



# Разработка методов для характеристики элементов логических генетических схем на основе системы CRISPR/dCas для регуляции работы генома

Выпускная квалификационная  
работа бакалавра

Выполнила:  
Студентка 4 курса **Разинкова Анна**

Руководители:  
аспирант **Мамаева Н. Ю.**  
д.ф.-м.н, чл.-корр. РАН, профессор **Шайтан А.К.**

Москва, 2025 г

# Система CRISPR-Cas

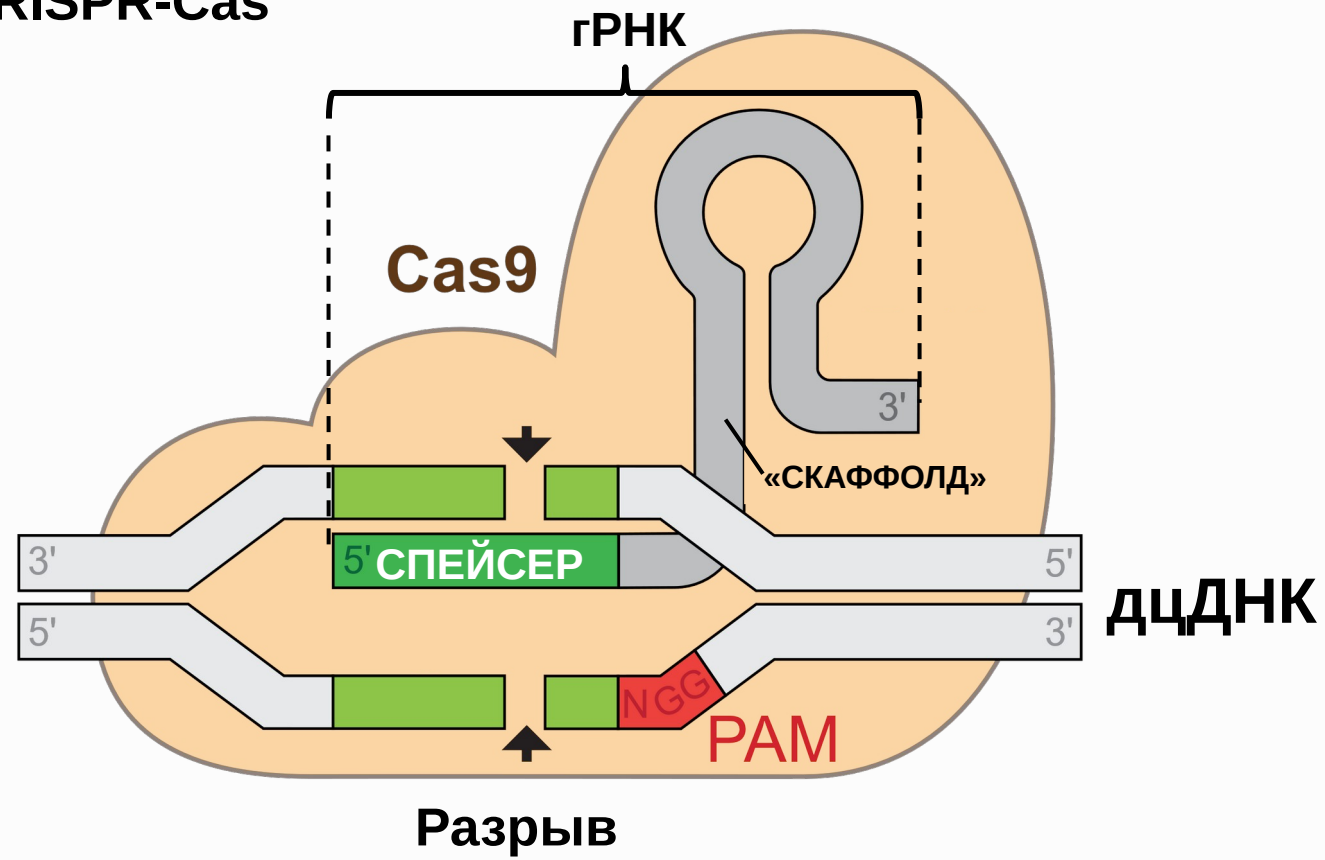


Рис.1. Схема тройного комплекса dCas9/ДНК/гРНК.

# Генетические схемы

Генетическая схема – взаимосвязанная система генов и регуляторных элементов, обеспечивающих кодирование белков или РНК, позволяющих клеткам взаимодействовать друг с другом и с окружающей средой.

