



УДК: 577.21/639.371.5

Аквакультура

Нокаут гена миостатина у карпа обыкновенного с помощью системы CRISPR/Cas9

М.Н. Рузина^{1,2}, О.Р. Емельянова^{1,2}, С.Ю. Савельева^{1,2}, С.А. Брускин^{2,1}, Н.С. Мюге^{1,3}

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО»), Окружной проезд, 19, Москва, 105187

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (ФГБУН «ИОГен РАН»), ГСП-1, ул. Губкина, д.3, Москва, 119991

³ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ФГБУН «ИБР РАН»), ул. Вавилова, д.26, Москва, 119334

E-mail: mnruzina@gmail.com

SPIN-код: М.Н. Рузина – 7695-4484; О.Р. Емельянова – 6811-3886; С.Ю. Савельева – 8079-5431; С.А. Брускин – 6752-9049; Н.С. Мюге – 1916-2289

Цель работы: разработка метода нокаута двух паралогичных копий гена миостатина с помощью CRISPR/Cas9-системы с доставкой редактирующего комплекса в зиготу карпа обыкновенного методом микроинъекций.

Материалы и методы: оплодотворение икры карпа обыкновенного проводили *in vitro*, sgRNA синтезировали методом ПЦР с перекрывающимися олигонуклеотидами и последующей транскрипцией, редактирующий комплекс, состоящий из sgRNA и эндонуклеазы Cas9, доставляли в зиготу карпа до первого дробления методом микроинъекций, область, включающую сайт редактирования, амплифицировали методом гнездовой ПЦР, события редактирования детектировали методами секвенирования по Сэнгеру и NGS-секвенирования.

Новизна: впервые в России разработана система нокаута гена миостатина карпа обыкновенного, позволяющая одновременно изменять обе паралогичные копии гена.

Результат: получено 12 особей F0 карпа обыкновенного с нокаутом гена миостатина. **Практическая значимость:** опробован методологический подход, позволяющий достаточно быстро и контролируемо получать особей карпа обыкновенного с запрограммированными мутациями. Криспанты по гену миостатина отличаются повышенной скоростью роста мышечной массы за счёт гипертрофии и гиперплазии мышечных волокон, что приводит к повышению качества филе рыбы. Популяции быстро растущих рыб более удобны для выращивания в условиях аквакультуры, чем популяции со стандартной скоростью роста.

Ключевые слова: карп обыкновенный *Cyprinus carpio*, CRISPR/Cas9, миостатин, нокаут гена, геномное редактирование.

CRISPR/Cas9-knockout of the myostatin gene in common carp

Maria N. Ruzina^{1,2}, Olga R. Emelianova^{1,2}, Svetlana Yu. Saveleva^{1,2}, Sergey A. Bruskin^{1,2}, Nikolai S. Muge^{1,3}

¹ Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography («VNIRO»), 19, Okruzhnoy proezd, Moscow, 105187, Russia

² N.I. Vavilov Institute of General Genetics RAS («IGG RAS»), 3, Gubkina str., Moscow, 119333, Russia

³ N.K. Koltzov Institute of Developmental Biology RAS («IDB RAS»), 26, Vavilov Str., Moscow, 119334, Russia

The goal of the study is to develop a method for knocking out the common carp two paralogous copies of the myostatin gene using the CRISPR/Cas9 system with delivery of the editing complex into zygote by microinjection.

Materials and Methods: fertilization of common carp eggs was carried out *in vitro*, sgRNA was synthesized by PCR with overlapping oligonucleotides and subsequent transcription, the editing complex consisting of sgRNA and the Cas9 endonuclease was delivered to the carp zygote by microinjection before the first cleavage. The region contained the editing site was amplified by nested PCR, editing events were detected by Sanger sequencing and confirmed by NGS.

Novelty: For the first time in Russia, a knockout system for the common carp myostatin gene has been developed, allowing both paralogous copies of the gene to be modified simultaneously.

Result: 12 F0 common carp individuals with knockout of the myostatin gene were obtained.

Practical significance: A methodological approach has been tested that allows for the rapid and controlled production of common carp with programmed mutations. Myostatin gene-deficient fish exhibit increased muscle growth due to hypertrophy and hyperplasia of muscle fibers, resulting in improved fish fillet quality. Fast-growing fish populations are more suitable for aquaculture than populations with standard growth rates.

