

СОЗДАНИЕ ЭКСПРЕССИОННОГО ВЕКТОРА ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНА ВАКУОЛЯРНОЙ ИНВЕРТАЗЫ КАРТОФЕЛЯ СИСТЕМОЙ CRISPR/CAS9

Ахметоллаева А.С.¹ , Манабаева Ш.А.^{1,2*} ¹ Национальный центр биотехнологии, 010000, Казахстан, г. Астана, Кургальжинское шоссе, 13/5² Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, 010000, Казахстан, г. Астана, ул. К. Сатпаева, 2

*manabayeva@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Создание генно-инженерных конструкций для редактирования генома растений требует значительных временных и материальных затрат, а также специализированного оборудования. Особенно важно глубокое понимание функций и эффективности каждого элемента конструкции при создании специализированных векторов для решения конкретных задач. Данная статья подробно рассматривает процесс создания генно-инженерных конструкций для редактирования гена инвертазы, ответственного за холодное осахаривание (CIS) клубней картофеля, начиная от разработки варибельной части направляющей РНК и заканчивая сборкой готового экспрессионного вектора для трансформации клеток картофеля. Для этого был проведен анализ нуклеотидных последовательностей гена инвертазы отечественных сортов картофеля, в сравнении с данными из базы NCBI, определены оптимальные мишени для редактирования гена с помощью технологии CRISPR/Cas9 и описан процесс клонирования двух экспрессионных векторов для геномного мультиплексного редактирования. Полученные экспрессионные векторы позволяют осуществить нокаут гена кислой вакуолярной инвертазы картофеля *VInv/Pain-1*. Учитывая, что уровень экспрессии Cas9 является ключевым фактором эффективности редактирования генома, был создан второй экспрессионный вектор с геном супрессора *p19* вируса кустистой карликовости томатов для усиления экспрессии данного гена и эффективности редактирования.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, гидРНК, осахаривание клубней, ген вакуолярной инвертазы картофеля, экспрессионный вектор.

ВВЕДЕНИЕ

Система CRISPR/Cas9 на сегодняшний день считается наиболее эффективным и быстрым методом геномного редактирования. Эта система, изначально обнаруженная в бактериях как часть их противовирусной адаптивной иммунной защиты, была переосмыслена и превращена в мощный инструмент для редактирования генов растений [1-5]. Применение CRISPR/Cas9 в геномном редактировании привело к значительным достижениям, включая область растениеводства, где создаются сельскохозяйственные культуры, обладающие устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессам, а также демонстрирующие повышенную урожайность [6-8].

Система CRISPR (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats), в частности CRISPR/Cas9 типа II, которая включает шесть известных типов, является одной из наиболее изученных была изначально обнаружена в *Streptococcus pyogenes*. Уникальность нуклеазы Cas9 заключается в том, что ее мишенью может стать почти любая последовательность в геноме, на которую ее запрограммируют. Она обладает высокой сайт специфичной активностью [9-11].

CRISPR/Cas9 состоит из двух основных компонентов: CRISPR ассоциированного белка Cas9 с эндонуклеазной активностью и направляющей РНК или гидовой РНК (single guide RNA – sgРНК). В клетке они формируют бинарный комплекс, который сканирует геном в поисках целевой последовательности в ДНК для ее расщепления. Известно, что белок Cas9 не активен в отсутствие гидРНК [12].

Белок Cas9 состоит из шести белковых доменов, два из которых (RuvC и HNH) обеспечивают активность рас-

щепления двуцепочечной ДНК. Модификация этих доменов может изменить функции белка Cas9, расширяя его потенциал в генной инженерии. ГидРНК длиной от 90 до 200 нуклеотидов, имеет два участка: консервативный участок или транс-активирующая РНК (тракрРНК) и варибельный участок РНК, включающая спейсер из CRISPR-кассеты (крРНК). ТракрРНК, обеспечивает связь всего комплекса с белком Cas9, в то время как крРНК направляет комплекс к целевой последовательности (протоспейсер) в геноме. Для распознавания целевой последовательности ДНК необходим мотив PAM (protospacer adjacent motif), который располагается рядом с протоспейсером в геноме. В системе CRISPR типа II из *St. pyogenes* этот мотив имеет последовательность 5'-NGG (где N – любой из четырех нуклеотидов: А, Т, G, С). При наличии мотива PAM и протоспейсера, эндонуклеаза Cas9 производит разрыв в ДНК.

Система CRISPR/Cas9 может быть нацелена практически на любую интересующую мишень в непосредственной близости от последовательности PAM путем изменения 20-нуклеотидной направляющей спейсерной последовательности варибельной части гидРНК. После разрыва цепей ДНК, клеточные механизмы защиты восстанавливают целостность ДНК. Разрывы в последовательности ДНК репарируются двумя способами: репарацией по типу NHEJ (non-homologous end joining) или HDR (homology-directed repair). Первый тип репарации, основанный на механизме NHEJ, обычно приводит к случайным делециям и инсерциям (инделлам) в месте двуцепочечного разрыва, что часто ведет к полной инактивации гена. В случае репарации по типу HDR, используется донорская последовательность для восстановления целостности ДНК или внесения изменений в ген [13, 14].

Недавно разработанные методы в геномной инженерии позволяют вносить точные правки в целевые сайты без формирования двуцепочечных разрывов и использования донорской ДНК. Эти методы были успешно применены к нескольким видам растений, показав многообещающие результаты [10, 15].

В дополнение к белку Cas9, Cas12a/Cpf1 также широко используется для редактирования растений. Cas12a/Cpf1 обладает уникальным механизмом и высокой специфичностью, что уменьшает побочные эффекты. Кроме того, он способен образовывать липкие концы, что упрощает коррекцию HDR и приводит к более точному редактированию. Используя эти методы, исследователи могут выявить функцию гена, улучшить свойства растений, повысить их устойчивость к вредителям и болезням, а также адаптировать их к различным стрессовым условиям [16-18].

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является одной из важнейших пищевых и технических культур, потребляемых во всем мире. Картофель также относится к ценным кормовым видам, содержащим много крахмала, белка, витаминов и каротиноидов. Большинство сортов картофеля имеют тетраплоидный набор хромосом.

Хранение картофеля в холодильных камерах при низких температурах помогает сохранить клубни на длительный период времени, предотвращая прорастание и болезни. Однако, при снижении температуры до 2-4°C, происходит холодное осахаривание клубней, что может привести к образованию канцерогенного акриламида при их приготовлении. Растительные вакуолярные инвертазы, принадлежащие к семейству гликозил-гидролаз, являются

ключевыми ферментами в метаболизме сахара в растениях. Они гидролизуют сахарозу на глюкозу и фруктозу. Кислая вакуолярная инвертаза картофеля кодируется геном *VInv/Pain-1* [19, 20].

Данная статья подробно рассматривает процесс создания генно-инженерных конструкций для редактирования гена инвертазы, ответственного за холодное осахаривание клубней картофеля, начиная от разработки варибельной части направляющей РНК и заканчивая сборкой готового экспрессионного вектора для трансформации клеток картофеля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

- Получение последовательности гена *VInv/Pain-1*
- Клубни и микроклубни картофеля сорта Аксор
- Набор для синтеза кДНК на матрице РНК SuperScript II (Invitrogen)
- Pfu DNA полимеразы (Thermo Fisher Scientific)
- Конструирование вектора pMR+3T
- Промежуточные векторы для клонирования pEn-Chimera: pMR203, pMR204, pMR205
- pMR284_pYUCas9Plus с селективирующим геном устойчивости к PPT (Phosphinothricin)
- Олигонуклеотидные праймеры (см. Таблицу 1)
- Набор DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific)
- Рестриктаза *BbsI* (Thermo Fisher Scientific)

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованных для клонирования и создания экспрессионных векторов

| Название олигонуклеотида | Последовательность олигонуклеотида (5'-3') |
|--------------------------|--|
| 1 | 2 |
| Inver-F (VInv) | ATGGCCACCCAGTACC |
| Inver-R | TTACAAGTCTTGCAAGGGGA |
| Tapret 1 – InvtT1F | ATTGCTAGTCACGTTTCTTATGCG |
| Tapret 1 – InvtT1R | TAACCGCATAAGAAACGTGACTAG |
| Tapret 2 – InvtT2F | ATTGCTGGTTCCTCCACCCGGCAT |
| Tapret 2 – InvtT2R | TAACATGCCGGGTGGAGGAACCAAG |
| Tapret 3 – InvtT3F | ATTGGGACACATCATATAACGGCC |
| Tapret 3 – InvtT3R | TAACGGCCGTTATATGATGTGTCC |
| M13F | GTAAAACGACCGCCAG |
| M13R | CAGGAAACAGCTATGAC |
| Hsp-ter-pMR284 F | ATGATTAAGATAAGGAGCT |
| P19- AgeI F | ACTACCGGTATGGAACGAGCTATACAAGGAAAC |
| P19-BglIII R | TCAAGATCTTCAGACTGAAGAGTCTGTCTTAC |
| PUC19-AgeI-F | GAGGACACGCTGAAATCACCGGTCTCTGTACAAATC |
| PUC19-AgeI-R | GATTTGTACAGAGAGACCGGTGATTCAGCGTGTCTC |
| P19delHindIII-F | ATACGACAGGACGGAAGCGTCACTGCACAGAGTCCCTTG |
| P19delHindIII-R | CAAGGACTCTGTGCAGTGACGCTCCGTCCTGTCTGAT |
| P19-F | ATGGAACGAGCTATACAAGG |
| P19-R | TTACTCGCTTCTTTTTCGA |