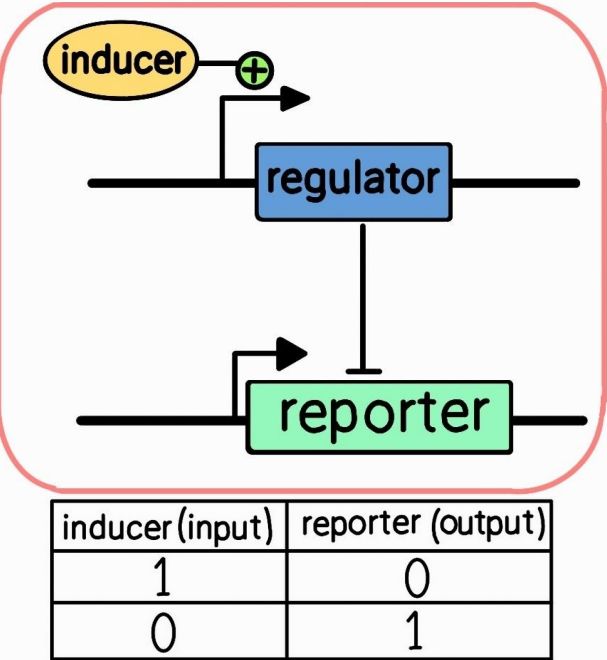


Рис.2. Понятие генетической схемы.

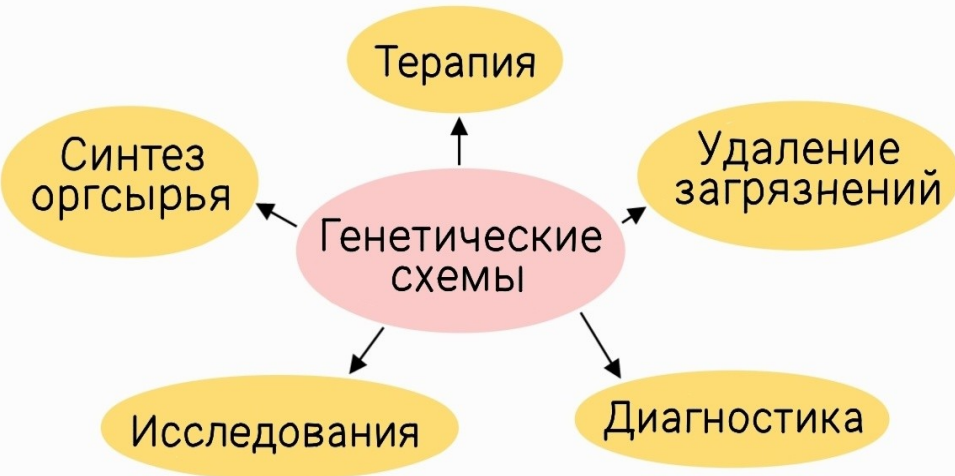


Рис.3. Области применения генетических схем.

# Цели и задачи

Цель данной работы заключается в разработке и тестировании генетической схемы на основе системы CRISPR/dCas9 в клетках *E. coli*. Задачи:

1. Выбор и оптимизация протокола для измерения эффективности работы генетических схем;
2. Дизайн и получение ДНК-конструкций, кодирующих логические генетические элементы;
3. Получение кривых роста и сигнала флуоресценции для разрабатываемой репортерной системы и генетической схемы различными методами.

