
КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 579.255+575.2.084

СОЗДАНИЕ ВЕКТОРОВ ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ДРОЖЖЕЙ-САХАРОМИЦЕТОВ НА ОСНОВЕ СИСТЕМЫ CRISPR-CAS9

© 2024 г. А. Г. Матвеев^а, А. С. Михайличенко^а, Г. А. Журавлева^{а, б, *}

^аСанкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

^бЛаборатория биологии амилоидов СПбГУ, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: g.zhuravleva@spbu.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 10.11.2023 г.

Принята к публикации 11.11.2023 г.

Проведено конструирование новых векторов для редактирования генома дрожжей с помощью CRISPR/Cas9. Разработана и успешно применена система, позволяющая осуществлять клонирование новых мишеней с помощью стандартных методов: ПЦР – рестрикция – лигирование. Благодаря сконструированным векторам получены мутанты *sup35-25*, делеция гена *PSH1* и дизрупция гена *NAM7 (UPF1)*. Протестирован удобный способ идентификации плазмид с новой мишенью и приведено подробное описание использованной методики клонирования и отбора плазмид с новыми мишенями.

Ключевые слова: геномное редактирование, CRISPR/Cas9, *SUP35*, *Saccharomyces cerevisiae*

DOI: 10.31857/S0026365624020073

Технологии редактирования генома в настоящее время активно развиваются. Благодаря высокой эффективности гомологичной рекомбинации у дрожжей *S. cerevisiae*, с помощью системы CRISPR/Cas9 можно осуществлять множество манипуляций с геномом дрожжей (Giersch, Finnigan, 2017).

Для применения CRISPR/Cas9 для редактирования генома необходимо экспрессировать нуклеазу Cas9 и единую гидовую или направляющую РНК (sgRNA), состоящую из последовательности мишени, слитой со скэффолдом sgRNA. В свою очередь, скэффолд состоит из объединенных частей crRNA и tracrRNA, достаточных для функционирования комплекса Cas9-sgRNA (Jinek et al., 2012). Для экспрессии этих компонентов в клетках дрожжей, как правило, используется плаزمид, в которой ген Cas9 находится под контролем сильного промотора (например, *TEF1* или *GPD*), а sgRNA контролируется промоторами малых РНК (например, *SNR52*), транскрипция с которых осуществляется с помощью РНК-полимеразы III. При этом для нацеливания системы CRISPR/Cas9 на определенную мишень необходимо клонировать последовательность этой мишени в вектор, содержащий все перечисленные компоненты. Сложность этого клонирования заключается в том, что оно должно быть “бесшовным”, то есть последовательности промотора, мишени и скэффолда sgRNA должны переходить одна в другую без каких-либо последовательностей в местах соединения, таких как рестрикционные сайты.

Существующие системы, позволяющие осуществлять “бесшовное” клонирование новых мишеней в векторы, основаны на методиках Gibson assembly, рекомбинации *in vivo* и GoldenGate (DiCarlo et al., 2013; Mans et al., 2015; Horwitz et al., 2015). Однако мы задались целью разработать способ осуществлять такое клонирование, используя только классические методы: ПЦР, рестрикцию и лигирование. Подобная система ранее уже была описана (Laughery et al., 2015). Созданный авторами вектор pML107 (Addgene #67639) содержит промотор *SNR52*, на 3'-конце которого находится сайт BclI, и неполный скэффолд sgRNA, фланкированный сайтом SmaI на 5'-конце. Согласно предлагаемой схеме клонирования, необходимо синтезировать два комплементарных олигонуклеотида, которые после гибридизации должны образовать фрагмент, содержащий совместимый с BclI липкий 5'-конец, последовательность мишени, а затем недостающий фрагмент скэффолда sgRNA. Для получения целевой плазмиды этот фрагмент нужно клонировать по одному липкому и одному тупому концу в вектор, обработанный рестриктазами BclI и SmaI. При работе с данной системой мы столкнулись с некоторыми неудобствами. Во-первых, клонирование по тупому концу происходит неэффективно. Во-вторых, сама плаزمида pML107 обладает большими размерами (12366 п.н.), что снижает эффективность дрожжевой трансформации. При этом плазмиду можно было бы оптимизировать, убрав из ее состава необязательные элементы, такие как ориджин репликации фага fl

и фланги фрагмента, содержащего селективный маркер *LEU2*.