Keywords: common carp *Cyprinus carpio*, CRISPR/Cas9, myostatin, gene knockout, genome editing.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы для создания новых линий организмов были разработаны и стали активно применяться методы геномного редактирования с помощью системы CRISPR/Cas [Doudna, Charpentier, 2014]. Данный подход позволяет контролируемо и направлено получить мутации, приводящие к получению желаемых признаков организмов уже в первом поколении после проведения редактирования. Карп обыкновенный (*Cyprinus carpio* L., 1758) – традиционный объект аквакультуры в тёплых регионах и регионах средней полосы России. Этот вид устойчив к условиям содержания в прудовых хозяйствах, неприхотлив к условиям выращивания, нетребователен к кормам, обладает высокими вкусовыми качествами, хотя и содержит большое количество межмышечных костей. Это аллотетраплоидный вид, последний акт полиплоидизации у него произошёл около 8,2 млн лет назад [Xu et al., 2014]. В геноме карпа содержатся два субгенома, А и В, по 25 хромосом в каждом, $2n=100$ [Chen et al., 2024]. Методами классической селекции в мире, в том числе в Советском союзе и в России, были получены породы с различными рыбоводными и товарными характеристиками и устойчивостью к некоторым заболеваниям. Метод геномного редактирования может быть успешно использован для создания новых пород карпа путём внесения направленных изменений в геном и получения рыб с запланированным фенотипом.

Для генетического редактирования сегодня наиболее широко используется фермент эндонуклеаза Cas9 в комплексе с гидовой РНК (гРНК), которая отвечает за точное нацеливание комплекса на желаемый локус. Эндонуклеаза производит двуцепочечный разрез ДНК в этой области. Координатой, определяющей положение разреза, является фрагмент PAM (Protospacer Adjacent Motif), специфичный для каждой Cas-эндонуклеазы короткий фрагмент ДНК, выше которого осуществляется разрез. Для Cas9 это фрагмент NGG, и разрез наносится на 3 нуклеотида выше данного PAM. Полученный разрез репарируется с помощью клеточного механизма негомологичного соединения концов (Non-homologous end joining, NHEJ, process), заполняется случайными нуклеотидами, также могут появляться небольшие делеции и замены оснований. Данные мутации приводят к сдвигу открытой рамки считывания, то есть, к выключению или нокауту, целевого гена. В рамках данного подхода подбирают гРНК, комплиментарную локусу в пределах первых трёхсот нуклеотидов первого экзона целевого гена, чтобы полученные мутации (делеции и инсерции нуклеотидов в месте репарации направленного двух-

цепочечного разрыва ДНК) в этой области вызвали сдвиг открытой рамки считывания и, как следствие, выключение гена. Для корректной доставки редактирующего комплекса в клетку и для эффективной работы Т7-полимеразы при синтезе РНК рекомендуется выбирать гРНК с нуклеотидом G на 5'-конце. В случае отсутствия такого нуклеотида у выбранной последовательности, его добавляют при синтезе праймера. Гидовая РНК объединяется в одну молекулу с последовательностью каркаса с образованием единой гРНК (sgRNA). С sgRNA связывается эндонуклеаза группы Cas.

Редактирующий комплекс, состоящий из sgRNA и эндонуклеазы, может быть доставлен в клетку как в виде смеси sgRNA и фермента, так и в виде плазмиды или мРНК, содержащих кассету данных генов. Способы доставки выбираются в зависимости от типа используемых в эксперименте клеток. Для икры чаще используют метод микроинъекций, для клеточных линий – методы электропорации, трансфекции или липофильной трансдукции.