# Схема экспериментов

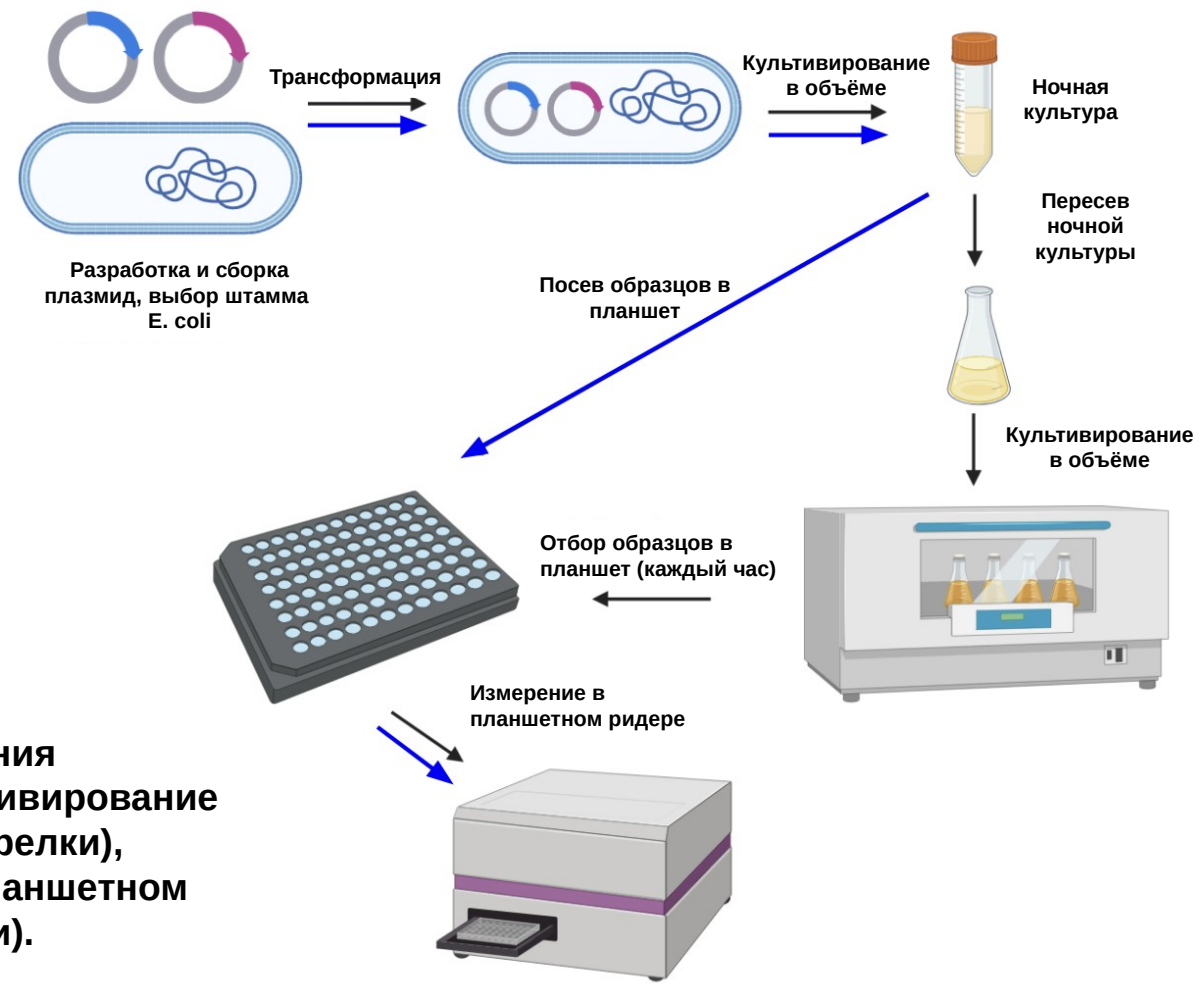


Рис.4. Схема проведения экспериментов: культивирование в шейкере (чёрные стрелки), культивирование в планшетном ридере (синие стрелки).

# Генетическая схема «NOT gate - mRFP»

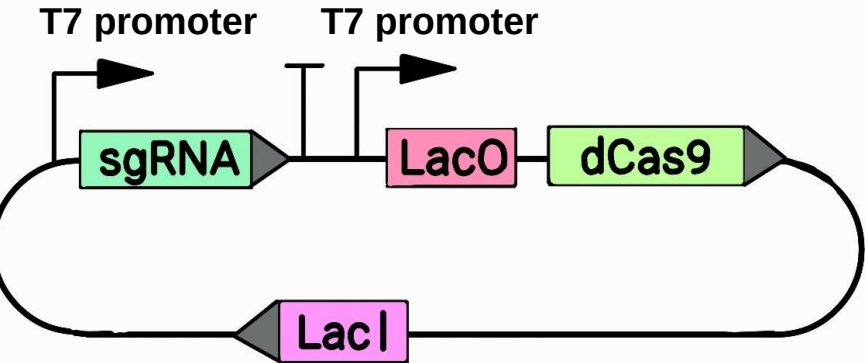


Рис.5. Схема эффекторной плазмиды pRSF\_Duet+sgRNA.

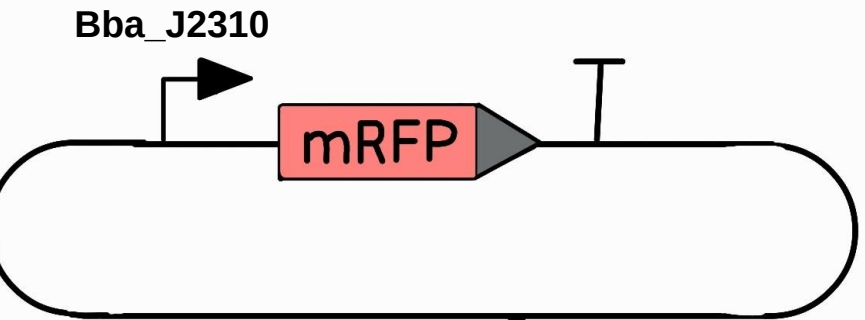


Рис.6. Схема репортерной плазмиды pSB1C3+mRFP.

