

Стандартная операционная процедура «Получение векторов для направленной модификации генома с использованием системы CRISPR/Cas»

Составлено: В.С. Фишман, к.б.н., в.н.с., А.Г. Мензоров, к.б.н., в.н.с.

Содержание и назначение: Определяет протокол получения векторов для направленной модификации генома с использованием системы CRISPR/Cas

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Технология CRISPR/Cas за последние несколько лет совершила прорыв в области редактирования геномов. В силу высокой эффективности и простоты сборки отдельных компонент в условиях современной лаборатории, система CRISPR/Cas применяется огромным количеством исследователей в самых разных областях биологии. После появления оригинальной статьи о редактировании генома млекопитающих системой CRISPR/Cas9 разработано множество методов, предлагающих те или иные модификации белков семейства Cas или направляющих РНК. Целый ряд работ посвящен использованию технологий, основанных на системе CRISPR/Cas для самых неожиданных целей – не только для редактирования геномов, но и для контроля экспрессии определенных генов, локализации и визуализации отдельных локусов ДНК в пространстве ядра, изменения статуса метилирования заданных сайтов в геноме млекопитающих и многое другое [1].

Система CRISPR/Cas состоит из двух основных частей. Первой является белок, нуклеаза Cas, которая способна вносить двухцепочечный разрыв в молекулу ДНК. Вторая представляет собой небольшую молекулу РНК размером около 120 нуклеотидов – химерную направляющую РНК (guide RNA, gRNA). Последовательность направляющей РНК можно условно разделить на две части. Около 100 нуклеотидов, расположенные на 3'-конце, являются одинаковыми для всех направляющих РНК, и обеспечивают формирование специфической пространственной структуры, которая узнается белком Cas. Около 20 нуклеотидов, расположенные на 5'-конце направляющей РНК, определяют последовательность ДНК, с которой свяжется белок Cas9. Белок Cas вносит двухцепочечный разрыв в молекулу ДНК в месте, которое комплементарно 5'-последовательности хнРНК при условии, что непосредственно за комплементарным хнРНК участком находится специфическая последовательность, которая называется PAM (protospacer adjacent motif, мотив, прилегающий к протоспейсеру). Последовательность PAM может быть различной у разных представителей семейства белков Cas.

Белок Cas вносит двухцепочечный разрыв в ДНК на небольшом расстоянии от PAM при условии, что в клетках присутствует хнРНК и в геноме клеток есть последовательность, комплементарная 5'-концу хнРНК, следом за которой находится последовательность PAM. На этом работа системы CRISPR/Cas9 заканчивается, и дальнейшая модификация генома происходит при участии системы репарации ДНК клетки.

Несмотря на огромное потенциальное разнообразие способов использования системы CRISPR/Cas, наиболее часто она применяется именно для редактирования геномов. И, несмотря на кажущуюся простоту, существует ряд технических сложностей, с которыми может столкнуться научный коллектив, использующий эту технологию впервые. В этой стандартной операционной процедуре мы подробно описываем протокол сборки генно-инженерных конструкций, необходимых для использования системы CRISPR/Cas для внесения мутаций в геном млекопитающих.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение векторов для направленной модификации генома с использованием системы CRISPR/Cas» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения плазмидных конструкций, содержащих компоненты системы CRISPR/Cas для ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепедагогического и биомедицинского направления» (Коллекции) ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации протокола получения векторов для направленной модификации генома с использованием системы CRISPR/Cas.

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с культурами клеток человека и животных.

В ходе работы мы руководствовались: правилами лабораторной практики (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н) и ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартинформ. 2010. 12 с.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все

расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Оборудование и материалы

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов:

Лабораторное оборудование (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования)

Для большей части оборудования ниже не указан производитель, так как можно использовать приборы разных производителей.

- Компьютер.
- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Пипеточный дозатор 0,5–100 мл.
- Центрифуга-вортекс для пробирок 0,5 и 1,5 мл.
- Центрифуга для пробирок 0,5 и 1,5 мл с возможностью центрифугирования на скоростях более 12 тыс. g.
- Центрифуга для пробирок 10 и 50 мл.
- Термостатируемый шейкер с возможностью поддержания температуры 37 °С.
- Программируемый амплификатор
- Холодильники на –80 °С, –20 °С и +4 °С.
- Автоклав.
- Камера для горизонтального гель-электрофореза, гребенки, блок питания
- Спектрофотометр для измерения концентрации нуклеиновых кислот Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).
- Гель-документирующая система BioRad ChemiDoc MP (BioRad).
- Металлический держатель для пробирок на 200 и 500 мкл.

