

# Наноконструкции с использованием пирен-модифицированных фотоблокированных олигонуклеотидов для доставки направляющих РНК в системе CRISPR/Cas9 в клетки

Семиколонова О.А.<sup>1,3</sup> Саковина Л.В.<sup>2,3</sup> Новопашина Д.С.<sup>1,3</sup>

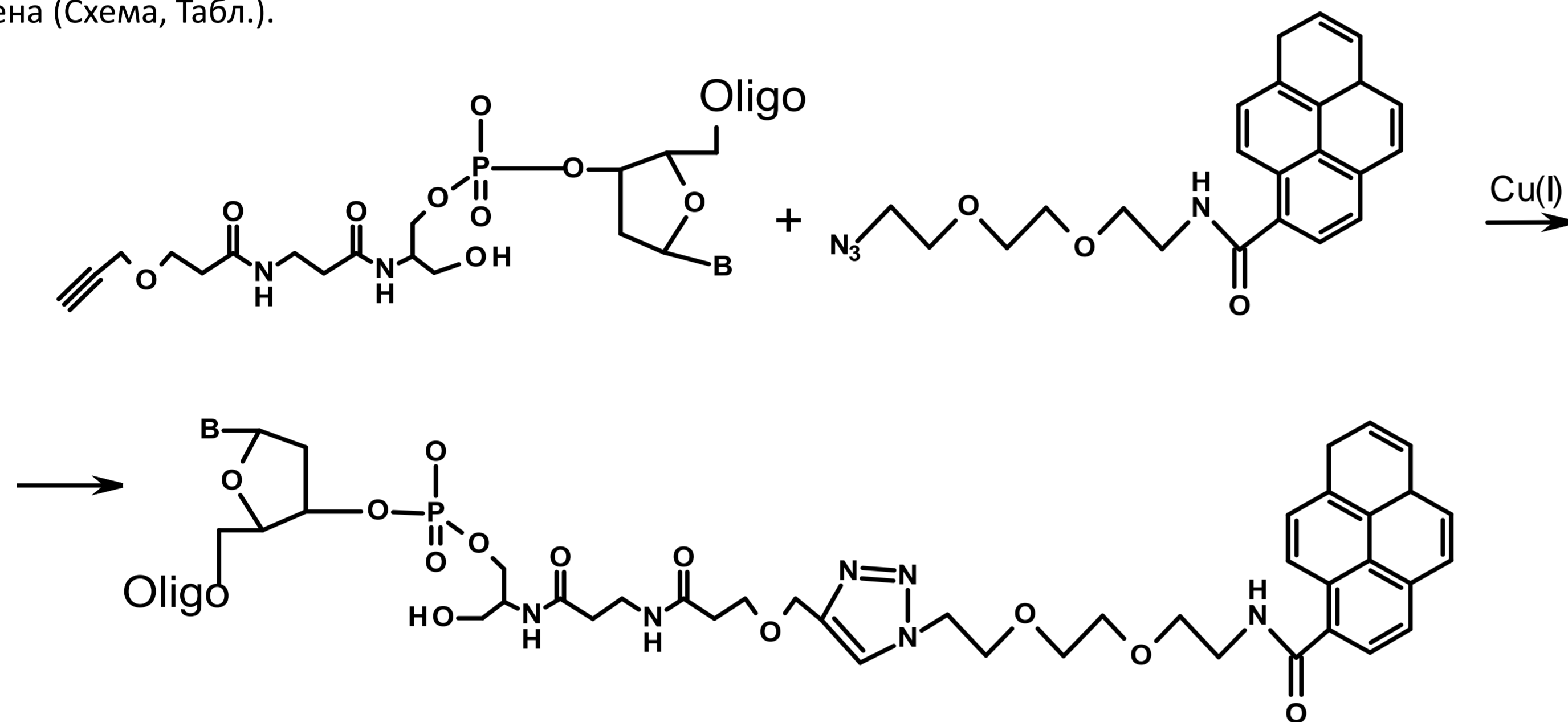
<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

## Иммобилизация комплекса вспомогательный олигонуклеотид/направляющая РНК на поверхности наночастиц

Для иммобилизации направляющей РНК на поверхности углеродных наночастиц синтезировали 3'-пиренильные конъюгаты комплементарных 20-ти и 30-ти звенных фоторасщепляемых олигодезоксирибонуклеотидов. На 3'-конец алкинмодифицированного олигодезоксирибонуклеотида, содержащего фоторасщепляемые (PL) линкеры, методом клик-химии присоединяли азидопроизводное пирена (Схема, Табл.).



