

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/00 (2024.08); A01K 67/0276 (2024.08)

(21)(22) Заявка: 2023135688, 28.12.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.12.2023Дата регистрации:
03.02.2025

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.12.2023

(45) Опубликовано: 03.02.2025 Бюл. № 4

Адрес для переписки:

308015, г.Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Токтарева Татьяна Михайловна

(72) Автор(ы):

Покровский Михаил Владимирович (RU),
Луговская Екатерина Сергеевна (RU),
Покровский Владимир Михайлович (RU),
Патраханов Евгений Александрович (RU),
Лебедев Петр Романович (RU),
Корокин Михаил Викторович (RU),
Карагодина Анастасия Юрьевна (RU),
Сушкова Дарья Николаевна (RU),
Воронина Диана Георгиевна (RU),
Дейкин Алексей Васильевич (RU),
Казбан Николай Егорович (RU),
Куприенко Татьяна Эдуардовна (RU),
Егорова Татьяна Владимировна (RU),
Савченко Ирина Михайловна (RU),
Усачев Евгений Валерьевич (RU),
Хохлова Наталья Сергеевна (RU),
Гончарова Татьяна Николаевна (RU),
Осипьян Сергей Игоревич (RU),
Бахмудова Елизавета Александровна (RU),
Курбатова Александра Андреевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2701662 С9, 30.09.2019.ДИМИТРИЕВА Т.В. и др. Модификация
метода анализа результатов редактирования
генома с помощью системы CRISPR/Cas9 на
предимплантационных эмбрионах мыши,
Вестник РГМУ, 2016, no. 3, pp. 16-22.
КОЛОСКОВА Е.М. и др. Трансгенные и
нокаутные кролики в биомедицине и
генотерапии. CRISPR/Cas9-технологии (обзор),
Биомедицина, в. (см. прод.)

(54) Способ получения кролика с нокаутом гена CSN2

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к способу получения кролика с нокаутом гена CSN2 (β -cas). Указанный способ включает редактирование гена CSN2 (β -cas) методом CRISPR/Cas9, для чего зиготы, оцененные как нормальные, подвергают процедуре микроинъекции генетической конструкцией, которая представляет собой смесь

из sgRNA и фермента CRISPR/Cas9 в соотношении 1:1, отделяют живые эмбрионы от погибших в результате микроинъекции и осуществляют трансплантацию эмбрионов самкам-реципиентам. Настоящее изобретение обеспечивает получение кролика с нокаутом гена CSN2 (β -cas), обладающего возможностью секреции кроличьего молока без β -казеина. 3 ил., 5 пр.

(56) (продолжение):

15, no. 4, 2019, pp. 12-33. US 2021161111 A1, 03.06.2021.

R U 2 8 3 4 0 1 6 C 1

R U 2 8 3 4 0 1 6 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 15/00 (2006.01)
A01K 67/0276 (2024.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 15/00 (2024.08); *A01K 67/0276* (2024.08)

(21)(22) Application: **2023135688, 28.12.2023**

(24) Effective date for property rights:
28.12.2023

Registration date:
03.02.2025

Priority:

(22) Date of filing: **28.12.2023**

(45) Date of publication: **03.02.2025** Bull. № 4

Mail address:

**308015, g.Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Toktareva Tatyana Mikhajlovna**

(72) Inventor(s):

**Pokrovskii Mikhail Vladimirovich (RU),
Lugovskaia Ekaterina Sergeevna (RU),
Pokrovskii Vladimir Mikhailovich (RU),
Patrakhonov Evgenii Aleksandrovich (RU),
Lebedev Petr Romanovich (RU),
Korokin Mikhail Viktorovich (RU),
Karagodina Anastasiia Iurevna (RU),
Sushkova Daria Nikolaevna (RU),
Voronina Diana Georgievna (RU),
Deikin Aleksei Vasilevich (RU),
Kazban Nikolai Egorovich (RU),
Kuprienko Tatiana Eduardovna (RU),
Egorova Tatiana Vladimirovna (RU),
Savchenko Irina Mikhailovna (RU),
Usachev Evgenii Valerevich (RU),
Khokhlova Natalia Sergeevna (RU),
Goncharova Tatiana Nikolaevna (RU),
Osipian Sergei Igorevich (RU),
Bakhmudova Elizaveta Aleksandrovna (RU),
Kurbatova Aleksandra Andreevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi
natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD OF PRODUCING RABBIT WITH GENE CSN2 KNOCKOUT**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, in particular to a method for producing a rabbit with gene knockout CSN2 (β -cas). Said method involves editing the CSN2 (β -cas) by CRISPR/Cas9 method, for which zygotes, assessed as normal, are subjected to microinjection procedure with genetic construct, which is a mixture of sgRNA and CRISPR/Cas9 enzyme in

