

Создание вектора для синтеза гидовых РНК с суперскрученной плазмиды и его валидация с помощью редактирования CRISPR/Cas9 *in vitro*

Д.Н. Поздеев^{1,3}, Э.А. Хуснутдинов¹, М.П. Терехов^{1,2}, Е.В. Михайлова^{1,2,3*}

¹ Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

² Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа, Россия

³ Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

* mikhele@list.ru

Ключевые слова: CRISPR/Cas; гидовые РНК; T7 терминатор; ICE

Construction of a vector for gRNA synthesis from a supercoiled plasmid and its validation by *in vitro* CRISPR/Cas9 editing

D.N. Pozdeev^{1,3}, E.A. Khusnutdinov¹, M.P. Terekhov^{1,2}, E.V. Mikhaylova^{1,2,3*}

¹ Institute of biochemistry and genetics UFRC RAS, Ufa, Russia

² Ufa state petroleum university, Ufa, Russia

³ Ufa university of science and technology, Ufa, Russia

* mikhele@list.ru

Key words: CRISPR/Cas; guide RNA; T7 terminator; ICE

Самым популярным и широко используемым методом CRISPR/Cas редактирования генома свиней является микроинъекция либо электропорация рибонуклеопротеидного комплекса, состоящего из белка Cas и гидовой РНК. Синтез последней – многоступенчатый процесс, от которого во многом зависит успешность редактирования. Обычно синтез осуществляется с плазмиды при помощи фермента T7 РНК-полимеразы. При этом критически важно обеспечивать высокую эффективность остановки транскрипции, что может быть достигнуто путем рестрикции вектора, а также использования более эффективных терминаторов.

Для эффективного редактирования геномов свиней была создана высококопийная плаزمид с усовершенствованным T7-терминатором, куда методом GoldenGate с отрицательной селекцией на стрептомицине может быть клонирована необходимая последовательность спейсера гидовой РНК. Работоспособность конструкции была проверена методом *in vitro* CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования (ICE) на примере двух гидовых РНК к гену *CD163*.

Наработка гидовой РНК проводилась с использованием набора T7 High Efficiency Transcription Kit (Transgen Biotech). Последовательность для редактирования длиной 1096 пн была наработана методом ПЦР с образцов ДНК свиней пород ландрас и йоркшир. Редактирование проводилось в буфере 3.1 (NEB) с использованием белка Cas9 (Biolabmix). После обработки РНКазой и протеиназой продукты реакции визуализировались в агарозном геле. Анализ показал успешное разрезание редактируемого фрагмента RNP-комплексом с образованием фрагментов ожидаемого размера.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2025-014 (№ 075-15-2024-666).