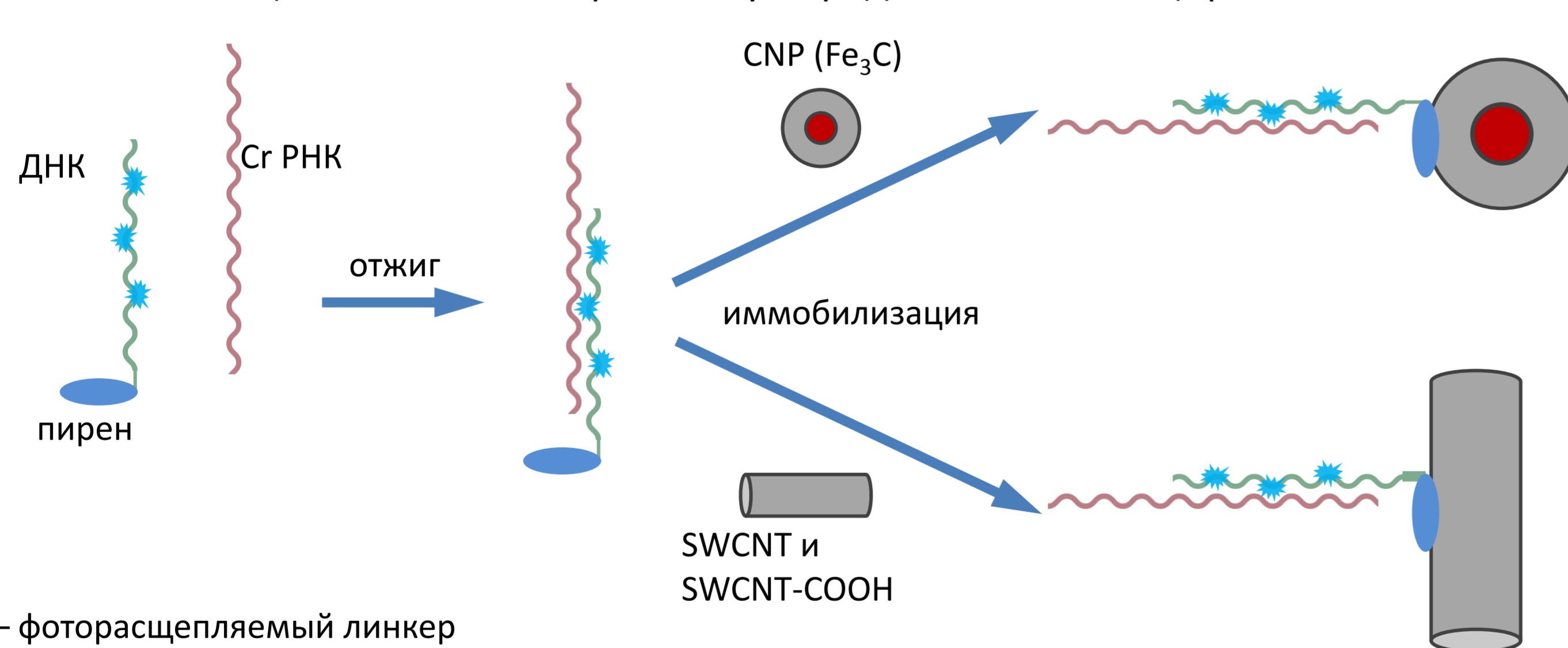
Твердофазным фосфитамидным методом получены направляющие РНК (сгРНК и tracrРНК), а также 3'-флуоресцентно меченая сгРНК.

