

## Разработка системы для оценки точности геномного редактирования на основе мутагенеза в гене *rpoB* *Escherichia coli*

М.М. Аманова, И.П. Вохтанцев, Д.О. Жарков\*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

\* oxoguanine@gmail.com

**Ключевые слова:** *rpoB*; CRISPR/Cas9; специфичность

## Development of a system for evaluating genome editing accuracy based on mutagenesis in the *rpoB* gene of *Escherichia coli*

M.M. Amanova, I.P. Vokhtantsev, D.O. Zharkov\*

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

\* oxoguanine@gmail.com

**Key words:** *rpoB*; CRISPR/Cas9; genome editing accuracy

Одна из главных задач при работе с системой CRISPR/Cas9 – это повышение ее специфичности. Есть два пути решения этой задачи: направленная эволюция и рациональный дизайн. Метод направленной эволюции основан на многократном отборе по определенному свойству из рандомизированных библиотек. Для использования рационального дизайна необходимы знания о структуре белка. Изменяя аминокислотную последовательность, можно получить варианты с разной субстратной специфичностью и каталитической активностью.

В ИХБФМ СО РАН методом рационального дизайна создаются варианты белка Cas9 с повышенной специфичностью. Для их первичной оценки была создана система оценки точности геномного редактирования на основе мутагенеза в гене *rpoB* *E. coli*.

Ген *rpoB* кодирует бета-субъединицу РНК-полимеразы. Так как точечные мутации в бета-субъединице вызывают устойчивость к рифампицину, форвард-мутагенез в гене *rpoB* широко применяется для оценки действия мутагенов на клетки [1]. Селекцией на устойчивость к рифампицину были отобраны 11 мутаций в гене *rpoB* в 5 штаммах *E. coli* (XL1-Blue, CC104, BL21(DE3), SIJ488, DH5 $\alpha$ ). На их основе сконструированы 2 панели изогенных штаммов *E. coli* (SIJ488, DH5 $\alpha$ ), каждый из которых несет мутацию вблизи от последовательности 5'-NGG-3', узнаваемую ферментом SpCas9 как мотив, соседствующий с протоспейсером. С использованием этой системы была оценена точность и эффективность действия белка SpCas9 дикого типа и его вариантов с предсказанной повышенной специфичностью узнавания последовательности протоспейсера.

**Финансирование:** Исследование поддержано грантом РНФ № 21-64-00017п.

### Список литературы

1. Garibyan L., Huang T., Kim M. et al. Use of the *rpoB* gene to determine the specificity of base substitution mutations on the *Escherichia coli* chromosome. *DNA Repair*. 2003;2(5):593-608. doi 10.1016/s1568-7864(03)00024-7