGTCCTCACC TACACCCACT
GTGAAGGGCA CTCGGGGACG CAGGTGGCAG GCGGGACTTG GCCCTGGGTG GCTCACAGGC CAGCCTGTAC CTTTGCCACT GATCTGAGAG GGAGTGCAGC
CACTTCCCGT GAGCCCTGTC GTCCACCGTC CGCCCTGAAC CGGGACCCAC CGAGTGTCCG GTCGGACATG GAAACGGTGA CTAGACTCTC CCTCACGTCC
ACAGCTCCAG GTATCGGAGG AGTCGAAGGT TAGGAGCCTG GGGTGTGTG CACCAGCTGT GGCCTGCATA TTCCTTCCTA CAGAGGGGGG GGGGCAGAGG
TGTCGAGGTC CATAGCCTCC TCAGCTTCCA ATCTCGGAC CCCACAACAG GTGGTCGACA CCGGACGTAT AAGGAAGGAT GTCTCCCCC CCCGTCTCC
  
```

Фрагмент **3'-последовательности** двухцепочечной ДНК для поиска сайтов ДЦР. Серый фон – область поиска, 300 п.н.. Фрагмент 3'НА- подчеркнут. PAM-мотив для *gRNA31* – AGG и для *gRNA33* находятся на верхней цепи ДНК. Курсивом выделена часть 3-го экзона.

Программа CRISPOR v.4.8

<http://crispor.tefor.net/>

sequence

target sequence

position	start - end	+	-	20mer + PAM (total 23mer)	GC% of 20mer	Tm of 20mer
61 - 83	+			GCCCCAAATTCATCGTCCAGG [aRNA]	60.00 %	77.25
62 - 84	-			CCGCCAAATTCATCGTCCAGGT [aRNA]	50.00 %	72.30
64 - 86	-			CCCAATTCATCGTCCAGGTAG [aRNA]	45.00 %	69.67
65 - 87	+			CCAAATTCATCGTCCAGGTAGG [aRNA]	50.00 %	72.6
65 - 87	-			CCAATTCATCGTCCAGGTAGG [aRNA]	50.00 %	72.6
100 - 122	+			CCTCACTCCGGGACGCACTCAGG [aRNA]	70.00 %	80.4
156 - 178	-			CCAACCAAGACTCGTGGCCTTGG [aRNA]	65.00 %	79.1

sequence



position		target sequence	sequence information			restriction sites	number of target sites ?		
start	end	20mer+PAM (total 23mer)	GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer		20mer +PAM	12mer +PAM	8mer +PAM
61	83	+ GCCCCCAAATTCATCGCTCCAGG [gRNA]	60.00 %	77.25 °C	-	ApoI	1 [detail]	2 [detail]	754 [detail]
62	84	- CCCCAAATTCATCGCTCCAGGT [gRNA]	50.00 %	72.30 °C	-	ApoI	1 [detail]	4 [detail]	7150 [detail]
64	86	- CCCCAAATTCATCGCTCCAGGTAG [gRNA]	45.00 %	69.67 °C	-	ApoI	1 [detail]	3 [detail]	10072 [detail]
65	87	+ CCAAATTCATCGCTCCAGGTAGG [gRNA]	50.00 %	72.30 °C	-	ApoI	1 [detail]	5 [detail]	6829 [detail]
65	87	- CCAAATTCATCGCTCCAGGTAGG [gRNA]	50.00 %	72.67 °C	-	ApoI	1 [detail]	3 [detail]	4055 [detail]
100	122	+ CCTCACTCCGGGACGCACTCAGG [gRNA]	70.00 %	80.40 °C	-		1 [detail]	3 [detail]	1212 [detail]
156	178	- CCAACCAAGACTCGTGGCCTTGG [gRNA]	65.00 %	79.19 °C	-		1 [detail]	5 [detail]	4052 [detail]

<http://chopchop.cbu.uib.no/>

[illegible]

Для создания компонентов CRISPR/Cas9 использовали плазмиду pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene plasmid # 42230, далее - pX330).

