

Установлены метрологические характеристики разработанной методики: за окончательный результат принимают среднеарифметическое двух определений, расхождение между которыми (сходимость) не должно превышать 0,3 %. Относительная ошибка измерения при  $P = 95$  не должна превышать 2,0 %.

#### Литература

1. ГОСТ ISO 7609–2014 Масла эфирные. Анализ методом газовой хроматографии на капиллярных колонках. Общий метод. М.: Стандартинформ, 2015. 16 с.
2. ГОСТ ISO 1272-2016 Масла эфирные. Метод определения содержания фенолов М.: Стандартинформ, 2016. 8 с.
3. ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов эксперимента. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pharmacopeia.ru/ofs-1-1-0013-15-statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-eksperimenta/> (дата обращения 24.04.2020).

UDC 633.81: 543.8

Danilova I. L., Timasheva L. A., Pekhova O. A.

#### **Determination of the content of individual phenolic compounds in essential oils of plants of the Lamiaceae family**

**Summary.** Based on the conducted research, a method with an internal standard for the quantitative determination of the content of individual phenolic compounds – carvacrol and thymol in essential oils of *Thymus vulgaris* L., *Monarda fistulosa* L., *Origanum vulgare* L., *Satureja hortensis* L., *Satureja montana* L. was developed. The internal standard – oxygen-containing monocyclic terpene alcohol menthol with a purity of 98.0% – was experimentally determined. Metrological characteristics of the developed method: the convergence of the arithmetic mean of two definitions is not more than 0.3 %; the relative measurement error at  $P= 95$  is not more than 2.0 %.

**Keywords:** essential oil, gas chromatographic technique, internal standard, thymol, carvacrol.

DOI 10.33952/2542-0720-2020- 5-9-10-129

УДК 575.224.46; 575.2.084

Езерский Вадим Аркадьевич, Колоскова Елена Михайловна, Трубицина Татьяна Петровна

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

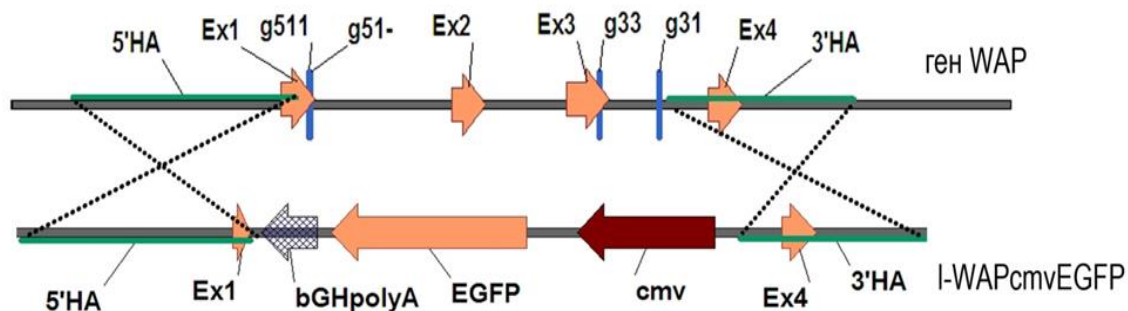
Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»  
e-mail: ez.vadim@yandex.ru

Генно-модифицированные (ГМ) организмы, в том числе животные становятся неотъемлемыми компонентами не только научных и биомедицинских исследований, но и агропромышленного комплекса во всем мире и в России. 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 [1]. 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 таких белков в экспериментальном и промышленном масштабе [2]. Уровень кислого сывороточного протеина (WAP) в молоке кролика достигает 15 г/л [3], что делает ген WAP перспективным кандидатом для замены геном целевого белка для технологии CRISPR/Cas9. К настоящему времени нами не

обнаружено публикаций о модификации гена WAP кролика с использованием эндонуклеазных технологий. Для оценки эффективности сайт-специфической интеграции трансгена на эмбриональном уровне в условиях *in vitro* с применением CRISPR/Cas9 на первом этапе нашей работы 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. Были подобраны последовательности направляющих РНК (нРНК) для делеции фрагмента гена WAP, разработана система оценки потенциальных генетических модификаций: делеций, инсерций, репарации гена гомологичной рекомбинацией с участием ДНК-матрицы (генетической конструкции) [4].