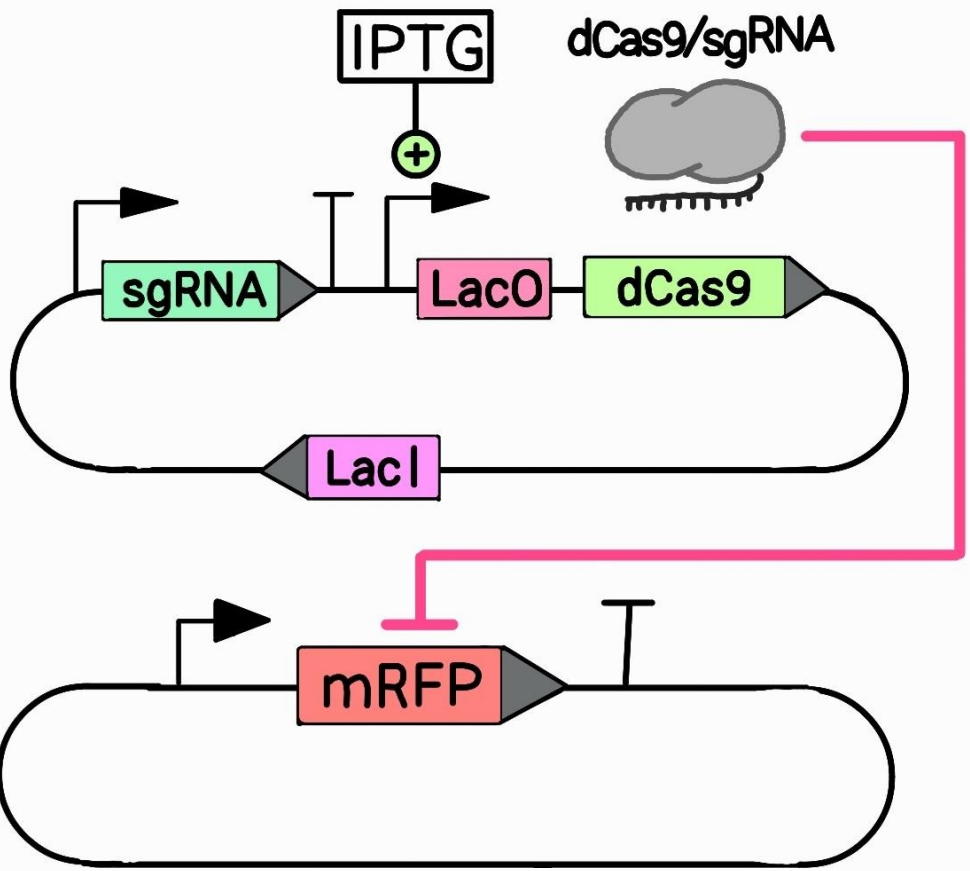


Рис.7. Схема активации ген. схемы.

