



## ФОТОАКТИВИРУЕМАЯ СИСТЕМА CRISPR/Cas9

© 2021 г. Е. А. Ахметова\*, \*\*, \*\*\*, В. М. Гольшев\*, \*\*\*, И. П. Вохтанцев\*, \*\*\*,  
М. И. Мещанинова\*, А. Г. Веньямина\*, Д. С. Новопашина\*, \*\*, \*\*\*, #

\*ФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины” СО РАН,  
Россия, 630090 Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

\*\* Научно-технологический университет “Сириус”, Россия, 354383 Сочи, Олимпийский просп., 1

\*\*\* Новосибирский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 1

Поступила в редакцию 18.09.2020 г.

После доработки 28.09.2020 г.

Принята к публикации 30.09.2020 г.

Разработан подход к созданию фотоактивируемой системы CRISPR/Cas9, содержащей белок Cas9, синтетическую 102-звенную sgРНК или пару направляющих crРНК/tracrРНК и блокирующие фоторасщепляемые олигодезоксирибонуклеотиды. Фоторасщепляемые олигодезоксирибонуклеотиды содержат два или три фоторасщепляемых линкера в своем составе. Термическая стабильность комплексов таких модифицированных олигонуклеотидов с направляющими РНК уменьшалась с увеличением количества линкеров. Исследована кинетика фоторасщепления фотомодифицированных блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов. Продемонстрирована *in vitro* возможность фотоактивации геномного редактирования в результате УФ-облучения при использовании фоторасщепляемых блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов в системе CRISPR/Cas9.

**Ключевые слова:** фоторасщепляемый линкер, направляющие РНК для системы CRISPR/Cas9, фотоблокирующий олигодезоксирибонуклеотид, фотоактивируемое редактирование генома *in vitro*

**DOI:** 10.31857/S0132342321020020

### ВВЕДЕНИЕ

Облучение светом определенной длины волны позволяет эффективно управлять активностью различных молекулярно-биологических систем *in vitro* и *in vivo* [1–3]. Введение светочувствительных молекул в состав олигонуклеотидов или белков дает возможность изменять их активность в клетках с высоким пространственно-временным разрешением. В литературе описаны конструкции, которые можно активировать, например, за счет удаления фотоблокирующей группы под действием света, изменения их вторичной структуры в результате смены конформации введенного светочувствительного линкера или внесения разрывов в их структуру путем гидролиза фоторасщепляемого линкера. На сегодняшний день известны разнообразные фоторегулируемые конструкции на ос-

нове малых интерферирующих РНК (siРНК) [4, 5], микроРНК [6, 7], антисмысловых олигонуклеотидов [8, 9], каталитических нуклеиновых кислот [10, 11], аптамеров [12], а также направляющих РНК для системы CRISPR/Cas9 [13–18].

CRISPR-системы, в частности системы CRISPR/Cas9 [19, 20], являются перспективным инструментом редактирования генома. Эффекторные комплексы направляющих РНК и Cas-белков позволяют вносить разрывы в заданные положения ДНК или РНК. В качестве направляющих РНК в системе CRISPR/Cas9 используют природный вариант из двух молекул РНК – crРНК, содержащей участок связывания с ДНК-мишенью и участок связывания со второй молекулой РНК, а именно tracrРНК, взаимодействующей с белком Cas9. Другим вариантом является использование химерной протяженной sgРНК, объединяющей в себе последовательности crРНК и tracrРНК [19].

На данный момент предложены два варианта создания фотоактивируемых систем CRISPR/Cas9. Первый вариант подразумевает создание направляющих РНК, содержащих фотогруппы в гетероциклических основаниях, которые блокируют активность CRISPR-системы до облучения светом [13–17]. Во втором варианте используют бло-

Сокращения: CRISPR – регулярно расположенные кластеры коротких палиндромных повторов (clustered regularly interspaced short palindromic repeats); crРНК – CRISPR РНК; PAM – мотив, прилегающий к протоспейсеру (protospacer adjacent motif); PL – 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиол; sgРНК – объединенная направляющая рибонуклеиновая кислота (single guide RNA); siРНК – малые интерферирующие РНК; tracrРНК – *транс*-активирующая CRISPR РНК (*trans*-activating CRISPR RNA).

# Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-51-29; факс: +7 (383) 363-51-53; эл. почта: danov@niboch.nsc.ru).

Таблица 1. Последовательности и молекулярные массы блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов

Шифр	Последовательность, 5'–3'	Молекулярная масса	
		рассчитано	найдено*
<b>B20_PL3</b>	TTTTTT-PL-ACAAA-PL-TTGAG-PL-TTATCC	7421.71	–
<b>B30_PL2</b>	GCTCTAAAAC-PL-TTTTTTACAA-PL-ATTGAGTTAT	9657.20	–
<b>B30_PL3</b>	GCTCTAAA-PL-ACTTTTT-PL-TACAAAT-PL-TGAGTTAT	9901.32	–
<b>B30_PL2_F</b>	<i>Flu</i> -GCTCTAAAAC-PL-TTTTTTACAA-PL-ATTGAGTTAT	10225.69	–
<b>B30_PL3_F</b>	<i>Flu</i> -GCTCTAAA-PL-ACTTTTT-PL-TACAAAT-PL-TGAGTTAT	10469.81	–
<b>B20</b>	TTTTTTACAAATTGAGTTATCC	6689.36	6690.34
<b>B30</b>	GCTCTAAAACTTTTTACAAATTGAGTTAT	9168.94	9169.02

\* По данным MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Прочерком обозначены случаи, когда не удалось зарегистрировать масс-спектр.

**PL** – фоторасщепляемый линкер на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола; **Flu** – остаток флуоресцеина, введенный по 5'-фосфату через аминоксильный линкер.

кирующие олигонуклеотиды, содержащие один или несколько фоторасщепляемых линкеров на основе 1-(2-нитрофенил)-пропандиола (PL), комплементарные направляющей sgРНК [18]. Такие блокирующие олигонуклеотиды связываются с sgРНК, образуя комплементарный дуплекс, не позволяющий sgРНК сформировать комплекс с ДНК-мишенью и инициировать работу системы CRISPR/Cas9 вплоть до облучения светом.

Целью данного исследования являлась разработка фотоактивируемой системы CRISPR/Cas9, содержащей белок Cas9, синтетическую 102-звенную sgРНК или пару направляющих sgРНК/tracrРНК и блокирующие фоторасщепляемые олигодезоксирибонуклеотиды, и сравнительное изучение влияния длины блокирующего олигонуклеотида и количества фоторасщепляемых линкеров в его составе на эффективность активации обоих вариантов систем.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания фотоактивируемой системы CRISPR/Cas9 нами были синтезированы фоторасщепляемые олигодезоксирибонуклеотиды, комплементарные фрагменту направляющей РНК в области связывания с ДНК-мишенью по аналогии с работой Jain et al. [18].

