

Оценка активности новых ортологичных CRISPR-Cas9 нуклеаз — PpCas9 и PaCas9 в клетках эукариот

Научный руководитель – Мадера Дмитрий Александрович

Усатова Полина Сергеевна

Студент (магистр)

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия,
Санкт-Петербург, Россия
E-mail: usatova@biocad.ru

Современная технология CRISPR-Cas (кластеризованные, регулярно разделенные, короткие палиндромные повторы/CRISPR-ассоциированный) открыла новые перспективы для геномной инженерии в области редактирования генома и дала возможность широкому спектру применений от базовой биологии до биотехнологии и медицины. Наиболее перспективен для применения в молекулярной биологии второй класс CRISPR-Cas систем [1]. Большинство подходов этого класса к редактированию генома основаны на использовании белка SpCas9: наиболее изученной на сегодняшний день эффективной нуклеазы типа II-A, выделенной из бактерии *Streptococcus pyogenes*. Несмотря на высокую эффективность расщепления ДНК, SpCas9 имеет несколько ограничений, в частности, из-за большого размера и несовершенной специфичности, что осложняет ее использование в терапевтических целях. [2]. В связи с этим, большое теоретическое и практическое значение имеет поиск и характеристика новых ортологичных Cas9 белков из различных видов бактерий и архей. Объектами данного исследования являются две новые Cas нуклеазы, найденные в бактериях: PpCas9 (*Pasteurella pneumotropica*), PaCas9 (*Homoeodictya palmata*).

Целью данного исследования является проверка активности нуклеаз PpCas9 и PaCas9 в клетках HEK293 (от англ. Human Embryonic Kidney) путем анализа частоты геномных модификаций, внесенных новыми нуклеазами CRISPR-Cas9 с помощью T7 эндонуклеазы I. (см. рис. 1).

Определение уровня экспрессии данных нуклеаз в клетках HEK проводили с помощью цитофлуориметра GuavaEasyCyte по флуоресценции GFP (от англ. Green fluorescence protein). Денситометрическое определение интенсивности ПЦР-фрагментов, полученных из генома клеточной линии HEK и обработанных T7 эндонуклеазой I, проводили с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health).

В ходе эксперимента были получены данные по активности исследуемых нуклеаз. Результаты анализа частоты геномных модификаций с помощью T7EI могут свидетельствовать об активности нуклеаз PaCas9 и PpCas9 в клетках эукариот. Процент геномных модификаций после действия данных нуклеаз в клетках HEK293 выше, чем у SpCas9. Следовательно, PpCas9 и PaCas9 — эффективные нуклеазы, которые можно применять для таргетного редактирования генома, используя в медицине и биотехнологии.

Источники и литература

- 1) Krzysztof Chylinski, Kira S. Makarova, Emmanuelle Charpentier, Eugene V. Koonin, Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems // Nucleic Acids Res. 2014; 42(10): 6091–6105.

- 2) Ran, F.A., Cong, L., Yan, W.X., Scott, D.A., Gootenberg, J.S., Kriz, A.J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K.S. In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9 // Nature. 2015; 520 (7546):186-91

Иллюстрации



Рис. 1. Данные анализа частоты геномных модификаций нуклеазами PpCas9 и PaCas9 в сравнении с SpCas9.