- Набор для выделения плазмидной ДНК Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen)
- Набор для лигирования Rapid DNA Dephos&Ligation Kit (Roche)
- Набор для элюции из геля Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen)
- Набор Multisite Gateway клонирования LR Clonase II Plus enzyme (Thermo Fisher Scientific)
- Компетентные клетки *E. coli* штамма XL-blue
- Набор для секвенирования Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystem)
- Клонирование гена p19 вируса ВККТ (вируса кукурузной карликовости томата)
- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific)
- Рестриктазы *AgeI*, *BglII*, *HindIII*, *DpnI*, (Thermo Fisher Scientific)
- Промежуточный бактериальный вектор pUC19
- Последовательность гена *p19* (ВККТ), размером 519 п.н. из вектора p31

Выделение РНК из клубней картофеля проводилось в соответствии с методиками, описанными в работах [21, 22]. Все растворы были приготовлены в предварительно стерилизованной и обработанной 0,1% DEPC (diethyl pугосarbonate) деионизированной воде.

Для проведения реакции обратной транскрипции (ОТ ПЦР) с использованием тотальной РНК применяли набор SuperScriptII согласно протоколу производителя.

Для амплификации фрагмента последовательности гена *VInv/Pain-1* была использована *Pfu* полимеразы в соответствии с инструкцией производителя. В реакционную смесь добавлялись фланкирующие олигонуклеотиды Invert-F (*VInv*) и Invert-R, а также кДНК. Протокол амплификации включал следующие этапы: первая стадия – нагрев до 95°C на протяжении 3 минут, 1 цикл; вторая стадия – 30 циклов с нагревом 95°C 30 секунд, затем охлаждение до 60°C на 40 секунд и наконец нагрев до 72°C на 4 минуты 15 секунд; третья стадия – окончательное выдерживание при 72°C в течение 10 минут, за которой последовало охлаждение до 4°C.

Для получения двуцепочечных олигонуклеотидов (см. Таблицу 1), одноцепочечные олигонуклеотиды разводили до конечной концентрации 100 пМ. Затем прямой и обратный олигонуклеотиды, для отжига комплементарных последовательностей, добавляли по 1 мкл в 1,5 мл пробирку, затем доводили объем до 50 мкл стерильной dH₂O. Далее производилась денатурация при 100°C в течении 5 минут, после чего медленно охлаждали до комнатной температуры.

Рестриктику проводили в минимальном объеме (от 10 до 20 мкл) с использованием рестриктазы согласно инструкции производителя. После этого фрагмент/вектор элюировали из агарозного геля с использованием набора для элюции Quick Gel Extraction Kit.

Лигирование вектора со вставкой проводили в молярном соотношении вставки к вектору 3:1 в соответствии с протоколом производителя. Лигазную смесь инкубиро-

вали при 22°C в течение 16 часов. После, лигазной смесью трансформировали компетентные клетки XL-Blue методом температурного шока.

Секвенирование проводилось по Сэнгеру, с использование набора Big Dye Terminator v.3.1. В реакцию добавлялась очищенная ДНК в количестве, зависящем от размера молекулы ДНК согласно таблице в инструкции производителя. Программа ПЦР секвенирования включала следующие этапы: первый этап – 96°C в течение 1 минуты, 1 цикл; второй этап – 96°C на 10 секунд, 58°C на 5 секунд, 60°C на 4 минуты, 30 циклов; третий этап – 10°C.

Клонирование осуществлялось с использованием набора Gateway LR Clonase II в соответствии с инструкцией производителя. В 1,5 мл пробирке объединяли три входных вектора p203+T1, p204+T2, p205+T3, а также вектор назначения pMR284. Объем реакционной смеси доводили до 8 мкл ТЕ буфером (pH8.0) и охлаждали во льду в течение 2 минут. Затем добавляли 2 мкл ферментативной смеси LR Clonase II enzyme mix, аккуратно перемешивали и инкубировали при 25°C в течение 16 часов. Для инактивации фермента добавляли 1 мкл протеиназы К, затем вортексировали и инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Полученной смесью ко-трансформировали компетентные клетки XL-Blue.

Для проведения сайт направленного мутагенеза выполняли ПЦР амплификацию с использованием *Phusion* полимеразы и разработанных олигонуклеотидов (см. Таблицу 1). Программа ПЦР амплификации включала следующие этапы: 98°C на 30 секунд – 1 цикл; 98°C на 10 секунд, 65°C на 40 секунд, 72°C на 2 минуты – 35 циклов; 72°C на 10 минут, 4°C. Часть смеси наносили на агарозный гель для проверки амплификации вектора. Затем к смеси добавили 0,5 мкл эндонуклеазы *DpnI* (10 U/μL) и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Фермент инактивировали при 80°C в течение 20 минут. Для трансформации брали 5 мкл смеси на 40 мкл компетентных клеток *E. coli* штамма XL-blue.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез нуклеотидной последовательности гена вакуолярной инвертазы картофеля *VInv/Pain-1*

Для активации гена кислой вакуолярной инвертазы *VInv*, клубни предварительно хранили при +4°C в течение 2,5 месяцев. Тотальную РНК выделяли из 300 мг сырой массы клубней картофеля сорта Аксор. Клубни предварительно обрабатывали: промывали, просушивали, измельчали. Количество РНК определяли путем измерения оптической плотности (OD) на ультрафиолетовом спектрофотометре NanoDrop 2000C (Thermo Scientific), США). Качество выделенных препаратов тотальной РНК оценивали электрофорезом в 2% агарозном геле. Для получения кДНК использовали реакцию обратной транскрипции.

Подбор олигонуклеотидных праймеров производился с использованием базы данных NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> и программы Vector NTI advance 11.5. Синтезировали специфичные фланкирующие олигонуклеотиды Inver-F (*VInv*) и Inver-R (см. Таблицу 1). Затем с использованием кДНК амплифицировали кодирующую

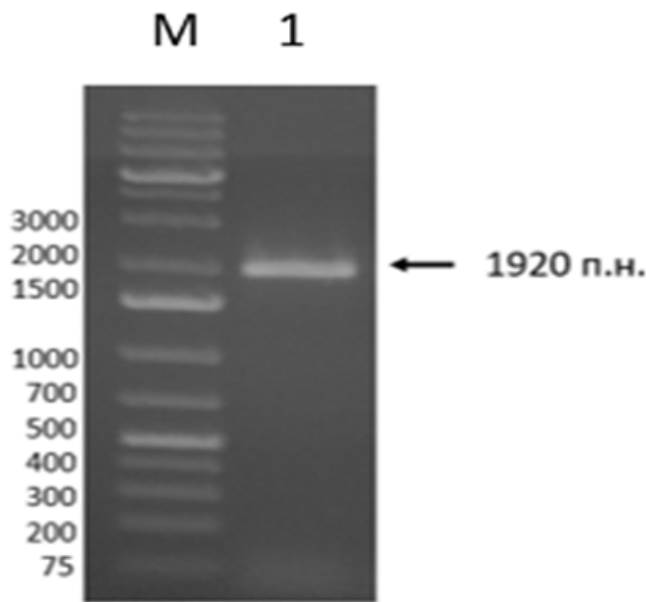


Рисунок 1. Электрофорез продукта ПЦР-амплификации в 1 % агарозном геле.

M - ДНК маркер 1kb plus DNA Ladder; 1- ампликон размером 1920 п.н. полученный с использованием олигонуклеотидов Invert-F (*VInv*) и Invert-R.

последовательность гена вакуолярной инвертазы длиной 1920 п.н., представленную на Рисунке 1. Последовательность была анализировали методом секвенирования.

Выбор целевых мишеней для создания направляющих РНК (гидРНК)

Последовательность гена вакуолярной инвертазы картофеля состоит из 7 экзонов и 6 интронов, общей длиной 6097 п.н. Для редактирования гена анализировали последовательности первых трех экзонов: первый экзон содержит 361 нуклеотид (с 1 по 361 нуклеотид), второй экзон - 9 нуклеотидов (с 362 по 370 нуклеотид), третий экзон - 860 нуклеотидов (с 371 по 1230 нуклеотид).

Последовательность кДНК-гена вакуолярной инвертазы сорта Аккор загружали в биоинформатические ин-

тернет-ресурсы CRISPRdirect и CRISPR-P 2.0 для выбора целевых последовательностей.