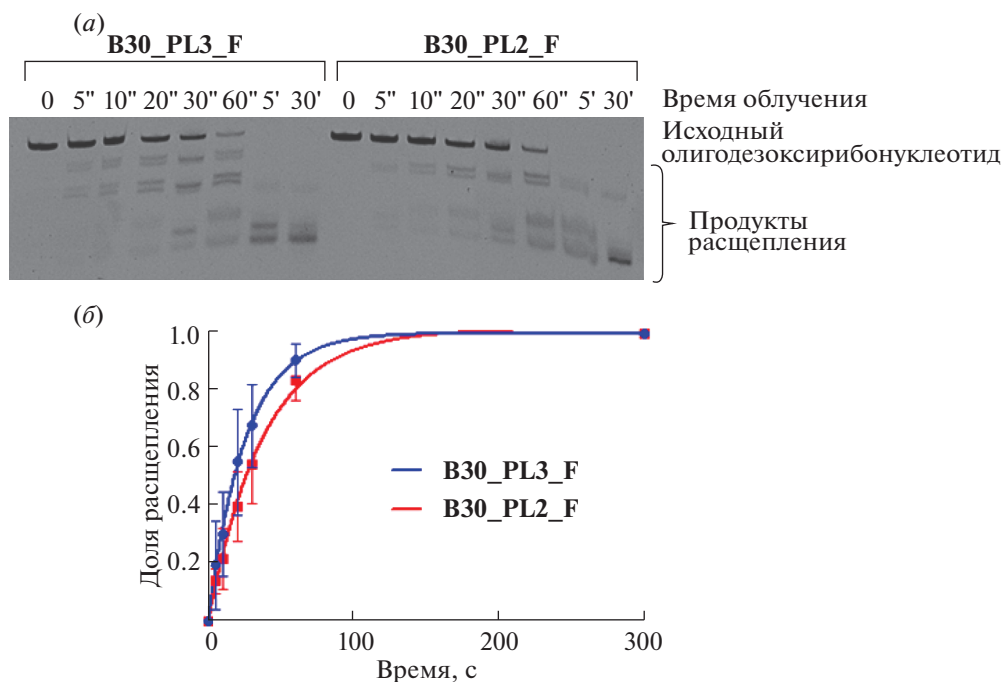
Для введения фоторасщепляемого линкера был синтезирован фосфитамида на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола (PL) [4, 8]. С его использованием в ходе автоматического твердофазного фосфитамида синтеза была получена серия фоторасщепляемых олигодезоксирибонуклеотидов, комплементарных фрагменту направляющей РНК, участвующей в образовании комплекса с ДНК-мишенью (табл. 1). Кроме того, были получены немодифицированные олигодезоксирибонуклео-

тиды такой же последовательности, не содержащие фоторасщепляемых линкеров.

Все олигодезоксирибонуклеотиды и их производные выделяли методом препаративного гель-электрофореза. Следует отметить, что электрофоретическая подвижность олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих фоторасщепляемый линкер, была меньше в сравнении с подвижностью немодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов с такой же нуклеотидной последовательностью. Строение олигонуклеотидов подтверждали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии (табл. 1). Олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие фоторасщепляемый линкер, скорее всего, гидролизуются по положениям введения фоторасщепляемых линкеров в процессе ионизации лазером, в результате чего не удалось получить спектры целых молекул. В масс-спектрах обнаруживали лишь пики, соответствующие массам фрагментов олигодезоксирибонуклеотидов, образующихся при гидролизе.

Кинетику расщепления олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих фоторасщепляемые линкеры, исследовали путем анализа облученных в течение определенного времени светом с длиной волны 365 нм водных растворов их 5'-флуоресцеин-модифицированных аналогов методом денатурирующего гель-электрофореза с флуоресцентной визуализацией геля (рис. 1а).

Сравнительное исследование расщепления флуоресцентно-меченых олигодезоксирибонуклеотидов (**B30\_PL3\_F** и **B30\_PL2\_F**), содержащих фоторасщепляемые линкеры, показало, что полное расщепление обоих олигодезоксирибонуклеотидов происходит уже через 5 мин облучения (рис. 1б). При этом полное расщепление олигодезоксирибонуклеотида с тремя фотолabile вставками происходит быстрее.



**Рис. 1.** (а) – Пример электрофоретического анализа расщепления флуоресцентно-меченых фотомодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов **B30\_PL3\_F** и **B30\_PL2\_F**; (б) – кинетические кривые расщепления **B30\_PL3\_F** и **B30\_PL2\_F**.

В качестве направляющих РНК для системы CRISPR/Cas9 автоматическим твердофазным фосфитамидным методом были синтезированы 102-звенная sgРНК и пара crРНК/tracrРНК (табл. 2).

С использованием плазмиды pBS2SKM Psp2 TTG на основе вектора pBluescript II SK(–) со вставкой протоспейсерной последовательности и РАМ (5'-TGG-3') в качестве ДНК-мишени проводили исследование способности фоторасщепляемых олигодезоксирибонуклеотидов, комплементарных направляющей РНК, блокировать работу системы CRISPR/Cas9 до облучения и активировать ее действие после облучения. Блокирующие олигонуклеотиды были сконструированы таким образом, чтобы образовывать комплементарный дуплекс с направляющей РНК и препятствовать

формированию комплекса с двуцепочечной ДНК-мишенью (плазмидой) (рис. 2).

В результате облучения блокирующий олигодезоксирибонуклеотид гидролизует по сайтам введения фоторасщепляемых линкеров, и РНК высвобождается из дуплекса, после чего запускается действие системы CRISPR/Cas9.

Предварительно была проверена термическая стабильность дуплексов блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих фоторасщепляемые линкеры, с направляющей РНК на примере crРНК (рис. 3).

Сравнительное исследование показало, что введение фоторасщепляемых линкеров уменьшает термическую стабильность дуплексов блокирующих олигонуклеотидов с crРНК, при этом увеличение числа линкеров также отрицательно ска-

**Таблица 2.** Последовательности химически синтезированных направляющих РНК

РНК (длина)	Последовательность олигодезоксирибонуклеотида*, 5'–3'
sgРНК (102 нт)	GG <u>AUAACUC</u> AAUUUGUAAAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG-CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
crРНК (42 нт)	<u>AUAACUC</u> AAUUUGUAAAAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUU
tracrРНК (74 нт)	AACAGCAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAC-CGAGUCGGUGCUUUUUU

\* Подчеркнута область взаимодействия с двуцепочечной ДНК-мишенью.