Олигонуклеотиды для создания компонентов CRISPR/Cas9 системы

Обозначение	5'-3' последовательность	Назначение
G51-F	CACC <u>G</u> cctacctggagcgatgaatt	pX330-51-
G51-R	AAAC aattcatcgctccaggtagg <u>C</u>	
G511F	CACC gcccccaaattcatcgctcc	pX330-511
G511R	AAAC ggagcgatgaatttgggggc	
G31F	CACC <u>G</u> tatcggaggagtcgaaggtt	pX330-31
G31R	AAAC aaccttcgactcctccgata <u>C</u>	
G33R	AAAC gatagcgcatggcgcagcgg <u>C</u>	pX330-33
G33F	CACC <u>G</u> ccgctgcgccatgcgctatc	

С олигонуклеотидами для получения нРНК были созданы плазмиды pX330-511, pX330-51-, pX330-33 и pX330-31, кодирующие Cas9 и нРНК к соответствующим сайтам гена WAP (рисунок).

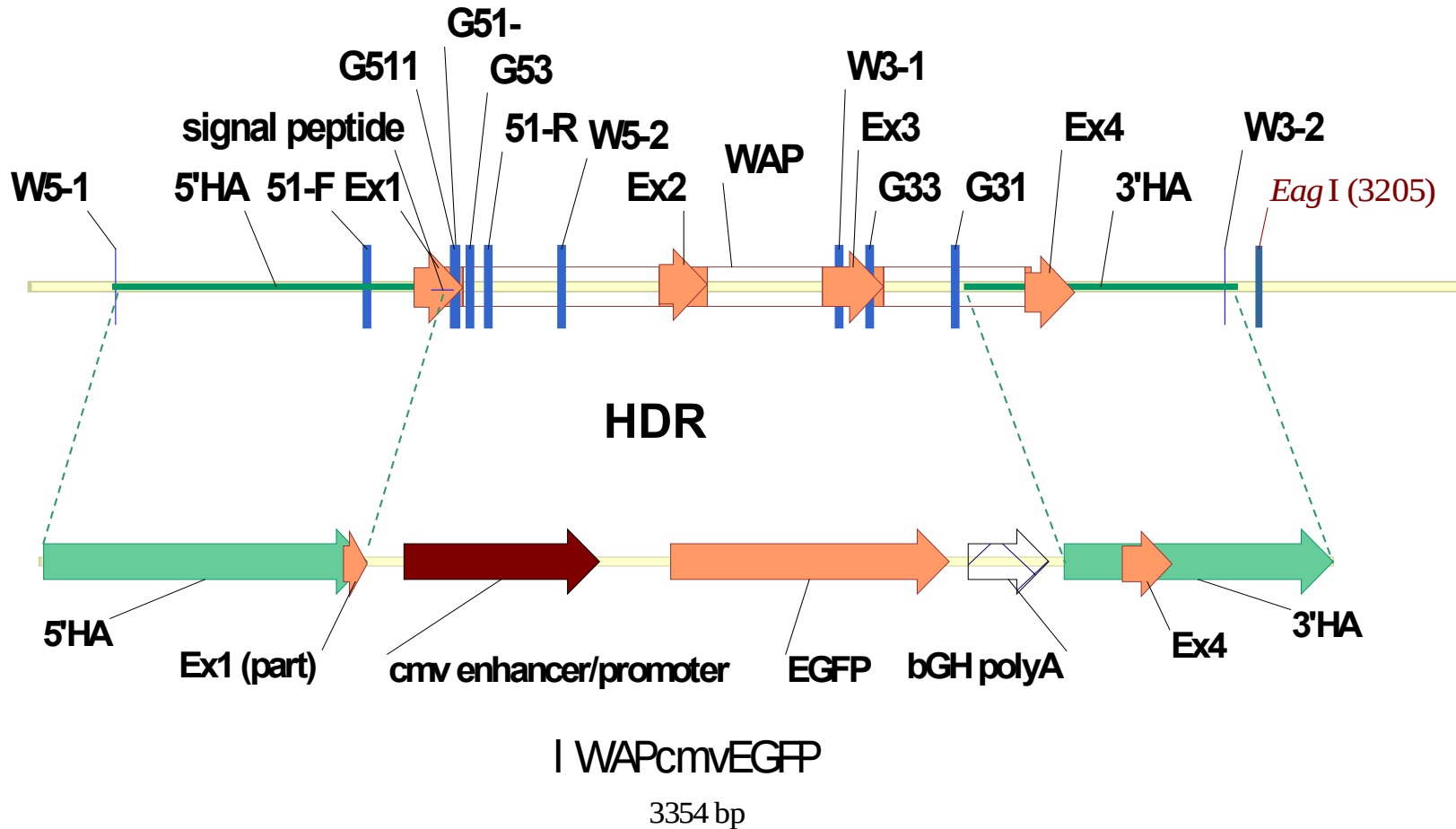
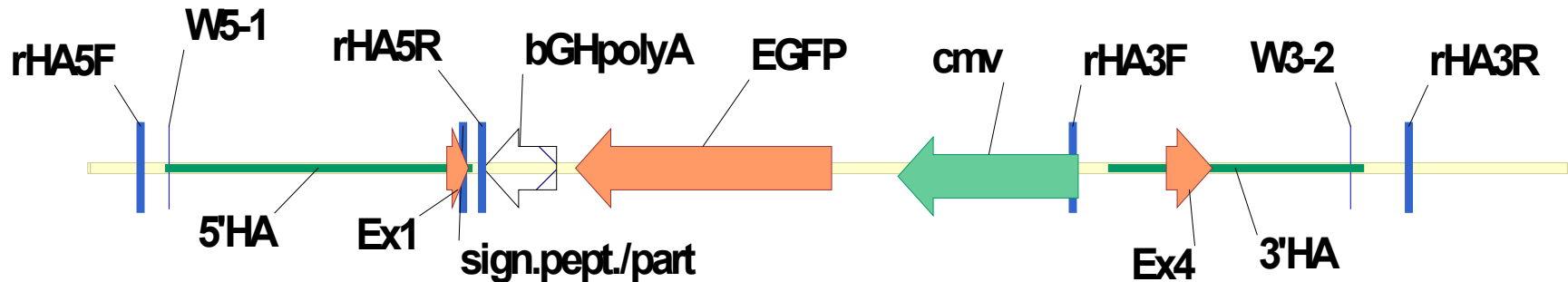


Схема гомологичной рекомбинации генной конструкции WAPcmvEGFP с геном rbWAP в результате работы CRISPR/Cas9 системы.

Показаны: G511, G51-, G31, G33 – мишени для гРНК; плечи гомологии 5'HA и 3'HA; структурные элементы гена и конструкции; праймеры.

4. Стратегия анализа модификаций. HDR.

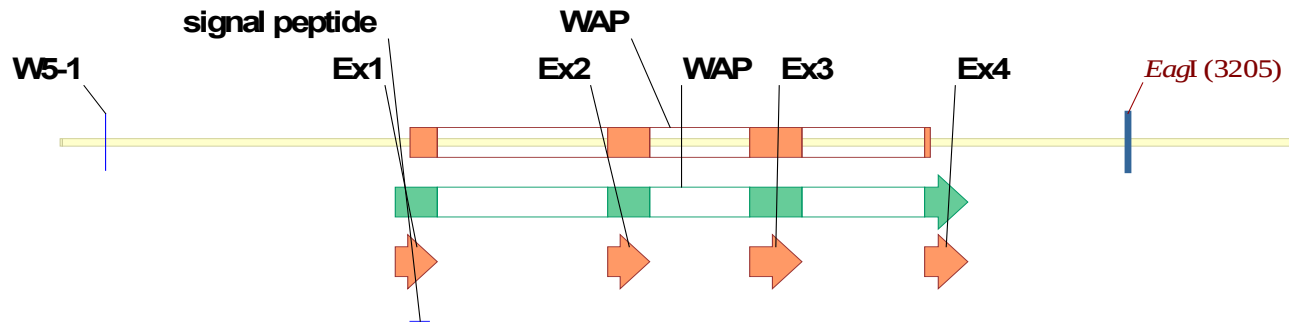