К настоящему моменту для карпа имеются публикации об экспериментальных работах по геномному редактированию с использованием нескольких генов-мишеней, однако результаты носят предварительный характер, и ни одна из работ не завершилась регистрацией породы или данными об испытаниях на последующих после редактирования поколениях рыб. Были проведены эксперименты с нокаутами гена миостатина (*myostatin*, *mstn*). Миостатин является обратным регулятором роста мышц, и его нокаут приводит к увеличению мышечной массы (выход филе) у рыбы за счёт повышения количества, гипертрофии и гиперплазии мышечных волокон [Zhong et al., 2016, Shahi et al., 2022]. Также проводились работы по редактированию у карпа гена транскрипционного фактора *sp7a*, у мутантов по которому наблюдались признаки редукции костей [Zhong et al., 2016]. Для установления эффективности геномного редактирования часто используется дополнительно проведение редактирования, проявляющееся в заметном изменении фенотипа, чаще всего изменение или утрата окраски, заметное на самых ранних стадиях онтогенеза. На карпе были проведены серии экспериментов по изменению пигментации у линии уцзянского карпа, который имеет ярко красное тело с чёрными пятнами. У данных рыб были выключены гены *asip1* и *asip2*, кодирующие сигнальный белок Агути, что привело к исчезновению характерных для дикого типа чёрных пятен и нарушению распределения меланофоров [Chen et al., 2019]. Нокаут гена рецептора меланокортина *mc1r* у данной линии карпа привёл к нарушению синтеза меланина

и снижению количества меланофоров, в результате чего рыбы приобретали сероватый цвет или становились альбиносами [Mandal et al., 2020]. Утрата тирозиназы 1 вследствие выключения гена *tyrp1* приводила к формированию серой или коричневой окраски кожи [Chen H. et al., 2021]. Также проведён эксперимент по получению популяции карпа обыкновенного, состоящей только из самок, в результате скрещивания самцов с выключенным геном *sup17a1*, кодирующим 17- α -гидроксилазу, с обыкновенными самками дикого типа [Zhai et al., 2022].

Целью нашей работы была разработка метода одновременного выключения двух паралогичных копий гена миостатина у карпа обыкновенного с помощью CRISPR/Cas9-системы с доставкой редактирующего комплекса в зиготу методом микроинъекций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подбор и синтез гидовых РНК

Для подбора гРНК использовались онлайн-сервисы CRISPOR [Concordet et al., 2018] и СНОРСНОР (version 3) [Labun et al., 2019]. Из серии подобранных гРНК эффективной оказалась одна последовательность, 104fw, с РАМ AGG: 5'-GCAGCCTTCCACAGCCA*CGGAGG-3'. Звёздочкой выделено место разреза, РАМ отмечен подчёркнутым шрифтом.

Синтез 104fw-sgRNA проводили методом ПЦР с перекрывающимися олигонуклеотидами и последующей транскрипцией. Олигонуклеотиды были синтезированы в ЗАО «Евроген». Прямой праймер был уникальным и, помимо направляющей последовательности, содержал промотор T7:

5'-GAAATtaatacgaactcactatag**CAGCCTTCCACAGCCACG**GGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'.

Жирным шрифтом выделена гРНК, строчными буквами – последовательность T7-промотора.

Обратный праймер кодировал стандартный каркас гидовой РНК:

5'AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGAT AACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAA AC-3'.

Для реакции ПЦР использовалась Phusion полимераза (New England Biolabs). Амплификацию проводили по следующей программе: денатурация 98 °C – 30 сек.; 35 повторений цикла 98 °C – 10 сек., 60 °C – 30 сек, 72 °C – 15 сек.; завершающая элонгация при 72 °C – 10 мин.

После синтеза проводили очистку продуктов ПЦР от остатков реакционной смеси методом спиртового переосаждения (преципитации): на 100 мкл ПЦР-про-

дукта использовали 17 мкл 3М ацетата натрия, pH 5.5, и 80 мкл изопропанола.

Затем проводили T7-транскрипцию гидовой РНК *in vitro* с использованием набора реагентов производства компании ООО «Биолабмикс» по стандартному протоколу. Для проведения микроинъекций использовали sgRNA с концентрацией выше 40 нг/мкл.

Оплодотворение икры карпа *in vitro*

Оплодотворение икры для использования в эксперименте проводилось *in vitro*. Сбор икры и спермы карпа проводился на базе рыбоводного комплекса ВНИИПРХ в утренние часы, после чего материал доставляли в лабораторию в холодных контейнерах при температуре +4 °C. От момента получения семенного материала до оплодотворения первой партии икры проходило 4-4,5 часа, до оплодотворения последней партии икры – 8-9 часов.