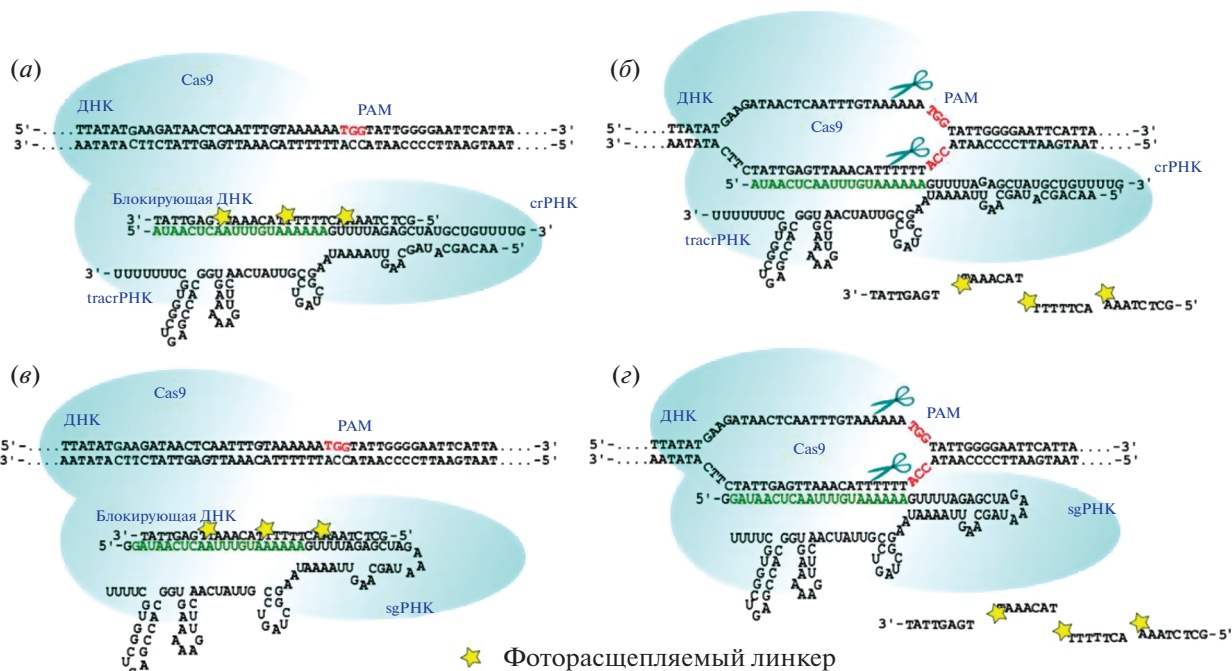


Рис. 2. Система CRISPR/Cas9, включающая двуцепочечную ДНК-мишень, направляющие РНК и блокирующие фоторасщепляемые ДНК до облучения (а, в) и после облучения (б, г). (а, б) – Система, содержащая пару направляющих crPHK/tracrPHK; (в, г) – система, содержащая химерную направляющую sgPHK.

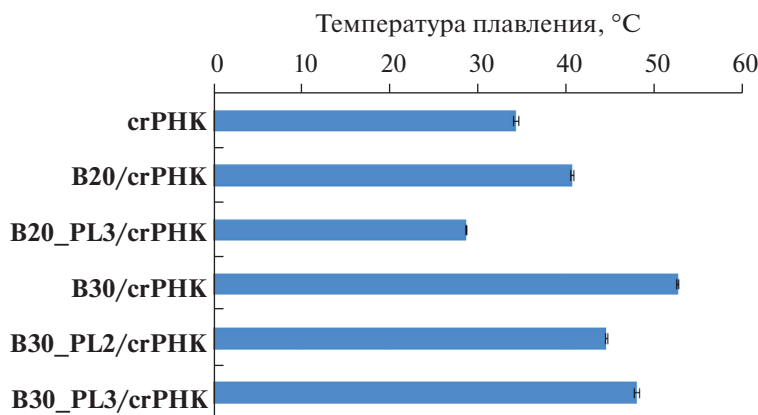


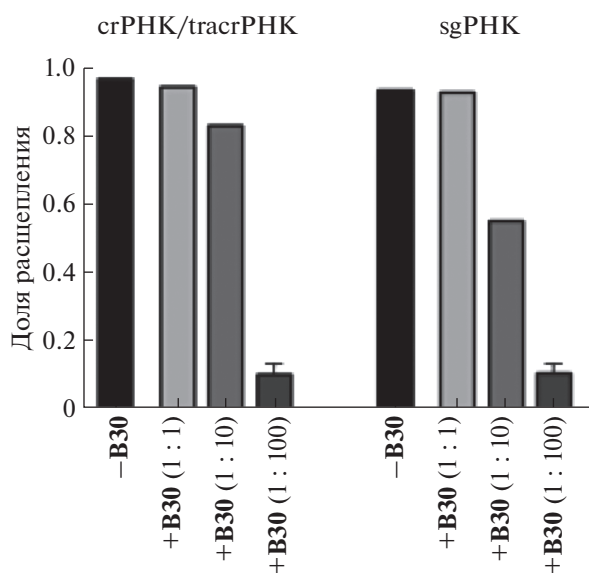
Рис. 3. Температуры плавления структурированной РНК-мишени (crPHK) и ее дуплексов с блокирующими олигонуклеотидами (B20 и B30) и их фотомодифицированными аналогами (B20\_PL3, B30\_PL2 и B30\_PL3). Условия см. в “Эксперим. части”.

зывается на стабильности. Как и ожидалось, более протяженные олигодезоксирибонуклеотиды формировали более стабильные дуплексы.

В результате исследования расщепления плазмидной ДНК белком Cas9 в присутствии направляющих РНК и блокирующих ДНК оказалось, что необходимо достаточно большой избыток блокирующих ДНК для ингибирования системы CRISPR/Cas9. Так, 10-кратный избыток блокирующего олигонуклеотида B30 снижал эффективность расщепления мишени лишь незначительно (рис. 4). Для

сравнительного исследования нами был выбран вариант с использованием 100-кратного избытка блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов.

При расщеплении суперскрученной плазмидной ДНК белком Cas9 в присутствии направляющих РНК регистрировали образование в основном линейной плазмиды и незначительное количество релаксированной формы плазмиды, содержащей один ник (разрыв в одной из цепей) (рис. 5а, 5б). Результаты сравнительного анализа расщепления ДНК-мишени показали, что в боль-



**Рис. 4.** Анализ расщепления плазмидной ДНК-мишени комплексами crPNC/tracrPNC/Cas9 и sgPNC/Cas9 в присутствии 10-кратного (1 : 10) и 100-кратного (1 : 100) избытка 30-звенного блокирующего немодифицированного олигодезоксирибонуклеотида **B30**. Условия см. в “Эксперим. части”.

шей степени снижается активность CRISPR-системы при использовании 30-звенных блокирующих олигонуклеотидов по сравнению с 20-звенными олигонуклеотидами, что согласуется со стабильностью их гетеродуплексов с crPNC. Введение фотолabile модификаций в структуру блокирующих олигонуклеотидов снижает уровень ингибирования действия CRISPR-системы. При этом наблюдали более высокий уровень ингибирования для комплексов Cas9 с sgPNC. Во всех случаях облучение светом длиной волны 365 нм в течение 30 мин позволяло восстановить активность CRISPR-системы (рис. 5в, 5г).

