

Создание генно-инженерных конструкций для внесения направленных мутаций в ген *nsun7* *M. Musculus*

Научный руководитель – Головина Анна Янковна

Швецова Екатерина Тимуровна

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: katja.shvecova@gmail.com

Ген *nsun7* (NOP2/Sun domain family, member 7) кодирует белок, предположительно являющийся РНК метилтрансферазой. Из литературных данных известно, что мутации в гене *nsun7* могут вызывать нарушения в подвижности сперматозоидов мышей и человека, приводя к стерильности. Определение мишени Nsun7 может пролить свет на причины некоторых типов мужского бесплодия и в дальнейшем дать возможность разработки способов борьбы с ними.

Для глубокого изучения функции белка часто требуется получение трансгенных животных. Однако, на сегодняшний день недостаточно отработаны схемы направленного внесения конкретных мутаций в геном. Процент животных, получивших нужную мутацию, обычно крайне мал. Существуют различные приемы с использованием направленного двуцепочечного разрыва и последующей гомологичной рекомбинацией. Данный метод имеет большое применение во всем мире и не имеет аналогов на сегодняшний день. Чтобы повысить эффективность выбранного метода, в качестве ДНК-матрицы для рекомбинации мы выбрали одноцепочечную ДНК с короткими гомологичными фланками.

Основной целью данной работы являлось получение генно-инженерных конструкций (одноцепочечных ДНК с короткими гомологичными фланками) для внесения направленных мутаций в ген *nsun7* *M. Musculus* при помощи системы CRISPR/Cas9. Одна из конструкций была создана с целью внести сразу после стартового кодона *nsun7* последовательность аффинного НА-тэга. В результате такой модификации будет получен белок Nsun7 с довеском на N-конце, что позволит проводить иммунопреципитацию целевого белка с мишенями. Вторая из созданных конструкций направлена на внесение гена флюоресцентного белка Katushka сразу после стартового кодона *nsun7*. Данная модификация позволит определить локализацию белка.

Обе конструкции были получены в виде двуцепочечной плазмидной ДНК, содержащей последовательность соответствующего довеска, окруженную 150 bp фланками, гомологичными *nsun7* в районе стартового кодона. Для получения конструкции с Katushka использовали метод NEBuilder HiFi DNA Assembly. Затем с помощью асимметричного ПЦР с данных плазмид были получены соответствующие одноцепочечные ДНК.

Произведено планирование, синтез и очистка гидовой РНК для осуществления требуемого двуцепочечного разрыва геномной ДНК с помощью системы CRISPR/Cas9. Синтез гидовой РНК проводился с помощью T7-транскрипции.

Произведена микроинъекция компонентов CRISPR/Cas9 системы вместе с одноцепочечной ДНК, содержащей вставку НА-тэга, в яйцеклетки мыши. Далее планируется произвести микроинъекцию второй конструкции и генотипирование получившихся линий мышей.

В результате анализа современных методов клонирования и внесения мутаций в геном, были выбраны оптимальные подходы, которые повысят процент мышей с необходимой нам мутацией.