

Применение системы CRISPR/Cas9 для получения репортерных плазмид и исследование мутагенеза, вызванного 8-оксогуанином, *in vitro* и *in vivo*

М.С. Чуприкова^{1*}, А.В. Юдкина¹, Д.О. Жарков^{1, 2}

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

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* ms.chuprikova@gmail.com

Ключевые слова: Cas9-никазы; репликация; репарация; точность

Application of the CRISPR/Cas9 system for the generation of reporter plasmids and the investigation of 8-oxoguanine-induced mutagenesis *in vitro* and *in vivo*

M.S. Chuprikova^{1*}, A.V. Yudkina¹, D.O. Zharkov^{1, 2}

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

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

* ms.chuprikova@gmail.com

Key words: Cas9-nickases; replication; repair; fidelity

Окислительные повреждения ДНК, в частности 8-оксогуанин (8-охоG), входят в число основных источников мутаций в геноме всех живых организмов. Для изучения репарации поврежденных оснований ДНК в живых клетках можно применять репортерные плазмиды с однонуклеотидными модификациями. Наиболее эффективный способ получения таких конструкций основан на внесении двух близко расположенных одноцепочечных разрывов на одной из цепей ДНК с помощью ДНК-никаз. Но данный метод ограничен узким спектром сайтов узнавания ДНК-никаз и поэтому не позволяет нацеливать их на любой желаемый регион. В ходе работы для получения репортеров с модификациями в произвольных сайтах адаптирована система Cas9-никаз, которая ограничена лишь мотивом PAM.

У плазмид с репликоном ColE1 в инициации репликации участвует ДНК-полимераза I. Синтезировав около 400 нуклеотидов отстающей цепи, она уступает место ДНК-полимеразе III. Таким образом, введение поврежденного основания (8-охоG) при помощи Cas9-никаз в данную область плазмиды позволяет исследовать мутагенез с участием ДНК-полимеразы I при прохождении повреждения в условиях *in vivo*.

Имеющиеся в литературе количественные данные о точности ДНК-полимераз *in vitro* в подавляющем большинстве получены на простейших субстратах вида «праймер–матрица», что не позволяет оценить вклад процессов синтеза с вытеснением цепи, которые часто встречаются в живой клетке при репликации и репарации. В данной работе исследована точность ДНК-полимеразы I (полноразмерной и фрагмента Кленова) на субстратах с вытесняемой ДНК- и РНК-цепью, идентичных по своей последовательности участку первого фрагмента Оказаки плазмиды pUC19. Показано, что точность включения нуклеотидов напротив 8-охоG зависит от присутствия и структуры вытесняемой цепи. Впервые проведено сравнение мутагенеза, вызванного 8-охоG, для ДНК-полимеразы I *E. coli* в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Финансирование: Исследование поддержано РНФ, № 24-14-00285.