ratio 1:1, living embryos are separated from dead ones as a result of microinjection and embryos are transplanted to female recipients.

EFFECT: present invention enables to obtain a rabbit with a CSN2 (β -cas) gene knockout, capable of secreting rabbit milk without β -casein.

1 cl, 3 dwg, 5 ex

RU 2 834 016 C1

RU 2 834 016 C1

Изобретение относится к биотехнологии, молекулярной биофармакологии, сельскому хозяйству и может быть использовано для получения кроликов, с секрецией кроличьего молока без β -казеина, пригодного в качестве сырья для получения гипоаллергенных молочных продуктов для пищевой, фармакологической и химической промышленности.

5 В рамках данной заявки используются следующие термины

sgRNA - это аббревиатура от «одионочной гидовой РНК», специальная единая направляющая РНК (sgRNA), которая содержит нацеливающую последовательность (последовательность crRNA) и последовательность, рекрутирующую нуклеазу Cas9 (tracrRNA).

10 Нокаут гена - это метод молекулярной генетики, при котором из организма удаляют или делают неработоспособными определённые гены. Таким образом получают организм, «нокаутный» по неработающим генам. Нокаутные организмы помогают узнать функции генов, нуклеотидная последовательность которых известна.

“Нокаутный организм” (например, животное или клетка) относится к организму, в 15 котором экспрессия или функция гена частично или полностью делетируется и включает геномный и функциональный нокауты, индуцируемый и конститутивный нокауты.

Молоко является важной составляющей ежедневного рациона взрослых и детей различного возраста, считается древнейшим продуктом с незапамятных времен и доныне питающим человека. Молочные белки вызывают большее насыщение, чем 20 жиры и углеводы. Этот эффект исходит из комбинированного действия интактных белков, пептидов и аминокислот [Akhavan T., Panahi S., Anderson G. H., Luhovyy B. L. Application of dairy-derived ingredients in food intake and metabolic regulation. In: M. Corredig, ed. Dairy-derived ingredients: Food and nutraceutical uses. - Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd, 2009. - P. 212-237]. Однако известно, что на компоненты молока могут 25 вызывать аллергические реакции. Приблизительно каждый 50-ый ребенок и каждый 100-ый взрослый человек страдает от аллергий на молоко и молочные продукты. Было доказано, что β -казоморфин из β -казеина молока может функционировать как иммуносупрессант таким образом нарушать толерантность клеток иммунной системы. Данный процесс может лежать в основе развития сахарного диабета (СД) 2-го типа 30 [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; 287 (16): 2081-2089.] При этом иные формы казеина не являются или являются многократно менее частыми аллергенами.

β -казеиновые белки составляют около 80% от общего количества белков молока и 35 могут быть представлены одним из двух главных генетических вариантов: A1 и A2. Разница между A1 и A2 заключается в замене аминокислоты пролин на гистидин в 67-й позиции белковой молекулы благодаря точечной мутации в гене A1 β -казеина. Следует понимать, что A1-подобные типы бета-казеина вызывают воспаление в кишечнике, а также являются возможной причиной усиления воспалительной реакции для расстройств 40 различной этиологии. [Мохаммад Райес Ул Хак • Раджив Капила • Рохит Шарма • Вамши Салиганти • Суман Капила Европейский журнал диетологии (2014) Сравнительная оценка двух типов молочного бета-казеина (A1 и A2) по Th2-опосредованной воспалительной реакции в кишечнике мышей DOI 10.1007/s00394-013-0606-7].