# Схема сборки спейсеров

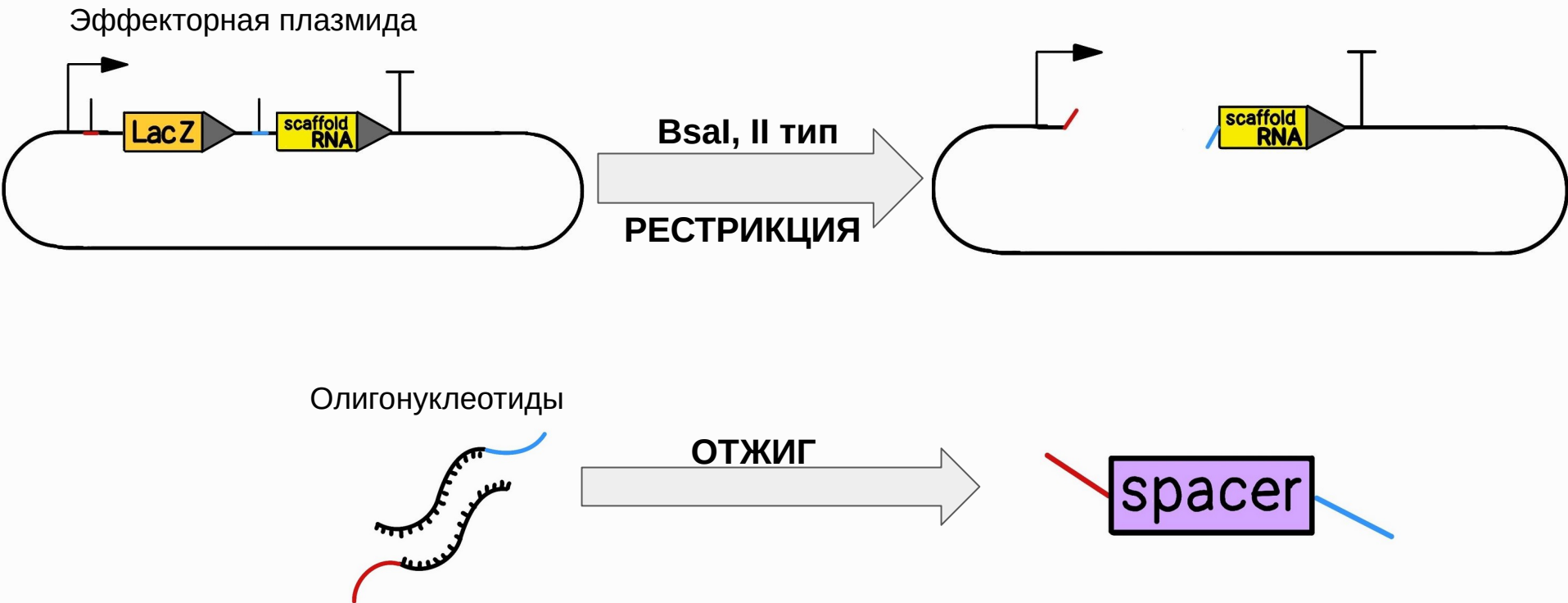


Рис.8. Схема сборки спейсеров (эффекторная плазмида)

