



OPEN  
BIO

# СБОРНИК ТЕЗИСОВ

**IX МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ:  
ВИРУСОЛОГОВ, БИОТЕХНОЛОГОВ, БИОФИЗИКОВ,  
МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И БИОИНФОРМАТИКОВ**

**В РАМКАХ ПЛОЩАДКИ ОТКРЫТЫХ КОММУНИКАЦИЙ OPENBIO**

НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО, 2022



ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»



ИННОВАЦИОННЫЙ  
ЦЕНТР КОЛЬЦОВО



НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО



БИОТЕХНОПАРК  
КОЛЬЦОВО



БИОФАРМ



МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФАКТОР  
ИННОВАЦИОННЫЙ

**IX МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ:  
ВИРУСОЛОГОВ, БИОТЕХНОЛОГОВ, БИОФИЗИКОВ,  
МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И БИОИНФОРМАТИКОВ**

Сборник тезисов

Новосибирск  
Наукоград Кольцово  
2022

УДК 577.2:62.01:578+(001)  
ББК 28.07:30.16:28.4  
М431

**М431** IX Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков — 2022: Сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2022. — 764 с.

ISBN 978-5-4437-1362-5

Сборник тезисов составлен на основе материалов, присланных российскими и иностранными учеными в оргкомитет Международной научно-практической конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов, вирусологов и биофизиков, проходящей в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2022.

Издание предназначено для преподавателей и научных сотрудников, аспирантов, магистрантов и студентов, интересующихся актуальными проблемами и разработками в области биотехнологии, вирусологии, молекулярной биологии и биофизики.

УДК 577.2:62.01:578+(001)  
ББК 28.07:30.16:28.4

ISBN 978-5-4437-1362-5

© АНО «Инновационный центр Кольцово», 2022

## МОДИФИЦИРОВАННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК ДЛЯ СОЗДАНИЯ СПЕЦИФИЧНОЙ И РЕГУЛИРУЕМОЙ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9\*

Л. В. Саковина, И. П. Вохтанцев, Д. С. Новопашина

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск  
Новосибирский государственный университет*

✉ kodi99@list.ru

### Аннотация

В данной работе проведено сравнительное исследование эффективности и специфичности работы CRISPR/Cas9 системы, содержащей модифицированные направляющие РНК. Создана система, содержащая фоторасщепляемые модифицированные направляющие РНК, действие которой может быть остановлено путем облучения УФ-светом.

В настоящее время системы CRISPR/Cas, заимствованные от адаптивного механизма бактерий, широко используются для создания молекулярно-биологических инструментов, в частности технологии геномного редактирования. Актуальными задачами в области геномного редактирования на основе системы CRISPR/Cas9 являются уменьшение побочных эффектов (off-target effects) и возможность регуляции активности системы. С этой целью было предложено использовать химически модифицированные направляющие РНК. Использование химического синтеза позволяет создавать направляющие РНК, содержащие модифицированные нуклеотиды или ненуклеотидные звенья и модификации в заданных положениях олигонуклеотидной цепи.

Целью данной работы был синтез химически модифицированных направляющих РНК, в том числе и содержащих фоторасщепляемые линкеры, и исследование эффективности расщепления модельной ДНК системами CRISPR/Cas9 с их участием.

Было проведено исследование влияния замены природных рибонуклеотидов на модифицированные рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды в составе направляющих РНК на их устойчивость к действию нуклеаз, эффективность и специфичность действия CRISPR/Cas9 системы с их участием в модельной системе, содержащей плазмидную ДНК или короткий синтетический ДНК-дуплекс. Были получены серии 2'-О-метил- и 2'-фтормодифицированных направляющих РНК, а также серии направляющих РНК, содержащих LNA-нуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды в определенных положениях олигонуклеотидной цепи, а также их 3'-флуоресцеинсодержащие аналоги.

Исследование устойчивости модифицированных направляющих РНК к действию нуклеаз проводили в модельной системе, содержащей эмбриональную телячью сыворотку. LNA и 2'-фтормодифицированные crRNA обладали наибольшей устойчивостью к действию нуклеаз.

Сравнительное исследование эффективности расщепления плазмидной ДНК, содержащей участок для связывания направляющей РНК и прилегающую к нему PAM последовательность, системой CRISPR/Cas9 с участием модифицированных направляющих РНК (sgRNA или пары crRNA/tracrRNA) показало, что во всех случаях системы CRISPR/Cas9 с парой модифицированных направляющих crRNA/tracrRNA более эффективно расщепляли плазмидную ДНК, чем системы с модифицированными sgRNA.

В результате исследования специфичности расщепления ДНК-мишени, проведенного на модельных ДНК-дуплексах, содержащих однонуклеотидные замены, было выявлено, что системы с 2'-фтор и LNA-модифицированными направляющими crRNA являются более чувствительными к заменам в ДНК, чем их немодифицированные аналоги. Этот результат подтверждает возможность снижения off-target эффектов при использовании модифицированных направляющих РНК.

Были сконструированы и получены 2'-фтормодифицированные направляющие РНК, содержащие один или два фоторасщепляемых линкера с целью создания фоторегулируемой системы CRISPR/Cas9. Продемонстрирована способность инактивации систем CRISPR/Cas9, содержащих направляющие 2'-фтормодифицированные фоторасщепляемые направляющие РНК, путем облучения УФ-светом (365 нм). В результате облучения происходит разрушение фтормодифицированных направляющих РНК, при этом происходит значительное снижение эффективности расщепления модельного ДНК-субстрата.

Полученные результаты подтверждают перспективность использования модифицированных направляющих РНК для создания эффективных, регулируемых и специфичных систем геномного редактирования CRISPR/Cas9.

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 22-14-00294.

© Л. В. Саковина, И. П. Вохтанцев, Д. С. Новопашина, 2022

Научное издание

**IX МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ:  
ВИРУСОЛОГОВ, БИОТЕХНОЛОГОВ, БИОФИЗИКОВ,  
МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И БИОИНФОРМАТИКОВ**

Сборник тезисов

Корректоры

*М. В. Власова, Д. И. Ковалёва, С. В. Исакова, Т. А. Маркова*

*Верстка А. С. Терешкиной*

*Обложка Е. В. Неклюдовой*

Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 95,5. Усл. печ. л. 88,8.

Заказ № 214.

Издательско-полиграфический центр НГУ  
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2.