45 Следовательно, снижение содержания β -казеина в молочных продуктах обусловлено потребностью получения гипоаллергенных молочных продуктов.

На сегодняшний день, все чаще используют трансгенных и нокаутных животных в качестве биореакторов. Например, трансгенные животные, секретирующие в молоко

гормоны, ферменты, антитела, факторы свертывания крови и роста и др., уже давно используют как биореакторы, т. е. продуценты биологически активных лекарственных белков человека. Консервативно эти же белки обычно выделяли из донорской крови, что приводило к дефициту необходимых лекарственных средств.

5 В Англии в 1988 г. впервые удалось получить трансгенных овец, продуцирующих с молоком фактор свертывания крови, необходимый для лечения людей, больных гемофилией.

Были созданы различные виды трансгенных животных, в молоке которых секретируются моноклональные антитела, эритропоэтин, инсулиноподобный фактор
10 роста, интерлейкины, белки теплового шока и пр.

В России в 1995 г. были предприняты попытки создать овец, продуцирующих химозин. Это ключевой фермент сыроделия, его традиционно выделяют из слизистой оболочки сычуга забитых молочных телят и ягнят.

Известен способ получения трансгенного животного, а именно свиньи, в геном
15 которой включен ген HSP70 или его фрагмент, в результате чего указанная трансгенная свинья сверхэкспрессирует HSP 70 в различных органах и в том числе в молочных железах (патент US2005260746 A1, опубликовано 2005-11-24). Согласно изобретению, трансгенных свиной получают путем введения трансгенов в зародышевую линию свиной. Введение трансгена в эмбрион можно осуществить любыми методами, известными в
20 данной области, такими как, например, микроинъекция, электропорация или липофекция. После введения трансгенной конструкции в оплодотворенную яйцеклетку яйцеклетку можно инкубировать *in vitro* в течение короткого времени или реимплантировать суррогатному хозяину, или и то, и другое. Трансгенное потомство может быть проверено на наличие и/или экспрессию трансгена любым соответствующим методом. Из 12
25 рожденных поросят только 2 поросенка несли трансген, т.е. выход составил 16,7 %.

Известен способ получения трансгенных кроликов, продуцирующих белки в молочную железу (RU 2402211 C2, Опубликовано: 27.10.2010). Способ предусматривает смешивание экзогенной ДНК, человеческих моноклональных антител и сперматозоидов кролика с последующим искусственным осеменением самок кролика. Получаемые в
30 потомстве самки способны стабильно продуцировать в молоко целевой рекомбинантный антиген.

Описан способ получения трансгенных мышей (RU 2644663 C). Первичные трансгены были получены методом микроинъекций раствора ДНК в ТЕ-буфере (концентрация ДНК 5 нг/мкл) в мужской пронуклеус оплодотворенных яйцеклеток мышей гибридной
35 линии (CBAxС57BL/6)F1 с последующей пересадкой выживших микроинъекцированных зигот псевдобеременным реципиентам. Техническим результатом настоящего изобретения является получение биологически активного, рекомбинантного человеческого БТШ70, экспрессируемого в молоке трансгенных мышей.

Известны современные мировые достижения по созданию кроликов - биомоделей
40 заболеваний человека с использованием технологий геномного редактирования, явления мозаицизма. В их числе нокаут генов: APOE, CD36, LDLR, RyR2, CFTR (трансмембранный регулятор муковисцидоза), APOC3, SCARB1 (белок липидного метаболизма - scavenger receptor class B member1), LEP (лептин) и LEPR (рецептор лептина). (<https://cyberleninka.ru/article/n/transgennyye-i-nokautnyye-kroliki-v-biomeditsine-i-genoterapii-crispr-cas9-tehnologii-obzor/viewer>).
45

Однако из уровня техники неизвестен способ получения кролика, обладающий возможностью секреции молока без β -казеина, которое можно использовать в качестве сырья для производства гипоаллергенных молочных продуктов в пищевой,

фармакологической и химической промышленности.

Задача изобретения заключается в создании нокаутного кролика, обладающего возможностью секреции молока без β -казеина.