Последовательность гена кислого сывороточного протеина кролика была взята из базы данных GenBank (запись NC\_013678). Геномная ДНК кролика калифорнийской породы была выделена из уха. Сиквенс клонированной 5' области гена WAP кролика показал 100% совпадение последовательности с опубликованной. Направляющие РНК подбирали с помощью доступных on-line программ СНОРНОР, CRISPR direct, CRISPOR v.4.8. 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'НА и 3'НА), 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'НА и 3'НА к гену WAP, на стыке которых интегрирован сайт для рестриктазы *EagI*.

Фрагмент *cmvEGFP-bGHPpolyA* с *EagI* липкими концами, вырезанный и очищенный из ранее созданной нами плазмиды, клонировали в подготовленную *pTZHArbWAP*. В результате была получена плазида *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-bGHPpolyA* в ней обратно ориентирован: поскольку вставка представляет собой независимую кассету экспрессии, ее ориентация в данном случае имеет значение только для последующей ПЦР-детекции. С олигонуклеотидами для получения нРНК, обработанными по протоколу [6], были созданы плазмиды *pX330-511*, *pX330-51-*, *pX330-33* и *pX330-31*, кодирующие Cas9 и нРНК к соответствующим сайтам гена WAP (рисунок).



**Рисунок – Схема гомологичной рекомбинации генной конструкции WAPcmvEGFP с геном gbWAP при использовании метода CRISPR/Cas9.**

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

Таким образом, нами получены сайт-специфичные к нуклеотидным последовательностям гена WAP компоненты CRISPR/Cas9 системы в плазмидной форме, а также ДНК-матрица, содержащая плечи гомологии к этому гену. Разработана

стратегия оценки потенциальных модификаций гена WAP с использованием полимеразной цепной реакции. ДНК-матрица, содержащая фрагмент *cmvEGFP-bGHpolyA*, в совокупности с плазмидами pX330-511, pX330-53, pX330-33 и pX330-31 предназначена для оценки эффективности работы компонентов системы CRISPR/Cas9 в условиях *in vitro*. Плазмида pTZHArbWAP предназначена для интеграции в нее нуклеотидных последовательностей биологически активных белков с перспективой получения ГМ кроликов, продуцирующих рекомбинантные белки с молоком вместо кислого сывороточного протеина.

### Литература

1. Шепелев М. В., Калининченко 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. Vol. 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.

UDC 575.224.46; 575.2.084

Ezerskii V. A., Koloskova E. M., Trubitshina T. P.

### **Green fluorescent protein gene for site-specific integration into the locus of the rabbit whey acidic protein gene.**

**Summary.** The high content of whey acidic protein in rabbit milk makes the gene of this protein a promising candidate for its replacement by the gene of pharmacologically active protein using the CRISPR/Cas9 system. The plasmid that contains 5' and 3' arms of homology to the rabbit WAP gene was created. A fragment containing a green fluorescent protein gene under the CMV promoter has been integrated into this site. A strategy of making double-stranded cuts in the gene WAP and receiving four pX330 plasmids encoding the endonuclease Cas9 and guide RNAs was developed. The plasmid containing a fragment *cmvEGFP* was designed for site-specific integration by homologous recombination into the gene WAP to assess the effectiveness of site-specificity of components of the CRISPR/Cas9 *in vitro*.

**Keywords:** genetic construction, whey acidic protein, CRISPR/Cas9, EGFP, rabbit.

DOI 10.33952/2542-0720-2020-5-9-10-21-1

УДК 623.7:623.98

Зеленский Роман Александрович, Пачкин Алексей Александрович, Иванисова Мария Владимировна, Кремнева Оксана Юрьевна

### **Эффективность отлова хлопковой совки в агронозе подсолнечника светодиодными ловушками**

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений»  
e-mail: zelenskyj00@mail.ru

Большая значимость подсолнечника в сельском хозяйстве обусловлена в первую очередь высокой масличностью культуры – более 50 %. Мировые площади возделывания составляют более 22 млн га. В Российской Федерации под подсолнечником занято около 8 млн га, в Краснодарском крае насчитывается более 385 тыс га [1].

Широкий спектр многолетних вредителей способен существенно снизить урожайность подсолнечника, что создает необходимость постоянного мониторинга и снижения численности вредителей. Одним из таких вредителей является хлопковая совка.