**Таблица.** Синтезированные направляющие РНК и пирен-модифицированные фоторасщепляемые олигодезоксирибонуклеотиды

Шифр	Последовательность
B-DNA30_PL	5'-GCTCTAAA-PL-ACTTTTT-PL-TACAAAT-PL-TGAGTTAT-Pyr-3'
B-DNA20_PL	5'-TTTTTT-PL-ACAAA-PL-TTGAG-PL-TTATCC-Pyr-3'
сгРНК_Flu	5'-AUAACUCAUUUGUAAAAAGUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG-Flu-3'
сгРНК	5'-AUAACUCAUUUGUAAAAAGUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG-3'
tracrРНК	5'-AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC-CGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGUGUCUUUUUUU-3'

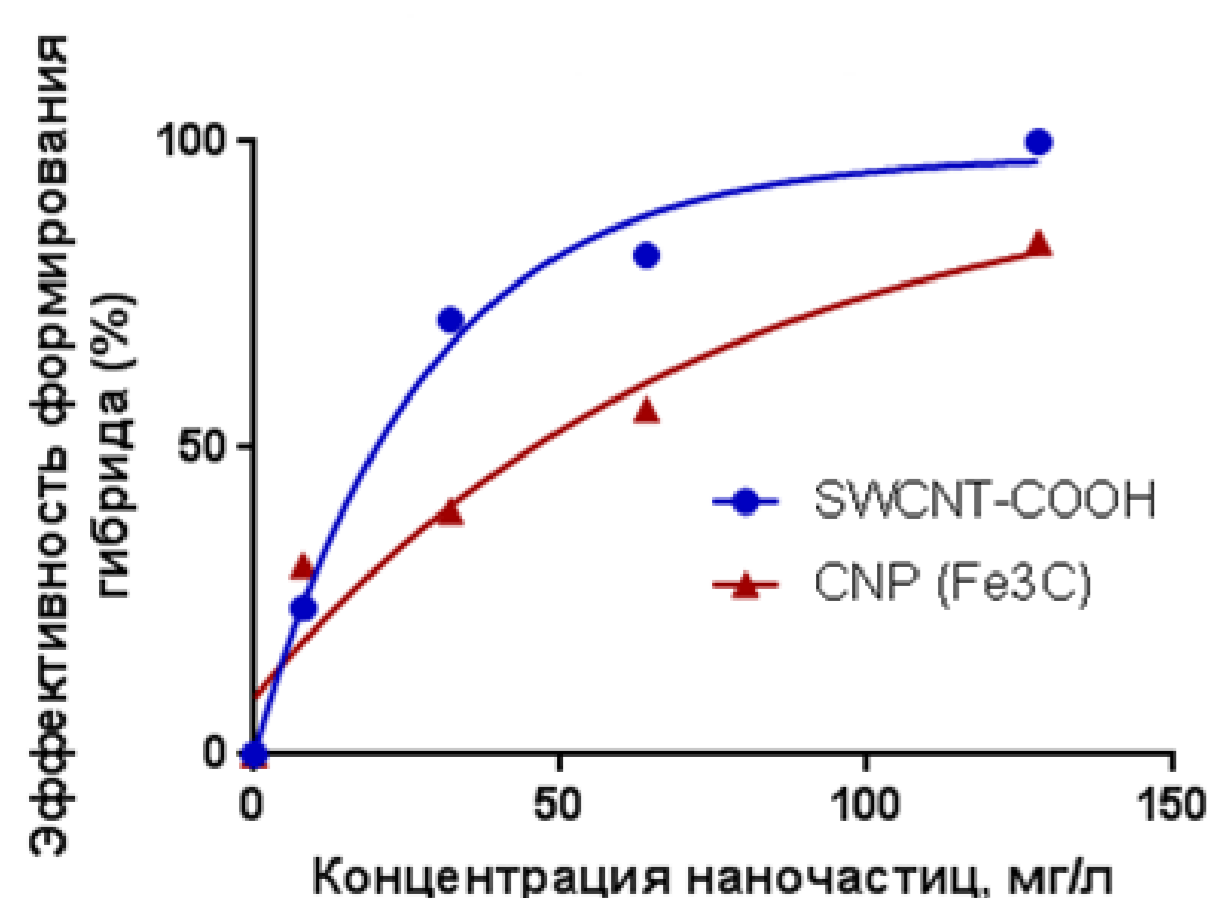
PL – фоторасщепляемый линкер, Pyr – остаток пирена, Flu – остаток флуоресцеина