Мы также наблюдали нестабильность при подержании плазмиды pML107 в клетках *E. coli* штамма DH5 α . В частности, мы наблюдали появление укороченных вариантов плазмид. Один из таких вариантов был обозначен как pML107-3. Его удалось изолировать, благодаря чему было установлено, что данный вариант вектора содержит делецию фрагмента с 8670 по 3199 п.н. (координаты на карте плазмиды, депонированной в Addgene #67639). Соответственно, в данной плазмиде отсутствует маркер *LEU2*, часть ориджина 2 μ -ДНК и часть *Cas9*, однако не затронут модуль для клонирования и экспрессии sgRNA.

В качестве целевого гена дрожжей для использования системы CRISPR/Cas9 мы выбрали ген *SUP35*, кодирующий один из факторов терминации трансляции, eRF3. Комплекс eRF3 с другим фактором терминации трансляции, eRF1, обеспечивает терминацию синтеза полипептидной цепи при появлении стоп-кодона в А-сайте рибосомы. Полная инактивация гена *SUP35* летальна, однако описаны некоторые мутации *sup35*, нарушающие работу факторов терминации трансляции. При этом повышается вероятность того, что рибосома будет проскальзывать стоп-кодон, в результате чего часть стоп-кодонов в транскриптах будет прочитана, как значащие кодоны. Для исследования терминации трансляции часто используются штаммы, несущие нонсенс-мутации в маркерных генах. При нарушениях в работе факторов терминации трансляции, такие нонсенс-мутации могут полностью или частично не проявляться из-за прочитывания стоп-кодонов – это явление называется нонсенс-супрессией, а штаммы, в которых это наблюдается, обладают нонсенс-супрессорным фенотипом (Inge-Vechtomov et al., 2003). Одной из мутаций с нонсенс-супрессорным фенотипом является *sup35-25*, которая приводит к замене треонина на изолейцин в 378-м положении белка Sup35 (Volkov et al., 2002). Данная мутация также удобна для детекции, так как она нарушает рестрикционный сайт BshTI (AgeI). Для получения данной мутации с помощью CRISPR/Cas9 можно использовать две мишени: в случае первой мишени (S35(-25) А) мутация нарушает соответствующий PAM, а во второй (S35(-25) В) приходится на нуклеотид, непосредственно предшествующий PAM (рис. 1а).

Для того чтобы получить конструкции для экспрессии sgRNA с мишенями в гене *SUP35* и полными последовательностями скэффолдов sgRNA, мы провели сайт-направленный мутагенез плазмиды pML107-3 с использованием высокопроцессивной полимеразы Pfx (Invitrogen #12344-024). Для получения sgRNA с мишенью S35(-25) А использовали праймеры S35(-25) А-sgR-F и S35(-25)

А-pSNR52-R, а для S35(-25) В – праймерами S35(-25) В-sgR-F и S35(-25) В-pSNR52-R (табл. 1).

В результате были получены векторы pML107-3-sgS35(-25) А и pML107-3-sgS35(-25) В. Подтвердив корректность последовательностей, мы переклонировали фрагменты XapI-Eco31I из этих плазмид в вектор YEplac181 (Gietz, Sugino, 1988) по сайтам EcoRI-Eco31I, получив таким образом мульткопийные плазмиды для экспрессии sgRNA в клетках дрожжей: YEplac181-sgS35(-25) А и YEplac181-sgS35(-25) В. Здесь и далее для клонирования нами были использованы эндонуклеазы рестрикции (кроме Ksp22I), лигаза фага Т4 и наборы реактивов для очистки ДНК производства “Thermo Scientific”. В отличие от остова pML107, YEplac181 более компактна, так как не содержит ориджина репликации фага f1 и несет меньший фрагмент с маркером *LEU2*.

Для сверхэкспрессии Cas9 мы сконструировали плазмиду YCplac22GPD-Cas9, переклонировав фрагмент PvuI-XbaI, длиной 5318 п.н., из pML107 в YCplac22 (Gietz, Sugino, 1988) вместо фрагмента PvuI-XbaI, длиной 151 п.н. Мы модифицировали Cas9, добавив на 3'-конец последовательность, кодирующую 6 гистидиновых остатков. Для этого в плазмиду YCplac22GPD-Cas9 по сайту BamHI был вставлен фрагмент BglII-BglII (31 п.н.) из pDEST-527 (Addgene #11518). Полученная плаزمид была названа YCplac22GPD-Cas9-His6. Последующие эксперименты показали, что наличие гистидинов на С-конце Cas9 не влияло на эффективность ее работы.