В чашке Петри диаметром 35 мм смешивали 1 см³ неоплодотворённой икры и две капли спермы. Перемешивание половых продуктов проводили с помощью гусиного пера или мягкой кисточки. После этого располагали икринки на длинном ребре предметного стекла и опускали стекло в резервуар с водой, направляя данное ребро вверх. В течение первых 45 сек. инкубации в воде икра карпа активировалась, оплодотворялась и приклеивалась к стеклу. Благодаря такой процедуре удавалось получить расположение анимального полюса икринки преимущественно направо от широкой грани предметного стекла, что удобно для последующего проведения микроинъекций.

Проведение микроинъекций

Для проведения микроинъекций использовались стереомикроскоп со светом, проходящим через основание предметного столика, микроманипулятор InjectMan® 4, Eppendorf AG, (Германия), Микроинжектор FemtoJet® 4i, Eppendorf AG, (Германия), универсальная стойка для установки микроманипулятора рядом со стереомикроскопом, Eppendorf AG (Германия).

Смесь компонентов редактирующего комплекса имела следующий состав: 2 мкл 104fw-sgRNA, 1,5 мкл Cas9, 1 мкл Cas-buffer 10 \times (ООО «Биолабмикс»), 6 мкл чистой H₂O.

Микрокапилляры для икры карпа обыкновенного с внутренним диаметром 1-3 мкм вытягивали на приборе RWD Micropipette puller (HF-3030B) из заготовок WPI 1B100F по программе Cycle = 1, Heat = 615, Pull = 0, Velocity = 50, Time = 250.

Микроинъекции проводили с углом наклона микрокапилляра в 30° к горизонтальной оси, давление при инъекции (Pi) составляло 800 hPa, компенсацион-

ное давление (Pc) – 90 hPa, время инъекции – 1 сек., результирующий объём инъекции – 0,5 nL.

Микроинъекции проводили в зиготу карпа на стадии одной клетки до начала дробления в анимальный полюс или в область желтка на границе анимального полюса.

Подращивание и содержание молоди карпа обыкновенного

Эмбрионы карпа культивировались в чашках Петри семь дней при температуре +21°C. Выклев личинок происходил на третий день после оплодотворения. На пятый день после оплодотворения личинкам предлагали перемолотый стартовый корм. На седьмой день после оплодотворения личинки активно питались и становились на плав. Такую молодь пересаживали в лотки с аэрацией и кормили свежими науплиусами артемии. Примерно через 1-1,5 месяца личинки достигали длины тела 1-1,5 см, их пересаживали в лотки системы замкнутого водоснабжения и переводили на готовый стартовый корм с высоким содержанием белка изготовления ФГБНУ «ВНИРО». Параметры воды для *Cyprinus carpio*: T = +21 °C, dGH = 5-20, pH = 6,8-7,5. При достижении мальками длины тела в 3-6 см у них были отобраны фрагменты плавников размером около 3 мм². Из полученных образцов была выделена ДНК с использованием сорбционных колонок с кремни-

вым фильтром [Ivanova et al., 2006]. Данная ДНК была использована для детекции событий редактирования.

Аmplification фрагмента гена *mstn*, включающего сайт редактирования

Для амплификации фрагмента гена *mstn* вокруг сайта редактирования была использована система гнездовой ПЦР (Nested-PCR, табл. 1). Данный подход позволял идентифицировать, на какой из двух хромосом, A9 или B9, локализована копия гена, повысить специфичность ПЦР и увеличить выход ампликонов. Для фрагмента гена *mstn*, расположенного на хромосоме B9, наблюдалась высокая эффективность первого раунда Nested-PCR. Поэтому после первого раунда проведены реакции секвенирования с внутренних праймеров. После проведения ПЦР полученный продукт в объёме 3 мкл очищали от примесей методом этанол-преципитации по описанному выше протоколу.

