



Разработка конвейера автоматизированного подбора праймеров для нокаута генов с использованием CRISPR-Cas9

Введение

Нокаут генов является ключевой техникой в современной генной инженерии. CRISPR-Cas9 система сегодня представляет собой наиболее эффективный инструмент для точного редактирования геномов бактерий. В двухплазмидных системах для *E. coli* процесс включает несколько этапов: дизайн направляющих РНК, подбор праймеров для плеч гомологии и скрининг офф-таргетных эффектов. Для этих задач существует множество инструментов. При масштабировании работ на несколько генов ручная координация таких разрозненных инструментов становится серьезным узким местом, увеличивая время подготовки экспериментов. Решением данной проблемы является разработка единого автоматизированного конвейера, интегрирующего все этапы проектирования в рамках локально развертываемого решения для повышения эффективности и воспроизводимости геномного редактирования.

Материалы и методы

Разработанный конвейер позволяет автоматизировать подбор олигонуклеотидов, используемых в протоколе CRASH (CRISPR-cas9 and asymmetric homology arm mediated genome modification) для нокаута генов *E. coli* с помощью двухплазмидной CRISPR-Cas9 системы с асимметричными плечами.

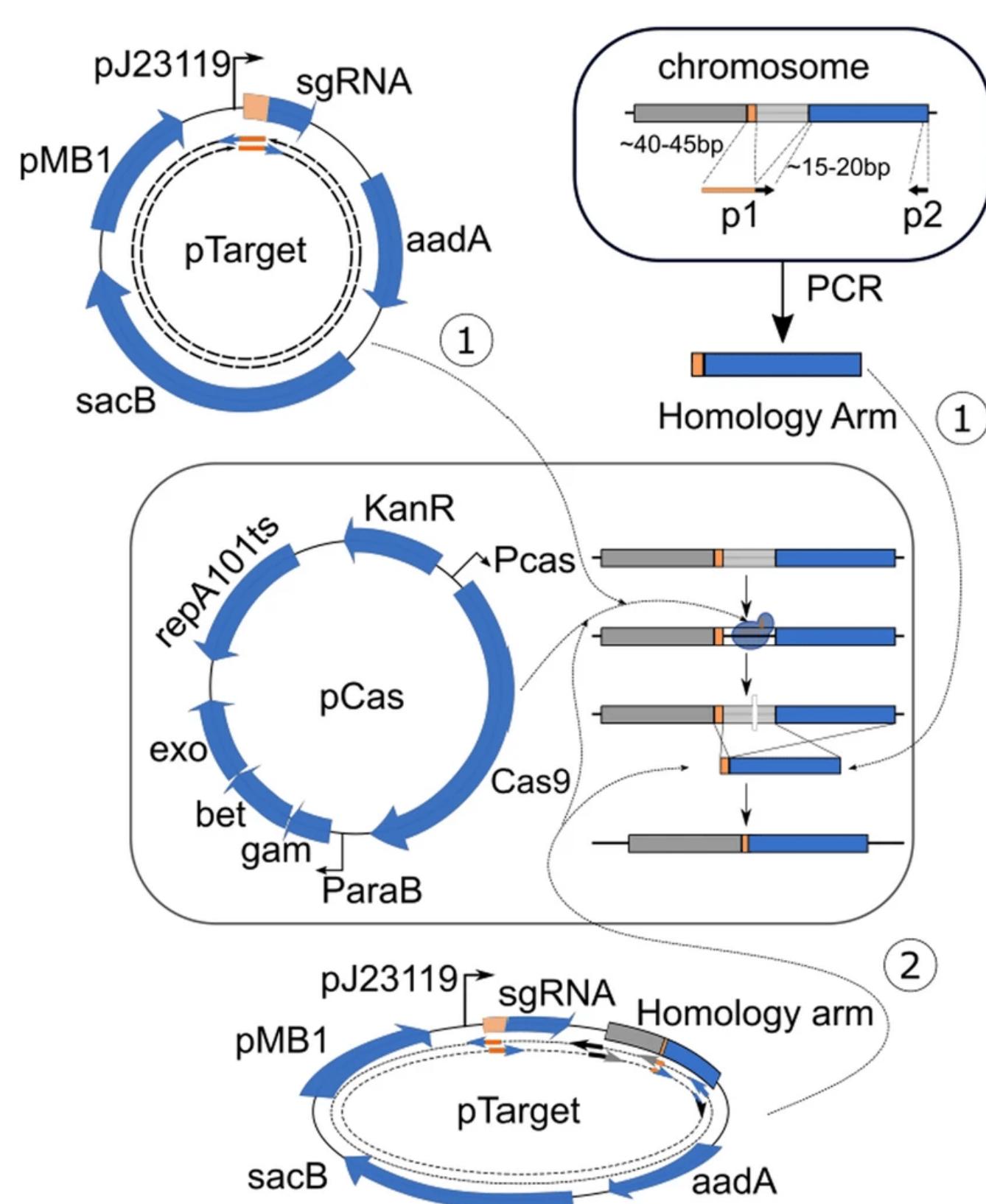


Рис. 1. Схема двухплазмидной CRISPR/Cas9 системы для нокаута генов *E. coli* (источник: Jiang, Yu, et al. “Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system” (2015)): (1) метод 1 — трансформация pCas-плазмида, последующая амплификация асимметричных плеч гомологии (р1/р2) с помощью ПЦР и их встраивание в pTarget; (2) метод 2 — трансформация pTarget-плазмида, содержащей готовые плечи гомологии. Оба метода включают использование sgRNA, селективного маркера aadA и Cas9-модуля для целевого редактирования генома.

Для тестирования разработанного конвейера использовался аннотированный геном изолята *E.coli* ZvL. Для подбора направляющих РНК и праймеров использовались программы СНОРСНОР и Primer3 соответственно. Интеграция и автоматизация вычислений осуществлялись с использованием набора скриптов, реализованных на языках R и Bash.

