

Редактирование генов карбоангидраз α -семейства *Arabidopsis thaliana* при помощи эндонуклеазы Cas9

Н.В. Пермякова¹, Н.Н. Руденко^{2*}, Л.К. Игнатова², Е.М. Надеева², Д.В. Ветошкина²,
М.А. Козулёва², Б.Н. Иванов²

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

* nataliacherry413@gmail.com

Ключевые слова: карбоангидразы; *Arabidopsis thaliana*; CRISPR/Cas9

Editing of carbonic anhydrase genes of α -family from *Arabidopsis thaliana* using endonuclease Cas9

N.V. Permyakova¹, N.N. Rudenko^{2*}, L.K. Ignatova², E.M. Nadeeva², D.V. Vetoshkina²,
M.A. Kozuleva², B.N. Ivanov²

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Basic Biological Problems, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Russia

* nataliacherry413@gmail.com

Key words: carbonic anhydrase; *Arabidopsis thaliana*; CRISPR/Cas9

За последние несколько лет были получены экспериментальные доказательства изменений в участках ДНК, расположенных на некотором расстоянии от места интеграции Т-ДНК. Для Т-ДНК индуцированных мутантов последствия целевой мутации могут быть замаскированы изменениями в других участках ДНК, что привело к использованию более точных технологий для создания мутаций – инструментов редактирования генома с использованием CRISPR/Cas9. Наши исследования показали, что карбоангидразы (КА) – ферменты, катализирующие взаимопревращение форм неорганического углерода, играют важную роль в фотосинтезе. Для получения CRISPR/Cas9 мутантов *Arabidopsis thaliana* по генам КА α -семейства использовали инструменты редактирования для внесения точечных мутаций, обладающие различной эффективностью мутагенеза для каждого из генов. При редактировании *aKA4* (*At4g20990*) в поколении T0 была получена точечная мутация, приводящая к сбою рамки считывания, и уже в следующем поколении от самоопыления были выявлены гомозиготы по мутации в этом гене. Нокаут гена *aKA4* повлиял на уровень экспрессии ряда генов, кодирующих белки фотосинтеза, генов, индуцируемых иммунными сигналами растений, а также сказывался на изменении фотосинтетических характеристик.

Для редактирования *aKA2* (*At2g28210*) использовали две направляющих РНК, и уже в поколении T0 было выявлено растение, несущее в одной копии гена большую делецию, а во второй копии гена – небольшую делецию, совмещенную с инверсией, и являющееся гомозиготой по мутации. Для редактирования *aKA5* (*At1g08065*) было отобрано две пары направляющих РНК, однако среди 150 проанализированных растений не было выявлено ни одного мутанта. Возможная причина низкой эффективности редактирования кроется в высоком проценте АТ пар (66%) в кодирующей последовательности этого гена, что представляет собой трудность при редактировании с помощью эндонуклеазы Cas9, которая ориентирована на РАМ NGG.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ 23-14-00396.