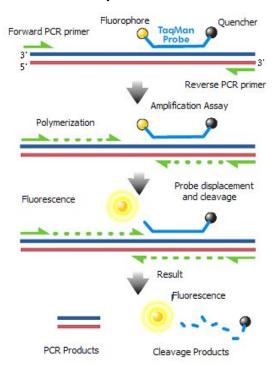
# Дизайн биосенсора нуклеиновых кислот на основе двух dCas9 белков

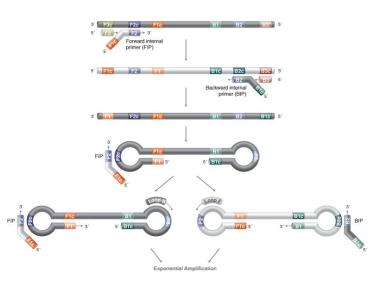
Новиков Роман, 10.03.2021

## Методы детекции НК

#### **qPCR**

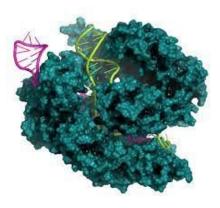


#### **LAMP**



https://www.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-andqpcr/isothermal-amplification/loop-mediated-isothermal-ampli fication-lamp

#### CRISPR/Cas

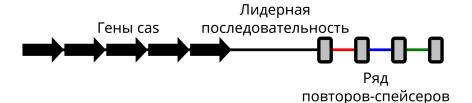


https://www.thermofisher.com/blog/behindthebenc h/crispr-cas9-genome-editing-guide-finessing-thetechnique-and-breaking-new-ground/

## CRISPR/Cas

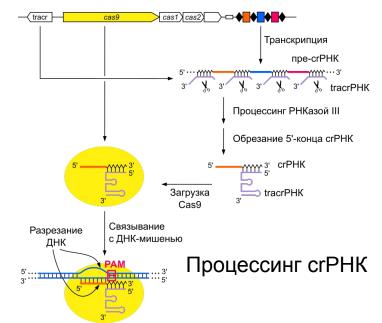
## Классификация Cas систем с примерами их использования в тест-системах

Класс	Тип	Пример белка	Пример тест- системы
Класс 1	1	Cas3	-
	III	Cas10	-
	IV	Scf1	-
Класс 2	II	Cas9	PC reporter (dCas9 - D10A и H840A)
	V	Cas12a	DETECTR
	VI	Cas13	SHERLOCK и SHERLOCK 2.0

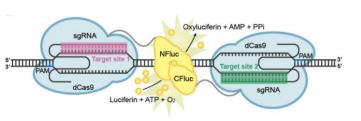


#### CRISPR/Cas локус

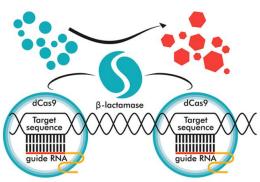
https://ru.wikipedia.org/wiki/CRISPR



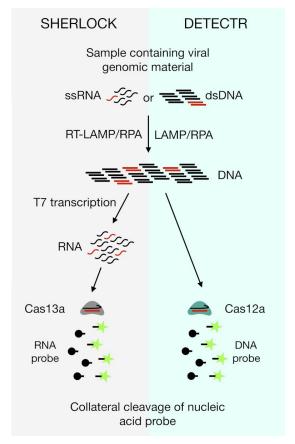
## Варианты биосенсоров на основе CRISPR/Cas



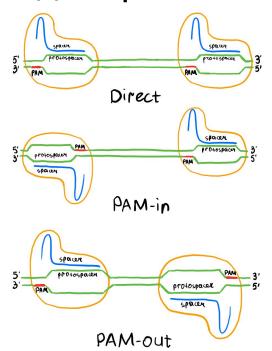
PC reporter - Сплит-система на основе SpdCas9 белков в комплексе с N- и Сфрагментами люциферазы DOI: 10.1021/acssynbio.6b00215

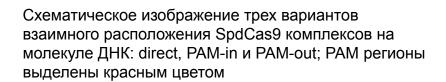


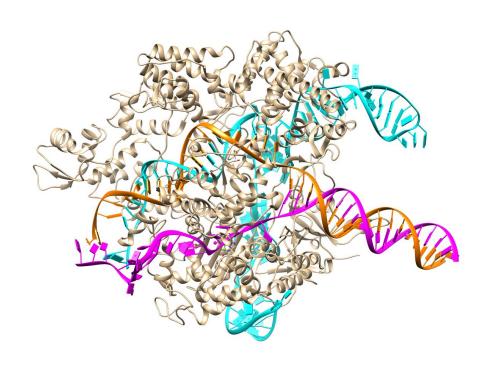
Сплит-система на основе SpdCas9 белков в комплексе с N- и C- фрагментами беталактамазы https://2019.igem.org/Team:Moscow