Кинетический анализ расщепления плазмиды также проводили, используя 100-кратный избыток блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов по отношению к направляющим PNC (рис. 6).

При использовании блокирующих фоторасщепляемых олигодезоксирибонуклеотидов **B30\_PL3** и **B30\_PL2** наблюдали значительное снижение уровня расщепления мишени. Облучение олигонуклеотида с тремя фотолинкерами в течение 30 мин приводило к практически полному восстановлению активности CRISPR-системы, в то время как облучение олигонуклеотидов с двумя линкерами восстанавливало уровень расщепления лишь частично.

Полученные результаты позволяют сделать заключение, что предложенная система CRISPR/Cas9 может быть использована для фотоконтролируемого редактирования генов *in vitro*. Для ис-

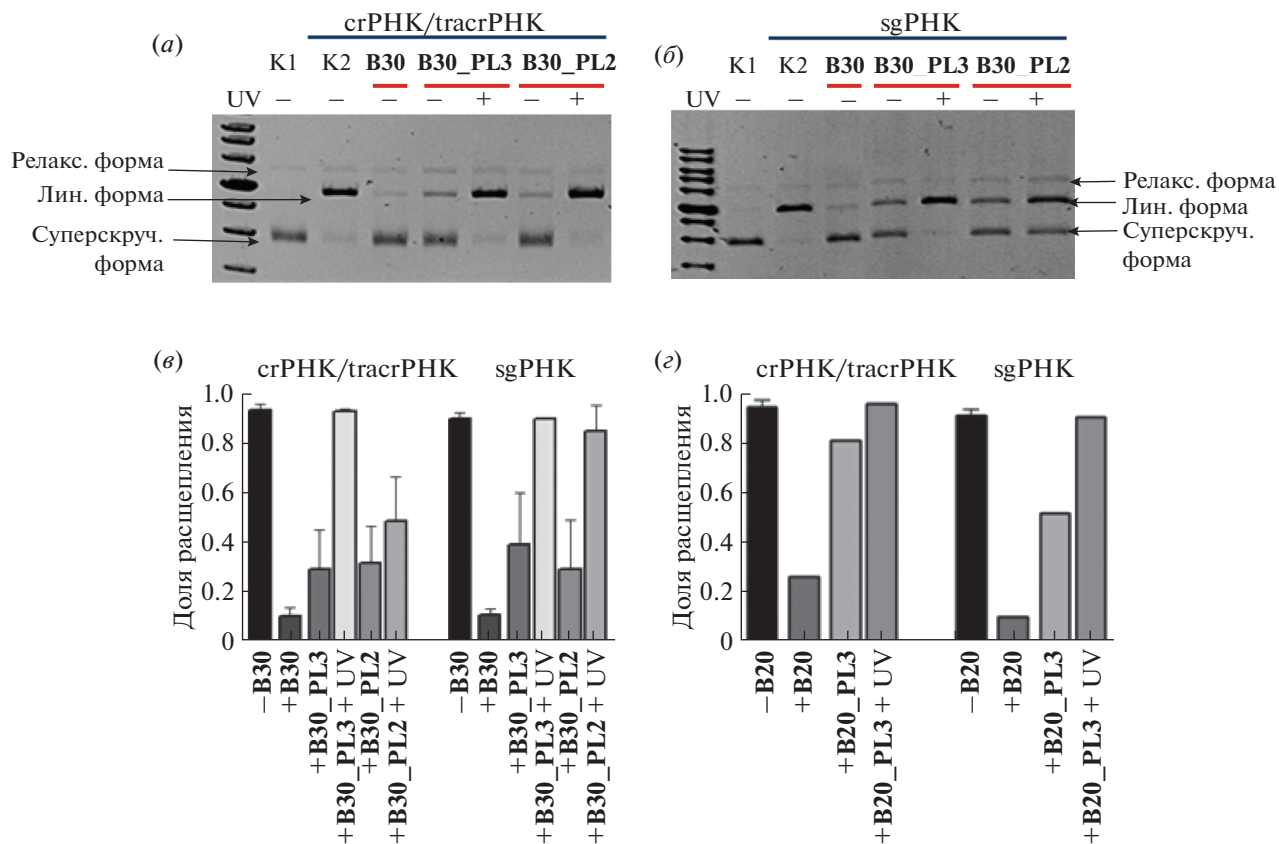
пользования этой системы *in vivo* необходимы дополнительные исследования с учетом особенностей проведения геномного редактирования в живых клетках.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы.** В работе были использованы следующие реактивы: перхлорат натрия, *N*-метилмидазол (Acros Organics, США); 4,4'-диметокситритилхлорид (Alfa Aesar, США), полимеры с присоединенным первым нуклеозидным звеном, 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил), 2'-*O*-третбутилдиметилсил-*N*-ацетилзащищенные рибонуклеозид-3'-фосфитамида, 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил), 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-*N*-ацетилзащищенные дезоксирибонуклеозид-3'-фосфитамида (ChemGenes, США); краситель “Stains-all”, персульфат аммония, дихлоруксусная кислота, акриламид, *N,N'*-метиленабисакриламид, 2,6-лутидин, бромистый этидий, Трис(гидроксиметил)аминометан (Fluka, Швейцария); фосфитамид флуоресцеина (GlenResearch, США); мочевины, 40%-ный водный раствор метиламина, молекулярные сита “Trap-Pac™ Molecular Sieve Bag” 3 Å (Millipore, США); агароза (MP, США); ацетон, пиридин, тетрагидрофуран, формамид, пропионовый ангидрид (PanReac, Испания); ксиленианол FF, бромфеноловый синий, *N,N,N',N'*-этилендиаминтетрауксусная кислота (Serva, Германия); 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиол, триэтиламин, 5-этилтио-1*H*-тетразол, триэтиламинтригидрофторид, этокситриметилсилан, 2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфитамид (Sigma-Aldrich, США); хлористый метилен, бикарбонат натрия, йод кристаллический, гексан (Реахим, Россия); ацетонитрил (ХимМед, Россия), а также другие реактивы и растворители отечественного и зарубежного производства.

Рекомбинантная эндонуклеаза Cas9 и плаزمида pBS2SKM Psp2 TTG на основе вектора pBlue-script II SK(-) со вставкой протоспейсерной последовательности и PAM (5'-TGG-3') получены согласно стандартному протоколу [21].

