

ДИЗАЙН МНОЖЕСТВЕННОЙ ЭКСПРЕССИОННОЙ КАССЕТЫ ДЛЯ НАРАБОТКИ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ РНК СИСТЕМЫ CRISPR-CAS

Зайцев П.А., Новиков Р.В., Грибкова А.К., Глухов Г.С., Шайтан А.К.

НТУ «Сириус», Сочи, Адлерский р-н, 354340, Олимпийский пр-т, 1 Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический ф-т, каф. Биоинженерии, Москва, 119991, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 73 Тел. +7(903)5954091 Email: zaitsev@mail.bio.msu.ru

Системы адаптивного иммунитета бактерий CRISPR-Cas совершили революцию в области молекулярной биологии за прошедшее десятилетие. Особенности устройства и механизмы формирования эффекторного комплекса системы, состоящего из белка эндонуклеазы Cas и молекулы направляющей РНК, сделала данную систему простой в использовании. А высокое разнообразие систем CRISPR-Cas, обнаруженных в разных группах бактерий, позволяет решать широкий спектр как фундаментальных, так и прикладных задач. С другой стороны, это простота устройства эффекторного комплекса системы, состоящего из белка эндонуклеазы Cas и молекулы направляющей РНК. Один из способов применения систем CRISPR-Cas является молекулярная диагностика патогенных микроорганизмов, основанная на специфическом узнавании фрагментов нуклеиновых кислот – ДНК и РНК – эффекторными комплексами CRISPR-Cas. Создание мультиплексных вариантов системы CRISPR-Cas – способной детектировать наличие сразу нескольких фрагментов нуклеиновых кислот патогена – является перспективным направлением в данной области.

В рамках данной работы был разработан дизайн молекулярной системы для синтеза двух типов направляющих РНК для формирования двух типов эффекторного комплекса CRISPR-Cas *in vitro*. В качестве вектора была выбрана плаزمида pSB1C3 с последовательностью BioBrick Bba_K1689000 – кассетой для экспрессии направляющей РНК. Последовательность кассеты была подтверждена методом секвенирования по Сэнгеру. Рестрикционный анализ с использованием фермента BsaI показал возможность клонирования спейсерной части направляющей РНК в данную кассету по соответствующим сайтам рестрикции. Согласно разработанному дизайну, планируется объединить две кассеты с направляющими РНК методом BioBrick Assembly Standard 10 – с использованием стандартов клонирования BioBrick. В стандарте 10 последовательность BioBrick фланкирована с 5'-конца участком с сайтами EcoRI и XbaI, а с 3'-конца – участком с сайтами SpeI и PstI. Особенностью данной системы является то, что при лигировании по сайтам рестрикции SpeI и XbaI происходит объединение фрагментов с исчезновением данных сайтов рестрикции. Таким образом, две последовательности с экспрессионной кассетой объединяются в одну на выбранном векторе. Данная система позволит проводить синтез сразу двух направляющих РНК для формирования двух эффекторных комплексов CRISPR-Cas для детекции целевых фрагментов нуклеиновых кислот.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-51053