Для основного дизайна мишеней использовали биоинформатический интернет-ресурс CRISPRdirect (dbcls.jp) (Рисунок 2), позволяющий анализировать последовательность гена, учитывая такие параметры, как локализацию мишеней, состав G/C, частоту встречаемости и др.

Выбранные последовательности содержат PAM-мотивы, то есть участки NGG, расположенные на 3' конце таргета и имеют длину в 20 нуклеотидов. Первый таргет 5'-STAGTCACGTTTCTTATGCG-3' расположен в первом экзоне, второй 5'-CTGGTTCCTCCACCCGGCAT-3' и третий 5'-GGACACATCATATAACGGCC-3' в третьем экзоне, содержащем сайт рестрикции *HaeIII*. Схема расположения представлена на Рисунке 3.

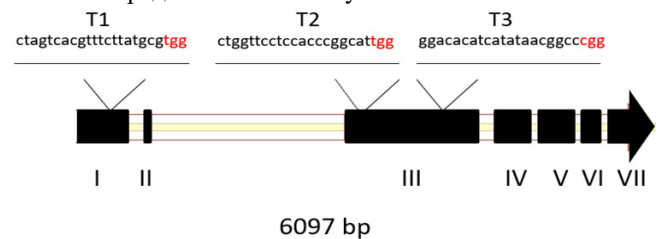


Рисунок 3. Схема последовательности гена *VInv* (GenBank: ID HQ110080.1)

Экзоны (I-VII) обозначены черным цветом, интроны желтым цветом.

Последовательности целевых олигонуклеотидов длиной 24 нуклеотида (20 нуклеотидов и 4 нуклеотида (-ATTG-) – для обеспечения удобства лигирования в вектор) были синтезированы химическим путем. Далее был проведен отжиг одноцепочечных олигонуклеотидов, что привело к получению двуцепочечных целевых последовательностей с липкими концами на 5' и 3' концах. Эти целевые последовательности были подготовлены для последующего лигирования в векторы по сайту *BbsI* [23]. Выбор целевых участков для создания гидРНК проводился, с учетом их расположения на первом и третьем экзонах гена вакуолярной инвертазы картофеля, признаны наиболее подходящими для точной и эффективной редак-

A

| position | target sequence | GC% of 20mer | Tm of 20mer | TTTT in 20mer | restriction sites | 20mer + PAM | 12mer + PAM | 8mer + PAM |
|----------|---------------------|--------------|-------------|---------------|-------------------|-------------|-------------|------------|
| 311-333 | ctggttcctccaccggcat | 55.00% | 72.99 °C | - | EaeI | [detail] | [detail] | [detail] |

B

| position | target sequence | GC% of 20mer | Tm of 20mer | TTTT in 20mer | restriction sites | 20mer + PAM | 12mer + PAM | 8mer + PAM |
|----------|---------------------|--------------|-------------|---------------|-------------------|-------------|-------------|------------|
| 675-697 | ctggttcctccaccggcat | 55.00% | 72.99 °C | - | EaeI | [detail] | [detail] | [detail] |

Рисунок 2. Биоинформатический поиск мишеней для нокаута гена *VInv* с использованием CRISPRdirect (dbcls.jp)

A, B – Общее количество 20-ти нуклеотидных последовательностей мишеней- 235, из них высокоспецифичных- 51. Стрелками указаны выбранные таргеты (T1, T2, T3).

ции гена.

Подготовка промежуточных векторов pMR203, pMR204 и pMR205 с гидРНК, содержащей 20-ти нуклеотидные таргетные последовательности

Вектора pMR203, pMR204, и pMR205 были любезно предоставлены Dr. Puchta (Germany). Эти векторы являются промежуточными векторами, предназначенными для клонирования в экспрессионный бинарный вектор pMR284 с помощью технологии Gateway LR Clonase II.

На Рисунке 4 представлена схема вектора pMR203, включающего регуляторные последовательности, необходимые для трансформации в бактериальных клетках, а также маркерный ген, обеспечивающий устойчивости к канамицину. В составе вектора имеется кассета с последовательностью гидРНК, которая фланкирована сайтами -att. Аналогичный состав имеют также векторы pMR204 и pMR205, отличающиеся между собой последовательностями сайтов -att.

Известно, что гидРНК вводится в клетку с помощью плазмидных векторов под соответствующими промоторами. В данной конструкции для экспрессии гидРНК используется промотор U6 *Arabidopsis thaliana* (*AtU6*). Промотор U6 для PolIII контролирует транскрипцию в клетках двудольных растений и считается достаточно высоко продуктивным и используется при редактировании растений и обладает высокой транскрипционной активностью [24]. Данный промотор обеспечивает транскрипцию гидРНК в клетках, когда она вводится с помощью плазмидных векторов. Использование промотора *AtU6* обеспечивает эффективную и стабильную экспрессию гидРНК, что важно для успешного выполнения генного редактирования.

Для сборки таргетных последовательностей в векторах была использована эндонуклеаза *BbsI*, распознающая последовательность из 6 нуклеотидов (GAAGAC) и образующая липкие концы для эффективного лигирования и правильного встраивания гибридного ду-

плексного олигомера ДНК длиной 24 нуклеотида. Аналогично в подобном клонировании применяется рестриктаза *AarI*, распознающая последовательность из 7 нуклеотидов (CACCTGC) и образующая липкие концы для эффективного встраивания в вектор [25].

После рестрикции, векторы были элюированы из 1% агарозного геля, получили линейаризованные промежуточные векторы. Таргетные последовательности, такие как T1, были лигированы между *AtU6* промотором и 5' концом консервативного участка направляющей РНК используя сайты *BbsI* в вектор pMR203. Процесс клонирования T1 в вектор pMR203, был повторен для создания промежуточных векторов pMR204 с таргетом T2 и pMR205 с таргетом T3.

Скрининг клеточных колоний был проведен после этапа клонирования. На Рисунке 5 представлены результаты ПЦР. Ожидаемый размер ампликона составлял 369 п.н.

Вставки секвенировали для проверки правильной сборки последовательностей, что отображено на Рисунке 6.

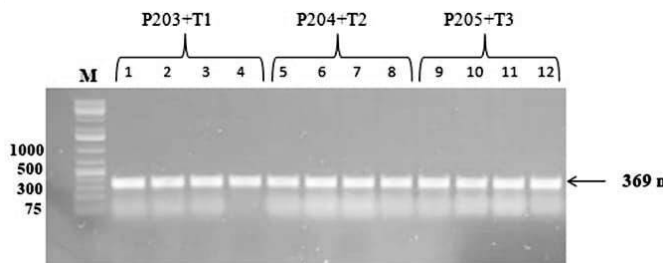


Рисунок 5. Результат ПЦР скрининга клонов в 1% агарозном геле полученных векторов pMR203, pMR204 и pMR205

Дорожки (слева направо): М - маркер 1kb plus DNA Ladder, дорожки 1 – 4 – ампликоны на таргет T1 в векторе p203+T1, дорожки 5 – 8 – ампликоны на таргет T2 в векторе p204+T2, дорожки 9 – 12 – ампликоны на таргет T3 в векторе p205+T3.

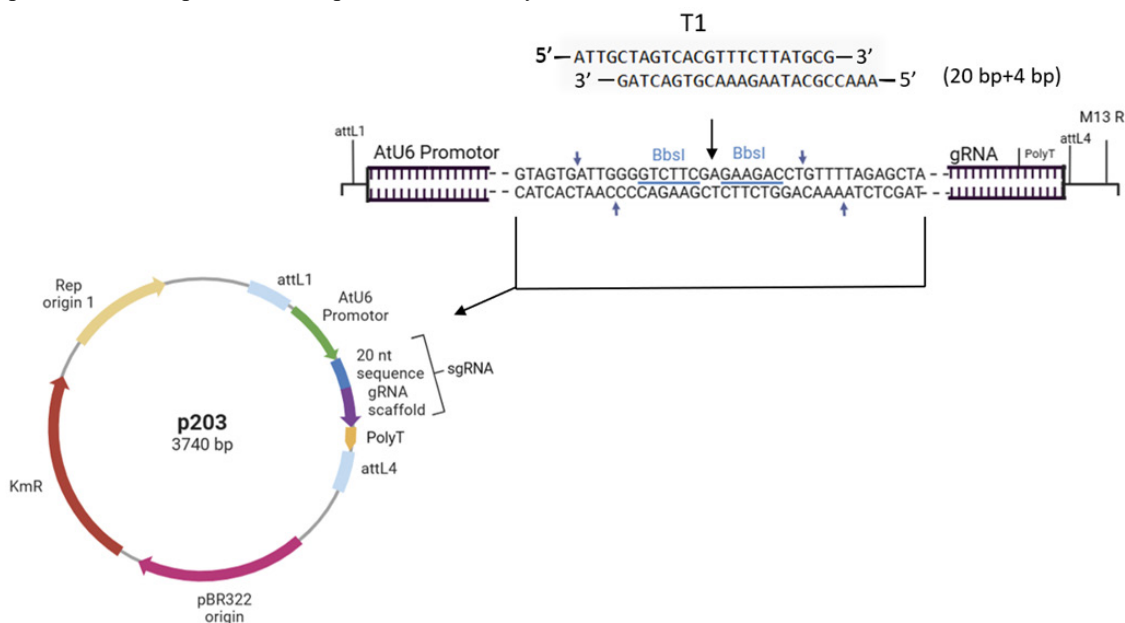


Рисунок 4. Схема конструирования промежуточного вектора pMR203

Таргет T1 лигирован по сайтам эндонуклеазы *BbsI* (обозначен голубым цветом) между промотором *AtU6* и неварианбельной последовательностью гидРНК.

