

Оценка функционирования нуклеаз SpCas9 и AsCpf1 (Cas12a) в клетках НЕК293 в дифференциально экспрессирующихся районах хроматина

Научный руководитель – Павлова Софья Викторовна

Шаяхметова Лилия Шагитовна

Студент (бакалавр)

Новосибирский государственный университет, Факультет естественных наук,
Новосибирск, Россия

E-mail: l.shayakhmetova@g.nsu.ru

Применение программируемых искусственных нуклеаз является одним из ключевых методов исследований в современной генетике, молекулярной биологии, медицине. Данное направление науки стало активно развиваться после появления эффективных методов редактирования нуклеотидных последовательностей, в частности, CRISPR-опосредованных систем. Благодаря доступности, относительной простоте устройства и высокой эффективности чаще всего применяют SpCas9. Однако данная система имеет недостатки, один из которых - нецелевая активность. Решением проблемы могут стать новые CRISPR-ассоциированные белки, проявляющие более низкий уровень нецелевой активности. Примером является система AsCpf1 (Cas12a).

Белок AsCpf1 обладает более привлекательными свойствами по сравнению с SpCas9. При гидролизе AsCpf1 образуются 5'-«липкие» концы, что обеспечивает более точную интеграцию донорного участка. AsCpf1 обладает более низким уровнем нецелевой активности, чем SpCas9. Тем не менее имеются свидетельства, что AsCpf1 недостаточно активна в районах компактного хроматина [1].

Чтобы сравнить работу нуклеаз SpCas9 и AsCpf1 в дифференциально экспрессирующихся районах хроматина клеток НЕК293, был выбран локус доступного хроматина Safe harbor на 1 хромосоме и район 17 экзона гена кардиального белка MYBPC3, который не экспрессируется в НЕК293. Мы подобрали специфические протоспейсеры в целевых районах и клонировали в соответствующие плазмиды, кодирующие SpCas9 (pX458) и AsCpf1 (pAsCpf1(TYCV)(BB), pAsCpf1-2NLS). С помощью липофектамина провели временную трансфекцию плазмид в клетки НЕК293. Через 48 часов после внесения векторов была выделена геномная ДНК клеток НЕК293, целевые районы амплифицированы и секвенированы. Полученные данные проанализировали с помощью алгоритма TIDE. Было показано, что нуклеаза SpCas9 редактирует районы как активного, так и неактивного хроматина. AsCpf1 редактирует только район Safe harbor.

Работа поддержана РФФИ и Новосибирской областью, номер проекта 19-44-540002 p_a.

Источники и литература

- 1) Zetsche B. et al. Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System // Cell. 2015. Vol. 163. № 3. P. 759-771.