Векторы для одновременной экспрессии Cas9 и sgRNA в дрожжах были сконструированы следующим образом: большой фрагмент PvuI-PaeI из YCplac22GPD-Cas9-His6 был переклонирован по тем же сайтам на место малых фрагментов (211 п.н.) плазмид YEplac181-sgS35(-25) А и YEplac181-sgS35(-25) В. Таким образом, были получены векторы YEplac181GC9H-sgS35(-25) А и YEplac181GC9H-sgS35(-25) В (рис. 1б), которые оказались меньше pML107 почти на 1 kb (11437 п.н.).

Мы использовали сконструированные плазмиды для получения мутантов *sup35-25* в штамме 74-D694 (Chernoff et al., 1995). Данный штамм содержит нонсенс-мутацию *ade1-14*, благодаря которой клетки не способны синтезировать аденин и, как следствие, накапливают красный пигмент, формирующийся из неметаболизированного предшественника аденина. При наличии нонсенс-супрессорной мутации *sup35-25* штамм становится прототрофным по аденину и приобретает характерный для дрожжей белый цвет колоний. Таким образом, по соотношению красных и белых колоний можно судить о том, какая доля колоний несет мутацию *sup35-25*. Помимо компонентов системы CRISPR/Cas9, необходим также фрагмент мутантной аллели *sup35-25*, который системы репарации