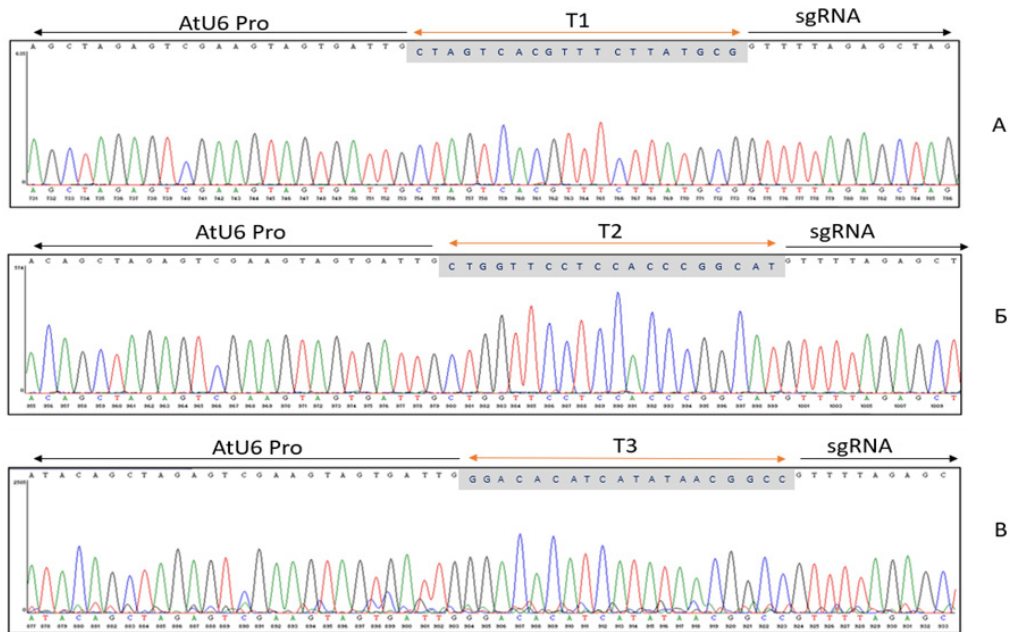


Рисунок 6. Верификация результатов секвенирования промежуточных векторов. Черными стрелками обозначены части последовательности AtU6Pro с 3'-конца и части последовательности гидРНК с 5'-конца. Таргетная последовательность обозначена красной стрелкой. А – вектор p203+T1; Б – вектор p204+T2; В – вектор p205+T3.

В результате были собраны три промежуточных вектора с кассетами для общей сборки клонирования в экспрессионный вектор pMR284, содержащий последовательность гена эндонуклеазы Cas9.

Клонирование целевых последовательностей из промежуточных векторов в экспрессионный вектор pMR284 с помощью технологии Gateway LR Clonase II

Технология Gateway является универсальным методом клонирования, который основан на специфических рекомбинационных свойствах бактериофага лямбда, обеспечивающие эффективное перемещение последовательностей ДНК в векторные системы. При создании вектора с помощью ферментативной смеси LR Clonase II происходит перенос одного фрагмента ДНК из одного вектора-донора в вектор назначения. Данные векторы содержат разноименные гомологичные участки ДНК бактериофага лямбда attL и attR, способные рекомбинировать друг с другом под действием ферментов LR Clonase II. Этот фермент пред-

ставляет собой смесь интегразы и эксцизионазы бактериофага лямбда, а также белка Integration Host Factor, кодируемый бактерией *E. coli*.

Бинарный экспрессионный вектор pMR284, любезно предоставленный профессором Токи из Института агробиологических наук в Японии, имеет размер 15 567 п.н. Данный вектор используется для трансформации растительных клеток и может реплицироваться как в клетках *E. coli*, так и в *A. tumefaciens*. В векторе присутствуют последовательности сайтов -att, необходимые для использования технологии Gateway. Для отбора трансформированных растительных клеток вектор содержит селективный маркерный ген PPT, который обеспечивает устойчивость фосфинотрицину, а также ген устойчивости к спектиномицину, обеспечивающие отбор клонов. Последовательность гена Cas9 размером 4140 п.н., расположена в Т-области экспрессионного вектора под регуляторными последовательностями убиквитинового промотора (Ubi)

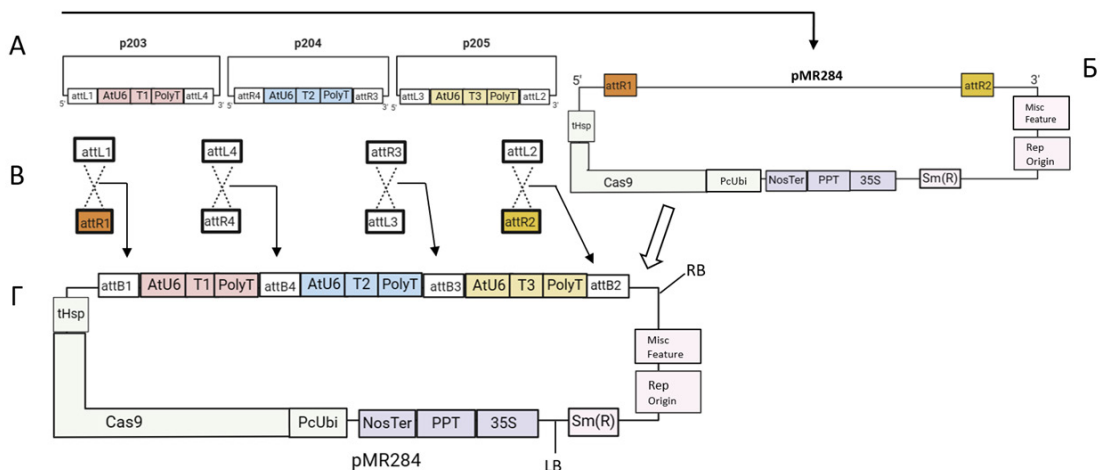


Рисунок 7. Схема сборки экспрессионного вектора pMR284(3T)

А- показаны промежуточные векторы p203+T1, p204+T2, p205+T3 с кассетами и расположением сайтов attL/attR; Б- экспрессионный вектор-акцептор pMR284 с сайтами attR1/attR2; В- показана рекомбинация сайтов -att между векторами; Г- схема конечной сборки экспрессионного вектора pMR284 с встроенными кассетами.

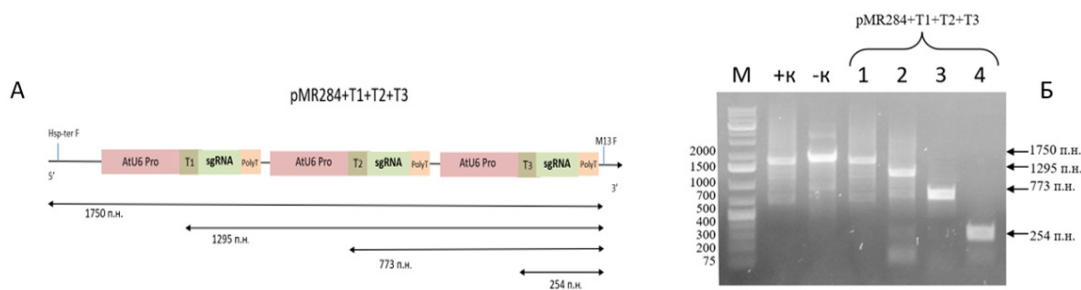


Рисунок 8. Схема предварительного анализа клона pMR284(3T)

А – схема клонированного вектора pMR284 с тремя таргетами. Внизу стрелками указаны ожидаемые размеры ПЦР ампликонов. Б – Электрофореграмма продуктов ПЦР: М – маркер 1kb plus DNA; +К – ампликон размером 1750 п.н., положительный контроль; -К – ампликон 1880 п.н., отрицательный контроль с нативной плазмиды pMR284, полученный олигонуклеотидами Hsp-ter F и M13F; Дорожки 1-4 представляют скрининг-анализ полученного клона pMR284: 1 – ампликон длиной 1750 п.н. полученный Hsp-ter F и M13F; 2 – ампликон длиной 1295 п.н. полученный олигонуклеотидами T1 и M13F; 3 – ампликон длиной 773 п.н. полученный олигонуклеотидами T2 и M13F; 4 – ампликон длиной 254 п.н. полученный олигонуклеотидами T3 и M13F.