5 Техническим результатом является создание кролика путем нокаута гена CSN2 (β -cas), что обеспечит секрецию кроличьего молока без β -казеина для производства гипоаллергенных молочных продуктов в пищевой, фармакологической и химической промышленности.

Поставленная задача решается путем создания кролика с нокаутом гена CSN2 (β -cas) методом редактирования генома CRISPR/Cas 9.

10 Ген CSN2 (β -cas) локализуется на 15 хромосоме (>chromosome:OryCun2.0:15:79884153:79895220:1), имеет 9 экзонов.

Для микроинъекции с помощью инструмента онлайн поиска CHOPCHOP отбирают sgRNA с характеристикой: sgRNA-sg31; Intron- 7 ; Sequence (5'-3'; PAM shown in brackets)-GGGCTATTGGTTGAACCACAGGG); Coordinates - chromosome:OryCun2.0:15:79891440:15 79892062:1),

Микроинъекцию эмбрионов осуществляют генетической конструкцией CSN2, которая представляет собой смесь из sgRNA и фермента CRISPR-cas 9, в соотношении 1:1, затем проводят трансплантацию эмбрионов, после получения потомства проводят генетический анализ потомства путем генотипирования кроликов, полученных от самок реципиентов с последующим анализом данных секвенирования.

Изобретение характеризуют следующие изображения.

Фиг. 1. Изображение проведения микроинъекции, где слева - манипуляционный капилляр для захвата эмбрионов в камере, изготовленный в микрокузнице; справа - микроинъекционная игла, изготовленная в пулере Sutter Instrument Company P-97; в центре - эмбрион кролика.

Фиг.2. Изображение электрофореза ПЦР, где образцы 2-19 номера животных, родившихся после трансплантации; kдоp-контрольный образец; 100bp+ маркер длин ДНК(«Евроген»).

Фиг.3. Таблица «Анализ секвенирования образцов в интернет-ресурсе «Synthego» Reverse последовательность».

Пример 1. Разработка генетической конструкции.

Создание нокаута гена кролика осуществляли методом редактирования генома CRISPR/Cas. Ген CSN2 (β -cas) локализуется на 15 хромосоме (>chromosome:OryCun2.0:15:79884153:79895220:1) имеет 9 экзонов. С помощью инструмента онлайн поиска CHOPCHOP, была отобрана химерная направляющая РНК sgRNA.

Было предположено, что выбранная sgRNA не будет иметь нецелевых сайтов с менее чем тремя несоответствиями и была протестирована в серии контрольных экспериментов. Характеристика направляющей РНК выбранной для микроинъекции: sgRNA-sg31; Intron- 7 ; Sequence (5'-3'; PAM shown in brackets)-GGGCTATTGGTTGAACCACAGGG); Coordinates - chromosome:OryCun2.0:15:79891440:40 79892062:1).

Разработанная генетическая конструкция CSN2 представляет собой смесь из sgRNA и фермента CRISPR/Cas9, в соотношении 1:1.

Пример 2. Микроинъекция эмбрионов.

45 Зиготы, оцененные как нормальные, были подвергнуты процедуре микроинъекции генетической конструкцией CSN2, которая представляет собой смесь из sgRNA и фермента CRISPR/Cas9, в соотношении 1:1.

Микроинъекцию генетической конструкцией CSN2 в количестве 2,5 нанограмма(ng)

проводили через пневматический микроинъектор Eppendorf FemtoJet 4i» (Eppendorf, США) с помощью гидравлических микроманипуляторов (Narishige group, Япония) под визуальным контролем через инвертированный исследовательский микроскоп «NIKON ECLIPSE TS2R» (Nikon, Япония). Изготовление микроинъекционных игл для прокалывания осуществляли на «пуллере микропипеток Флеминга-Брауна Р-97».

Изготовление капилляров для фиксации яйцеклеток производили с помощью пуллера для вытягивания капилляров «Narishige Р-1000» (Япония) и микрокузницы «Narishige MF-900» (Япония). Микроинъекции производили в одно и то же время суток, одним оператором (фиг.1).

10 Пример 3. Трансплантация эмбрионов.

