

Создание регулируемой системы CRISPR-Cas12a для редактирования генома микобактерий

Дудик П.С.^{1,2}, Армянинова Д.К.¹

¹Институт Биохимии им А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

электронный адрес: info@fbras.ru

²Институт Агробиотехнологии РГАУ-МСХА им К.А. Тимирязева, Москва, Россия

Аннотация

Mycobacterium tuberculosis – опасный патоген, вызывающий туберкулез, представляет собой угрозу для общественного здравоохранения во всем мире. Изучение и редактирование генома *M.tuberculosis*, разработка новых лекарств – актуальная, но очень трудоемкая задача. Одним из таких перспективных инструментов является система CRISPR/Cas12a. Двучепочный разрыв ДНК после действия эндонуклеазы Cas12a у микобактерий может восстанавливаться посредством одного из трёх основных путей репарации (HR, NHEJ, SSA), активизирующихся на разных этапах жизненного цикла клетки.

Для эффективного решения различных задач редактирования необходимо создать удобную регулируемую систему редактирования. В данной работе была произведена характеристика индуцируемого тетрациклином промотора Pmyc1tetO, а также изучена зависимость уровня транскрипции гена *cas12a* от различных доз индуктора.

Эксперимент

На первом этапе в плазмиду pSBY(myb1tetO)_sgRNA, которая содержит все компоненты для работы CRISPR системы в микобактериях, ввели последовательность гена тетрациклинового репрессора TetR. Наличие вставки подтверждали методом ПЦР. На втором этапе ввели полученную плазмиду в штамм *M.smegmatis* MC²155 методом электропорации.

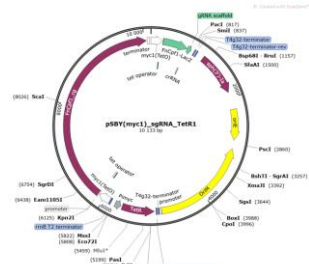


Рис. 1 Карта плазмиды pSBY(myb1)_sgRNA_TetR



Рис. 2 Колонии трансформированных клеток *M.smegmatis*

Далее были оценены зависимость уровня транскрипции гена *cas12a* и динамика роста клеток *M.smegmatis* от различных доз (50; 100 нг/мл) и типов индуктора (Tc, ATc).

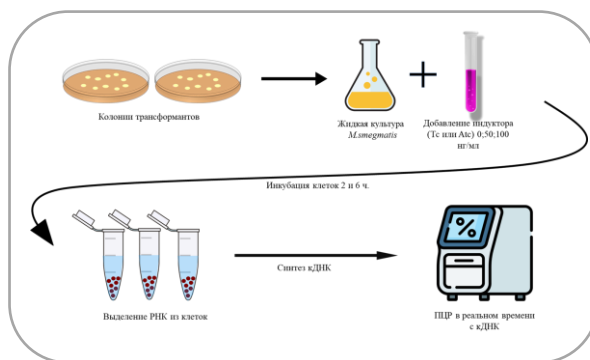


Рис. 3 Схема эксперимента по выявлению уровня экспрессии гена *cas12a* от различных доз и типов индуктора

Результаты

Уровень экспрессии *cas12a* при инкубации в течение 2 и 6 ч с добавлением Tc в концентрации 50 и 100 нг/мл практически одинаковый и незначительно повышается, относительно контроля.

При инкубации в течение 2 ч с ATc экспрессия гена по сравнению с группой Tc отличается незначительно, при инкубации 6 часов с ATc в концентрации 100 нг/мл – уровень экспрессии *cas12a* повышается в 6 раз относительно контроля.

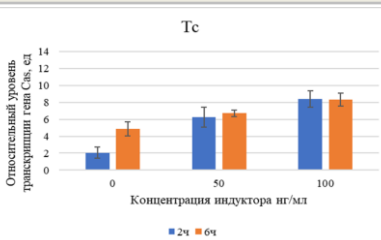


Рис. 4 График оценки зависимости уровня транскрипции гена *cas12a* от Tc

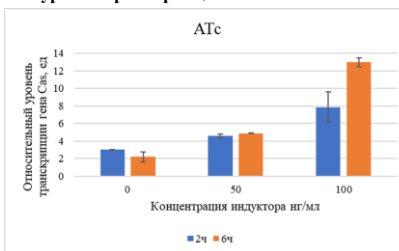


Рис. 5 График оценки зависимости уровня транскрипции гена *cas12a* от ATc

Показатель OD₆₀₀ через 6 ч заметно снижается по сравнению с контролем при добавлении Tc, следовательно, он обладает достаточно выраженным токсическим эффектом, подавляющим рост клеток *M.smegmatis* в отличие от ATc. Вероятно, этим можно объяснить и менее выраженный уровень экспрессии *cas12a* в присутствии Tc, в отличие от добавления ATc.

При добавлении ATc к клеткам в тех же концентрациях, все показатели OD₆₀₀ близки по значению к контролю во всех точках.

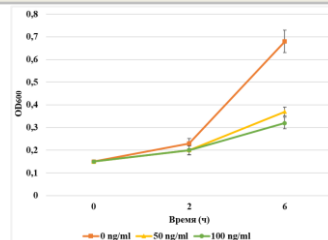


Рис. 6 График кривых роста клеток *M.smegmatis* при добавлении Tc

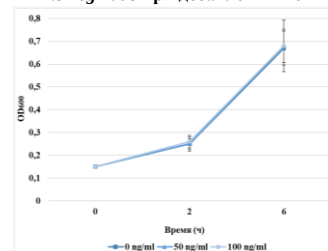


Рис. 7 График кривых роста клеток *M.smegmatis* при добавлении ATc

Заключение

1. Создана одноплазмидная систему CRISPR-Cas12a, регулируемая TetR, для редактирования генома микобактерий;
2. Получен штамм *M.smegmatis*, несущий собранный вариант системы CRISPR/Cas12a;
3. Изучена зависимость уровня транскрипции гена *cas12a* и динамика роста клеток в зависимости от типа и концентрации индуктора.