Arabidopsis thaliana и терминатора гена Hsp (heat shock protein) *Petroselinum crispum*.

Для проведения реакции клонирования векторов набором Gateway LR Clonase II, объединяли экспрессионный вектор акцептор pMR284 и промежуточные векторы-доноры p203+T1, p204+T2, p205+T3. Промежуточные векторы содержат кассеты фланкированные последовательностями для без лигазного клонирования: p203+T1 с сайтами attL1/attL4, p204+T2 с сайтами attR4/attR3, p205+T3 с сайтами attL3/attL2, как показано на Рисунке 7.

Правильность сборки кассет в векторе назначения была предварительно проверена с использованием метода ПЦР с олигонуклеотидами, как показано на Рисунке 8.

Размеры были рассчитаны на основе схем векторов с использованием программы Vector NTI advance 11.5. Для проверки правильности сборки бинарного вектора pMR284(3T) было проведено секвенирование.

Мультиплексные редакторы генов позволяют одновременно воздействовать на несколько областей одного и того же гена, что способствует увеличению шансов ре-

дактирования. Это приводит к проявлению разнообразных типов мутаций и различной степени их проявления [26-28].

Клонирование в экспрессионный вектор pMR284(3T) последовательность супрессорного гена p19 вируса кустистой карликовости томатов (ВККТ)

Для клонирования последовательности супрессорного гена *p19* (размер 519 п.н.) ВККТ, мы ставили задачу интегрировать его последовательность в экспрессионный вектор pMR284(3T). Ген *p19* позволяет вирусу активно заражать растения и характеризуется исключением противовирусных механизмов в клетках растений. При ко-экспрессии данный ген усиливает экспрессию близлежащих генов [29, 30]. Для усиления экспрессии CRISPR кассеты заменили последовательность маркерного гена PPT на последовательность гена *p19* в векторе pMR284(3T). Последовательность гена PPT имеет размер 552 п.н. и находится под контролем сильного конститутивного промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV) и терминатора NOS.

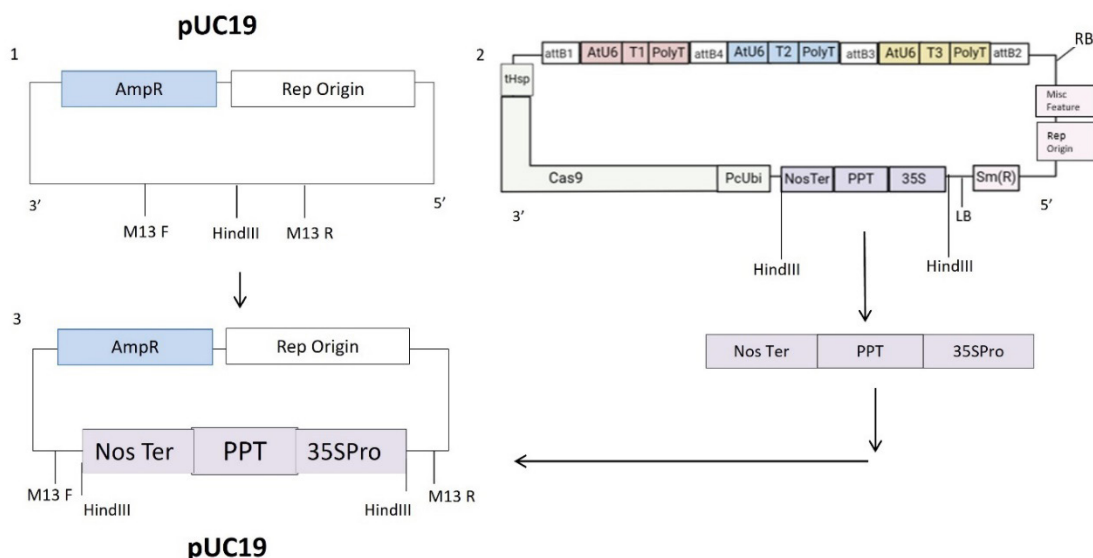


Рисунок 9А. Схема получения pUC19+35SPro+PPT+NOSTer.

1-Рестрикция вектора pUC19 эндонуклеазой HindIII; 2- Рестрикция вектора pMR284(3T) для получения кассеты -35SPro+PPT+NOSTer-; 3- Клонирование кассеты -35SPro+PPT+NOSTer- в вектор pUC19

Для этого, из ранее полученного бинарного вектора pMR284(3T) была вырезана кассета -35SPro+PPT+NOSTer- по сайтам рестрикции *Hind*III, как представлено на Рисунке 9А. Затем данная кассета была лигирована в заранее подготовленную линейаризованную плазмиду pUC19 по тем же сайтам рестрикции (*Hind*III), в полилинкерную область.

Далее, из полученного вектора pUC19+35SPro+PPT+NOSTer был удален ген PPT используя эндонуклеазу *Bgl*III по сайтам рестрикции. Полученные клоны вектора pUC19+35SPro+NOSTer были подвергнуты анализу с помощью секвенирования.

Для последующего клонирования был проведен сайт-направленный мутагенез с использованием олигонуклеотидов PUC19-AgeI-F / PUC19-AgeI-R (см. Таблицу 1) для создания сайта рестрикции *Age*I, необходимый для последующих шагов клонирования. В результате замены аденина на гуанин в позиции 13 нуклеотида был сгенерирован сайт рестрикции *Age*I, указанный на Рисунке 9Б. Полученные клоны были подвергнуты анализу с помощью секвенирования с применением праймера M13R.

После этого была выполнена рестрикция вектора по сайтам рестрикции *Age*I и *Bgl*III. Это привело к получению линейной плазмиды с липкими концами на 5'-конце сайта *Age*I и на 3'-конце сайта *Bgl*III, соответственно.

Далее для подготовки гена *p19* к клонированию в плазмиду pUC19+35SPro+NOSTer, мы использовали плазмиду p31, содержащую последовательности генов ВККТ. Ген *p19* был амплифицирован с помощью олигонуклеотидов P19-AgeIF/P19-BglIIR (см. Таблицу 1) и гидролизо-

ван эндонуклеазами рестрикции *Age*I и *Bgl*III с образованием липких концов.

Затем провели лигирование вектора pUC19+35SPro+NOSTer с геном *p19*, в результате чего была получена плазида pUC19+35SPro+p19+NOSTer. Схема данного процесса представлена на Рисунке 9В.

Полученный вектор pUC19+35SPro+p19+NOSTer был анализирован с помощью секвенирования. В дальнейшем планировалось переклонировать кассету -35SPro+p19+NOSTer- в вектор pMR284(3T) по сайту *Hind*III.

Для переноса по сайтам *Hind*III, необходимо было провести сайт направленный мутагенез для удаления сайта рестрикции *Hind*III из внутренней последовательности гена *p19*. Для этого в положении 243 нуклеотида по-

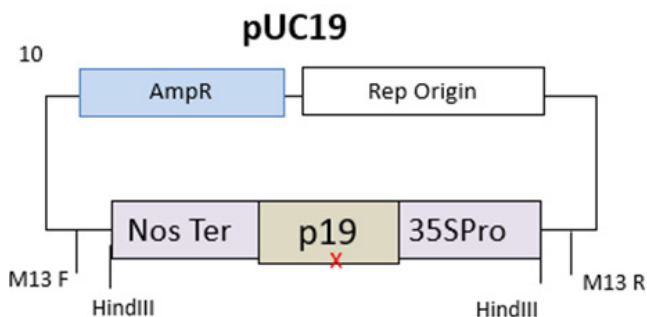


Рисунок 9Г. 10 – Точечная замена нуклеотида в последовательности гена *p19* для удаления сайта рестрикции *Hind*III. Верификация результатов секвенирования вектора pUC19.

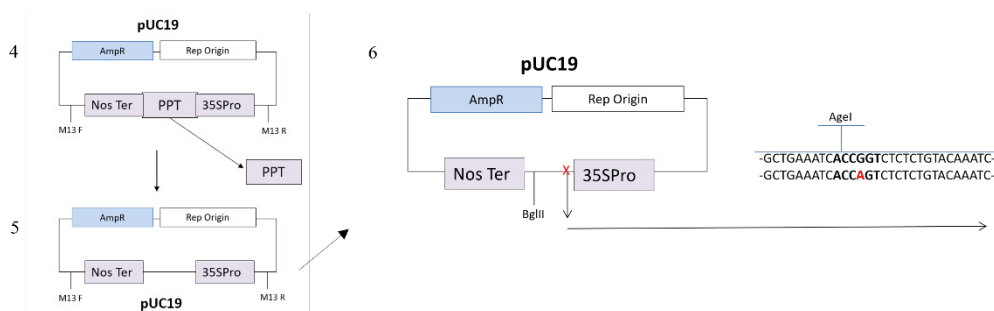


Рисунок 9Б. Этапы создания сайта рестрикции *Age*I в векторе pUC19.

4-5 – Удаление гена PPT; 6 – Иллюстрация сайт направленного мутагенеза.