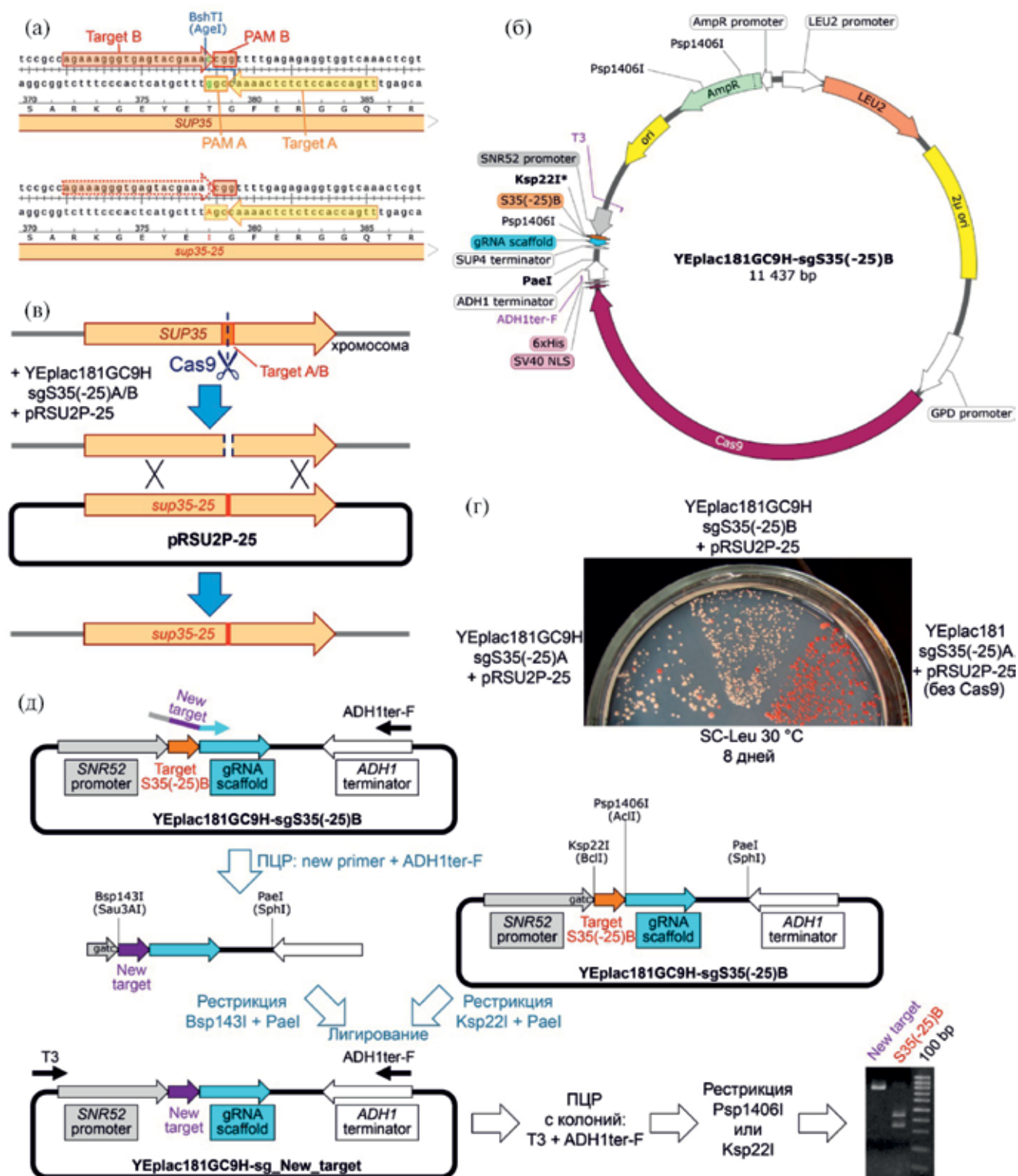


Рис. 1. Создание удобной системы клонирования мишеней в вектор для редактирования генома *Saccharomyces cerevisiae* с помощью CRISPR-Cas9. (а) — Схема расположения мутации *sup35-25* и мишеней S35(-25) А и S35(-25) В в гене *SUP35*. (б) — Карта плазмиды YEplac181GC9H-sgS35(-25) В; создана с помощью программы SnapGene Viewer. (в) — Схема получения мутантов *sup35-25*. (г) — Рост колоний штамма 74-D694, трансформированного плазмидами в указанных комбинациях. (д) — Схема клонирования новых мишеней в вектор YEplac181GC9H-sgS35(-25) В и отбора колоний *E. coli*, несущих корректно сконструированный новый вектор.

смогли бы использовать как матрицу для гомологичной рекомбинации после того, как Cas9 внесет двуцепочечный разрыв в гене *SUP35*. В качестве источника такого фрагмента для репарации мы использовали плазмиду pRSU2P-25 (Volkov et al., 2002) (рис. 1в). Мы трансформировали штамм 74-D694 (табл. 1) плазмидами YEplac181GC9H-sgS35(-25) А и YEplac181GC9H-sgS35(-25) В совместно с pRSU2P-25, используя стандартную методику (Gietz et al., 1995). В результате подавляющее большинство колоний приобрело белый цвет при использовании обеих мишеней (рис. 1г). Восемь случайно выбранных белых колоний (четыре, полученных с помощью sgRNA S35(-25) А, и четыре — с S35(-25) В) были проверены с помощью ПЦР и секвенирования фрагмента гена *SUP35*. Во всех случаях была обнаружена мутация *sup35-25*. Таким образом, полученные нами плазмиды позволяют эффективно редактировать геном *S. cerevisiae*.

Мы также разработали методику “бесшовного” клонирования новых мишеней с использованием ПЦР, рестрикции и лигирования, а также способ селекции корректно сконструированных новых векторов (рис. 1д). Полученные нами плазмиды, несущие sgRNA S35(-25) В, удобно использовать для получения конструкций, несущих другие мишени, так как наличие данной мишени приводит к появлению сайтов рестрикции Ksp22I и Psp1406I (AclI), которые позволяют осуществлять клонирование и отбор векторов. Предлагаемая схема позволяет создать как вектор на основе YEplac181-sgS35(-25) В, экспрессирующий только направляющую РНК, так и вектор, несущий также *Cas9-His₆*, на основе YEplac181GC9H-sgS35(-25) В. На первом этапе необходимо наработать одну из этих плазмид в штамме *E. coli*, в котором неактивна Dam-метилаза, так как в дальнейшем необходимо будет использовать рестриктазу Ksp22I, чувствительную к Dam-метилованию. Мы использовали