**Оборудование.** Все водные растворы были приготовлены с использованием деионизованной воды, полученной с помощью прибора Millipore Simplicity System (Millipore, США). Концентрирование растворов олигонуклеотидов производили на вакуумном концентраторе Concentrator Plus (Eppendorf, США). Осажденные из растворов олигонуклеотиды центрифугировали на центрифуге MiniSpin Plus (Eppendorf, Германия). Перемешивание растворов осуществляли с помощью Thermomixer Comfort (Eppendorf, Германия). Оптическую плотность растворов олигонуклеотидов измеряли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США). Тонкослойную хро-



**Рис. 5.** Электрофореграммы продуктов расщепления ДНК-мишени (релаксированной формы плазмиды, содержащей один ник (одноцепочечный разрыв), и линейной формы плазмиды, содержащей двуцепочечный разрыв) комплексами crPHK/tracrPHK (а) и sgPHK (б) с Cas9 в присутствии 30-звенных блокирующих олигонуклеотидов. К1 – исходная ДНК-мишень, К2 – продукты расщепления ДНК-мишени белком Cas9 в присутствии соответствующих направляющих РНК. Анализ расщепления плазмидной суперскрученной ДНК-мишени белком Cas9 с парой направляющих crPHK/tracrPHK или с направляющей sgPHK в присутствии 100-кратного избытка фоточувствительных блокирующих 30-звенных (в) и 20-звенных (г) олигонуклеотидов до и после облучения светом с длиной волны 365 нм.

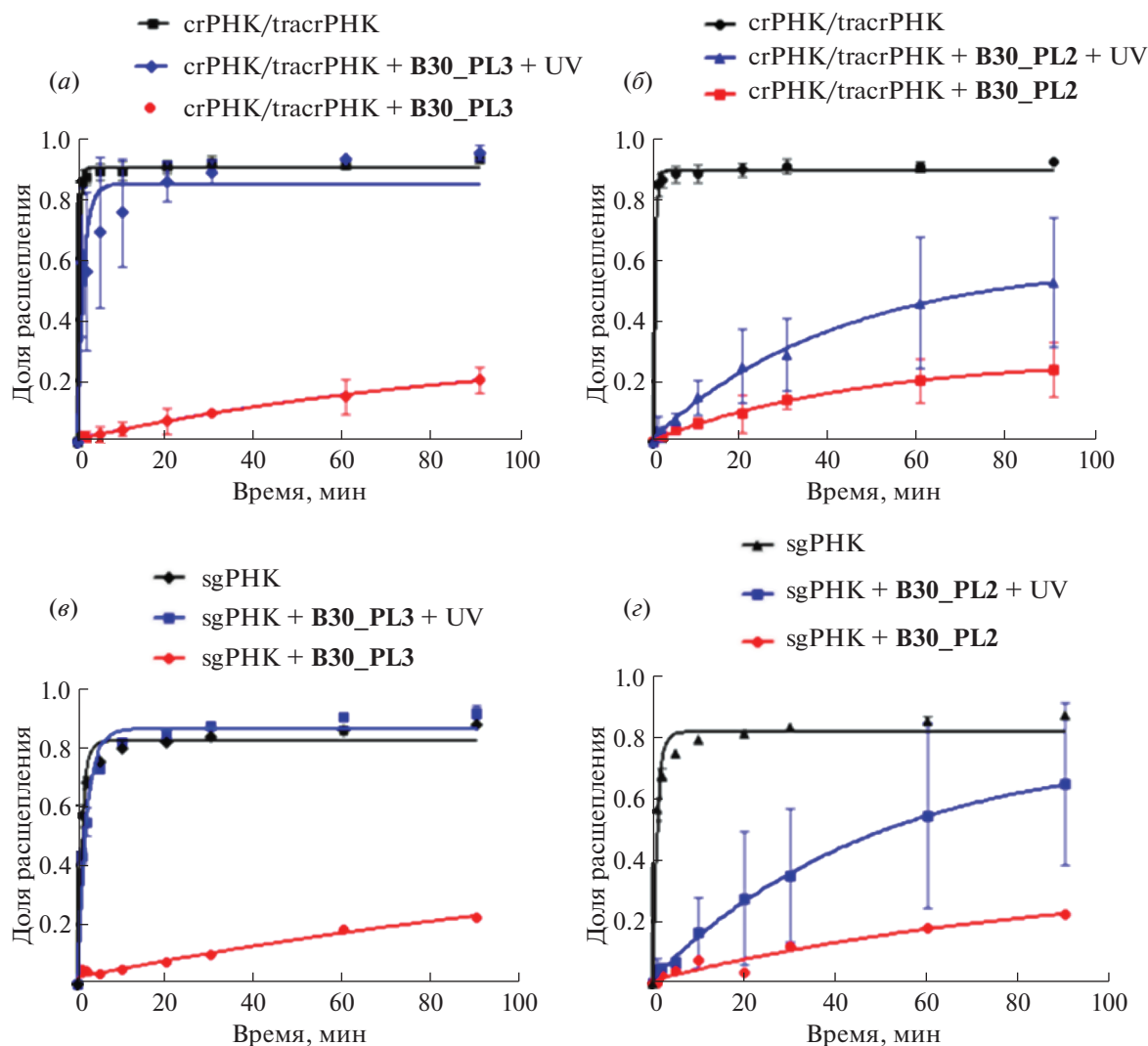
матографию проводили на пластинках DC-Alufo-  
lien Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия).

**Синтез 2-О-4,4'-диметокситритил-1-(2-нитро-  
фенил)-1,2-этандиола (I).** Синтез проводили по  
анalogии с работами Ji et al. [4] и Tang et al. [8] с  
небольшими изменениями. К раствору 200 мг  
1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола (1.1 ммоль) в  
1 мл абс. пиридина добавляли раствор 406.6 мг  
4,4'-диметокситритилхлорида (1.2 ммоль) в 3 мл  
абс. пиридина и проводили реакцию в течение  
часа. За глубиной протекания реакции следили с  
помощью тонкослойной хроматографии (система  
А этилацетат : гексан, 2 : 8). После прохожде-  
ния реакции добавляли 0.5 мл метанола для разло-  
жения избытка 4,4'-диметокситритилхлорида. Ре-  
акционную смесь после упаривания растворяли в  
хлористом метиле и проводили экстракцию на-  
сыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub>. Объединенные  
органические слои сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и  
упаривали досуха. Выделение продукта проводили  
методом колоночной хроматографии на силикаге-

ле в градиенте концентрации этилацетата в гекса-  
не (0–35%). R<sub>f</sub> 0.11. Выход реакции составил 85%.

<sup>1</sup>H-ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ, м.д.: 7.85 (d, 1H),  
7.82 (d, 1H), 7.62 (t, 1H), 7.42–7.35 (m, 3H), 7.30–  
7.16 (m, 11H), 6.78 (m, 4H), 5.50 (dd, 1H), 3.78 (s,  
7H), 3.62 (dd, 1H), 3.16 (dd, 1H).