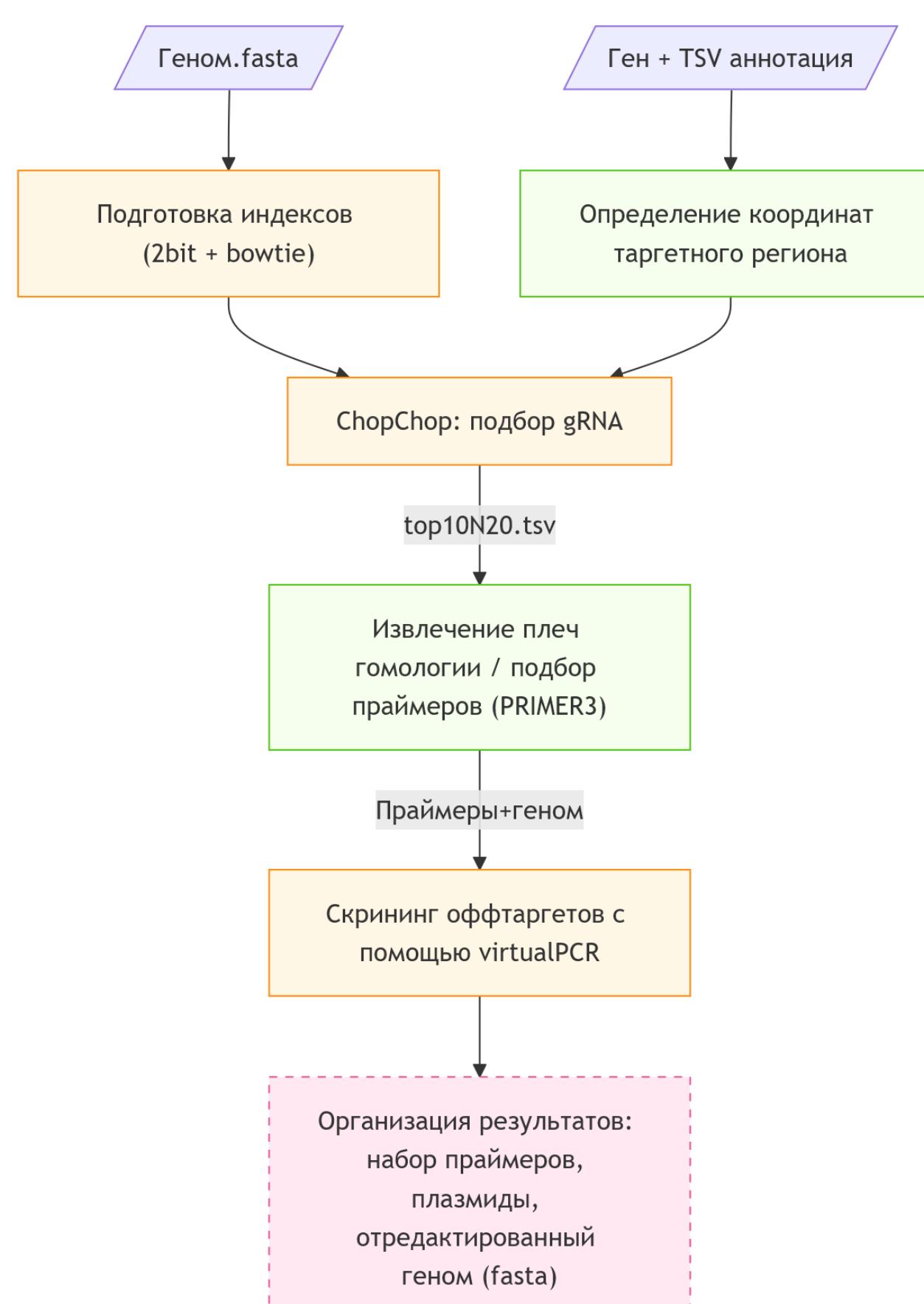


Рис. 2. Схема работы конвейера: фиолетовым цветом указаны входные файлы, зелёным – R скрипты, жёлтым – сторонние утилиты, красным – совокупность выходных данных.

```
>gRNA_forward1
ACGACTAGTCCAGAAAAAGCGATGCCGGTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCT
>gRNA_forward2
ACGACTAGTGACAGGGGCAGGAATTCTGGTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCT
>gRNA_forward3
ACGACTAGTAAAGTGCCTGTTCACAAAGGTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCT
>gRNA_revers
AGTTGACGCTAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCC
>left_homology_arm_primer_f
AGCGTCAACTTGCTTCCGCTTTAATCCCT
>left_homology_arm_primer_r
CTTGGGGCAGTCATATGCCATTGTTGCCAGTTCC
>right_homology_arm_primer_f
ATGACTGCCCGCAAGAACGACTTAACCGATGACCCC
>right_homology_arm_primer_r
ACGCTGCAGATGCGTTAACCATGATGGGT

>left_arm_2770657_2771106
ATTACCGCCCGTTTTATTAGCAAGGATGTGGCTAATGAGTCAGGACAGTAAAGTTTATCCGCTTTCTCGTCGGTA
