

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-268

**ИНТЕРФЕРОМЕТРИЧЕСКАЯ РАССЕЙВАЮЩАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСА ЭНДОНУКЛЕАЗЫ SPYCAS9 С НАПРАВЛЯЮЩЕЙ SGRNA\*****INTERFEROMETRIC SCATTERING MICROSCOPY FOR INVESTIGATION SPYCAS9 ENDONUCLEASE AND GUIDE SGRNA COMPLEX**Л. В. Саковина<sup>1,2</sup>, А. В. Ендуткин<sup>1</sup>, Д. О. Жарков<sup>1,2</sup><sup>1</sup>*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*<sup>2</sup>*Новосибирский государственный университет*L. V. Sakovina<sup>1,2</sup>, A. V. Endutkin<sup>1</sup>, D. O. Zharkov<sup>1,2</sup><sup>1</sup>*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*<sup>2</sup>*Novosibirsk State University*

✉ kodi99@list.ru

**Аннотация**

С помощью интерферометрической рассеивающей микроскопии (ИРМ), основанной на принципах интерференционно-отражательной микроскопии и интерферометрической рассеивающей микроскопии [1], возможно измерение молекулярных масс отдельных молекул. В данной работе была проведена оценка метода ИРМ для исследования биохимических свойств эндонуклеазы SpyCas9 и ее комплекса с направляющей sgRNA.

**Abstract**

Using interferometric scattering microscopy (ISM), based on the principles of interference-reflection microscopy and interferometric scattering microscopy [1], it is possible to measure the molecular masses of individual molecules. In this study, we evaluated the ISM method to investigate the biochemical properties of the SpyCas9 endonuclease and SpyCas9 and guide sgRNA complex.

Интерферометрическая рассеивающая микроскопия (ИРМ) основана на обнаружении рассеянного света от образца в оптическом микроскопе. При этом имеется корреляция между степенью рассеяния света и размером молекулы, что позволяет измерять массы отдельных молекул в растворе без процедуры мечения или иммобилизации образца. На сегодняшний день ИРМ используется для измерения молекулярных масс белков и нуклеиновых кислот, оценки гомогенности их растворов, изучения гетерогенности и стехиометрии комплексов, а последующая обработка данных позволяет оценить степень сродства молекул в комплексах.

В частности, ИРМ может использоваться в качестве дополнительного аналитического метода для характеристики свойств препаратов белков после очистки. В данной работе для оценки чистоты, однородности препарата SpyCas9 из *Streptococcus pyogenes*, полученного тремя стадиями хроматографической очистки: аффинной с иммобилизованными ионами Ni<sup>2+</sup>, ионообменной и гель-фильтрацией, был использован метод ИРМ. При низких концентрациях SpyCas9 (5–50 нМ), используемых для ИРМ, определена молекулярная масса Cas9 (155,9 кДа), соответствующая ранее охарактеризованной для SpyCas9 [2]. При определении молекулярной массы sgRNA протяженностью 102 нуклеотида регистрировали образование как мономерной формы (38 кДа), так и димеров (67,05 кДа).

Кроме того, с помощью ИРМ было проведено исследование свойств связывания эндонуклеазы SpyCas9 и направляющей sgRNA. В присутствии sgRNA молекулярная масса смещалась и соответствовала 184,9 кДа, что указывает на формирование комплекса.

**Литература**

1. Cole D., Young G., Weigel A. et al. Label-Free Single-Molecule Imaging with Numerical-Aperture-Shaped Interferometric Scattering Microscopy // ACS Photonics. 2017. Vol. 4. P. 211–216.
2. Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D. et al. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA // Cell. 2014. Vol. 156. P. 935–949.

\* Исследование выполнено при поддержке РФФ (проект № 21-64-00017).

© Л. В. Саковина, А. В. Ендуткин, Д. О. Жарков, 2024