rbWAPcmvEGFPprev - HDR
4152 bp

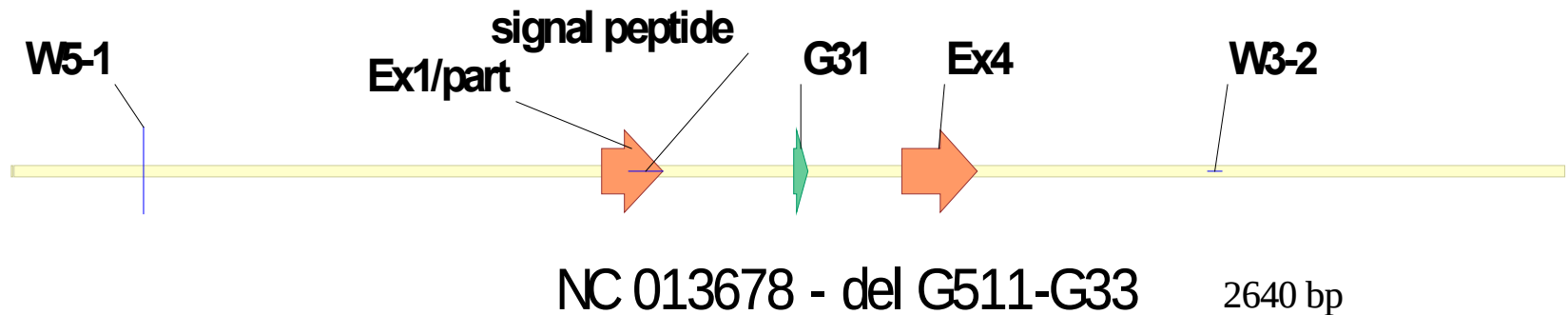
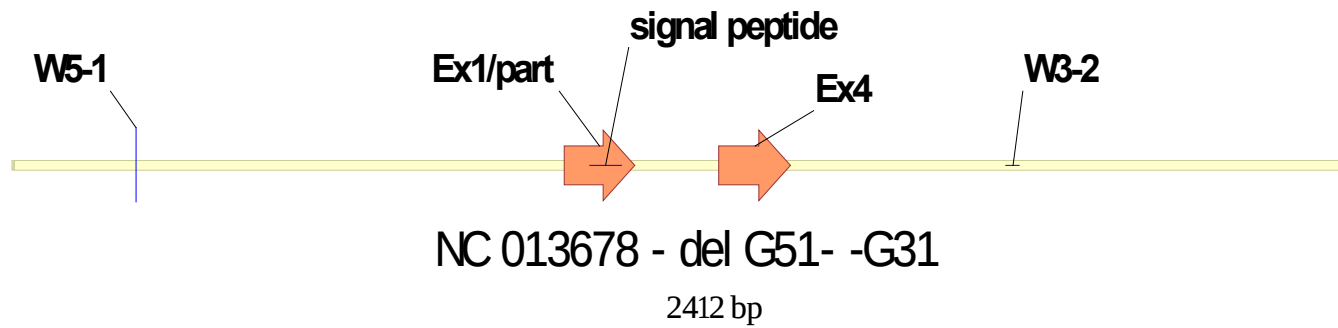
Таблица 3. ПЦР-анализ возможной HDR

Пара праймеров	ПЦР-амплификат, п.н.	
	WT	ГМ животное, эмбрион (модификация)
rHA5F/rHA5R	-	5'HA для HDR (с учетом обратной ориентации cmvEGFP) 981
rHA3F/rHA3R	-	3'HA для HDR (с учетом обратной ориентации cmvEGFP) 968

4. Стратегия анализа модификаций. NHEJ.



Варианты репарации гена rbWAP нехомологичным соединением концов (NHEJ). Большие делеции.