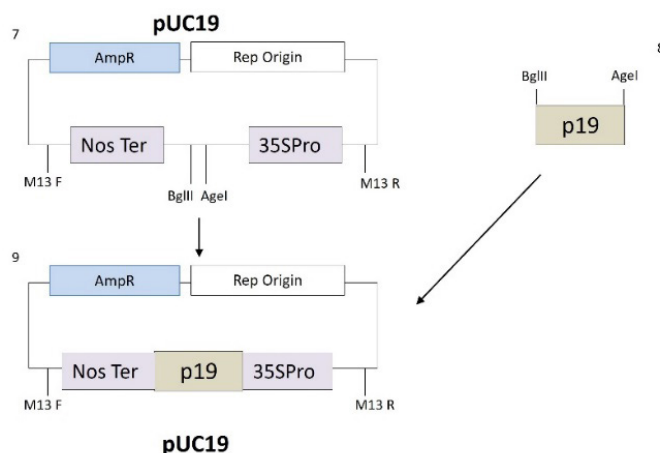


Рисунок 9В. 7-9 – Схемы получения вектора pUC19+35SPro+p19+NOSTer

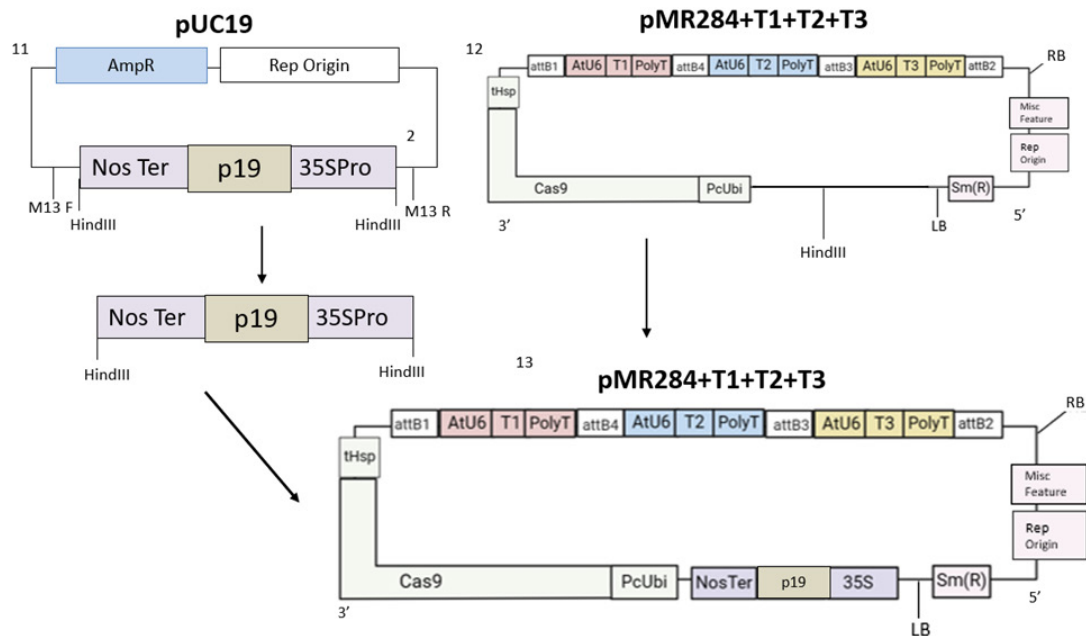


Рисунок 9Д. 11-13 – Схема переноса кассеты -35SPro+p19+NOSTer- по сайтам рестрикции *HindIII* в вектор pMR284(3T) представлена в трех этапах

следовательности гена *p19*, в триplete аминокислоты аланина, нуклеотид тимин был заменен на гуанин, при этом не изменяя аминокислотную последовательность белка *p19*. Для проведения ПЦР амплификации использовались олигонуклеотиды P19delHindIII-F/P19delHindIII-R (см. Таблицу 1). Полученный продукт анализировали с помощью секвенирования, результаты представлены на Рисунке 9Г.

Из плазмиды pUC19+35SPro+p19+NOSTer была вырезана кассета -35SPro+p19+NOSTer- и лигирована в вектор pMR284(3T). В результате получили вектор pMR284(3T)+p19. Последовательность вектора была подвергнута секвенированию. Данный процесс изображен на Рисунке 9Д.

Таким образом, будет осуществлено редактирование гена картофеля, стимулирующий накопление редуцирующих сахаров в клубнях картофеля при действии низких температур с получением мутантных линий растений-регенерантов.

В настоящее время достаточно много работ показавшие роль вакуолярной инвертазы в холодом осахаривании у картофеля, катализирующая необратимый гидролиз сахарозы. Подобные работы по подавлению функции гена вакуолярной инвертазы *VInv* уже проводились, например с помощью РНК-интерференции, искусственных нуклеаз TALEN, а также с помощью CRISPR/Cas9.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Достижения в области селекции растений с использованием технологий редактирования генома CRISPR/Cas играют ключевую роль в обеспечении продовольственной безопасности в будущем. Методы редактирования генома в сельском хозяйстве позволяют создавать новые сорта, более устойчивые к стрессам и болезням, что способствует устойчивому увеличению производства продуктов питания и помогает справиться с вызовами, стоящими перед сельским хозяйством.

В статье описан процесс создания генно-инженерных конструкций для редактирования гена инвертазы, ответственного за холодное осахаривание клубней картофеля, начиная от разработки вариативной части направляющей РНК и заканчивая сборкой готового экспрессионного вектора для трансформации клеток картофеля. Были выбраны три целевые последовательности для создания гидовых РНК и их клонирования в промежуточные вектора. Успешно создан бинарный вектор pMR284(3T) с тремя кассетами, содержащими направляющие РНК, используя технологию Gateway. Для изучения влияния гена супрессора *p19* на результативность редактирования генома с помощью CRISPR/Cas9, данный ген был клонирован в экспрессионный бинарный вектор, создав конструкцию pMR284(3T)+*p19*. Полученными экспрессионными векторами планируем трансформировать клетки штаммов *A. tumefaciens* AGLO. Затем инокулируем листовые и каллусные картофельные экспланты до получения трансформированных линий. Проведем анализ на определение типов мутаций в растениях с помощью секвенирования. Клубни отобранных линий растений будем анализировать на накопление редуцирующих сахаров и акриламида.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан в рамках грантового финансирования ИРН AP23490126 «Разработка и оптимизация элементов системы CRISPR/Cas9 для изучения механизмов засухоустойчивости картофеля» на 2024-2026 годы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tussipkan D., Manabayeva S. A. Employing CRISPR/Cas technology for the improvement of potato and other tuber crops // *Frontiers in plant science*. – 2021. – 12:747476. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.747476>.