**Синтез 1-(2-циано-N,N-диизопрропилфосфит-  
амид)-2-О-4,4'-диметокситритил-1-(2-нитрофенил)-  
1,2-этандиола (II).** Синтез проводили по анало-  
гии с работой Ji et al. [4] с небольшими изменени-  
ями. К раствору 480 мг (1 ммоль) соединения (I) в  
3 мл абс. ацетонитрила добавляли раствор, содер-  
жавший 195 мг 5-этилтиотетразола в 1.2 мл абсо-  
лютного ацетонитрила и 300 мкл N,N-диизопрро-  
пилэтиламина, а затем 625 мкл (2 ммоль) 2-циа-  
ноэтил-N,N,N',N'-тетраизопрропилфосфитамида.  
За прохождением реакции следили с помощью  
ТСХ (система Б хлороформ : гексан : этилацетат,  
4 : 4 : 2). После прохождения реакции к реакцион-  
ной смеси добавляли 6 мл этилацетата, раствор  
над осадком отбирали, осадок промывали не-



**Рис. 6.** Кинетические кривые расщепления плазмидной ДНК-мишени комплексом crPHK/tracrPHK/Cas9 в присутствии блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов B30\_PL3 (а) и B30\_PL2 (б) и комплексом sgPHK/Cas9 в присутствии блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов B30\_PL3 (в) и B30\_PL2 (г).

сколько раз этилацетатом. Реакционную смесь экстрагировали насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$ . Объединенные органические слои сушили безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали досуха. Продукт выделяли из реакционной смеси методом колоночной хроматографии на силикагеле в градиенте концентрации этилацетата в гексане (0–30%).  $R_f$  0.80. Выход реакции составил 61%.

$^1\text{H}$ -ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ , м.д.: 7.89 (d, 1H), 7.80–7.76 (d, 1H), 7.59–7.51 (t, 2H), 7.41–7.33 (m, 3H), 7.29–7.10 (m, 13H), 6.80–6.72 (m, 5H), 5.81–5.72 (m, 1H), 3.90–3.80 (m, 10H), 3.56–3.38 (m, 3H), 3.27–3.20 (m, 1H), 2.63–2.38 (m, 2H), 2.04–1.02 (m, 1H), 1.28–1.11 (m, 12H), 0.94–0.80 (d, 7H).  
 $^{31}\text{P}$ -ЯМР (150 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  150.1.

**Фосфитамидный синтез олигонуклеотидов.** Олигонуклеотиды были получены на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия) твердофазным фосфитамидным методом в реакторах объемом 50 мкл согласно оптимизированному для данного прибора синтетическому протоколу. Введение фосфитамида (II) в олигодезоксирибонуклеотиды проводили с использованием его 0.1 М раствора в абс. ацетонитриле в течение 30 мин. Флуоресцеин вводили на 5'-конец олигонуклеотидов в ходе фосфитамидного синтеза по протоколу, рекомендованному производителем. Олигонуклеотиды деблокировали и отделяли от полимерного носителя 40%-ным раствором метиламина в течение 15 мин (20 мин для 102-звенного олигорибонуклеотида) при 65°C и постоянном перемешивании или, в случае 5'-флуоресцеин-

содержащих олигонуклеотидов, 30%-ным водным раствором аммиака при комнатной температуре в течение 16 ч. В случае олигорибонуклеотидов удаление 2'-*O*-TBDMSi-защитных групп с олигорибонуклеотидов проводили с использованием свежеприготовленного раствора *N*-метилпирролидинон : Et<sub>3</sub>N : Et<sub>3</sub>N · 3HF (1.5 : 0.75 : 1, v/v/v) при 65°C при перемешивании в течение 1.5 ч, добавляли этокситриметилсилан, через 10 мин проводили осаждение олигорибонуклеотидов диэтиловым эфиром.

**Анализ гомогенности олигонуклеотидов.** Гомогенность полученных олигонуклеотидов подтверждали методом гель-электрофореза в 12%-ном (акриламид : *N,N'*-метиленабисакриламид 30 : 0.5) или 15%-ном (акриламид : *N,N'*-метиленабисакриламид 29 : 1) ПААГ в денатурирующих условиях (8 М мочевины, 50 мМ Трис-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH 8.3, 0.1 М Na<sub>2</sub>ЭДТА). Для нанесения на гель использовали 5 мкл раствора 8 М мочевины с содержанием 0.025% ксиленианолового FF. Для визуализации олигонуклеотидов использовали раствор красителя "Stains-all", приготовленный из 50 мг красителя "Stains-all" и 100 мл смеси вода-формамид (1 : 1). После окрашивания гели сушили на приборе GelDryer model 583 (Bio-Rad, США).

**Выделение олигонуклеотидов и их конъюгатов методом препаративного гель-электрофореза.** Деблокированные олигонуклеотиды и конъюгаты выделяли с помощью препаративного гель-электрофореза в денатурирующем 12%-ном или 15%-ном ПААГ в вышеуказанных условиях. Визуализировали олигонуклеотиды в геле при наложении геля на пластину DC-Alufohlen Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия) в свете УФ-лампы ( $\lambda = 254$  нм). В случае фоточувствительных олигодезоксирибонуклеотидов во избежание активации реакции расщепления под воздействием УФ-излучения закрывали стеклом основную часть геля, содержащую продукт, оставляя только небольшую его часть, достаточную для визуализации. Олигонуклеотиды элюировали из геля 0.3 М раствором перхлората натрия или, в случае протяженных РНК, 0.3 М раствором ацетата натрия (pH 5.2), после чего проводили обессоливание с использованием Tet-Pak C18 Cartridge (Millipore, США) или осаждение спиртом соответственно.

Осаждали олигонуклеотиды из водных растворов в виде натриевых солей десятикратным объемом 2%-ного раствора перхлората натрия в ацетоне. Протяженные олигорибонуклеотиды осаждали из 0.3 М раствора ацетата натрия (pH 5.2) четырехкратным объемом этилового спирта при -20°C как минимум в течение 2 ч. Супернатант после центрифугирования отбирали, осадок промывали охлажденным 80%-ным этиловым спиртом и сушили досуха на воздухе.

**Исследование кинетики расщепления фотомодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов при облучении.** Олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие фоторасщепляемые линкеры и остаток флуоресцеина на 5'-конце (B30\_PL2\_F и B30\_PL3\_F), в виде растворов с концентрацией 10 мкМ в воде или в буфере (20 мМ HEPES, pH 7.5, 100 мМ KCl, 1 мМ дитиотреитол, 0.5 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25% глицерина) облучали светом с длиной волны 365 нм в течение 1, 2, 5, 10, 15 и 30 мин. Продукты расщепления анализировали в денатурирующем 15%-ном ПААГ с последующей визуализацией УФ-облучением на длине волны 312 нм с использованием прибора для гель-документации Quantum Vilber Lourmat (Vilber Lourmat, Франция). Для получения количественных характеристик изображения переводили в цифровую форму в программном пакете Quantity One (Bio-Rad, США). Долю расщепления модифицированного олигодезоксирибонуклеотида рассчитывали в программном продукте Microsoft Excel. Параметры рассчитывали в программном пакете GraphPad Prism 5.0.4.533 (GraphPad, США) с использованием уравнения:

$$f_a = P_{st} (1 - e^{-k_1 t}),$$

где  $f_a$  – доля продукта реакции,  $P_{st}$  – доля продукта при переходе реакции в стационарную фазу (предельная степень расщепления),  $k_1$  – константа реакции псевдопервого порядка,  $t$  – время реакции.