После проведения микроинъекции эмбрионов оценивали их целостность и отделяли живые эмбрионы от погибших в результате микроинъекции. Трансплантацию эмбрионов осуществляли самкам-реципиентам с визуализируемой красной вульвой после ссаживания с вазектомированным самцом после успешно завершеного коитуса. Все оперативные вмешательства были произведены под наркозом Zoletil 100 + Медитин 1 мг/мл в дозах 0,75 мг/кг и 0,05 мг/кг соответственно. Был произведен разрез по белой линии живота на 5 см выше тазовой линии. Эмбрионы были помещены в воронку яйцевода как в правый, так и в левый рог. После проведения манипуляции ткани ушивали. После операции животное до выхода из наркоза находилось под наблюдением ветеринарного врача.

20 Пример 4. Генетический анализ потомства.

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. По достижению потомством возраста 2 недели, животным был присвоен индивидуальный номер путем установки клипсы в область хряща ушной раковины с последующим помещением биопсийного материала в пробирку типа эппендорф. К образцам биопсийного материала добавляли лизирующий буфер (NaOH+ ЭДТА ph 12.2) и инкубировали в термостате ГНОМ «программируемый» (ДНК-технологии, Россия) при температуре 90 градусов в течении 1,5 часов. Для реакции ПЦР были синтезированы компанией Евроген (Россия) праймеры: Forward 5'CGG TCC CCT TTG TTG ACT CT3' Referens 5'GAG CTC TTG AAC TTA TTC CAC CA 3'. ПЦР реакция была проведена с использованием реагента GenPak® PCR Core (12x8) согласно инструкции. Протокол реакции ПЦР: (Denaturation 95°C - 5 min; Cycle denaturation 95°C - 30 sec; Annealing 58°C - 30 sec; Elongation 72°C - 40 sec Go to (2) x30; Final elongation 72°C - 3 min; Freeze 4C-forever). Затем проводили горизонтальный гель-электрофорез в камере SERVA BlueMarine 200 с использованием источника питания Invitrogen PowerEase Touch 350W (Thermo Scientific). Для проведения электрофореза был приготовлен 2% агарозный гель с использованием агарозы LE2 (Lonza Rockland, inc. США) и добавлением этидия бромида (UN2810, Германия) в расчете 10мг/мл агарозного геля. Протокол проведения электрофореза: 150W, 1 час. После проведения электрофореза результаты фиксировали при помощи системы GEIDOC (Birad, США). Затем амплификат очищали для проведения секвенирования с использованием Clean up mini (Евроген, Россия). Анализ образцов проводился с помощью интернет-ресурса «Decodr» и «Syntego».

45 В результате проведения серии экспериментов по созданию кролика с нокаутом в гене CSN2 методом CRISPR/Cas9 было подготовлено 150 самок доноров, получено 2110 эмбрионов из которых 1987 эмбрионов характеризовали как нормальные и 123 как аномальные. В результате проведения микроинъекций было получено 640 живых

клеток, которые были пересажены 32 самкам реципиентам. В результате было получено 17 особей от самок реципиентов.

Пример 5. Анализ данных секвенирования кроликов, полученных от самок реципиентов.

5 В результате генетического анализа 17 особей потомства от самок реципиентов было получено 4 кролика с нокаутом гена CSN2, т.е. 23,5%.

По результатам анализа секвенирования Reverse последовательности было выделено четыре образца: 177, 178, 182, 183 (таблица на фиг.3), которые соответствуют 2,6,7,13 номерам животных на фигуре 2.

10 Образец 178 по результатам программы имеет индекс нокаута 72, однако данное животное является мозаиком с четырьмя вариантами нокаута гена в организме, причем в 1 случае инсерция одного нуклеотида после векторной последовательности, в остальных трех случаях это делеция на 38,27,35 нуклеотид соответственно.

15 Образец 183 имеет индекс нокаута 8, основываясь на результатах программы животное является мозаиком с шестью вариантами изменения генома в соматических клетках, причём в трех случаях это инсерция в размере 18,17,1 нуклеотид и в трех случаях это делеция в размере 28,19,2 в области гайдовой последовательности.

20 Образец 182 имеет индекс нокаута 93. В данном образце зарегистрирована вставка одного нуклеотида, что может говорить о высокой вероятности сдвига рамки считывания.