Расходные материалы и реактивы (приведены возможные варианты производителей материалов и реактивов)

Указанные ниже реагенты можно заменять на аналогичные от других производителей, поэтому, например, для части пластиковых расходных материалов производитель не указан. Часть необходимых материалов приведены в тексте.

- Деионизованная вода (ddH₂O) с удельным сопротивлением более 18 МОм·см, например Sigma 7732-18-5.

- Плазмидные вектора-бекбоны. Вектора выбираются в зависимости от выбранного типа клеток и дизайна эксперимента. Поставщик Addgene.
- Олигонуклеотиды.
- Полинуклеотид киназа фага T4 (T4 PNK, NEB M0201S) и соответствующий буфер (10X T4 PNK Buffer, поставляется вместе с ферментом).
- Лигаза фага T4 (T4 DNA ligase, NEB M0202S) и соответствующий буфер (T4 DNA Ligase Buffer, поставляется вместе с ферментом).
- Эндонуклеазы (NEB RXXXXXS).
- Бычий сывороточный альбумин (BSA), концентрация 20 мг/мл, качество пригодное для молекулярно-биологических работ (например, NEB B9000S).
- Компетентные клетки *Escherichia coli* (например, NEB C3019).
- Антибиотики Ампициллин (например, Sigma 69-53-4), Канамицин (например, Sigma 25389-94-0), концентрация стока 100 мг/мл.
- Жидкая среда LB (на 100 мл содержит: триптон 1 г (Медиген 440210); бактериально-дрожжевой экстракт 0.5 г (Медиген 450250); NaCl 0.5 г (Медиген 141659-1000)). Среда автоклавируется перед использованием.
- Агаризованная среда LB (на 100 мл содержит: триптон 1 г; бактериально-дрожжевой экстракт 0.5 г; NaCl 0.5 г; агар 1.5 г (Медиген A0949,0250)). Среда автоклавируется перед использованием.
- Наборы для выделения плазмидной ДНК, мини-, миди- или макси-«преп».
- Реактивы для гель-электрофореза: Tris-Base (Sigma T6066), Tris-HCl (Sigma T3253), EDTA (6381-92-6), уксусная кислота (Медиген 64-19-7).
- Чашки Петри 60–150 мм (например, Медиген 91).
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки объемом 0.2, 0.5 и 1.5 мл.

Получение векторов для направленной модификации генома с использованием системы CRISPR/CAS

Выбор системы клонирования

Выбор системы клонирования проводится можно разбить на два этапа [1]:

Анализ последовательностей целевых локусов генома

Анализ проводится, используя свободное программное обеспечение, например, <https://crispr.med.harvard.edu/>.

Результатом проведенного анализа являются последовательности gRNA, необходимые для узнавания системой CRISPR/Cas данного локуса.

Одновременно с выбором последовательности gRNA необходимо выбрать систему CRISPR/Cas9 для модификации генома. Выбор системы CRISPR/Cas9 зависит от наличия в целевых локусах PAM-последовательностей, специфичных для той или иной CRISPR/Cas9 системы. Например, для PAM-последовательности NGG можно использовать системы spCas9, а для PAM NNGRRT – saCas9. Соответствие различных вариантов PAM-последовательности и системы Cas9 указаны, например, в ресурсе <https://crispr.med.harvard.edu/> и на сайте <https://www.addgene.org/crispr/mammalian/>.

Выбор базового вектора для клонирования

После выбора системы CRISPR/Cas необходимо выбрать базовый вектор для клонирования gRNA и для экспрессии нуклеазы Cas. Базовые векторы для клонирования приведены на сайте <https://www.addgene.org/> (в частности – <https://www.addgene.org/crispr/mammalian/>) с каталожными номерами.

Разработка дизайна эксперимента по клонированию последовательностей gRNA

Протокол клонирования предполагает гидролиз базового вектора в специфической позиции, добавление к нему олигонуклеотидов, содержащих последовательности gRNA (вставки), и последующее лигирование базового вектора и вставки. Участки гидролиза и соответствующие им ферменты гидролиза, а также последовательности олигонуклеотидов, необходимых для проведения клонирования, выбираются исследователем исходя из карт базовых векторов, доступных на сайте <https://www.addgene.org/>. Ниже будет приведен типовой протокол для клонирования олигонуклеотидов, соответствующих системе SpCas9 в вектор gRNA_Cloning_Vector_BsmBI.