Детекция событий редактирования методом секвенирования по Сэнгеру

Терминирующую реакцию секвенирования проводили с использованием обратного праймера второго раунда Nested-PCR (*mstn_check_R*), с набором «BrilliantDye™ Terminator, v 3.1» по стандартному протоколу. Программа амплификации: денатурация 95,2 °C – 2 мин.; 50 повторений цикла: 95,2 °C –

Таблица 1. Система Nested-PCR для амплификации фрагментов генов *mstn* у карпа обыкновенного

Table 1. Nested-PCR system for amplification of *mstn* gene fragments in common carp

Раунд Nested-PCR	Локализация на хромосоме	Название праймера	Последовательность праймера	Параметры амплификации	Полимераза	Размер продукта
I	A9	CC_A9_mstn_n_F	CCACAAGATGGCGCTACGTA	98 °C – 2 мин. 35 циклов: 96 °C – 10 сек. 56 °C – 30 сек. 72 °C – 3 мин. 72 °C – 5 мин. 12 °C – ∞	Fuzz	1977 пн
		CC_A9_mstn_n_R	TCTGCTCTAGGTGGGACGAA			
	B9	CC_B9_mstn_n_F	TACGGTGCTGCTCAAGTTGT	98 °C – 2 мин. 35 циклов: 96 °C – 10 сек. 60 °C – 30 сек. 72 °C – 3 мин. 72 °C – 5 мин. 12 °C – ∞	Fuzz	1626 пн
		CC_B9_mstn_n_R	AGCAGCTGAACTCACCAGTC			
II	A9, B9	mstn_check_F	GGAGATATAACGGCGCACCA	95 °C – 5 мин. 35 циклов: 95 °C – 10 сек. 60 °C – 30 сек. 72 °C – 30 сек. 72 °C – 5 мин. 12 °C – ∞	Taq	316 пн
		mstn_check_R	TACGTTCTGTGGCCATGGTC			

10 сек., 53,5 °C – 10 сек., 59,5 °C – 4 мин.; хранение при 12 °C.

Полученные продукты снова очищали методом этанол-преципитации, растворяли в 12 мкл формамида и денатурировали при температуре 95 °C в течение 2 мин. Секвенирование образцов ДНК проводили на приборе ABI Prism 3130xl согласно протоколу фирмы-изготовителя (Applied Biosystems, USA). Анализ последовательностей проводился в программе Geneious 10.0.5. [Kearse et al., 2012]. Для выполнения работы использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Рыбохозяйственная геномика» ФГБНУ «ВНИРО».

Детекция событий редактирования методом NGS-секвенирования

NGS-секвенирование было проведено для шести образцов, отредактированных по *mstn* с хромосомы A9 и для пяти образцов с хромосомы B9. Для секвенирования были использованы внутренние праймеры второго раунда Nested-PCR с прикрепленными к ним TruSeq-адапторами, представляющими собой уникальные последовательности ДНК для индивидуального мечения образцов. Последовательности праймеров представлены ниже, адапторная часть выделена жирным шрифтом:

mstn_F_Tru: **CTACACGACGCTCTTCCGATCT**GAGATATAACGGCGCACCA

mstn_R_Tru: **CAGACGTGTGCTCTTCCGATCT**TACGTTCTGTGGCCATGGTC

Протокол подготовки библиотеки образцов для секвенирования включал в себя следующие стадии: индексная ПЦР, очистка ПЦР-продуктов набором «AmpureXP beads 0.8x», измерение концентрации полученных ПЦР-продуктов на приборе Qubit с набором «HS DNA», нормализация концентрации до 4 нМ,

пулирование образцов в библиотеку. Секвенирование образцов было проведено на приборе Surfseq (технология Illumina) на базе ООО «Геномед», Москва в режиме парноконцевых чтений 150+150. Биоинформатическая обработка включала в себя процессы триммирования и фильтрации и определение уникальных последовательностей в каждом образце в пакете программ usearch v11. Подсчёт вариантов редактированных последовательностей проводился с учётом частоты встречаемости в образце (не менее 5%), что с большой долей вероятности указывало на возникновение мутации вплоть до пятого-шестого этапов дробления (16-32 бластомера).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выживаемость личинок на пятый день после оплодотворения

Эмбрионы карпов в условиях лаборатории показывали высокую смертность в первый день после оплодотворения, на стадии, предшествующей вылуплению личинки, и на стадии перехода личинки на активное питание как в экспериментальной группе, так и в контрольной. Оценка выживаемости личинок карпа обыкновенного была проведена после выклева на 5-й день после оплодотворения. Она составила 36,6% и 45% в экспериментальной и контрольной группах соответственно. Отход личинок в обеих группах продолжился и на более поздних стадиях развития молоди с примерно одинаковой интенсивностью.