Образец 177 является мозаиком. По результатам программы возможно 8 вариантов редактирования генома из которых 6 вариантов делеция и 2 инсерции.

25 Результаты исследований по примерам 1-5 доказывают, что технический результат достигнут и поставленная задача по созданию способа получения кролика с секретией кроличьего молока без β -казеина путем нокаута гена CSN2 достигнут.

```

<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing
1.3//EN" "ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing dtdVersion="V1_3" fileName="Способ получения
30 кролика с нокаутом гена CSN2.xml" softwareName="WIPO Sequence"
softwareVersion="2.3.0" productionDate="2024-11-06">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>RU</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>2023135688</ApplicationNumberText>
35 <FilingDate>2023-12-28</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>1061</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>RU</IPOfficeCode>
40 <ApplicationNumberText>2023135688</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-12-28</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="ru">федеральное государственное
автомомное образовательное учреждение высшего образования
45 &quot;Белгородский государственный национальный исследовательский
университет&quot; (НИУ &quot;БелГУ&quot;)</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>federal&apos;noe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatel&apos;noe uchrezhdenie vysshego obrazovaniya

```

```

&quot;Belgorodskij gosudarstvennyj nacional&apos;nyj
issledovatel&apos;skij universitet&quot; (NIU
&quot;BelGU&quot;)</ApplicantNameLatin>
  <InventorName languageCode="ru">Покровский Михаил
5  Владимирovich</InventorName>
  <InventorNameLatin>Pokrovskii Mikhail
  Vladimirovich</InventorNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="ru">Способ получения кролика с
нокаутом гена CSN2</InventionTitle>
10 <SequenceTotalQuantity>3</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
15 <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
20 <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>mRNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
25 <INSDQualifier id="q2">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Oryctolagus
cuniculus</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
30 </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
      <INSDSeq_sequence>gggctattggttgaaccacaggg</INSDSeq_sequence>
      </INSDSeq>
35 </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="2">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
40 <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
45 <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>