Схема иммобилизации сгРНК на поверхности углеродных наночастиц трех типов



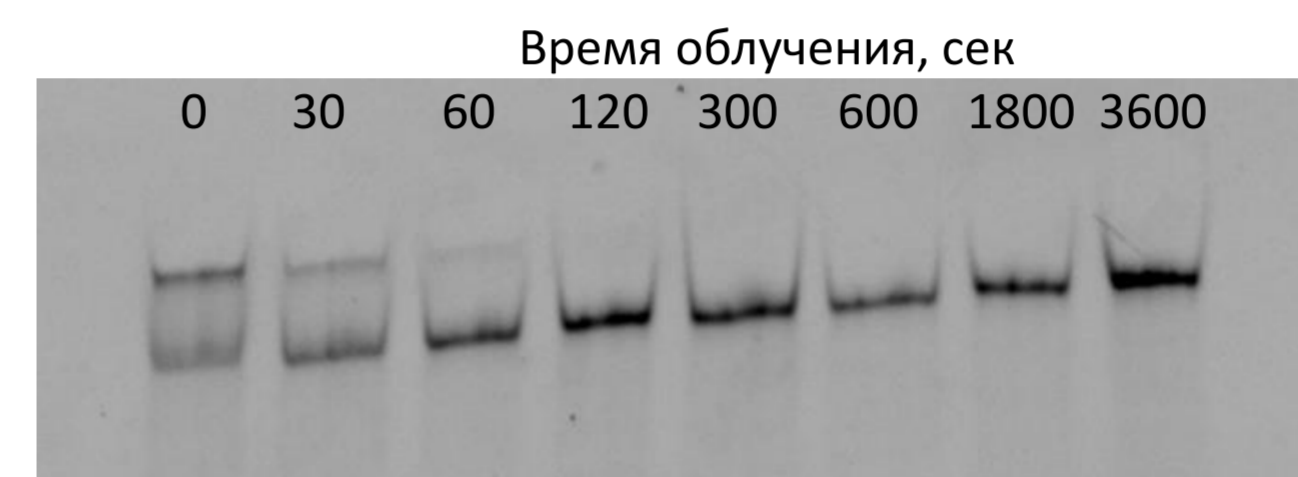
- ★ – фоторасщепляемый линкер
- CNP (Fe<sub>3</sub>C) – углеродные наночастицы, содержащие комплекс железа
- SWCNT – одностенные углеродные нанотрубки
- SWCNT-COOH – одностенные углеродные нанотрубки, содержащие COOH-группы

Для исследования процесса иммобилизации нами был использован метод, предложенный ранее в нашей лаборатории, а именно регистрация изменения флуоресценции при иммобилизации пиренильных якорных групп на поверхности углеродных наночастиц и последующее построение изотерм адсорбции.