TTGTGGTCCCCCTGCAAGGCCTGATAAGCGTAGTGATCAGGCAATGCTTCCGCTTTAATCCCTCAGCAACTTTCAA
CAAACTCAGGCACCACCTGGCTGCCGGCGTAATATTCTGGCAAATTCACTACCAACCTGACTCGGTTCAAGATTC
AGTTCACGGTGTGCGGCCATGCAGTTCTGCTCGTAACAAACCCAGCCGCCGATAAAACATGCCGGATGTGCCAAT
GGCAATGAAAATATCGGCCATCGACAACGCCATATAAATTCCATGCCAGTGGCATTCGCCAAACCAACTACAT
GCGGGCGCAAGGGTGCCGGAAACTGGCAACAATGGCATTATCTCTGGG
>right_arm_2771484_2772083
TACTCTGGTTTCCATTGCTTCCGGACCACCTTATCTGAAAAAAATACGCTGACGCAAACGCTCGCGAGGCGGC
GTTTATTTACGAAAACGACTTAACCGATGACCCGACGCGACAGCATAGCAACCTCTGTTGTTAACGTTAGATGT
AGGAAGGCCGCACCACGCATTCTCCCGCATACCGTGGCGCGCGTCAATGCCGGAACACGAGCTACAGGTAAGAG
ATGACGAGGCAGCCTGTCGCCAGTTGCGTTGTGATTGCCGGAAATTGATAAGCCACCAATGACGACCGAGTCAG
GGTCACAAATGGTCAGGATATTCCAGACAAACCGCTAATAATCCAGATAACGCTAACGTCAGCTGCGCCCTGCC
TCGCCTTGTACATAAGCGCAATAATTCTGGGAGCCTGCAACGGTTGATGATAATAGTGTGATACGCCACGCAAAAC
GCGACCAAGACAGATAATTCAATGCAGCCATGCTGACCACAGCCGAGCGCGTAACGGGAAATCCAACCCCATCATGG
TTAACCGCATCAACCGGCAGACGCATATGCCAAACTCGCC
```

