

Масс-фотометрия для исследования комплексов системы CRISPR/Cas9

Л.В. Саковина^{1,2*}, А.В. Ендуткин¹, Д.С. Новопашина^{1,2}, Д.О. Жарков^{1,2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* kodi99@list.ru

Ключевые слова: CRISPR/Cas9; 2'-модифицированные РНК; масс-фотометрия

Mass Photometry for CRISPR/Cas9 system complex research

L.V. Sakovina^{1,2*}, A.V. Endutkin¹, D.S. Novopashina^{1,2}, D.O. Zharkov^{1,2}

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* kodi99@list.ru

Key words: CRISPR/Cas9; 2'-modified RNA; Mass Photometry

Система геномного редактирования CRISPR/Cas9 широко применяется в молекулярной биологии и генетической инженерии. Дизайн и использование химически модифицированных направляющих РНК остается актуальным направлением в области исследования систем редактирования генома на основе CRISPR/Cas9. В данной работе проведено исследование влияния модификаций в составе направляющих РНК на активность CRISPR/Cas9 системы *in vitro*. При сравнительном исследовании эффективности расщепления модельной плазмиды нуклеазой SpyCas9 из *Streptococcus pyogenes* в комплексе с направляющими sgРНК, содержащими 2'-фтор-, 2'-О-метил- и дезоксирибонуклеотиды, а также в присутствии немодифицированной sgРНК, продемонстрировано снижение степени расщепления ДНК-мишени, однако отмечено, что в присутствии 2'-фтормодифицированной sgРНК наблюдалось расщепление более 50% субстрата. С помощью метода интерферометрической рассеивающей микроскопии (ИРМ) возможна регистрация молекулярных масс отдельных молекул. В данной работе проведена оценка метода ИРМ для исследования биохимических свойств эндонуклеазы SpyCas9 и ее комплекса с направляющей sgRNA. Таким образом, была определена соответствующая ранее охарактеризованной молекулярная масса SpyCas9 (155,9 кДа), для SpyCas9 [1]. При определении молекулярной массы sgRNA регистрировали как образование мономерной формы (38 кДа), так и димеров (67,05 кДа). В присутствии sgRNA и SpyCas9 молекулярная масса смещалась и соответствовала 184,9 кДа, что указывает на формирование комплекса. При исследовании стабильности и стехиометрии образования комплекса эндонуклеазы SpyCas9 с направляющими sgРНК с течением времени суммарная масса компонентов комплекса сохранялась в течение нескольких часов. Также наблюдали кратное увеличение массы комплекса, что может указывать на образование димеров.

Финансирование: Исследование поддержано РНФ № 21-64-00017-П.

Список литературы

1. Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D. et al. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*. 2014;156:935-949