

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПАРЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕННЫХ CRISPR/CAS ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ЦЕЛЕВОГО УЧАСТКА ДНК, ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Армеев Г.А., Новиков Р.В., Шайтан А.К.

НТУ "Сириус", Олимпийский пр-т 1, 354340, Сочи, Россия Биологический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, 1-12 Ленинские горы, Москва, 119991, Россия

Разработка новых методов детекции молекул, характерных для патогенных микроорганизмов, и других методов молекулярной диагностики весьма востребована. Весьма перспективным выглядит применение систем детекции основанных на Cas белках, в частности dCas9. Применение систем такого рода удобно тем, что позволяет создать универсальную платформу, в которой белковая часть остается неизменной, а выбор патогена осуществляется при помощи CRISPR РНК. В данной работе мы исследовали применимость систем детекции ДНК патогена при помощи флуоресцентно меченных Cas белков методами молекулярного моделирования.

Суть работы предлагаемой нами системы заключается в том, что два или более флуоресцентно-меченых CRISPR/CAS комплекса, будут связываться с ДНК достаточно близко друг от друга, что приведет к возможности резонансного переноса энергии между флуоресцентными зондами, который можно будет детектировать при помощи универсального либо специализированного спектрофлуориметра. В качестве флуоресцентных зондов целесообразно применять хромобелки, в данной работе мы выбрали пару белков Citrine и mScarlet.

Для того, чтобы оценить возможность переноса энергии между хромобелками, мы произвели поиск наиболее выгодных ориентаций пар Cas9 белков на ДНК. Мы определили, что одной из наилучших (по критерию отсутствия стерических перекрытий и расстоянию между белками) является пара комплексов CAS расположенных один за другим с расстоянием между ними в 38 н.п. Мы подготовили эту модель для изучения методом молекулярной динамики в огрубленном силовом поле SIRAH и рассчитали траекторию свободной динамики продолжительностью 600 нс при помощи программы Gromacs 2020. Система сохраняла структуру на всем времени моделирования.

Мы предложили следующие точки введения меток: концевая метка на С-конце CAS (положение 1361) и внутренняя метка в положении GLY 533. Согласно проведенному анализу расстояние между этими аминокислотами варьирует в ходе траектории от 1 до 4 нм, однако, после учета размеров флуоресцентных белков с использованием библиотеки Labellib, мы показали, что ожидаемый разброс расстояний между флуоресцентными метками выше и приводит к значительно более низким величинам эффективности переноса энергии (от 0,25 до 0,75).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 19-34-51053.