Детекция событий редактирования методом секвенирования по Сэнгеру

Если в хроматограмме образца на три нуклеотида выше PAM резко снижалось качество сиквенса, выра-

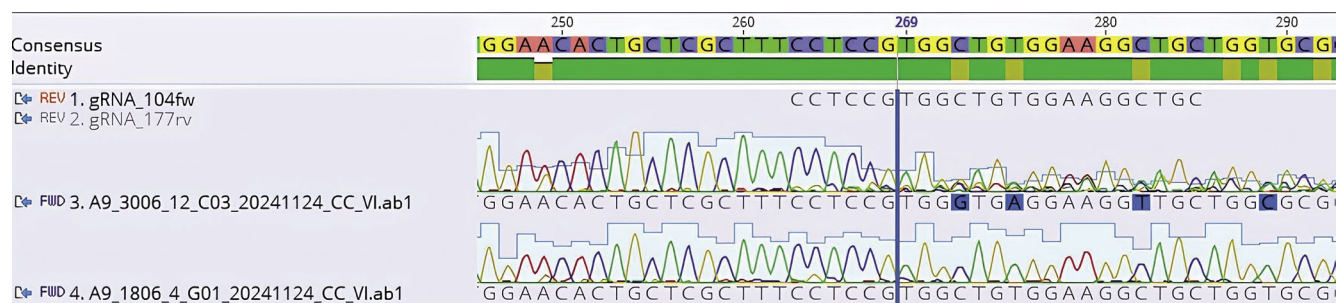


Рис. 1. Хроматограмма секвенирования по Сэнгеру отредактированного (A9_3006_12) и неотредактированного образцов (A9_1806_4). Так как секвенирование проходило с обратного праймера, то последовательность гРНК на рисунке записана в направлении 3'-5' CTT – последовательность PAM. Место ожидаемого двуцепочечного разреза эндонуклеазой CAS9 с последующей репарацией и включением инделов отмечено синей вертикальной линией.

Fig. 1. Sanger sequencing chromatogram of the edited (A9_3006_12) and unedited (A9_1806_4) samples. gRNA sequence is written in the 3'-5' direction because of sequencing performed with reverse primer. CTT is the PAM sequence. The cut site is marked with a blue line

вания, но может быть использовано для идентификации паралогичной копии в геноме (на хромосомах A9 или B9). В область в 150 пар нуклеотидов от прямого праймера попадает также замена нуклеотида С на Т в позиции 67 от начала фрагмента, позволяющая отличить фрагменты *mstn* с A9 и B9 хромосом, что упрощает идентификацию их происхождения. Если в эксперименте не планируется первоначальное секвенирование по Сэнгеру, а только NGS-анализ, то первый раунд Nested-PCR можно пропустить.

Так как в нашем исследовании был задействован клеточный механизм репарации ДНК по типу неомологического соединения концов, то мутации возникшие в области редактирования, носили случайный характер. Одинаковые варианты мутаций, том числе достаточно длинные инсерции, встречались у разных образцов. Для всех исследованных рыб выявлено 60 вариантов последовательностей, отличающихся от отредактированной формы.

Анализ генотипов полученных рыб выявил высокую степень соматического мозаицизма. У всех трансгенных особей F0, наряду с инсерционно-делеционными мутациями (инделами), детектировался аллель дикого типа (WT), что свидетельствует о происхождении тканей плавника как от отредактированных, так и от интактных клеток-предшественников. Наличие множества вариантов мутаций у одного организма указывает на то, что редактирующий комплекс в клетках эмбриона рыбы продолжает разрезание ДНК в дочерних клетках не менее четырёх-пяти раундов дробления. Он попадает в новые бластомеры, в каждом из которых процесс редактирования повторяется. Так как мы использовали эндонуклеазу Cas9, то уже изменённые варианты гена *mstn* могли подвергаться вторичному редактированию до тех пор, пока количество несоответствий между последовательностью гена и гРНК не достигало трёх [Guo et al., 2023]. В идеальном случае редактирующий комплекс попадает в клетку на стадии до первого деления, совершает один акт редактирования и разрушается. В таком случае мы бы наблюдали один вариант редактирования в одном образце. В наших условиях таких образцов обнаружено не было, все полученные особи имели мозаичный генотип. Это свидетельствует, что даже при введении комплекса Cas9 и гидовой РНК на стадии одного бластомера, первый акт редактирования протекает в эмбрионе после первого или второго раунда дробления, что приводит к наблюдаемому мозаицизму.