Вектор gRNA_Cloning_Vector_BsmBI содержит бактериальный ориджин репликации, ген устойчивости к канамицину, промотор U6, два сайта рестрикции *BsmBI* и терминатор транскрипции. При обработке рестриктазой *BsmBI* из вектора удаляется небольшой фрагмент, расположенный между промотором U6 и конститутивной частью gRNA. Поскольку фермент *BsmBI* относится к типу ферментов IIS, он узнает асимметричный сайт (CGTCTC) и вносит двухцепочечный разрыв на некотором расстоянии от него. Поэтому в результате гидролиза вектора gRNA_Cloning_Vector_BsmBI из него удаляются сайты узнавания фермента *BsmBI* и образуются липкие концы для лигирования фрагмента ДНК, кодирующего специфическую последовательность gRNA. Таким образом, обработку ферментом *BI* и лигирование можно проводить в одной реакции.

Для выбранной последовательности gRNA вида G (N)¹⁹ NGG и комплементарной ей последовательности CCX (X)¹⁹ C (где азотистые основания X комплементарны соответствующим основаниям N), необходимо заказать химический синтез двух

олигонуклеотидов: gRNA_F 5'- CACCG (N)19 GTT- 3' и gRNA_R 5'- CТААААС (X)19 С - 3'.

Для секвенирования полученных векторов необходимо заказать олигонуклеотид M13F: 5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3'.

Протокол клонирования на примере вектора gRNA_Cloning_Vector_BsmBI

Подготовительный этап

Полученные олигонуклеотиды должны быть разведены до концентрации 100 мкМ в ddH₂O.

Отжиг и фосфорилирование нуклеотидов

Смешайте в пробирке в указанном порядке:

- 1) 6,5 мкл ddH₂O.
- 2) По 1 мкл каждого из двух олигонуклеотидов gRNA_F и gRNA_R.
- 3) 1 мкл 10X T4 PNK Buffer.
- 4) 0,5 мкл T4 PNK.

Объем реакции составляет 10 мкл.

Перемешайте содержимое пробирки пипетированием, затем инкубируйте в следующем температурном режиме:

- 5) 37 °C → 30 мин.
- 6) 95 °C → 5 мин.
- 7) Равномерное снижение температуры до 25°C по 5°C/мин.

Реакция рестрикции-лигирования.

Смешайте в пробирке в указанном порядке:

- 8) 6,5 мкл ddH₂O.
- 9) 1 мкл T4 DNA Ligase Buffer*.
- 10) 0,1 мкл BSA.
- 11) 0,4 мкл реакционной смеси, полученной на шаге I (содержит фосфорилированные двухцепочечные фрагменты ДНК).
- 12) 1 мкл плазмиды gRNA_Cloning_Vector_BsmBI.
- 13) 0,5 мкл T4 DNA Ligase.
- 14) 0,5 мкл BsmBI.

Перемешайте содержимое пробирки пипетированием, затем инкубируйте в следующем температурном режиме:

- 15) 37 °C → 5 мин.
- 16) 20 °C → 5 мин.

17) Повторить шаги 1 и 2 15–35 раз.

Трансформация бактериальных клеток

18) Используйте 0,5–1 мкл продукта реакции II для трансформации компетентных клеток *E. coli*. Высадить трансформированные бактериальные клетки необходимо на чашку Петри на твердую агаризованную среду LB (20–25 мл), содержащую селективный антибиотик канамицин с конечной концентрацией 50 мкг/мл. Убрать чашки с бактериями в термостат, инкубировать при 37 °С в течение 12–18 ч.

19) Скрининг трансформантов

20) Выбрать 2–4 клон из полученных трансформантов. Нарастить соответствующие бактериальные культуры и выделить плазмидные ДНК как описано в руководствах к соответствующим наборам. Провести секвенирование плазмидной ДНК с использованием праймера M13F, чтобы удостовериться в корректности последовательности gRNA.

21) Нарботка полученных векторов в препаративных масштабах

22) Для клонов, секвенограмма которых соответствует ожидаемой, провести наработку плазмидной ДНК набором макси- или миди-«преп» в соответствии с протоколом, составленным производителем. Провести тестирование выделенной плазмидной ДНК при помощи гель-электрофореза.

При подготовке СОП «Идентификация и характеристика клеточных линий человека и животных» использованы следующие литературные источники:

1 Мензоров А.Г., Лукьянчикова В.А., Кораблев А.Н., Серова И.А., Фишман В.С. Практическое руководство по редактированию геномов системой CRISPR/Cas9 // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. Т. 20(6). С. 930–944.