

Оценка применения системы CRISPR-Cas9 в комбинации с флуорогенными зондами для клеточного имиджинга

Л.Г. Малошенок^{1*}, Г.А. Абушинова¹, Абдеева И.А.¹, Васина Е.М.³, В.В. Жердева²

¹ Институт общей генетики РАН, Москва, Россия

² Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

* maloshenoklg@gmail.com

Ключевые слова: dCas9; флуорогенные зонды; sgRNA; РНК аптамеры

Evaluation of CRISPR–Cas9-based strategies for cellular imaging using fluorogenic probes

L.G. Maloshenok^{1*}, G.A. Abushinova¹, I.A. Abdeeva¹, E.M. Vassina³, V.V. Zherdeva²

¹ Institute of general genetics RAS, Moscow, Russia

² Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the RAS, Moscow, Russia

³ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

* maloshenoklg@gmail.com

Key words: dCas9; fluorogenic probes; sgRNA; RNA aptamers

Мы создали модифицированные гидовые РНК (гРНК) системы CRISPR–dCas9 с встроенными РНК-аптамерами tdBroccoli и MangoIV в петли 1, 2 или на 3'-конце tracrРНК. На основе ортологов SpdCas9, St1dCas9 и NmdCas9 были сконструированы плазмидные и лентивирусные векторы, направленные на специфическое связывание с теломерными повторами человека. In vitro флуоресцентная спектроскопия показала 300–1000-кратное усиление свечения при взаимодействии аптамеров с красителями DFHBI (tdBroccoli) и TO3 (MangoIV) с высокой аффинностью в наномолярном диапазоне (3–6 нМ для MangoIV–TO3, 2–3 нМ для tdBroccoli–DFHBI). Встраивание аптамерных последовательностей не нарушало формирование комплекса dCas9–гРНК и специфическое связывание с геномными локусами, что подтвердили флуоресцентная микроскопия клеток человека с dCas9–FP. Полученные данные демонстрируют, что модифицированные гРНК с аптамерами эффективно визуализируют геномные локусы без белковых флуоресцентных меток и пригодны для мультиплексного прижизненного имиджинга. *Финансирование:* грант РФ №22-14-00205 и государственное задание ИОГен РАН «Изучение генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека», № 125040704886-1.