# Результаты «NOT GATE - mRFP»

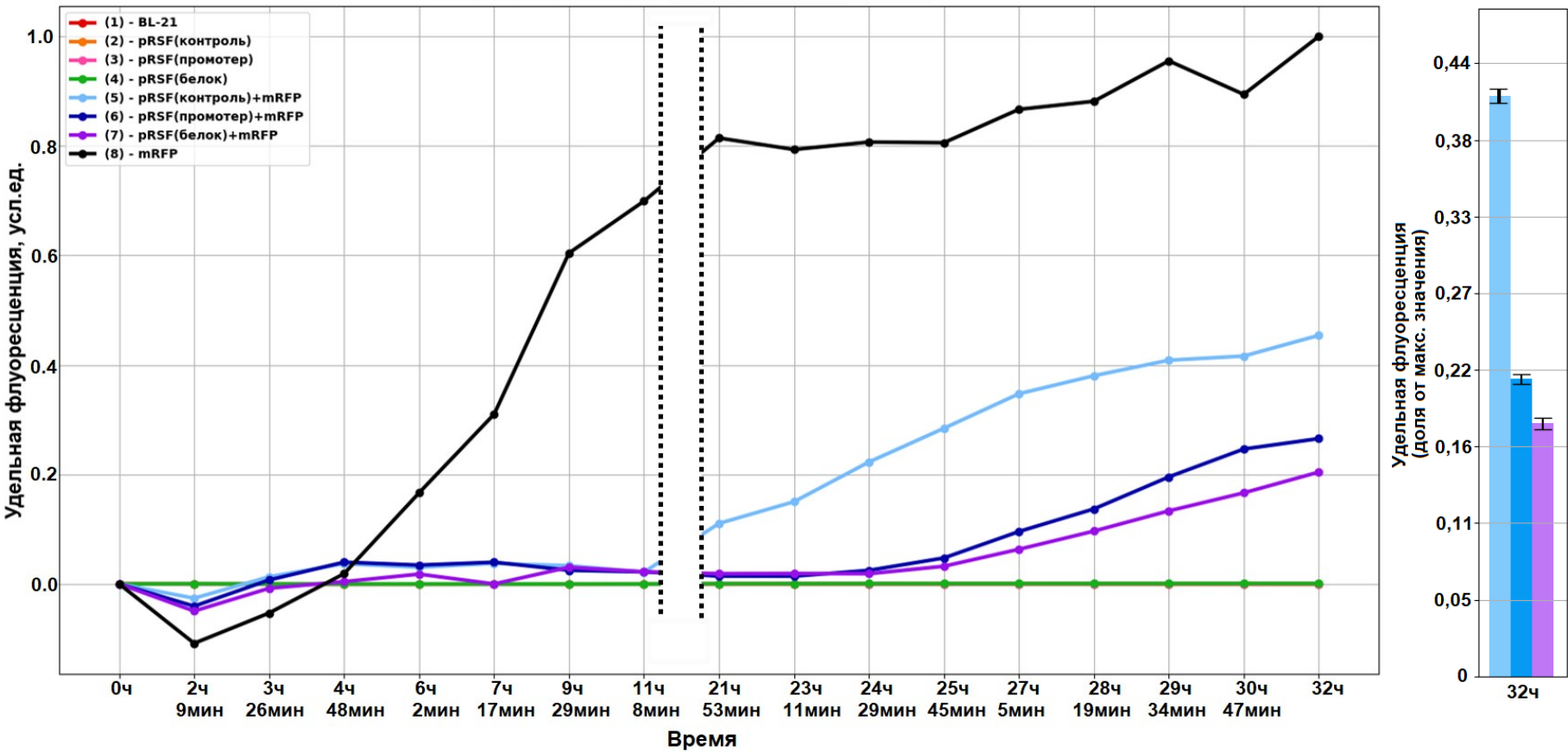


Рис.9. Изменение сигнала флуоресценции mRFP



# Оптимизация метода измерения

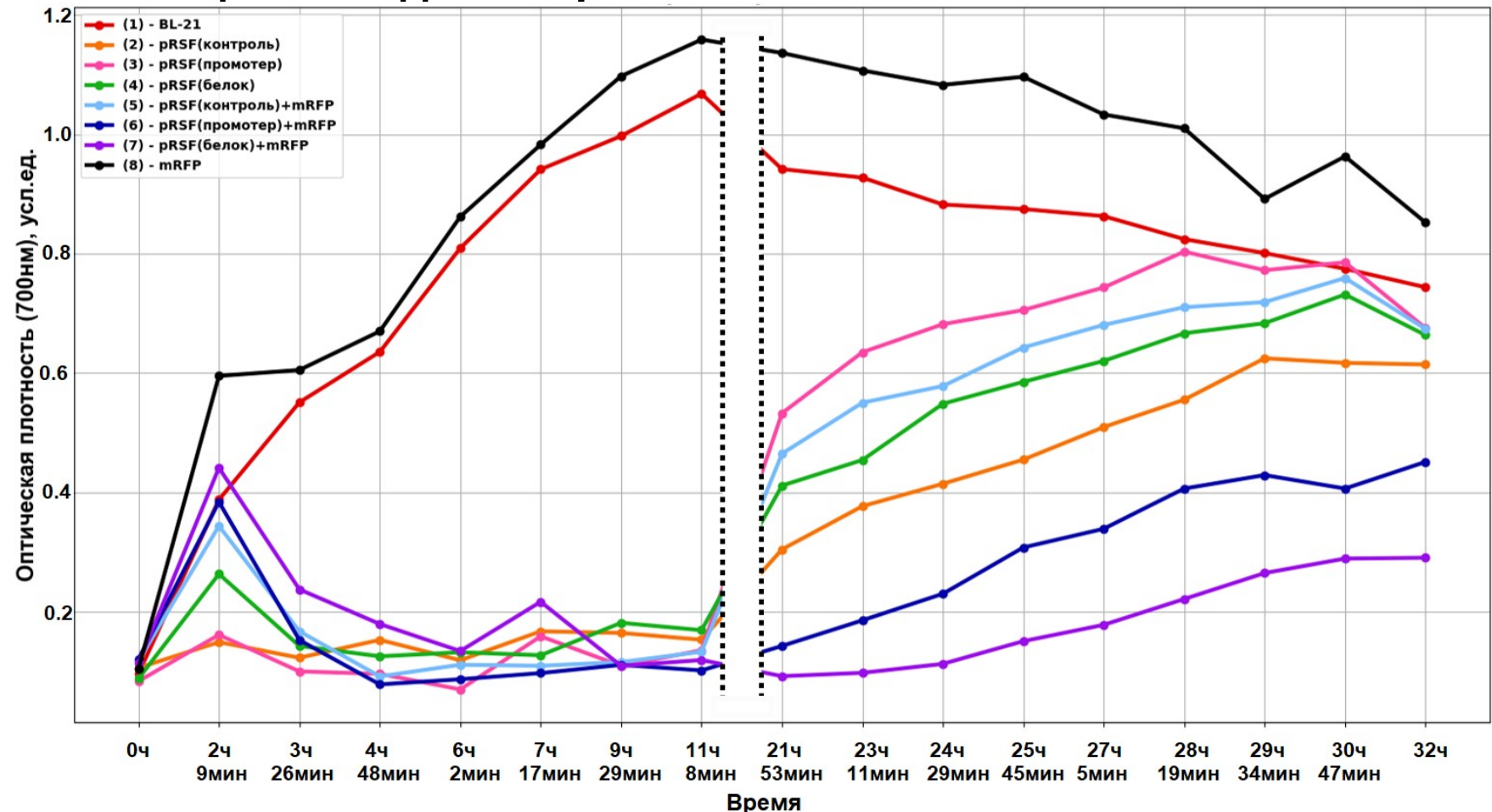


Рис.11. Кривые роста клеток при культивировании в шейкере.