Таблица 1. Используемые в работе штаммы, плазмиды и олигонуклеотиды

Название, ссылка	Тип	Описание (генотип или последовательность)
DH5α	Штамм <i>E. coli</i>	F ⁻ φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169 recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>
ER2925	Штамм <i>E. coli</i>	<i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10) Tet^S endA1 rspL136 (Str^R) dam13::Tn9 (Cam^R) xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2</i>
74-D694 (Chernoff et al., 1995)	Штамм <i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα ade1-14 trp1-289 ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 flo8-1 [psi⁻] [PIN⁺]</i>
U-1A-D1628 (Moskalenko et al., 2003)	Штамм <i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα ade1-14 trp1-289 his3-Δ200 lys2 ura3-52 leu2-3,112 sup45::HIS3MX [pRS316-SUP45] [psi⁻] [PIN⁺]</i>
U-14-D1690 (Maksiutenko et al., 2021)	Штамм <i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα ade1-14 trp1-289 his3-Δ200 lys2 ura3-52 leu2-3,112 sup35::HIS3MX [pRSU2] [psi⁻] [PIN⁺]</i>
pRSU2P-25 (Volkov et al., 2002)	Плаزمид	<i>CEN URA3 P_{SUP35}-sup35-25 amp^R</i>
pML107 (Laughery et al., 2015)	Плазмид	<i>2μ LEU2 P_{GPD}-SpCas9 P_{SNR52}-sgRNA-scaffold(part) amp^R</i>
pML107-3	Плазмид	<i>P_{GPD}-SpCas9(part) P_{SNR52}-sgRNA-scaffold(part) amp^R</i>
pML107-3-sgS35(-25) А	Плазмид	<i>P_{GPD}-SpCas9(part) P_{SNR52}-S35(-25) A-sgRNA amp^R</i>
pML107-3-sgS35(-25) В	Плазмид	<i>P_{GPD}-SpCas9(part) P_{SNR52}-S35(-25) B-sgRNA amp^R</i>
YCplac22GPD-Cas9	Плазмид	<i>CEN TRP1 P_{GPD}-SpCas9 amp^R</i>
YCplac22GPD-Cas9-His6	Плазмид	<i>CEN TRP1 P_{GPD}-SpCas9-His₆ amp^R</i>
YEplac181-sgS35(-25) А	Плазмид	<i>2μ LEU2 P_{SNR52}-S35(-25) A-sgRNA amp^R</i>
YEplac181-sgS35(-25) В	Плазмид	<i>2μ LEU2 P_{SNR52}-S35(-25) B-sgRNA amp^R</i>
YEplac181GC9H-sgS35(-25) А	Плазмид	<i>2μ LEU2 P_{GPD}-SpCas9-His₆ P_{SNR52}-S35(-25) A-sgRNA amp^R</i>
YEplac181GC9H-sgS35(-25) В	Плазмид	<i>2μ LEU2 P_{GPD}-SpCas9-His₆ P_{SNR52}-S35(-25) B-sgRNA amp^R</i>
YEplac181GC9H-sgP1(6)	Плазмид	<i>2μ LEU2 P_{GPD}-SpCas9-His₆ P_{SNR52}-P1(6)-sgRNA amp^R</i>
YEplac181GC9H-sgU1(7)	Плазмид	<i>2μ LEU2 P_{GPD}-SpCas9-His₆ P_{SNR52}-U1(7)-sgRNA amp^R</i>
S35(-25) А-sgR-F	Олигонуклеотид	accacctctctcaaacggttttagagctagaaatagcaagttaaaaataaggc
S35(-25) В-sgR-F	Олигонуклеотид	aagggtgagtacgaaacggttttagagctagaaatagcaagttaaaaataaggc
S35(-25) А-pSNR52-R	Олигонуклеотид	gttttgagagaggtgtcaagatcatttatctttcactg
S35(-25) В-pSNR52-R	Олигонуклеотид	gtttcgtactcacctttctgatcatttatctttcactg
ADH1ter-F	Олигонуклеотид	ttccggatcctagactctcaggcgcaatttctatga
T3	Олигонуклеотид	Attaaccctcactaaag
P1(6)-sgR-F	Олигонуклеотид	aatgatcgacctggcccaacggcctaggttttagagctagaaatagc
U1(7)-sgR-F	Олигонуклеотид	taaaggatccttccaaacgaatcggtacggttttagagctagaaatagc