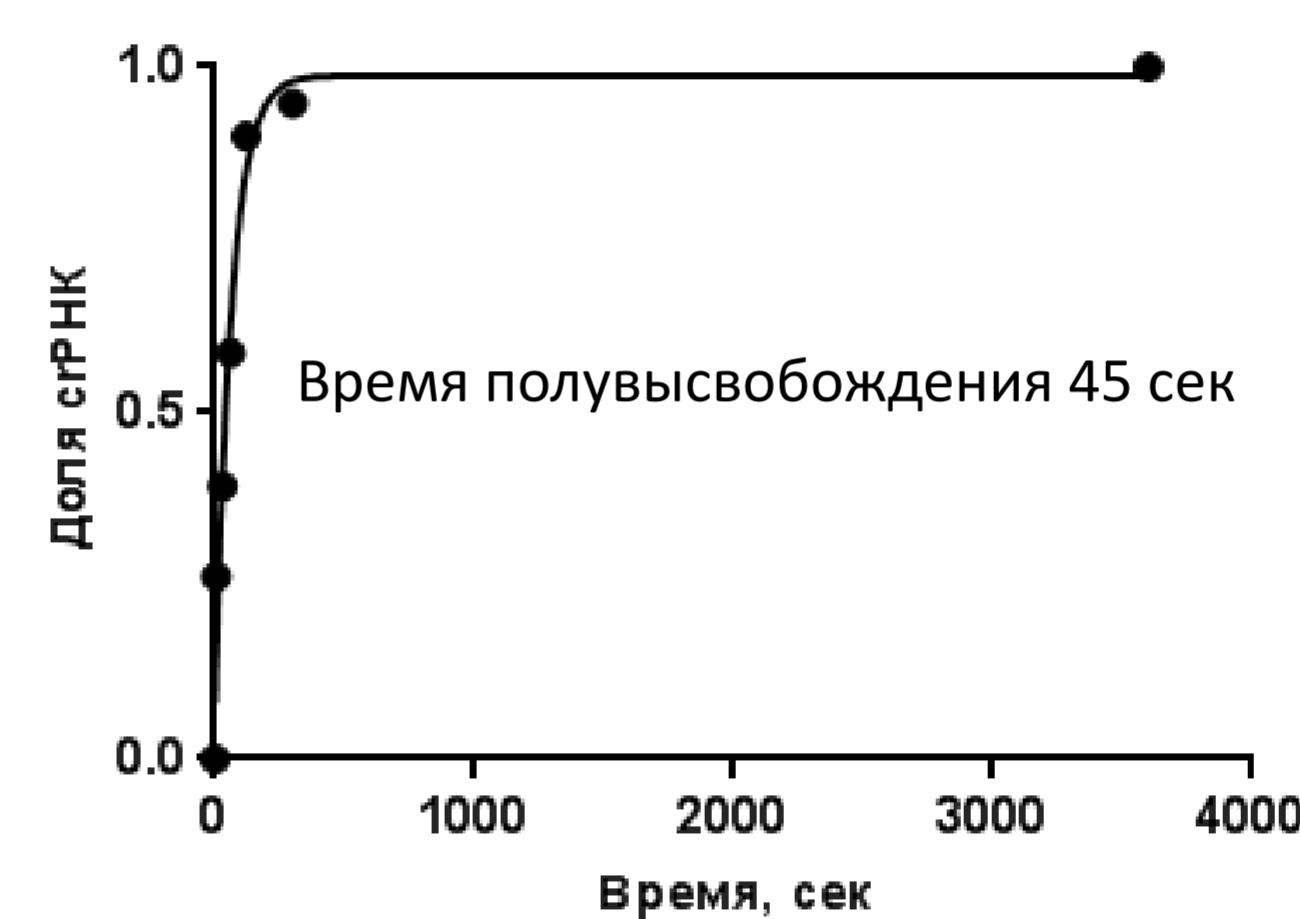


**Условия:** 0,01М фосфатный буфер (pH 7,5), концентрация олигонуклеотидных компонентов 1·10<sup>-6</sup>М, отжиг олигонуклеотидных компонентов без наночастиц в течение 2 минут, ультразвуковая обработка смеси олигонуклеотидных компонентов с наночастицами в течение 30 минут. Более эффективно иммобилизация происходит на SWCNT-COOH, что возможно связано с более ровной структурой поверхности нанотрубок в сравнении с поверхностью углеродных наночастиц с ядром из карбида железа.