2. Ahmad M. Plant breeding advancements with

- «CRISPR-Cas» genome editing technologies will assist future food security // *Frontiers in plant science*. – 2023. – 14, 1133036. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1133036>.
3. Aljabali A.A., El-Tanani M., Tambuwala M. M. Principles of CRISPR-Cas9 technology: Advancements in genome editing and emerging trends in drug delivery // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2024. – vol. 92: 105338. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105338>.
4. Anzalone A. V., Koblan L. W., Liu D. R. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors // *Nature biotechnology*. – 2020. – 38(7):824-844. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0561-9>.
5. Cardi T., Murovec J., Bakhsh A., Boniecka J., Bruegmann T., Bull S. E., Eeckhaut T., Fladung M., Galovic V., Linkiewicz A., Lukan T., Mafra I., Michalski K., Kavas M., Nocolia A., Nowakowska J., Sági L., Sarmiento C., Yıldırım K., Zlatković M., Hensel G., Van Laere K. CRISPR/Cas-mediated plant genome editing: outstanding challenges a decade after implementation // *Trends Plant Sci*. – 2023. – 28, 1144–1165. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.05.012>.
6. Zeng, Y., Wen, J., Zhao, W., Wang, Q., & Huang, W. Rational Improvement of Rice Yield and Cold Tolerance by Editing the Three Genes OsPIN5b, GS3, and OsMYB30 With the CRISPR-Cas9 System // *Frontiers in plant science*. – 2020. – 10, 1663. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01663>.
7. Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., & Qiu, J. L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew // *Nature biotechnology*. – 2014. – 32(9), 947–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.2969>.
8. Tiwari, J. K., A, J., Tuteja, N., & Khurana, S. M. P. Genome editing (CRISPR-Cas)-mediated virus resistance in potato (*Solanum tuberosum* L.) // *Molecular biology reports*. – 2022. – 49(12), 12109–12119. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07704-7>.
9. Hillary, V. E., & Ceasar, S. A. A Review on the Mechanism and Applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 Proteins Utilized for Genome Engineering // *Molecular biotechnology*. – 2023. – 65(3), 311–325. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00567-0>.
10. Hua, K., Han, P., & Zhu, J. K. Improvement of base editors and prime editors advances precision genome engineering in plants // *Plant physiology*. – 2022. – 188(4), 1795–1810. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab591>.
11. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nature protocols*. – 2013. – 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>.
12. 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. – №20(6). – С.930-944. <https://doi.org/10.18699/VJ16.214>.
13. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering // *Cell*. – 2014. – 157(6):1262-1278. doi:10.1016/j.cell.2014.05.010.
14. Erdoğan, İ., Cevher-Keskin, B., Bilir, Ö., Hong, Y., & Tör, M. Recent Developments in CRISPR/Cas9 Genome-Editing Technology Related to Plant Disease Resistance and Abiotic Stress Tolerance // *Biology*. – 2023. – 12(7), 1037. <https://doi.org/10.3390/biology12071037>.
15. Koblan LW, Doman JL, Wilson C, et al. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction // *Nat Biotechnol*. – 2018. – 36(9):843-846. <https://doi.org/10.1038/nbt.4172>.
16. Movahedi A, Aghaei-Dargiri S, Li H, Zhuge Q, Sun W. CRISPR Variants for Gene Editing in Plants: Biosafety Risks and Future Directions // *Int J Mol Sci*. – 2023. – 24(22):16241. Published 2023 Nov 13. <https://doi.org/10.3390/ijms242216241>.
17. Геращенко, Г. А., Рожнова, Н. А., Кулуев, Б. Р., Кирьянова, О. Ю., Гумерова, Г. Р., Князев, А. В., Вершинина, З. Р., Михайлова, Е. В., Чемерис, Д. А., Матниязов, Р. Т., Баймиев, А. К., Губайдуллин, И. М., Баймиев, А. К., Чемерис, А. В. // *Молекулярная биология*. – 2020. – 54(1), 29–50. <https://doi.org/10.31857/S0026898420010061>.
18. Capdeville, N., Schindele, P., & Puchta, H. Getting better all the time - recent progress in the development of CRISPR/Cas-based tools for plant genome engineering // *Current opinion in biotechnology*, 2023, 79, 102854. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102854>.
19. Zhu X, Richael C, Chamberlain P, Busse JS, Bussan AJ, et al. Vacuolar Invertase Gene Silencing in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Improves Processing Quality by Decreasing the Frequency of Sugar-End Defects // *PLOS ONE*. – 2014. – 9(4): e93381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093381>.
20. Draffehn, A.M., Meller, S., Li, L. et al. Natural diversity of potato (*Solanum tuberosum*) invertases // *BMC Plant Biol*. – 2010. – 10, 271. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-271>.
21. Kumar, G. N., Iyer, S., & Knowles, N. R. Extraction of RNA from fresh, frozen, and lyophilized tuber and root tissues // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2007. – 55(5), 1674–1678. <https://doi.org/10.1021/jf062941m>.
22. Vennapusa, A. R., Somayanda, I. M., Doherty, C. J., & Jagadish, S. V. K. A universal method for high-quality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber // *Scientific reports*. – 2020. – 10(1), 16887. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73958-5>.
23. Nadakuduti, S. S., Starker, C. G., Voytas, D. F., Buell, C. R., & Douches, D. S. Genome Editing in Potato with CRISPR/Cas9 // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. – 2019. – 1917, 183–201. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8991-1_14.
24. Kor S. D., Chowdhury N., Keot A. K., Yogendra K., Chikkaputtaiah C., Sudhakar Reddy P. RNA Pol III promoters-key players in precisely targeted plant genome editing // *Front Genet*. – 2023. – 4;13:989199. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.989199>.
25. Рожнова Н.А., Геращенко Г.А., Чемерис А.В. Создание экспрессионного вектора для геномного редактирования гена eds1 // *Биомика*. – 2019. – Т.11., №.4 – С. 422-429. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2019-35>.
26. Abeuova L., Kali B., Tussipkan D., Akhmetollayeva A., Ramankulov Y., Manabayeva S. CRISPR/Cas9-mediated multiple guide RNA-targeted mutagenesis in the potato //

Transgenic Res. – 2023. – 32(5):383-397. <https://doi.org/10.1007/s11248-023-00356-8>.

27. Wu S., Kyaw H., Tong Z., Yang Y., Wang Z., Zhang L., Deng L., Zhang Z., Xiao B., Quick W. P., Lu T., Xiao G., Qin G., Cui X. a. A simple and efficient CRISPR/Cas9 system permits ultra-multiplex genome editing in plants // *The Crop Journal*. – 2024. – 10.1016/j.cj.2024.01.010. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2024.01.010>.

28. Ursache, R., Fujita, S., Dénervaud Tendon, V., & Geldner, N. Combined fluorescent seed selection and multiplex CRISPR/Cas9 assembly for fast generation of multiple Arabidopsis mutants. *Plant methods*. – 2021. – 17(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00811-9>.

29. Gao S. J., Damaj M. B., Park J. W., Beyene G., Buenrostro-Nava M. T., Molina J., Wang X., Ciomperlik J. J., Manabayeva S. A., Alvarado V. Y., Rathore K. S., Scholthof H. B., & Mirkov T. E. Enhanced transgene expression in sugarcane by co-expression of virus-encoded RNA silencing suppressors // *PLoS One*. – 2013. – 14; 8(6):e66046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066046>.

30. Arzola, L., Chen, J., Rattanaporn, K., Maclean, J. M., & McDonald, K. A. Transient co-expression of post-transcriptional gene silencing suppressors for increased in planta expression of a recombinant anthrax receptor fusion protein // *International journal of molecular sciences*. – 2011. – 12(8): p. 4975–4990. <https://doi.org/10.3390/ijms12084975>.

REFERENCES

1. Tussipkan D., Manabayeva S. A. Employing CRISPR/Cas technology for the improvement of potato and other tuber crops // *Frontiers in plant science*. – 2021. – 12:747476. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.747476>.

2. Ahmad M. Plant breeding advancements with «CRISPR-Cas» genome editing technologies will assist future food security // *Frontiers in plant science*. – 2023. – 14, 1133036. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1133036>.

3. Aljabali A.A., El-Tanani M., Tambuwala M. M. Principles of CRISPR-Cas9 technology: Advancements in genome editing and emerging trends in drug delivery // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2024. – vol. 92: 105338. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105338>.

4. Anzalone A. V., Koblan L. W., Liu D. R. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors // *Nature biotechnology*. – 2020. – 38(7):824–844. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0561-9>.

5. Cardi T., Murovec J., Bakhsh A., Boniecka J., Bruegmann T., Bull S. E., Eeckhaut T., Fladung M., Galovic V., Linkiewicz A., Lukan T., Mafra I., Michalski K., Kavasa M., Nicolia A., Nowakowska J., Sági L., Sarmiento C., Yıldırım K., Zlatković M., Hensel G., Van Laere K. CRISPR/Cas-mediated plant genome editing: outstanding challenges a decade after implementation // *Trends Plant Sci*. – 2023. – 28, 1144–1165. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.05.012>.

6. Zeng, Y., Wen, J., Zhao, W., Wang, Q., & Huang, W. Rational Improvement of Rice Yield and Cold Tolerance by Editing the Three Genes OsPIN5b, GS3, and OsMYB30 With the CRISPR-Cas9 System // *Frontiers in plant science*. – 2020. – 10, 1663. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01663>.

7. Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., & Qiu, J. L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew // *Nature biotechnology*. – 2014. – 32(9), 947–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.2969>.

8. Tiwari, J. K., A, J., Tuteja, N., & Khurana, S. M. P. Genome editing (CRISPR-Cas)-mediated virus resistance in potato (*Solanum tuberosum* L.) // *Molecular biology reports*. – 2022. – 49(12), 12109–12119. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07704-7>

9. Hillary, V. E., & Ceasar, S. A. A Review on the Mechanism and Applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 Proteins Utilized for Genome Engineering // *Molecular biotechnology*. – 2023. – 65(3), 311–325. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00567-0>.

10. Hua, K., Han, P., & Zhu, J. K. Improvement of base editors and prime editors advances precision genome engineering in plants // *Plant physiology*. – 2022. – 188(4), 1795–1810. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab591>.

11. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nature protocols*. – 2013. – 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>.

12. Menzorov A., Lukyanchikova V., Korablev A., Serova I., Fishman V. Genome editing using CRISPR/Cas9 system: a practical guide // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. – 2016. – vol. 20, pp. 930-944. <https://doi.org/10.18699/VJ16.214>.

13. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering // *Cell*. – 2014. – 157(6):1262-1278. [doi:10.1016/j.cell.2014.05.010](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010).

14. Erdoğan, İ., Cevher-Keskin, B., Bilir, Ö., Hong, Y., & Tör, M. Recent Developments in CRISPR/Cas9 Genome-Editing Technology Related to Plant Disease Resistance and Abiotic Stress Tolerance // *Biology*. – 2023. – 12(7), 1037. <https://doi.org/10.3390/biology12071037>.

15. Koblan LW, Doman JL, Wilson C, et al. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction // *Nat. Biotechnol*. – 2018. – 36(9):843-846. <https://doi.org/10.1038/nbt.4172>.