штамм ER2925 (“New England Biolabs”), однако должен подойти любой штамм *Dam*⁺. Необходимо также подобрать праймер, содержащий с 5'-конца сайт рестриктазы Bsp143I (Sau3AI), затем последовательность новой мишени и участок, отжигающийся на скэффолд sgRNA. В общем виде праймеры, которые мы использовали, имели следующую последовательность: 5'-XXXXgacN NNNNNNNNNNNNNNNgttttagagctgaaatagc-3', где XXX – произвольные нуклеотиды, а NNN... – последовательность мишени (без PAM). С полученным праймером в паре с праймером ADH1ter-F необходимо далее провести ПЦР на матрице YEplac181-sgS35(-25) В или YEplac181GC9H-sgS35(-25) В. На этом этапе можно использовать плазмиды, выделенные из *Dam*⁺ штаммов, но в таком случае лучше избавиться от матрицы, либо выделив продукт из агарозного геля, либо обработав ПЦР-смесь рестриктазой DpnI, однако быстрее использовать неметилированные плазмиды и проводить очистку ПЦР-продукта из раствора. На следующем этапе необходимо рестрицировать ПЦР-продукт с помощью Bsp143I (Sau3AI) и PaeI (SphI), а плазмиду — с помощью Ksp22I (или BclI) и PaeI (SphI). Ksp22I (SibEnzyme) — изошизомер BclI, но, в отличие от BclI, температурный оптимум ее работы составляет 37°C, поэтому ее удобнее использовать для двойной рестрикции. Затем необходимо инактивировать рестриктазы (инкубированием при 65°C в течение 20 мин), после чего смешать растворы плазмиды и ПЦР-продукта, добавить АТФ и лигазу фага Т4. Фрагмент способен лигироваться в плазмиду, так как рестрикция Ksp22I и Bsp143I приводит к появлению совместимых липких концов. Полученную лигазную смесь можно использовать для трансформации компетентных клеток *E. coli*. Корректно сконструированная плазида должна отличаться от исходной всего на 20 нуклеотидов, так как происходит замена только последовательности мишени. Чтобы отличить бактерии, несущие исходную плазмиду, от бактерий с новой, мы сначала ставили ПЦР с колоний с праймерами T3 и ADH1ter-F, а затем полученный ПЦР-продукт рестрицировали либо эндонуклеазой Psp1406I (AclI), либо Ksp22I. Так как при замене мишени S35(-25) В на любую другую мишень хотя бы один из сайтов Psp1406I (AclI) или Ksp22I с большой вероятностью не сохранится, то мы увидим единственный фрагмент в том случае, если бактериальный клон содержал новую плазмиду, и два фрагмента, если исходную. Для рестрикции мы использовали до 2.5 мкл неочищенной ПЦР-смеси при объеме реакции 10 мкл: это позволяет ускорить отбор плазмид и проверять одновременно множество колоний, так как нет необходимости проводить очистку ПЦР-продуктов.

С использованием описанной выше методики мы получили плазмиды с мишенями в генах *PSH1* и *NAM7* (*UPF1*). Для этого были использованы

праймеры P1(6)-sgR-F и U1(7)-sgR-F (табл. 1), и были получены плазмиды YEplac181GC9H-sgP1(6) и YEplac181GC9H-sgU1(7), соответственно. С помощью этих плазмид нам удалось получить штаммы на основе U-1A-D1628 и U-14-D1690 (табл. 1), нокаутные по генам *PSH1* и *NAM7*.

Таким образом, мы разработали новую систему векторов и успешно ее применили для редактирования генома *S. cerevisiae*. Все плазмиды и другие материалы статьи доступны по запросу.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данное исследование было выполнено на базе Ресурсного центра “Развитие молекулярных и клеточных технологий” научного парка СПбГУ. Статья посвящается 300-летию СПбГУ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Проект выполнен при финансовой поддержке гранта РФФ № 23-14-00063.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chernoff Y.O., Lindquist S.L., Ono B., Inge-Vechtomov S.G., Lieberman S.W. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi⁺] // Science. 1995. V. 268. P. 880–884. <https://doi.org/10.1126/science.7754373>
- DiCarlo J.E., Norville J.E., Mali P., Rios X., Aach J., Church G.M. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41. P. 4336–4343. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt135>
- Giersch R.M., Finnigan G.C. Yeast still a beast: diverse applications of CRISPR/Cas editing technology in *S. cerevisiae* // Yale J. Biol. Med. 2017. V. 90. P. 643–651.
- Gietz R.D., Sugino A. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites // Gene. 1988. V. 74. P. 527–534. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90185-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90185-0)
- Gietz R., Schiestl R., Willems A., Woods R. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure // Yeast. 1995. V. 11. P. 355–360. <https://doi.org/10.1002/yea.320110408>
- Horwitz A.A., Walter J.M., Schubert M.G., Kung S.H., Hawkins K., Platt D.M., Hernday A.D.,