**Термическая денатурация дуплексов направляющих РНК с блокирующими олигодезоксирибонуклеотидами.** Дифференциальные кривые термической денатурации дуплексов были получены на установке с терморегулируемой оптической кюветой на базе спектрофотометра Cary 300 BioMelt (Varian Inc., Австралия). Концентрации олигонуклеотидных компонентов 1 мкМ в буфере 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат натрия (pH 7.4), 1 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА. Изменение температуры проводили со скоростью 0.5°C/мин. Детекцию поглощения осуществляли на двух длинах волн (260 и 270 нм). Обработку кривых термической денатурации и ренатурации проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Office 2010 (Microsoft Corporation, США). Температуры плавления были определены как максимумы первых производных кривых плавления по температуре.

**Расщепление плазмидной ДНК белком Cas9 в присутствии направляющих РНК.** Реакцию проводили в 10 мкл раствора, содержавшего 20 мМ HEPES (pH 7.5), 100 мМ KCl, 1 мМ дитиотреитол, 0.5 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25% глицерина. Контрольный раствор содержал все компоненты, кроме направляющей РНК и белка Cas9.



Первоначально проводили сборку эффекторного комплекса. Для этого в буфер добавляли 1.35 мкл (1 мкМ, 1.35 пмоль) направляющей РНК, а в случае пары направляющих *cr*РНК/*tracr*РНК – по 1.35 мкл (1 мкМ, 1.35 пмоль) каждой РНК и 0.602 мкл раствора белка Cas9 (2.24 мкМ, 1.35 пмоль) в 50-кратном избытке по отношению к плазмиде pBS2SKM. Растворы перемешивали и инкубировали 15 мин при 37°C. Пары *cr*РНК/*tracr*РНК до добавления Cas9 предварительно инкубировали 5 мин при 90°C и охлаждали до 25°C. Затем в каждую пробирку добавляли 1 мкл раствора (50 нг/мкл, 27 фмоль) плазмиды pBS2SKM, содержащей протоспейсер и последовательность РАМ (5'-TGG-3'). Перемешивали реакционные смеси и инкубировали в течение часа при 37°C в условиях отсутствия прямого солнечного света. Для остановки реакции к реакционной смеси добавляли 2.5 мкл раствора, содержавшего 250 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 1.2% SDS, 0.01% бромфенолового синего и 30% глицерина.

При анализе активности CRISPR-систем в присутствии блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов сначала инкубировали 5 мин при 90°C гетеродуплекс 1.35 мкл направляющей *cr*РНК или *sg*РНК (1 мкМ, 1.35 пмоль) с эквимолярным количеством блокирующего олигонуклеотида или с 10- или 100-кратным его избытком, добавляя 1.35 мкл 1, 10 или 100 мкМ раствора блокирующего олигодезоксирибонуклеотида соответственно, и остужали до 25°C. Затем добавляли Cas9 и инкубировали эффекторный рибонуклеопротеиновый комплекс 15 мин при 37°C.

Деактивацию блокирующих фоторасщепляемых олигодезоксирибонуклеотидов проводили путем облучения их растворов в течение 30 мин УФ-светом ( $\lambda = 365$  нм).

**Исследование кинетики расщепления плазмидной ДНК белком Cas9 в присутствии направляющих РНК.** Реакцию проводили в 85 мкл раствора, содержавшего 20 мМ HEPES (рН 7.5), 100 мМ KCl, 1 мМ дитиотреитол, 0.5 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25% глицерина. Для сборки эффекторного комплекса в буфер добавляли 3.5 мкл (1 мкМ, 3.5 пмоль) направляющей *sg*РНК, а в случае пары направляющих *cr*РНК/*tracr*РНК – по 3.5 мкл (1 мкМ, 3.5 пмоль) каждой РНК, и 1.56 мкл раствора белка Cas9 (5.8 мкМ, 3.5 пмоль) в 15-кратном избытке по отношению к плазмиде pBS2SKM. Растворы перемешивали и инкубировали 15 мин при 37°C. Пары *cr*РНК/*tracr*РНК до добавления Cas9 предварительно инкубировали 5 мин при 90°C и остужали до 25°C. При анализе активности CRISPR-систем в присутствии блокирующих олигодезоксирибонуклеотидов сначала инкубировали 5 мин при 90°C гетеродуплекс 3.5 мкл направляющей *cr*РНК или *sg*РНК (1 мкМ, 3.5 пмоль) с 3.5 мкл

(100 мкМ, 0.35 нмоль, 100-кратный избыток) раствора блокирующего олигодезоксирибонуклеотида и остужали до 25°C. После этого добавляли 1.56 мкл раствора Cas9 (5.8 мкМ, 3.50 пмоль) и инкубировали комплекс 15 мин при 37°C. Аналогичным образом готовили растворы, содержащие блокирующие фоторасщепляемые олигодезоксирибонуклеотиды, дезактивированные УФ-облучением в течение 30 мин ( $\lambda = 365$  нм).

После сборки эффекторного комплекса в каждую пробирку добавляли 8.5 мкл раствора (50 нг/мкл, 0.233 пмоль) плазмиды pBS2SKM. Реакционные смеси перемешивали и инкубировали в течение 1.5 ч при 37°C в условиях отсутствия прямого солнечного света. Для остановки реакции отбирали аликвоты 10 мкл через 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60 и 90 мин и добавляли их в пробирки с 2.5 мкл раствора, содержавшего 250 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 1.2% SDS, 0.01% бромфенолового синего и 30% глицерина.

**Анализ эффективности расщепления плазмиды.** Эффективность реакции расщепления суперскрученной формы плазмиды до релаксированной и линейной форм плазмиды белком Cas9 в присутствии направляющих РНК анализировали методом гель-электрофореза в 1%-ном агарозном геле в ТАЕ-буфере (4 мМ Трис, 3 мМ CH<sub>3</sub>COOH, 0.07 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА) с добавлением 2.5 мкл этидий бромида (концентрация – 10 мг/мл). На гель наносили 10 мкл реакционной смеси в Quenching Buffer (250 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 1.2% SDS, 0.01% бромфенолового синего и 30% глицерина). Для контроля подвижности в геле продуктов расщепления использовали ДНК-маркер 1 kb, длина фрагментов от 250 до 10000 п.н. (СибЭнзим, Россия). Проводили визуализацию с использованием системы гель-документации Quantum (Vilber Lourmat, Франция). Для получения количественных характеристик изображения переводили в цифровую форму в программном пакете Quantity One (Bio-Rad, США).