Для того, чтобы получить группу мутантных рыб с чистым, не мозаичным вариантом гена, необходимо проводить скрещивания отредактированных особей F0 между собой с генотипированием всех потомков.

Предположительно для закрепления мутации в линии клеток-предшественников половых клеток достаточно одного поколения (F1). Для формирования чистой линии по мутантному генотипу может понадобиться ещё одно поколение (F2). Жизнеспособность мозаичных F0, полученных в результате мутагенеза, не гарантирует высокой жизнеспособности потомков F1 и F2, гомозиготных по нокауту гена. Поэтому любые результаты редактирования надо оценивать не в первом поколении, а в последующих. Учитывая, что половое созревание карпов происходит на третьем году жизни, создание линии карпов с гомозиготных по нокауту вариантам в обоих паралогичных копиях гена *mstn* может занять от шести лет.

Миостатин – это обратный регулятор роста мышц, который начинает экспрессироваться и работать на той стадии роста и развития рыбы, когда животное уже достигло оптимальных размеров в зависимости от условий среды. Поэтому эффект от нокаута гена *mstn* мы ожидаем увидеть, когда отредактированные рыбы достигнут более зрелого возраста. В работе Zhong и соавторов [Zhong et al., 2016] отличия по длине и массе тела между отредактированными по *mstn* особями карпа и диким типом наблюдались уже с первого месяца жизни. В нашем случае достоверных различий в размере и массе мальков контрольной и отредактированной группы не наблюдается.

Для расширения списка кандидатных генов для нокаута с целью улучшения хозяйственно-ценных признаков у карпа обыкновенного можно обратиться к работам, выполненным на других представителях семейства Карповые [Orlova et al., 2024]. Список генов, подходящих для нокаута, у любого организма неизбежно будет достаточно ограниченным. Работа генов у каждого организма настроена так, чтобы максимально способствовать приспособленности к условиям окружающей среды. Очень мало существует генов, выключение которых приводит к появлению признаков, повышающих жизнеспособность или улучшающих хозяйственно-ценные признаки особей. Тем не менее, можно сказать, что возможности нокаута генов для улучшения хозяйственно-ценных признаков карпа обыкновенного пока не исчерпаны.

Технологии геномного редактирования быстро развиваются, в этой области появляются новые инструменты. Так сегодня реализована возможность вносить мутации одновременно в несколько ДНК-локусов одного организма, избегать ошибочного редактирования нецелевых локусов (офф-таргет эффект). Перспективно использование нокин-подхода, позволяющего направленно вносить в ДНК реципиента новые последовательности, например промоторы, активирующие

молчащие до этого гены, последовательности доменов или целых генов, экспрессию которых хочется получить в отредактированной линии. Геномное редактирование – удобный и точный метод мутагенеза для улучшения хозяйственно-ценных признаков аквакультурных видов рыб, в том числе карпа обыкновенного.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые в России разработана и опробована CRISPR/Cas9-система для выключения двух паралогичных копий гена миостатина у карпа обыкновенного. Получены рыбы F0-поколения с запрограммированными мутациями. Все полученные особи мозаичны по данному локусу. Для закрепления мутаций в линии зародышевых половых клеток и получения гомозигот по мутантному генотипу требуется проведение дальнейших скрещивания и получения потомков F1 и F2.

Благодарности

Авторы выражают искреннюю благодарность за помощь В.Н. Дементьеву, Д.А. Балашову, К.В. Ковалеву и Ю.А. Новоселовой (ВНИИПРХ), И.Ф. Олемскому, М.А. и А.А. Ёжкиным, Д.П. Савченко (ЦИ ВНИРО), А.М. Орлову (ИО РАН), А.Д. Золотаренко (ИОГен РАН), а также вдумчивым анонимным рецензентам данной статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Все применимые этические нормы соблюдены.