## Моделирование







Структура SpdCas9 комплекса (PDB id 5Y36). Циановым выделена sgRNA, оранжевым таргетная цепь ДНК, маджента - нетаргетная

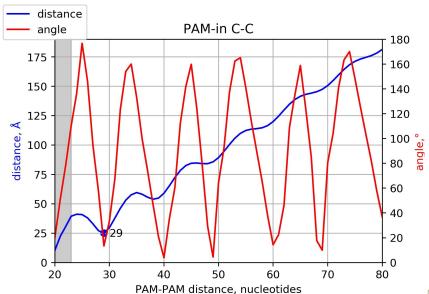
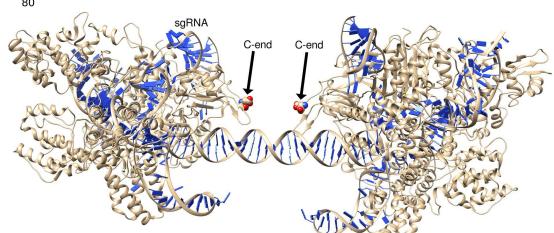


График зависимости расстояния между С-концами SpdCas9 белков в PAM-in ориентации, а также угла с от расстояния между PAM-сайтами; серым выделена стерически недоступная область; оптимальная конфигурация отмечена точкой

Структура двух SpdCas9-белков в составе нуклео-протеинового комплекса в PAM-in ориентации с расстоянием между PAM-сайтами в 29 нуклеотид; сферами выделены С-концы SpdCas9-белков



## Комплекс с фрагментами бета-лактамазы

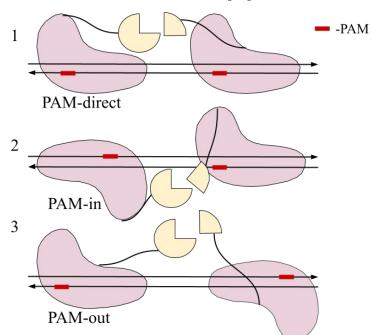
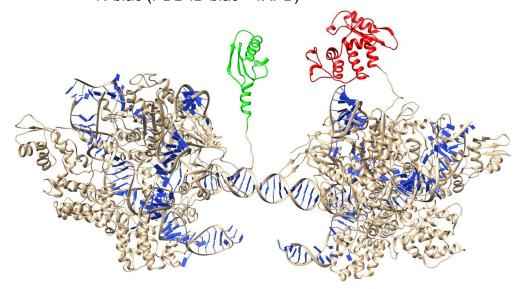


Схема возможных вариантов взаимного расположения двух dCas9-белков с пришитыми к ним фрагментами бета-лактамаза на локусе ДНК в составе рассматриваемого биосенсора; PAM мотивы выделены красным цветом; 5'-3'-направление цепей ДНК обозначено стрелками

Структура двух SpdCas9-белков в составе нуклео-протеинового комплекса в PAM-in ориентации с расстоянием между PAM-сайтами в 27 нуклеотид; зеленый - C-blac, красный - N-blac (PDB ID blac - 1XPB)



## MD

# Варианты систем, выбранные для динамики

Ориентация	Порядок расположен ия	Расстояние РАМ-РАМ, нуклеотиды
PAM-direct	C-N	49
PAm-in	C-N	27
PAM-out	C-N	53

- SIRAH force field
- 150 mM NaCl
- box 2nm ромбододекаэдр
- time 10us

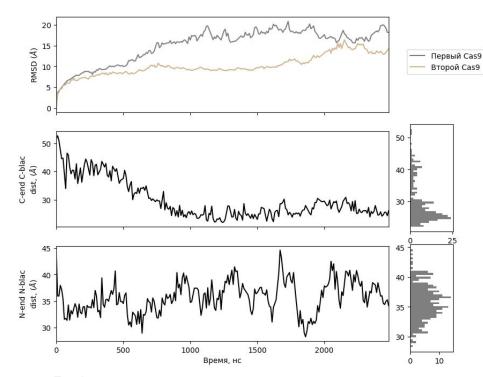


График среднеквадратичного отклонения координат частиц от времени моделирования для первого и второго SpdCas9. Снизу - графики изменения расстояния между С-концом первого SpdCas9 и центром C-blac; N-концом второго SpdCas9 и центорм N-lac

## План дальнейшей работы

- 1) Переписать скрипты для генерации моделей для пакета MDanalysis
- 2) Сделать модуль с функциями для построения моделей и оценки их эффективности с помощью пакета LabelLib
- 3) Рассмотреть случаи разных Cas9 белков (сейчас только SpCas9, но можно и SaCas9, StCas9, CjCas9)
- 4) Совместить молекулярное моделирование с поиском мишеней для детекции в геномах