16. Movahedi A, Aghaei-Dargiri S, Li H, Zhuge Q, Sun W. CRISPR Variants for Gene Editing in Plants: Biosafety Risks and Future Directions // *Int J Mol Sci*. – 2023. – 24(22):16241. <https://doi.org/10.3390/ijms242216241>.

17. Gerashchenkov, G. A., Rozhnova, N. A., Kuluev, B. R., Kiryanova, O. Y., Gumerova, G. R., Knyazev, A. V., Vershinina, Z. R., Mikhailova, E. V., Chemeris, D. A., Matniyazov, R. T., Baimiev, A. K., Gubaidullin, I. M., Baimiev, A. K., & Chemeris, A. V. // *Molekuliarnaia biologiiia*. – 2020. – 54(1), 29–50. <https://doi.org/10.31857/S0026898420010061>.

18. Capdeville, N., Schindele, P., & Puchta, H. Getting better all the time - recent progress in the development of CRISPR/Cas-based tools for plant genome engineering // *Current opinion in biotechnology*. – 2023. – 79, 102854. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102854>.

19. Zhu X, Richael C, Chamberlain P, Busse JS, Bussan AJ, et al. Vacuolar Invertase Gene Silencing in Potato

(*Solanum tuberosum* L.) Improves Processing Quality by Decreasing the Frequency of Sugar-End Defects // PLOS ONE. –2014. – 9(4): e93381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093381>.

20. Draffehn, A.M., Meller, S., Li, L. et al. Natural diversity of potato (*Solanum tuberosum*) invertases // BMC Plant Biol. –2010. –10, 271 <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-271>. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-271>.

21. Kumar, G. N., Iyer, S., & Knowles, N. R. Extraction of RNA from fresh, frozen, and lyophilized tuber and root tissues. *Journal of agricultural and food chemistry*. –2007. –55(5), 1674–1678. <https://doi.org/10.1021/jf062941m>.

22. Vennapusa, A. R., Somayanda, I. M., Doherty, C. J., & Jagadish, S. V. K. A universal method for high-quality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber // *Scientific reports*. – 2020. –10(1), 16887. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73958-5>

23. Nadakuduti, S. S., Starker, C. G., Voytas, D. F., Buell, C. R., & Douches, D. S. Genome Editing in Potato with CRISPR/Cas9 // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). – 2019. – 1917, 183–201. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8991-1_14.

24. Kor S. D., Chowdhury N., Keot A. K., Yogendra K., Chikkaputtaiah C., Sudhakar Reddy P. RNA Pol III promoters-key players in precisely targeted plant genome editing // *Front Genet*. – 2023. – 4;13:989199. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.989199>.

25. Rozhnova N. A., Gerashchenkov G., Chemeris A. The creation of an expression vector for genome editing of the EDS 1 gene // *Biomics*. –2019. – vol.11., no.4 – ss. 422-429. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2019-35>.

26. Abeuova L., Kali B., Tussipkan D., Akhmetollayeva A., Ramankulov Y., Manabayeva S. CRISPR/Cas9-mediated multiple guide RNA-targeted mutagenesis in the potato // *Transgenic Res*. – 2023. – 32(5):383-397. <https://doi.org/10.1007/s11248-023-00356-8>.

27. Wu S., Kyaw H., Tong Z., Yang Y., Wang Z., Zhang L., Deng L., Zhang Z., Xiao B., Quick W. P., Lu T., Xiao G., Qin G., Cui X. a. A simple and efficient CRISPR/Cas9 system permits ultra-multiplex genome editing in plants // *The Crop Journal*– 2024. – 10.1016/j.cj.2024.01.010. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2024.01.010>.

28. Ursache, R., Fujita, S., Dénervaud Tendon, V., & Geldner, N. Combined fluorescent seed selection and multiplex CRISPR/Cas9 assembly for fast generation of multiple *Arabidopsis* mutants // *Plant methods*. – 2021. –17(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00811-9>.

29. Gao S. J., Damaj M. B., Park J. W., Beyene G., Buenrostro-Nava M. T., Molina J., Wang X., Ciomperlik J. J., Manabayeva S. A., Alvarado V. Y., Rathore K. S., Scholthof H. B., & Mirkov T. E. Enhanced transgene expression in sugarcane by co-expression of virus-encoded RNA silencing suppressors // *PLoS One*. –2013. – 14; 8(6):e66046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066046>.

30. Arzola, L., Chen, J., Rattanaporn, K., Maclean, J. M., & McDonald, K. A. Transient co-expression of post-transcriptional gene silencing suppressors for increased in planta expression of a recombinant anthrax receptor fusion protein. *International journal of molecular sciences*. –2011. – 12(8): p. 4975–4990. <https://doi.org/10.3390/ijms12084975>.

CREATION OF AN EXPRESSION VECTOR FOR MULTIPLEX EDITING OF THE POTATO VACUOLAR INVERTASE GENE USING THE CRISPR/CAS9 SYSTEM

Akhmetollayeva A.S.¹, Manabayeva Sh.A.^{1,2*}

¹ National Center for Biotechnology, 13/5, Qorghalzhyn Hwy., Astana, 010000, Kazakhstan

² L.N.Gumilyov Eurasian National University, Satpayev st. 2, Astana, 010000, Kazakhstan Corresponding author: *manabayeva@biocenter.kz

ABSTRACT

Creating genetic engineering constructs for plant genome editing requires considerable time, material resources, and specialized equipment. A thorough understanding of the functions and efficacy of each construct element is critical to the design of specialized vectors for specific tasks. This article provides a detailed overview of the process of creating genetic engineering constructs for editing the invertase gene responsible for cold-induced sweetening (CIS) in potato tubers, starting with the design of the variable part of the guide RNA and ending with the assembly of the final expression vector for potato cell transformation. For this purpose, an analysis of the nucleotide sequences of the invertase gene from domestic potato varieties was performed, along with a comparative analysis the data from the NCBI database. Optimal targets for gene editing using CRISPR/Cas9 technology were identified and the process of cloning two expression vectors for multiple genome editing was described. The expression vectors obtained allow the knockout of the potato acid invertase gene *VInv/Pain-1*. Considering that the expression level of Cas9 is a key factor for the efficiency of genome editing, a second expression vector containing the *Tomato bushy stunt virus* suppressor gene *p19* was created to enhance the expression of this gene and the editing efficiency.

Keywords: CRISPR/Cas9, sgRNA, sweetening of tubers, potato vacuolar invertase gene, expression vector.

CRISPR/CAS9 ЖҮЙЕСІ АРҚЫЛЫ КАРТОПТЫҢ ВАКУОЛЯРЛЫ ИНВЕРТАЗА ГЕНІН МУЛЬТИПЛЕКСТІ РЕДАКЦИЯЛАУ ҮШІН ЭКСПРЕССИЯ ВЕКТОРЫН ҚҰРУ

Ахметоллаева А.С.¹, Манабаева Ш.А.^{1,2*}

¹ Ұлттық биотехнология орталығы, Қорғалжын көшесі 13/5, Астана, 010000, Қазақстан

² Л.Н.Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Сәтбаев көшесі 2, Астана, 010000, Қазақстан *manabayeva@biocenter.kz

ТҮЙІН

Өсімдік геномын өңдеу үшін гендік-инженерлік құрылымдарын құру айтарлықтай уақыт пен материалдық шығындарды, сондай-ақ арнайы жабдықты қажет етеді. Белгілі бір міндеттерді шешу үшін арналған векторларды құру кезінде әрбір құрылымдық элементтің функциялары мен тиімділігін терең түсіну өте маңызды. Бұл мақалада бағыттаушы РНҚ-ның өзгермелі бөлігін жасаудан бастап, картоп жасушаларын трансформациялау үшін дайын экспрессиялық векторды жинауға дейін картоп түйнектерінің суық қанттануына (CIS) жауап беретін инвертаза генін редакциялау үшін гендік-инженерлік құрылымдарды құру процесі егжей-тегжейлі қарастырылады. Ол үшін отандық картоп сорттарының инвертаза генінің нуклеотидтер тізбегіне NCBI базасынан алынған деректермен салыстырмалы талдау жүргізілді, CRISPR/Cas9 технологиясын қолдану арқылы гендік редакциялаудың оңтайлы нысаналары анықталды және де геномды мультиплексті өңдеу үшін екі экспрессиялық векторды клондау процесі сипатталды. Алынған экспрессия векторлары картоптың *VInv/Pain-1* қышқыл вакуолярлы инвертаза генін нокаутқа түсіруге мүмкіндік береді. Cas9 экспрессия деңгейі геномды өңдеу тиімділігінің негізгі факторы екенін ескере отырып, осы геннің экспрессиясын және өңдеу тиімділігін арттыру үшін қызанақ бұталы ергежейлі вирусының *p19* супрессор генімен екінші экспрессиялық вектор құрылды.

Негізгі сөздер: CRISPR/Cas9, бағыттаушы РНҚ, түйнектердің қанттануы, картоптың вакуольді инвертаза гені, экспрессия векторы.