# Оптимизация метода измерения

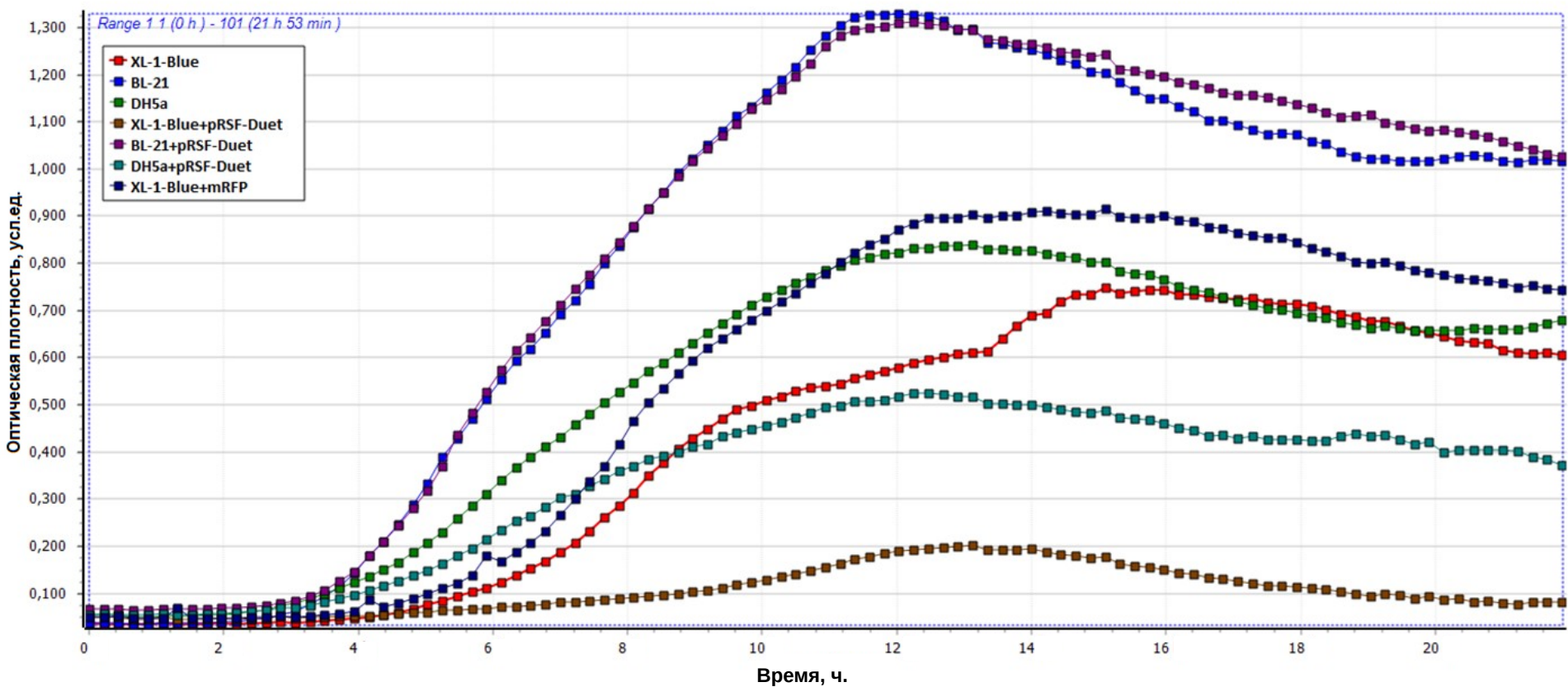


Рис.12. Пример кривой роста при измерении в планшетном ридере.