## Высвобождение сгРНК из комплексов, иммобилизованных на поверхности наночастиц, под действием УФ-облучения



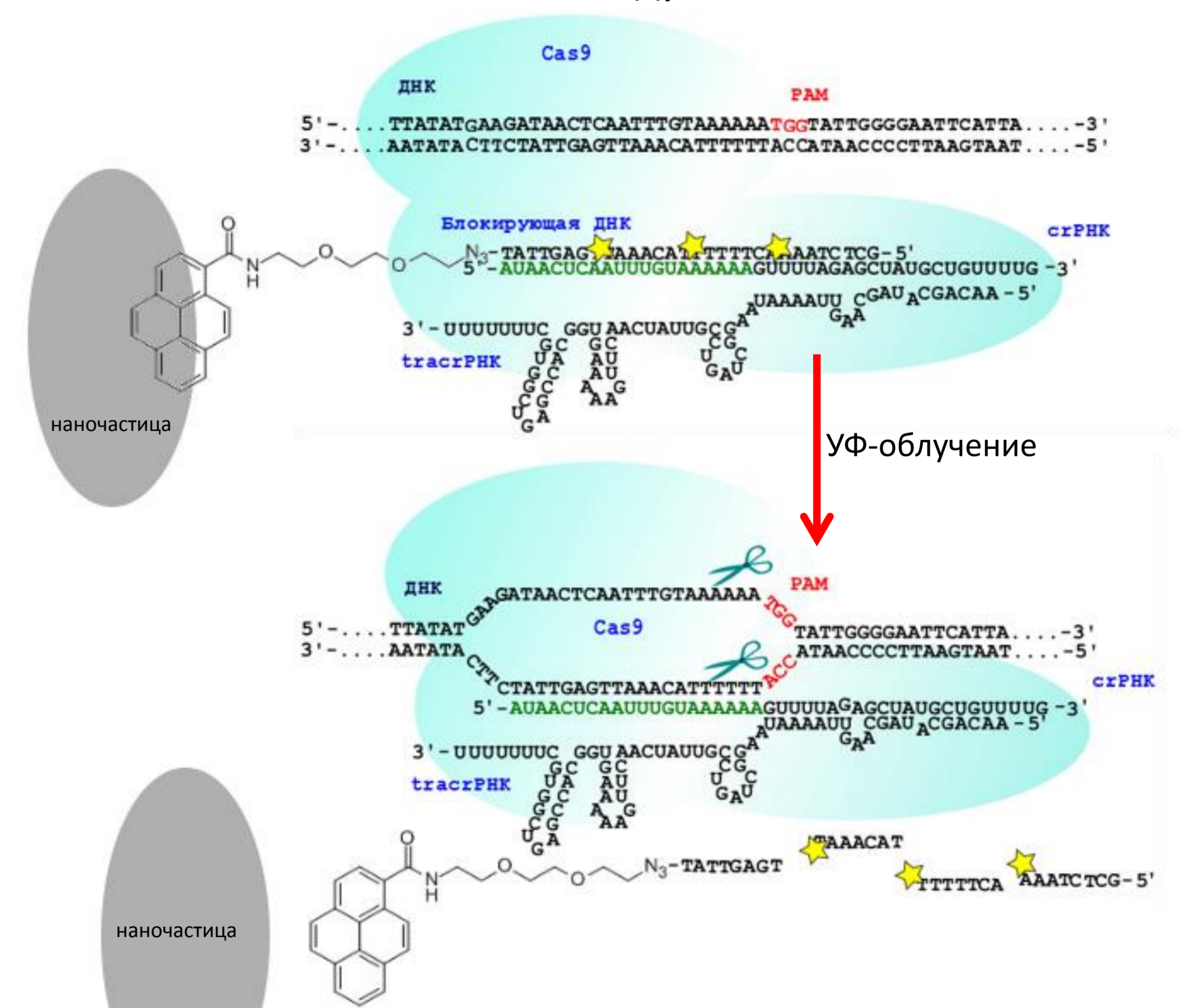
Исследовали высвобождение сгРНК с поверхности углеродных наночастиц на примере SWCNT под действием УФ-облучения.