- Mahatdejkul-Meadows T., Szeto W., Chandran S.S., Newman J.D.* Efficient multiplexed integration of synergistic alleles and metabolic pathways in yeasts via CRISPR-Cas // *Cell Syst.* 2015 V. 1. P. 88–96.
https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.02.001
- Inge-Vechtormov S., Zhouravleva G., Philippe M.* Eukaryotic release factors (eRFs) history // *Biol. Cell.* 2003. V. 95. P. 195–209.
https://doi.org/10.1016/s0248-4900(03)00035-2
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science.* 2012. V. 337. P. 816–821.
https://doi.org/10.1126/science.1225829
- Laughery M.F., Hunter T., Brown A., Hoopes J., Ostbye T., Shumaker T., Wyrick J.J.* New vectors for simple and streamlined CRISPR-Cas9 genome editing in *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast.* 2015. V. 32. P. 711–720.
https://doi.org/10.1002/yea.3098
- Maksiutenko E.M., Barbitoff Y.A., Matveenko A.G., Moskalenko S.E., Zhouravleva G.A.* Gene amplification as a mechanism of yeast adaptation to nonsense mutations in release factor genes // *Genes (Basel).* 2021. V. 12. Art. 2019.
https://doi.org/10.3390/genes12122019
- Mans R., van Rossum H.M., Wijsman M., Backx A., Kuijpers N.G., van den Broek M., Daran-Lapujade P., Pronk J.T., van Maris A.J., Daran J.M.* CRISPR/Cas9: a molecular Swiss army knife for simultaneous introduction of multiple genetic modifications in *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Res.* 2015. V. 15. Art. fov004.
https://doi.org/10.1093/femsyr/fov004
- Moskalenko S.E., Chabelskaya S.V., Inge-Vechtormov S.G., Philippe M., Zhouravleva G.A.* Viable nonsense mutants for the essential gene *SUP45* of *Saccharomyces cerevisiae* // *BMC Mol. Biol.* 2003. V. 10. Art. 2.
https://doi.org/10.1186/1471-2199-4-2
- Volkov K., Aksenova A., Soom M., Osipov K., Svitin A., Kurischko C., Shkundina I., Ter-Avanesyan M., Inge-Vechtormov S., Mironova L.* Novel non-Mendelian determinant involved in the control of translation accuracy in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics.* 2002. V. 160. P. 25–36.
https://doi.org/10.1093/genetics/160.1.25

SHORT COMMUNICATIONS

Construction of Vectors for the Genome Editing of *Saccharomyces* Yeast Using CRISPR-Cas9 System

A. G. Matveenko¹, A. S. Mikhailichenko¹, and G. A. Zhouravleva^{1, 2, *}

¹*St Petersburg State University, St Petersburg, 199034 Russia*

²*Laboratory of Amyloid Biology SPbU, St Petersburg, 199034 Russia*

*e-mail: g.zhuravleva@spbu.ru

Received October 13, 2023; revised November 10, 2023; accepted November 11, 2023

Abstract—New vectors for the yeast genome editing using CRISPR/Cas9 were constructed. A system for cloning of new targets using the standard methods (PCR–restriction–ligation) was developed and successfully applied. The constructed vectors allowed us to obtain the *sup35-25* mutants, deletion of the *PSH1* gene and disruption of the *NAM7 (UPF1)*. A convenient method for identifying plasmids with a new target was tested. A detailed description of the cloning technique used and selection of plasmids with the new targets is provided.

Keywords: genome editing, CRISPR/Cas9, *SUP35*, *Saccharomyces cerevisiae*