ПЦР-анализ возможных NHEJ модификаций гена *rbWAP*, полученных с использованием компонентов CRISPR/Cas9 системы

Пара	ПЦР-амплификат, п.н.		Примечания
	WT	ГМЖ (модификация)	
P51R/P51F	99	<99 ($\Delta G51^-$; $\Delta G511$; $\Delta G51^-/G511$)	ПААГ
P31R/P31F	94	<94 ($\Delta G31$)	ПААГ
P33R/P33F	103	<103 ($\Delta G33$)	ПААГ
P33R/P31F	331	≤ 331 ($\Delta G31$, $\Delta G33$) ≈ 100 ($\Delta G31/G33$)	АГ
P51R/P31F	1420	≈ 100 для $\Delta G511(G51^-)/G31$; ≈ 300 для $\Delta G511(G51^-)/G33$	АГ
W5-1/W3-2	2937	≈ 1600 для $\Delta G511(G51^-)/G31$; ≈ 1800 для $\Delta G511(G51^-)/G33$	АГ
P51R/W5-2	355	≤ 355 ($\Delta G51^-$, $\Delta G511$)	АГ

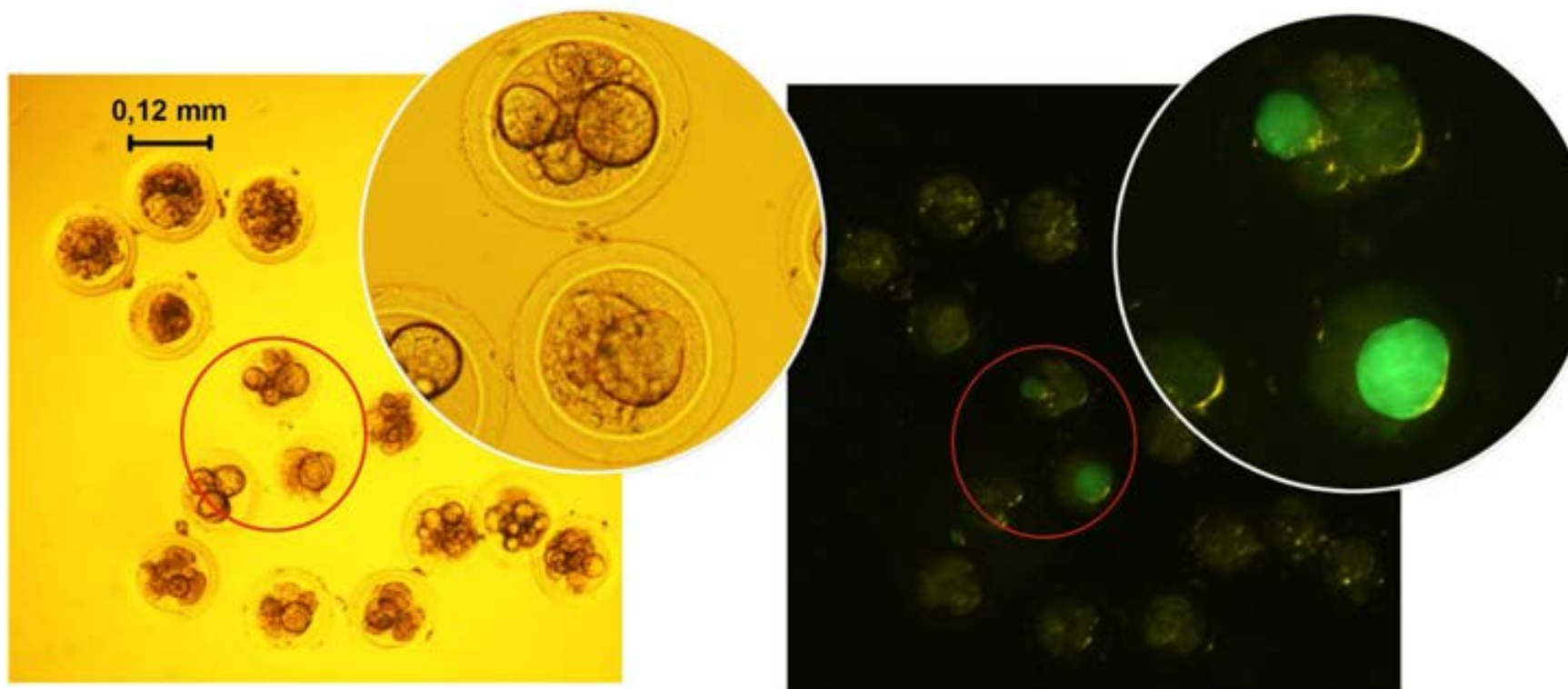
Праймеры для ПЦР-анализа модификаций гена *rbWAP*

Обозначение	5'-3' последовательность	Положение, назначение
P51F	Gagtgaggaaggcagctgg	1-й интрон начало
P51R	tctcatcagcctggccct	1-й экзон
P31F	ggaatatgcaggccacagct	3-й интрон
P31R	gatctgagagggagtgcagc	3-й интрон
P33F	gggaggggctcaggacacata	3-й интрон начало
P33R	tgtgccaacgacatcgagtg	
rHA5F	Tgtggaacccacaaaggacg	5'utr < 5'HA, для HDR
rHA5R	Atagcaggcatgctggggat	3' конец bGH polyA для HDR
rHA3F	Cgtaagtattgtaacgcggaactcc	5' конец cmv для HDR
rHA3R	Ccatgacctagctgctctccatta	3'utr > 3'HA, для HDR

- ❖ Была создана плаزمида pTZHArbWAP, содержащая плечи гомологии к гену WAP кролика, с уникальным сайтом рестрикции на их стыке. Плазмида предназначена для интеграции в нее нуклеотидных последовательностей биологически активных белков с перспективой получения ГМ кроликов, продуцирующих рекомбинантные белки с молоком вместо кислого сывороточного протеина
- ❖ Была создана генетическая конструкция, включающая в себя ген зеленого флуоресцентного белка под цитомегаловирусным промотором (фрагмент cmvEGFbGHPpolyA), фланкированный плечами гомологии к 5'- и 3'- областям гена WAP кролика.