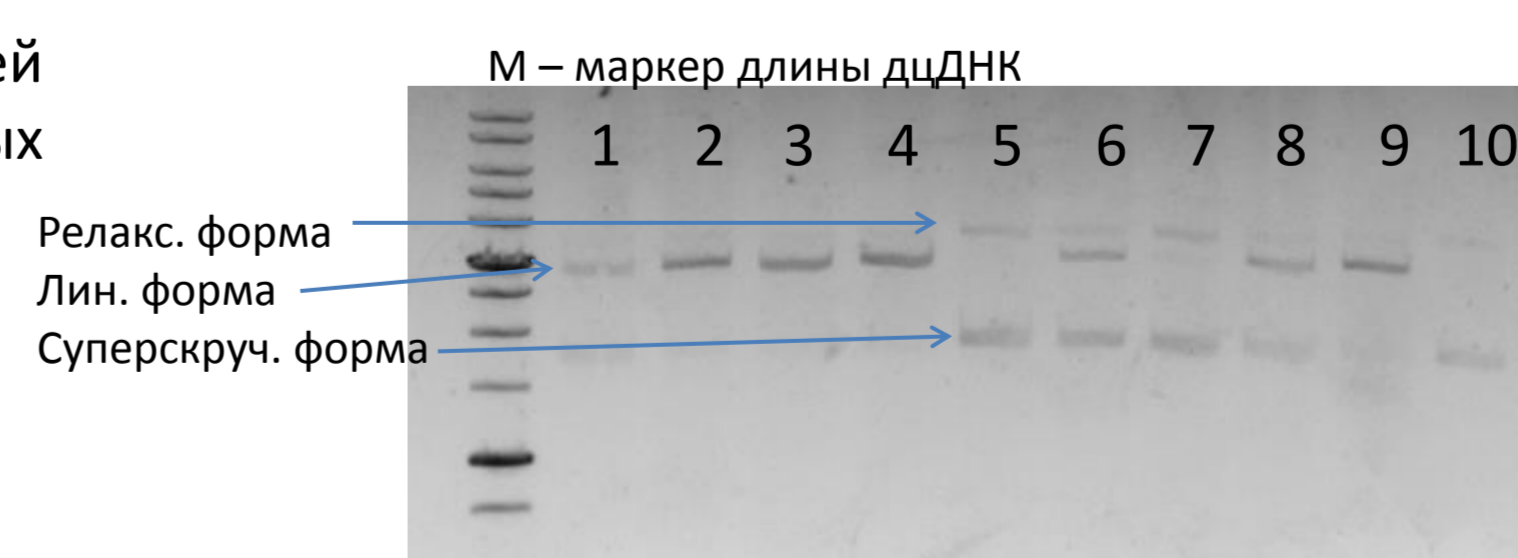
**Условия:** концентрация олигонуклеотида B-DNA30\_PL 1·10<sup>-6</sup>М, температура 25°C, длина волны облучения 365 нм.

Облучение вызывает быстрое расщепление олигодезоксирибонуклеотида, содержащего PL-линкеры, что вызывает разрушение комплекса и высвобождение сгРНК с поверхности наночастиц.

