

Флуоресцентный метод количественной оценки и оптимизации связывания комплексов dCas-гРНК с ДНК

Н.Ю. Мамаева^{1*}, П.Г. Фескин¹, В.А. Яковлев¹, А.К. Шайтан^{1,2}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

* mamaeva19n@gmail.com

Ключевые слова: CRISPR-dCas; редактирование эпигенома; регуляция транскрипции; поляризация флуоресценции

Fluorescence-based method for quantitative assessment and optimization of dCas–gRNA–DNA complex binding

N.Yu. Mamaeva^{1*}, P.G. Feskin¹, V.A. Yakovlev¹, A.K. Shaytan^{1,2}

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Institute of Gene Biology, Moscow, Russia

* mamaeva19n@gmail.com

Key words: CRISPR-dCas; epigenome editing; transcriptional regulation; fluorescence polarization

Система CRISPR/(d)Cas9, помимо редактирования генома, используется для направленной регуляции экспрессии генов и эпигеномного редактирования. Среди известных вариантов наиболее распространенным является белок dSpCas9, обладающий высокой эффективностью, но большим размером, что создает проблемы, связанные с доставкой. Более компактные системы, такие как SaCas9 и CjCas9, легче интегрировать в векторные конструкции, но они уступают по эффективности связывания. Оптимизация этих белков может повысить их сродство к целевым последовательностям ДНК и усилить эпигенетический эффект. Для решения этой задачи необходимы точные количественные оценки силы связывания комплексов dCas–гРНК–ДНК. В данной работе разработаны и оптимизированы флуоресцентные методики измерения на планшетном ридере, позволяющие определять константы связывания в *in vitro* системах и создавать основу для рациональной инженерии Cas-белков с улучшенными характеристиками. Эксперименты проводились с очищенными белками SpdCas9, SadCas9 и CjdCas9. Параметры взаимодействия комплексов dCas–гРНК–ДНК определялись методом измерения поляризации флуоресценции с использованием планшетного сканера.

В ходе работы разработан метод характеристики параметров связывания на основе измерения поляризации флуоресценции. С применением данного подхода определены константы связывания комплексов dCas–гРНК с ДНК при различных значениях ионной силы, а также установлены минимальные условия по ионной силе, необходимые для формирования стабильных комплексов, что имеет особое значение, например, при электропорации. Разработанный метод может быть использован для рациональной оптимизации дизайна Cas-белков и внесения направленных мутаций, а также для оценки эффективности созданных конструкций на ранних этапах их разработки.

Финансирование: Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2024-539).