Для оценки эффективности сайт-специфической интеграции трансгена на эмбриональном уровне в условиях *in vitro* с применением CRISPR/Cas9

- ❖ Были подобраны последовательности направляющих РНК (нРНК) для делеции фрагмента гена WAP,
- ❖ Была разработана система оценки потенциальных генетических модификаций: делеций, инсерций, репарации гена гомологичной рекомбинацией с участием ДНК-матрицы (генетической конструкции).



Эмбрионы кролика, культивированные 5 суток после микроинъекции в пронуклеус компонентов CRISPR/Cas9 системы – плазмид рХ330 и генной конструкции, содержащей плечи гомологии к гену WAP кролика и ген зеленого флуоресцентного белка, при использовании CRISPR/Cas9 технологии.
Фотографии сделаны в видимом (слева) и в синем свете (справа).

Литература

1. Шепелев М. В., Калиниченко С. В., Дейкин А. В., Коробко И. В. Получение рекомбинантных белков из молока трансгенных животных: современное состояние и перспективы// АСТА NATURAE. 2018. Т.10. № 3(38). С.42-50.
2. Bosze Z., Hiripi L., Carnwath J.W., Niemann H. The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins// Transgenic. Res. 2003. V.12. P.541–553.
3. Maertens L., Lebas F., Szendrő Zs. Rabbit milk: a review of quantity, quality and non-dietary affecting factors // World Rabbit Sci. 2006. Vol.14. P.205-230.
4. Колоскова Е.М., Каркищенко В.Н., Езерский В.А., Петрова Н.В., Максименко С.В. Трансгенные и нокаутные кролики в биомедицине и генотерапии. CRISPR/CAS9-технологии (обзор) // Биомедицина. 2019. №4. С.12-33.
5. Мензоров А.Г., Лукьянчикова В.А., Кораблев А.Н., Серова И.А., Фишман В.С. Практическое руководство по редактированию геномов системой CRISPR/Cas9// Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. Т.20. № 6. С.930-944.



*Спасибо
за внимание!*