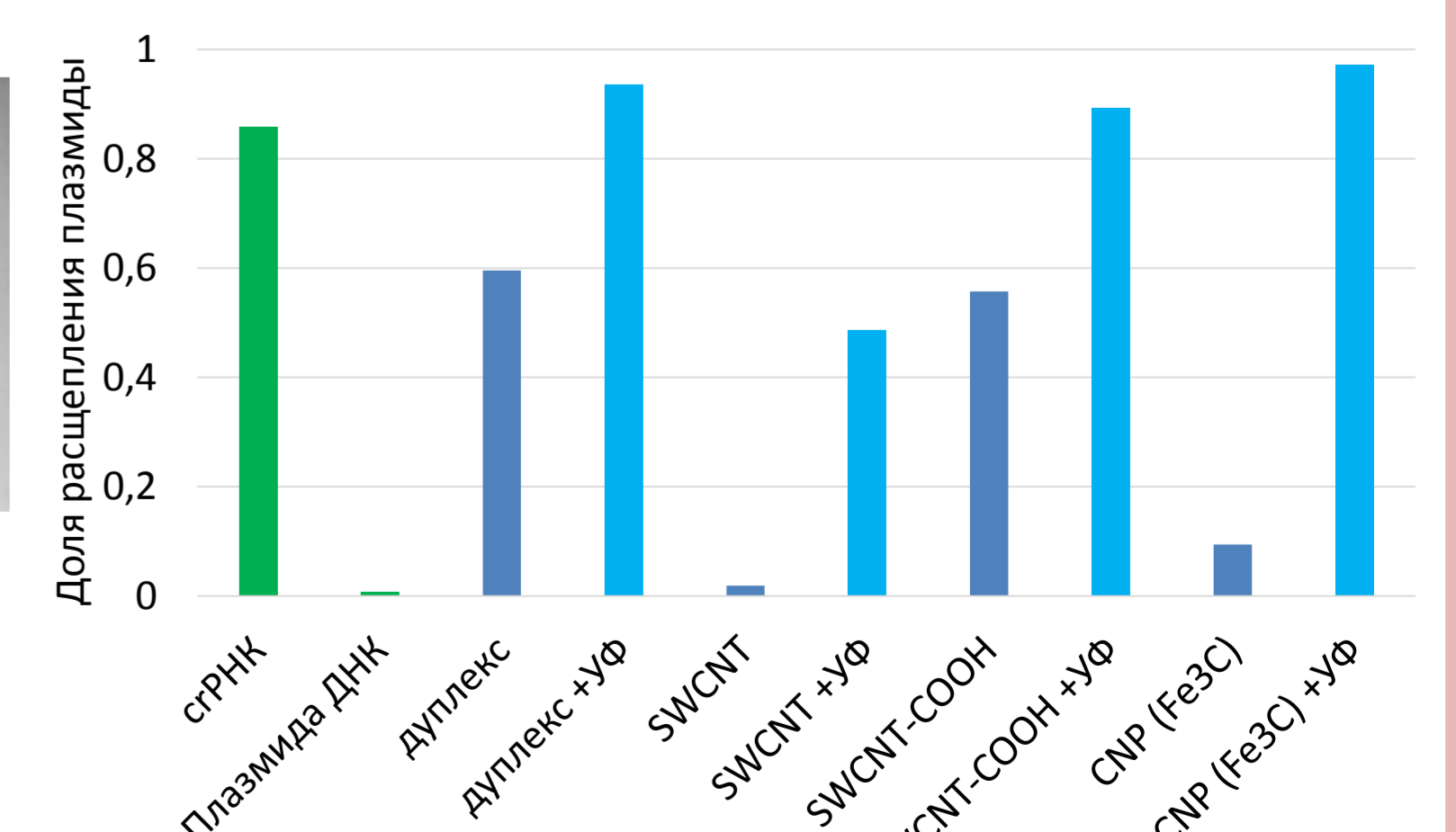
## Исследование способности CRISPR/Cas9 системы, содержащей иммобилизованные направляющие РНК расщеплять модельную ДНК плазмиду



Проводили исследование эффективности работы CRISPR/Cas9 системы в присутствии сгРНК, иммобилизованных на углеродных наночастицах разного типа до и после облучения. В результате сравнительного исследования было показано, что иммобилизация на поверхности CNP(Fe<sub>3</sub>C) частиц позволяет подавить действие системы геномного редактирования до облучения и восстановить эффективность ее действия путем облучения УФ-светом.



Расщепление плазмидной ДНК в присутствии:  
1 – сгРНК, иммобилизованной на поверхности SWCNT, после облучения  
2 – сгРНК, иммобилизованной на поверхности SWCNT-COOH, после облучения  
3 – сгРНК, иммобилизованной на поверхности CNP (Fe<sub>3</sub>C), после облучения  
4 – дуплекса сгРНК с B30-DNA, после облучения  
5 – сгРНК, иммобилизованной на поверхности SWCNT  
6 – сгРНК, иммобилизованной на поверхности SWCNT-COOH  
7 – сгРНК, иммобилизованной на поверхности CNP (Fe<sub>3</sub>C)  
8 – дуплекса сгРНК с B30-DNA  
9 – сгРНК.  
Контрольная дорожка 10 – исходная плазмидная ДНК



**Условия:** буфер, содержащий 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, концентрация олигонуклеотидных компонентов 1·10<sup>-6</sup>М, концентрация наночастиц 1 мг/л. Инкубировали 15 мин при 37 °С, затем добавляли 1 мкл раствора (50 нг/мкл, 27 фмоль) плазмиды pBS2SKM, инкубировали в течение часа при 37 °С. Для остановки реакции к реакционной смеси добавляли 2,5 мкл раствора, содержащего 250 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 1,2% SDS, 0,01% бромфенолового синего и 30% глицерина.

**Полученные наноконструкции могут быть в дальнейшем использованы для доставки направляющих РНК в клетки и фотоактивируемого включения системы CRISPR/Cas9.**