

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ РАБОТЫ CRISPR/DCAS9-СИСТЕМ: ОТ *IN VITRO* ЭКСПЕРИМЕНТОВ В БЕСКЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ ДО ИССЛЕДОВАНИЙ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

Мамаева Н.Ю., Фескин П.Г., Разинкова А.И., Шайтан А.К.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический ф-т, каф. Биоинженерии, 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Тел.: (095)939-19-63, факс: (095)939-11-15, E-mail: mamaeva19n@gmail.com

Система CRISPR/(d)Cas9, широко используемая в качестве инструмента редактирования генома, может быть адаптирована для регуляции экспрессии генов путем активации или репрессии транскрипции, редактирования эпигенома, визуализации динамики геномных локусов и построения генетических сетей. Для оценки эффективности работы новых эпигенетических инструментов, построения моделей генетических схем, необходимо понимание параметров взаимодействия комплексов dCas-гРНК-ДНК и уровней экспрессии репортерных белков, измеренных в системах *in vitro*. В данной работе были оптимизированы методы измерения флуоресценции в планшетном ридере для измерения констант связывания dCas-гРНК с ДНК, оценки эффективности работы эпигенетических инструментов в эукариотических клетках и генетических схем в бактериях.

Константы диссоциации измеряли методом поляризации флуоресценции в планшетном ридере в 384-луночных планшетах. Эксперименты по эффективности работы эпигенетических инструментов проводили на клетках НЕК293, а анализ генетических схем в клетках в клетках *E.coli*. В случае клеточных систем сигнал флуоресценции измеряли в черных 96-луночных планшетах.

В данной работе метод измерения поляризации флуоресценции был использован для измерения констант диссоциации (K_d) комплексов dCas9-гРНК с ДНК в буферах с различной концентрацией одно- и двухвалентных ионов. Для оценки эффективности работы генетических схем были подобраны условия культивирования бактериальных клеток в планшетном ридере на примере репортерной системы на основе mRFP и получены кривые роста клеток, созревания флуоресцентного белка и подавления его активности системой на основе белка dCas9. На следующем этапе работы были подобраны протоколы измерения сигнала флуоресценции для оценки эпигенетических инструментов на основе dCas9, слитого с доменом репрессии KRAB и показана эффективность использования планшетного ридера для кинетического анализа уровня репрессии репортерных белков.

Таким образом, измерение сигналов флуоресценции и поляризации флуоресценции в планшетном ридере позволяет оптимизировать и автоматизировать оценку эффективности работы dCas-систем как в бесклеточных системах, так и в клетках.