

# Использование бесшовной системы CRISPR/Cas9 для получения мух *Drosophila melanogaster* с точечными мутациями

Жукова М.<sup>1\*</sup>, Яковлев К.<sup>2</sup>, Шидловский Ю.<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия

<sup>3</sup> Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

\* zhukovamv@gmail.com

**Ключевые слова:** сайт-направленный мутагенез; CRISPR/Cas9; дрозофила; генная инженерия

**Мотивация и цель:** Нашей задачей было получение линии *Drosophila melanogaster* с одной точечной заменой в гене *orb*, приводящей к появлению стоп-кодона и преждевременной остановке синтеза белка. Такая мутация необходима для последующего изучения функциональной роли неконсервативной С-концевой последовательности белка Orb.

**Методы и алгоритмы:** Бесшовная система редактирования генома CRISPR/Cas9 основана на бесследном вырезании селективных маркеров из сайта интеграции с помощью piggyBac (PB) транспозазы. PB транспозоны встраиваются по последовательностям ТТАА в геноме. ТТАА сайты дублируются при встройке транспозона и остаются в одной копии после вырезания транспозона при участии PB транспозазы. В коммерческом донорном векторе pH-D-ScarlessDsRed для бесшовной системы редактирования селективный маркер *dsRed* фланкирован концами PB транспозона и ТТАА сайтами, что обеспечивает его вырезание с помощью PB транспозазы. При подборе сайта разрезания генома Cas9-эндонуклеазой важно, чтобы сайт находился в непосредственной близости от ТТАА сайта встройки, в этом случае последовательности донорного вектора и геномной последовательности будут отличаться и Cas9-эндонуклеаза будет разрезать только геномную ДНК, а не донорный вектор. Мы выбрали сайт для разреза ДНК на расстоянии 252 нуклеотида от проводимой точечной замены. В работе использовались стандартные методы, применяемые в геномной инженерии, такие как ПЦР и молекулярное клонирование. Для получения точечной мутации мы вводили соответствующую замену в одно из двух плеч, окружающих селективный маркер *dsRed* в донорном векторе. Точечную замену вводили в два перекрывающихся комплиментарных праймера, амплифицировали с этими праймерами два продукта ПЦР. Получившиеся продукты смешивали и проводили сшивающую ПЦР, при которой используются праймеры, комплиментарные 5' и 3' концам суммарного фрагмента. В ранние эмбрионы линии мух, экспрессирующей эндонуклеазу Cas9 (линия #55821 из Bloomington Drosophila Stock Center, Блумингтон, США), инъецировали водный раствор ДНК, содержащий донорный вектор и плазмиду, экспрессирующую sgРНК. С разбившимися из эмбрионов мухами проводили индивидуальные скрещивания с

особями линии  $w^{1118}$ , их потомство отбирали на наличие встройки по селективному признаку – красным глазам (*DsRed*). Последующее вырезание селективного маркера мы проводили путем скрещивания линии, несущей встройку части донорного вектора, с линией, экспрессирующей РВ транспозазу в эмбриогенезе (линия #8285 из Bloomington *Drosophila* Stock Center, Блумингтон, США).

**Результаты:** Коммерческий вектор *pHD-ScarlessDsRed* имеет линкерные последовательности с набором сайтов рестрикции для встраивания плеч для гомологичной рекомбинации с обеих сторон от селективного маркера *dsRed*. При вырезании *dsRed* РВ транспозазой эти линкерные последовательности остаются в геноме. Таким образом, помимо вносимой в ген мутации, при использовании коммерческого вектора в гене остаются дополнительные последовательности, которые могут оказывать влияние на его экспрессию. Мы решили доработать коммерческий вектор, для чего соединение селективного маркера *dsRed* с плечами проводили не путем лигирования ДНК по сайтам рестрикции в линкерах, фланкирующих *dsRed*, а путем сшивающей ПЦР. Сначала отдельно амплифицировались два гомологичных плеча и *dsRed* с использованием праймеров, перекрывающих каждое из плеч и *dsRed* в местах их стыка. Затем проводили сшивающую ПЦР с получением одного общего фрагмента с использованием двух внешних праймеров. Такой подход позволил удалить линкерные последовательности из коммерческого вектора *pHD-ScarlessDsRed*.

В последующей работе мы столкнулись со сложностями при вырезании селективного маркера РВ транспозазой. При анализе нескольких сотен потомков ни одного случая вырезания *dsRed* не произошло, что свидетельствует о низкой эффективности работы РВ транспозазы в нашем случае. Мы провели второе скрещивание между особями первого поколения, несущих встройку донорного вектора и РВ транспозазу. Во втором поколении мы получили несколько особей, у которых отсутствовал селективный маркер *dsRed* и присутствовала точечная замена в кодирующей части гена *orb*.