# Оптимизация системы

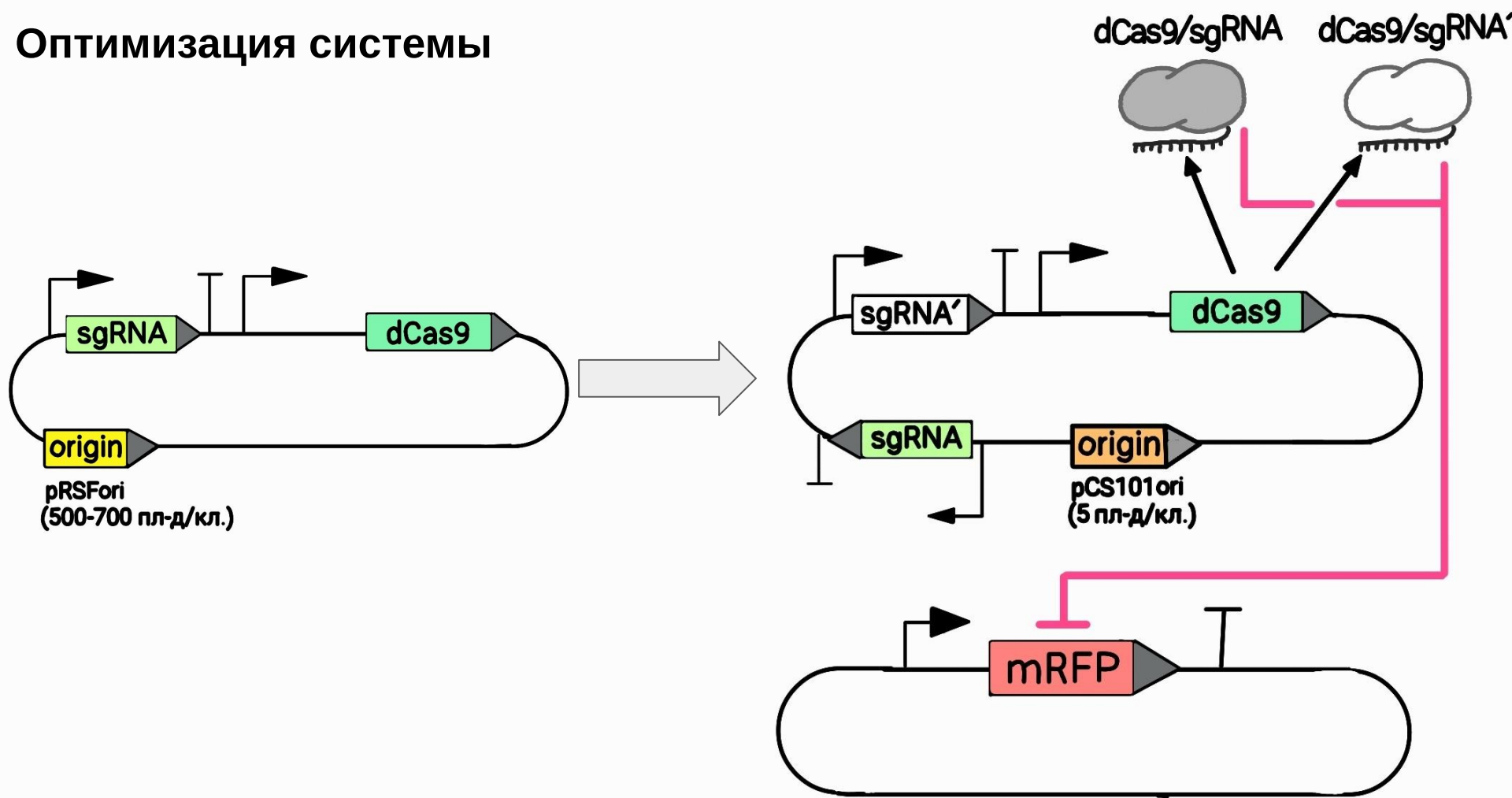


Рис.13. Схема оптимизации эффекторной плазмиды.

# Выводы

1. Разработаны протоколы для культивирования бактериальных клеток, методами отбора проб из шейкера-инкубатора и постоянного культивирования в планшетном ридере;
2. Измерение кривых роста клеток в планшетном ридере упрощает анализ генетических схем;
3. Получены ДНК-конструкции, кодирующие генетические элементы логического вентиля “НЕ” на основе CRISPR/dCas-системы;
4. Нацеливание dCas9-белка на область открытой рамки считывания белка эффективнее нацеливания на промоторную часть, поскольку нацеливание на ОРС приводит к снижению уровня экспрессии репортерного белка (RFP) на 54% по сравнению с контролем, в то время как при нацеливании на промотор - на 47%.

# Благодарности.

Хочу выразить благодарность своим научным руководителям: Мамаевой Наиде Юсуповне и Шайтану Алексею Константиновичу, а также Винникову Ренату за полезные советы, а также помощь в постановке экспериментов. Также хочу поблагодарить Глухова Григория Сергеевича за составление рецензии на данную работу.