

BOT-116 Rev. Cientif. FCV-LUZ, XXXIII, SE, 280-281, 2023, <https://doi.org/10.52973/rcfcv-wbc124>**Production of β -lactoglobulin (BLG) gene knock-out blastocyst stage embryos of Indian water buffalo using CRISPR and SCNT technology****Aseem Tara, Priyanka Singh, Devika Gautam,
Gaurav Tripathi, Shreya Malhotra, Sacchinandan De,
Manoj K. Singh, Naresh L. Selokar***Animal Biotechnology Division (ABTD), ICAR-National Dairy
Research Institute, Karnal, Haryana, 132001, India**Corresponding author: Selokar, Naresh (naresh.selokar@icar.gov.in).**ABSTRACT**

In several tropical countries, buffalo milk has a higher-value demand than cow milk due to its nutritional and economic value. In India, the buffalo is the main dairy animal and contributes 45% of the total milk produced in the country. Besides the nutritional value of milk, several allergen proteins such as casein, α -lactalbumin, β -lactoglobulin (BLG), and immunoglobulins have been reported. Breeding strategies, nutritional management, and quantitative genetics have improved milk yield, but these approaches could not lead to significant changes in milk composition. With the development of biotechnology, especially genome editing tools (CRISPRs), it is possible to generate new value-added products such as designer hypoallergenic milk for human health benefits. Keeping this in mind, we planned to utilize the CRISPR tools to disrupt the buffalo β -lactoglobulin (BLG) gene to produce hypoallergenic milk in the long run. In pursuit of our objectives, we designed three single guide RNAs (sgRNAs) targeting the BLG locus in buffalo. Subsequently, we assessed their editing efficiency through a combination of Sanger sequencing, followed by TIDE and ICE analysis. Among three sgRNAs, the most efficient sgRNA was used to generate the clonal population of edited cells. Several single-cell clones were established and screened using the TA cloning (also known as rapid cloning or T cloning) and Sanger sequencing methods. Of 14 single-cell clones screened, eight were found to have BLG gene disruption events (57% editing rates). Using SCNT, we successfully produced cloned blastocyst stage embryos from 4 BLG-gene disrupted clonal cells.

Producción de embriones en etapa de blastocisto con desactivación del gen β -lactoglobulina (BLG) de búfalo de agua indio utilizando tecnología CRISPR y SCNT

**Aseem Tara, Priyanka Singh, Devika Gautam,
Gaurav Tripathi, Shreya Malhotra, Sacchinandan De,
Manoj K. Singh, Naresh L. Selokar***División de Biotecnología Animal (ABTD), ICAR-Instituto
Nacional de Investigación Láctea, Karnal, Haryana, 132001,
India**Autor de correspondencia: Selokar, Naresh (naresh.selokar@icar.gov.in).**RESUMEN**

En varios países tropicales, la leche de búfala tiene una demanda de mayor valor que la leche de vaca debido a su valor nutricional y económico. En la India, la búfala es el principal animal lechero y aporta el 45% del total de leche producida en el país. Además del valor nutricional de la leche, se han informado varias proteínas alergénicas como la caseína, la α -lactoalbúmina, la β -lactoglobulina (BLG) y las inmunoglobulinas. Las estrategias de reproducción, el manejo nutricional y la genética cuantitativa han mejorado la producción de leche, pero estos enfoques no han podido conducir a cambios significativos en la composición de la leche. Con el desarrollo de la biotecnología, especialmente las herramientas de edición del genoma (CRISPR), es posible generar nuevos productos con valor agregado, como el diseño de leche hipoalergénica para beneficiar la salud humana. Teniendo esto en cuenta, planeamos utilizar las herramientas CRISPR para alterar el gen de la β -lactoglobulina de búfala (BLG) y así producir leche hipoalergénica a largo plazo. Para lograr nuestros objetivos, diseñamos tres guías de ARN de guía única (sgRNA) dirigidos al locus BLG en búfalos. Posteriormente, evaluamos su eficiencia de edición mediante una combinación de secuenciación Sanger, seguida de análisis TIDE e ICE. Entre los tres sgRNA, se utilizó el sgRNA más eficiente para generar la población clonal de células editadas. Se establecieron y seleccionaron varios clones unicelulares utilizando los métodos de clonación TA (también

The cloned blastocyst production rates (25 to 30%) were similar to non-edited control cells. Efforts are ongoing to establish pregnancies from BLG-KO cloned embryos. This work can lead to the generation of designer buffaloes to produce hypoallergenic milk for human benefit.

Keywords: buffalo, milk allergy, β -lactoglobulin, CRISPR, SCNT, hypoallergenic milk.

conocida como clonación rápida o clonación T) y secuenciación de Sanger. De los 14 clones unicelulares analizados, se encontró que ocho tenían eventos de alteración del gen BLG (tasas de edición del 57%). Utilizando transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), producimos con éxito embriones clonados en etapa de blastocisto a partir de 4 células clonales alteradas por el gen BLG. Las tasas de producción de blastocistos clonados (25 a 30%) fueron similares a las de las células de control no editadas. Se están realizando esfuerzos para establecer preñeces a partir de embriones clonados BLG-KO. Este trabajo puede conducir a la generación de búfalos diseñados para producir leche hipoalergénica para beneficio humano.

Palabras clave: búfala, alergia a la leche, β -lactoglobulina, CRISPR, SCNT, leche hipoalergénica.