**Выводы:** Мы усовершенствовали коммерческий вектор *pHD-ScarlessDsRed* путем использования сшивающей ПЦР для соединения гомологичных плеч с селективным маркером, что позволило получить линию мух, не имеющую следов линкеров при вырезании *dsRed* из гена *orb*. Этот подход может быть использован не только для получения линий с точечными мутациями в других генах, но и для других типов мутаций, таких как делеции и инсерции.

**Финансирование:** Работа поддержана Российским научным фондом (№ 24-24-00517).

## **The use of CRISPR/Cas9 scarless system to generate *Drosophila melanogaster* line with point mutations**

Zhukova M.<sup>1\*</sup>, Yakovlev K.<sup>2</sup>, Shidlovskii Y.<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Gene Biology, RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup> A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine biology, FEB RAS, Vladivostok, Russia

<sup>3</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

\* zhukovamv@gmail.com

**Key words:** site-directed mutagenesis; CRISPR/Cas9; *Drosophila*; genetic engineering

**Motivation and Aim:** Our goal was to obtain *Drosophila melanogaster* line with a single nucleotide substitution in the *orb* gene, leading to the appearance of a stop codon and synthesis of the truncated protein. This mutation is required for further study of the functional role of the non-conserved C-terminal sequence of Orb.

**Methods and Algorithms:** The CRISPR/Cas9 scarless genome editing system is based on the traceless excision of selective markers from the integration site using piggyBac (PB) transposase. PB transposons target TTAA sites in the genome for insertion. TTAA sites are duplicated during transposon insertion and remain in a single copy after transposon excision by PB transposase. In the commercial donor vector pHD-ScarlessDsRed for the scarless editing system, the selective marker *dsRed* is flanked by PB transposon ends and TTAA sites to ensure its removal by PB transposase. When selecting a cleavage site for Cas9-endonuclease in a genome, it is important that the site is in close proximity to the TTAA insertion site. In this case the sequences of the donor vector and the genomic sequence will be different and Cas9-endonuclease will excise only the genomic DNA and not the donor vector. We selected Cas9 cleavage site 252 nt away from the point mutation. We used standard methods of genetic engineering, such as PCR and molecular cloning. To obtain a point mutation, we introduced a corresponding substitution into one of the two arms surrounding the selective marker *dsRed* in the donor vector. The point substitution was introduced into two overlapping complementary primers, and two PCR products were amplified with these primers. The resulting products were mixed and stitching PCR was performed using primers complimentary to the 5' and 3' ends of the total fragment. An aqueous DNA solution containing the donor vector and a plasmid expressing sgRNA was injected into early embryos of a fly line expressing Cas9 endonuclease (line #55821 from Bloomington Drosophila Stock Center, Bloomington, USA). Flies developed from embryos were individually crossed with individuals of line *w<sup>1118</sup>*, their offspring were selected for the presence of the insertion by the selective trait – red eyes (DsRed). Subsequently we performed excision of the selective marker by crossing the line carrying the insertion part of the donor vector with a line expressing PB transposase in embryogenesis (line #8285 from Bloomington Drosophila Stock Center, Bloomington, USA).

**Results:** The commercial vector pHD-ScarlessDsRed has linker sequences with a set of restriction sites to insert shoulders for homologous recombination on both sides of the selective marker *dsRed*. When *dsRed* is excised by PB transposase, these linker sequences remain in the genome. Thus, in addition to the point mutation in the gene, when using a commercial vector, additional sequences remain that may affect gene expression. We decided to improve the commercial vector, for which the connection of the selective marker *dsRed* to the shoulders was carried out by stitching PCR rather than by ligating DNA at restriction sites in linkers flanking *dsRed*. First, two homologous shoulders and *dsRed* were amplified separately using primers that overlapped each of the shoulders and *dsRed* at their junction sites. Stitching PCR was then performed to obtain one common fragment using two external primers. This approach allowed us to remove linker sequences from the commercial vector pHD-ScarlessDsRed.

In subsequent work, we encountered difficulties in excision of the selective marker by PB transposase. When we analyzed several hundred offspring, there was no a single case of excision of *dsRed*, indicating the low efficiency of PB transposase in our case. We performed a second cross between individuals of the first generation carrying the donor vector insert and PB transposase. In the second generation, we obtained several

individuals that lacked the selective marker *dsRed* and had a point substitution in the coding part of the *orb* gene.

*Conclusion:* We have improved the commercial pHD-ScarlessDsRed vector by using stitching PCR to connect homologous arms with a selective marker. This allowed us to obtain a fly line with no linker traces when *dsRed* is excised from the *orb* gene. This approach can be used not only to obtain lines with point mutations in other genes, but also for other types of mutations, such as deletions and insertions.

*Funding:* The work is supported by the Russian Science Foundation (No. 24-24-00517).