Финансирование

Работа выполнена в рамках гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации «Геномная селекция как инструмент интенсификации создания новых отечественных пород и линий лососевых рыб для товарной аквакультуры» № 075-15-2025-479 от «30» мая 2025 г.

ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

Chen H., Wang J., Du J., Mandal B.K., Si Z., Xu X., Yang H., Wang C. 2021. Analysis of recently duplicated TYRP1 genes and their effect on the formation of black patches in Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. *color*) // *Anim. Genet.* V. 52. P. 451-460. DOI: 10.1111/age.13071

Chen H., Wang J., Du J., Si Z., Yang H., Xu X., Wang C. 2019. ASIP disruption via CRISPR/Cas9 system induces black patches dispersion in Oujiang color common carp // *Aquaculture.* V. 498. P. 230-235. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.08.057

Chen L., Li C., Li B., Zhou X., Bai Y., Zou X., Zhou Z. et al. 2024. Evolutionary divergence of subgenomes in common carp

provides insights into speciation and allopolyploid success // *Fundamental Research.* V. 4. P. 589-602. DOI: 10.1016/j.fmre.2023.06.011

Concordet J.-P., Haussler M. 2018. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens // *Nucleic Acids Res.* V. 46. P. W242-W245. DOI: 10.1093/nar/gky354

Doudna J.A., Charpentier E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 // *Science.* V. 346(6213). P. 12580-96. DOI: 10.1126/science.1258096

Guo C., Ma X., Gao F., Guo Y. 2023. Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing // *Front. Bioeng. Biotechnol.* V. 11. P. 1143-157. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1143157

Ivanova N.V., Deward J.R., Hebert P.D.N. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA // *Molecular Ecology Notes.* V. 6(4). P. 998-1002. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2006.01428.x

Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S. et al. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data // *Bioinformatics.* V. 28(12). P. 1647-2164. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts199

Labun K., Montague T.G., Krause M., Torres Cleuren Y.N., Tjeldnes H., Valen E. 2019. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing // *Nucleic Acids Res.* V. 47. P. W171-W174. DOI: 10.1093/nar/gkz365

Mandal B.K., Chen H., Si Z., Hou X., Yang H., Xu X., Wang J., Wang C. 2020. Shrunken and scattered black spots turn out due to mc1r knockout in a white-black Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. *color*) // *Aquaculture.* V. 518. P. 734-822. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.734822

Orlova S.Yu., Ruzina M.N., Emelianova O.R., Sergeev A.A., Chikurova E.A., Orlov A.M., Muge, N.S. 2024. In search of a target gene for a desirable phenotype in aquaculture: genome editing of Cyprinidae and Salmonidae species // *Genes (Basel).* V. 15. P. 726. DOI: 10.3390/genes15060726

Shahi N., Mallik S.K., Sarma D. 2022. Muscle growth in targeted knockout common carp (*Cyprinus carpio*) *mstn* gene with low off-target effects // *Aquaculture.* V. 547. 737423. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.737423

Xu P., Zhang X., Wang X., Li J., Liu G., Kuang Y., Xu J., Zheng X., Ren L., Wang G., et al. 2014. Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio* // *Nat Genet.* V. 46. P. 1212-1219. DOI: 10.1038/ng.3098

Zhai G., Shu T., Chen K., Lou Q., Jia J., Huang J., Shi C., Jin X., He J., Jiang D. et al. 2022. Successful production of an all-female common carp (*Cyprinus carpio* L.) population using *cyp17a1*-deficient neomale carp // *Engineering.* V. 8. P. 181-189. DOI: 10.1016/j.eng.2021.03.026

Zhong Z., Niu P., Wang M., Huang G., Xu S., Sun Y., Xu X., Hou Y., Sun X., Yan Y. et al. 2016. Targeted disruption of *sp7* and myostatin with CRISPR-Cas9 results in severe bone defects and more muscular cells in common carp // *Sci. Rep.* V. 6. P. 229-253. DOI: 10.1038/srep22953

Поступила в редакцию 12.12.2025 г.
Принята после рецензий 24.12.2025 г.