Долю расщепления плазмиды рассчитывали по следующим формулам:

$$N_{\Sigma} = \frac{I_{\text{лин}} + I_{\text{рел}}}{I_{\text{лин}} + I_{\text{рел}} + I_{\text{суперск}}/k} \times 100\%,$$

$$N_{dsDNA} = \frac{I_{\text{лин}}}{I_{\text{лин}} + I_{\text{рел}} + I_{\text{суперск}}/k} \times 100\%,$$

$$N_{ssDNA} = \frac{I_{\text{рел}}}{I_{\text{лин}} + I_{\text{рел}} + I_{\text{суперск}}/k} \times 100\%,$$

где  $N_{\Sigma}$  – суммарное расщепление плазмиды;  $N_{dsDNA}$  – расщепление двух цепей ДНК плазмиды;  $N_{ssDNA}$  – расщепление одной цепи ДНК плазмиды;  $I_{\text{лин}}$  – интенсивность полосы, соответствующей ли-

нейной форме плазмиды;  $I_{\text{рел}}$  – интенсивность полосы, соответствующей релаксированной форме плазмиды;  $I_{\text{суперск}}$  – интенсивность полосы, соответствующей суперскрученной форме плазмиды;  $k = 1.14$  – коэффициент эффективности окрашивания суперскрученной формы ДНК относительно релаксированной формы [22].

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.А. Черносовой (Центр масс-спектрометрического анализа Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) за регистрацию масс-спектров олигонуклеотидов.

### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-34-51026. Оптимизация синтеза протяженных олигорибонуклеотидов проведена при финансовой поддержке базового бюджетного финансирования Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы № АААА-А17-117020210021-7.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания проведенных кем-либо из авторов данной статьи экспериментов с привлечением людей или использованием животных в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hartmann D., Smith J.M., Mazzotti G., Chowdhry R., Booth M.J. // *Biochem. Soc. Trans.* 2020. V. 48. P. 1645–1659. <https://doi.org/10.1042/BST20200014>
- Wu Y., Yang Z., Lu Y. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2020. V. 57. P. 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.05.003>
- Ruble B.K., Yeldell S.B., Dmochowski I.J. // *J. Inorg. Biochem.* 2015. V. 150. P. 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.03.010>
- Ji Y., Yang J., Wu L., Yu L., Tang X. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016. V. 55. P. 2152–2156. <https://doi.org/10.1002/anie.201510921>
- Shah S., Jain P.K., Kala A., Karunakaran D., Friedman S.H. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. P. 4508–4517. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp415>
- Gripenburg J.C., Ruble B.K., Dmochowski I.J. // *Bioorg. Med. Chem.* 2013. V. 21. P. 6198–6204. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.04.082>
- Connelly C.M., Uprety R., Hemphill J., Deiters A. // *Mol. Biosyst.* 2012. V. 8. P. 2987–2993. <https://doi.org/10.1039/c2mb25175b>
- Tang X., Su M., Yu L., Lv C., Wang J., Li Z. // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. P. 3848–3855. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq079>
- Wu L., Wang Y., Wu J., Lv C., Wang J., Tang X. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. P. 677–686. <https://doi.org/10.1093/nar/gks996>
- Korman A., Sun H., Hua B., Yang H., Capilato J.N., Paul R., Panja S., Ha T., Greenberg M.M., Woodson S.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. P. 12080–12086. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003425117>
- Young D.D., Lively M.O., Deiters A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. P. 6183–6193. <https://doi.org/10.1021/ja100710j>
- Feng M., Ruan Z., Shang J., Xiao L., Tong A., Xiang Y. // *Bioconjug. Chem.* 2017. V. 28. P. 549–555. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00646>
- Zhou W., Brown W., Bardhan A., Delaney M., Ilk A.S., Rauen R.R., Kahn S.I., Tsang M., Deiters A. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2020. V. 59. P. 8998–9003. <https://doi.org/10.1002/anie.201914575>
- Tamaitree L., Brown T. // *ACS Cent. Sci.* 2020. V. 6. P. 616–618. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00350>
- Moroz-Omori E.V., Satyapertiwi D., Ramel M.-C., Høgset H., Sunyovszki I.K., Liu X., Wojciechowski J.P., Zhang Y., Grigsby C.L., Brito L., Bugeon L., Dallman M.J., Stevens M.M. // *ACS Cent. Sci.* 2020. V. 6. P. 695–703. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b01093>
- Liu Y., Zou R.S., He S., Nihongaki Y., Li X., Razavi S., Wu B., Ha T. // *Science.* 2020. V. 368. P. 1265–1269. <https://doi.org/10.1126/science.aay8204>
- Zhang Y., Ling X., Su X., Zhang S., Wang J., Zhang P., Feng W., Zhu Y.Y., Liu T., Tang X. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2020. V. 59. <https://doi.org/10.1002/anie.202009890>
- Jain P.K., Ramanan V., Schepers A.G., Dalvie N.S., Panda A., Fleming H.E., Bhatia S.N. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016. V. 55. P. 12440–12444. <https://doi.org/10.1002/anie.201606123>
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. // *Science.* 2012. V. 337. P. 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829.2012>
- Khadempar S., Familghadakchi S., Motlagh R.A., Farahani N., Dashtiahangar M., Rezaei H., Gheibi Hayat S.M. // *J. Cell Physiol.* 2019. V. 234. P. 5751–5761. <https://doi.org/10.1002/jcp.27476>
- Anders C., Jinek M. // *Methods Enzymol.* 2014. V. 546. P. 1–20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00001-5>
- Shubsda M.F., Goodisman J., Dabrowiak J.C. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1997. V. 34. P. 73–79. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(96\)01204-3](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(96)01204-3)

## Photoactivatable System CRISPR/Cas9

**E. A. Akhmetova\***, \*\*, \*\*\*, **V. M. Golyshev\***, \*\*\*, **I. P. Vokhtantsev\***, \*\*\*,  
**M. I. Meschaninova\***, **A. G. Venyaminova\***, and **D. S. Novopashina\***, \*\*, \*\*\*, #

#Phone: +7 (383) 363-51-29; fax: +7 (383) 363-51-53; e-mail: danov@niboch.nsc.ru

\*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, prosp. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

\*\*Sirius University of Science and Technology, Olimpijskij prosp. 1, Sochi, 354383 Russia

\*\*\*Novosibirsk State University, ul. Pirogova 1, Novosibirsk, 630090 Russia

The approach to design of photoactivatable CRISPR/Cas9 system consisted of Cas9 protein, synthetic 102-nt sgRNA or pair of guide crRNA/tracrRNA and blocking photocleavable oligodeoxyribonucleotides was developed. Photocleavable oligodeoxyribonucleotides contained two or three photodegradable linkers in their structure. Thermal stability of complexes of these modified oligonucleotides with guide crRNA decreased upon increasing of linker quantity. Kinetic of photomodified oligodeoxyribonucleotides cleavage was investigated. The possibility of *in vitro* photoactivation gene editing after UV-irradiation using photomodified blocking oligodeoxyribonucleotides in CRISPR/Cas9 system was demonstrated.

*Keywords: photocleavable linker, guide RNAs for CRISPR/Cas9 system, photoblocking oligodeoxyribonucleotide, photoactivatable gene editing in vitro*