```

```

    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q4">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Oryctolagus
5 cuniculus</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
10 <INSDSeq_sequence>ccccagctcctgcccttcacg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
15 <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>RNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
20 <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
25 <INSDQualifier_value>other RNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q6">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Oryctolagus
30 cuniculus</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
35 <INSDSeq_sequence>tgccctcctcactctgtgtaac</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

(57) Формула изобретения

40 Способ получения кролика с нокаутом гена CSN2 (β -cas), обладающего возможностью секреции кроличьего молока без β -казеина, включающий редактирование гена CSN2 (β -cas), локализуемого на 15 хромосоме >chromosome:OryCun2.0:15:79884153:798952 20:1, имеющего 9 экзонов, методом CRISPR/Cas9, для чего зиготы, оцененные как нормальные, подвергают процедуре микроинъекции генетической конструкцией, которая

45 представляет собой смесь из sgRNA с характеристикой sgRNA-sg31; 5'-3'; PAM - GGGCTATTGGTTGAACCACAGGG; Coordinates – chromosome:OryCun2.0:15:79891440:7 9892062:1 и фермента CRISPR/Cas9 в соотношении 1:1, отделяют живые эмбрионы от погибших в результате микроинъекции и осуществляют трансплантацию эмбрионов

самкам-реципиентам.

5

10

15

20

25

30

35

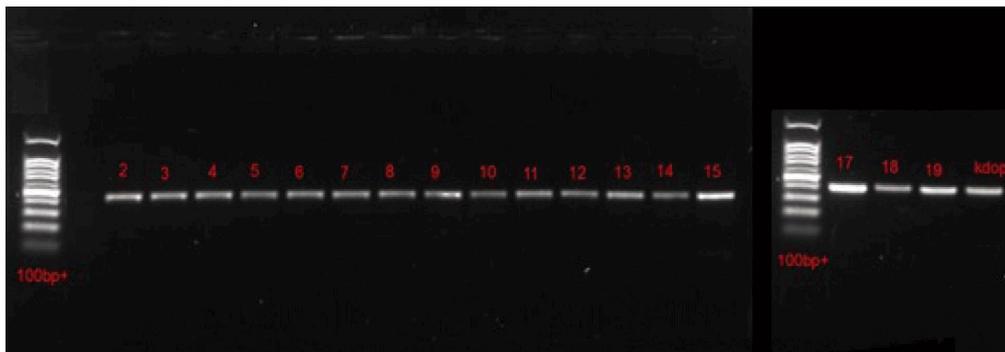
40

45

1

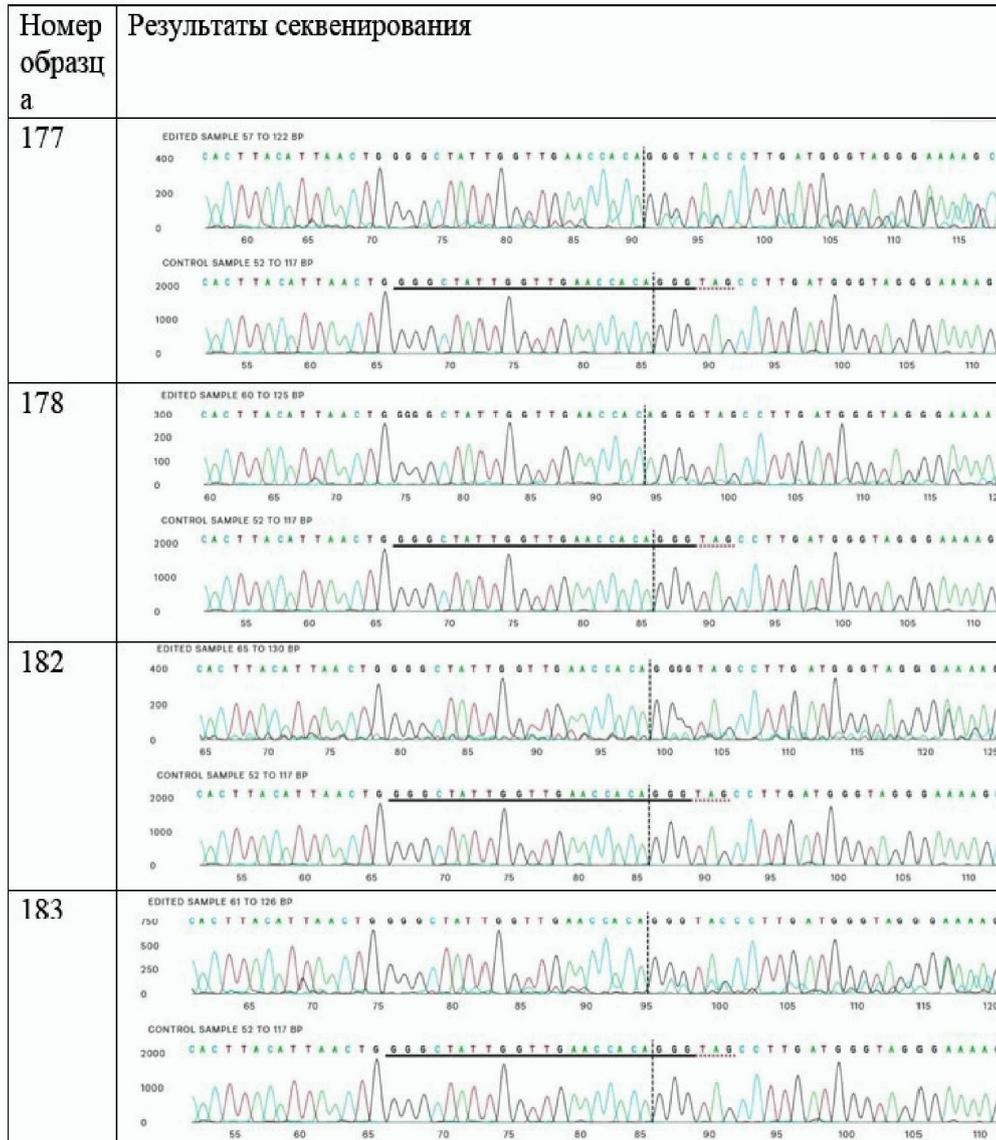


Фиг. 1



Фиг.2

2



Фиг.3