Рис. 3. Пример вывода набора праймеров и последовательности левого и правого пелча гомологии для гена *hfq*

Цель

Разработка конвейера для автоматизированного дизайна олигонуклеотидов к двухплазмидной CRISPR-Cas9 системе с асимметричными плечами гомологии для нокаута генов в геноме *E. coli*.

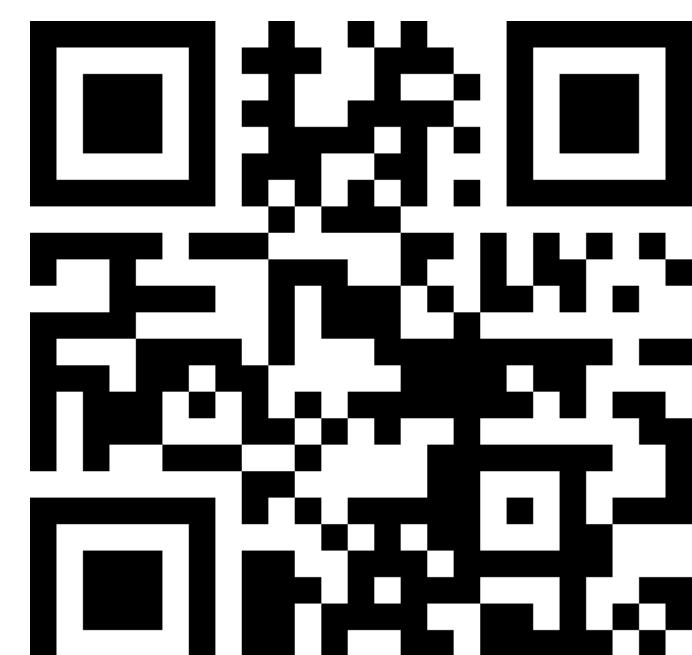
Результаты

Разработан конвейер для автоматизации дизайна двухплазмидной CRISPR-Cas9 системы с асимметричными плечами гомологии при нокауте генов *E. coli*, объединяющий подбор gRNA (CHOPCHOP), дизайн праймеров (Primer3) и аналитику через скрипты на R и Bash.

Конвейер генерирует: набор олигонуклеотидов (gRNA, праймеры для плеч гомологии и скрининга клонов), аналитические данные (размер целевого фрагмента, ожидаемые длины ПЦР-продуктов) и модели плазмид рTarget с итоговой конфигурацией конструкта.

Решение требует экспериментальной валидации; в планах — расширение на другие организмы и оптимизация параметров редактирования.

Исходный код проекта доступен по ссылке github.com/hophee/2PAC и QR-коду ниже:



Зайцев И.П.

Зайцев И.Л.,
*Федеральное Государственное Бюджетное
Учреждение «Федеральный научно-клинический
центр физико-химической медицины
Федерального Медико-биологического
Агентства»,
119435,Москва, Одинцово, Малая Пироговская,
д. 1А
Россия*