

біотехнології. Так, обробка насіння 5 хвилин в 70% C_2H_5OH і 40 хвилин в 5% $NaOCl$ призводить до стимуляції росту кореня і збільшенню екскреції загальних білків, амінокислот і вуглеводів.

Сорока Д.С.

студентка,

Науковий керівник: Соколова І.Є.

кандидат біологічних наук, доцент,

Дніпровський національний університет

імені Олеса Гончара

ТЕХНОЛОГІЯ CRISPR/CAS9. ЇЇ ДОСЯГНЕННЯ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

У зв'язку з інтенсивним розвитком молекулярної біології та генної інженерії, людство навчилося проводити різні маніпуляції з генами. Більшість з них дорогі у використанні, неточні і трудомісткі. З цієї причини був розроблений новий метод редагування генома CRISPR/Cas9, як більш точний, економічний і швидкий спосіб редагування генів. Він надав можливість ученим з високою точністю редагувати, нокаутувати і вирізати цілі гени та окремі їх ділянки, наприклад, що несуть злоякісні мутації, а також замінювати гени на ті, які необхідні для виробничої та наукової діяльності людини.

Метою роботи був аналіз літератури щодо досягнень і перспектив використання технології CRISPR/Cas9.

Технологія CRISPR виникла в рамках проекту фундаментальних досліджень, метою яких було з'ясування того, як бактерії борються з вірусними інфекціями. Бактеріям доводиться стикатися з вірусами в середовищі свого проживання. У бактерії є всього кілька хвилин, щоб знешкодити вірус до того, як бактерія буде зруйнована. Таким чином, у клітинах багатьох бактерій існує адаптивна імунна система – CRISPR, що дозволяє виявляти і руйнувати вірусну ДНК [4, с. 167]. Крім того, даний механізм, діє ще й як обмежувач горизонтального переносу генетичної інформації між різними клітинами бактерій. Також відзначено, що система CRISPR може брати активну участь у регуляції роботи «своїх» бактеріальних генів, а також послідовностей профагів і транспозонів всередині генома. Не виключено, що система CRISPR пригнічує у бактерій вироблення деяких антигенів, що допомагає послабити імунну відповідь з боку господаря.

CRISPR (від англ. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) являє собою кластер регулярних коротких паліндромних повторів, розділених спейсерами – ділянками варіабельних послідовностей. Розмір CRISPR-повтору складає 23-47 пар основ, а спейсерів – від 21 до 72 пар. Число груп «повтор/спейсер» може досягати 375, але зазвичай менше 50 [4, с. 167]. Спейсери, очевидно, представляють собою сегменти захоплених вірусних і плазмідних послідовностей і мають високу швидкість еволюції для cas-генів

[3, с. 725]. Cas-гени кодують білки, що входять у велику неоднорідну родину, які несуть функціональні домени типових нуклеаз (ферментів, що розрізають ДНК), хеліказ (розплітають ланцюги ДНК), полімераз (нарощують ланцюг ДНК при її подвоєнні) і ДНК-зв'язуючих білків. Це означає, що білки, які кодуються згаданими cas-генами, здатні виконувати функції всіх перерахованих вище ферментів.

До складу системи CRISPR входить також білок Cas9, який здатний шукати, розщеплювати і, в підсумку, знищувати вірусну ДНК особливим способом.

Cas9 – CRISPR-асоційований білок (від англ. *CRISPR associated protein 9*) – це керована за допомогою РНК-гідів ендонуклеаза, пов'язана з адаптивною імунною системою CRISPR у цілому ряду бактерій, зокрема, у *Streptococcus pyogenes* [2, с. 337]. *S. pyogenes* використовує Cas9 для запам'ятовування, подальшої перевірки та розрізання чужорідної ДНК, наприклад, ДНК бактеріофагів або плазмід [1, с. 199].

Мікроби можуть містити більше одного локусу CRISPR. Таким чином один локус спрямований на захист від одного вірусу. У архей *Methanocaldococcus jannaschii* було ідентифіковано 18 локусів, що більше, ніж 1% геному. Зазвичай CRISPR знаходяться в бактеріальній хромосомі, але можуть бути розташовані і в плазмідній ДНК.

Загальна стратегія редагування генома включає чотири основні етапи:

- 1) вибір цільової послідовності в геномі;
- 2) створення нуклеазної конструкції, спрямованої на обрану мету;
- 3) доставка цієї конструкції в клітинне ядро;
- 4) аналіз отриманих мутацій [5, с. 22].

В ході дослідження активності білка Cas9, була визначена можливість його застосування в генно-інженерній технології. Ця технологія допомагає дослідникам видаляти та вставляти фрагменти ДНК всередину клітин з неймовірною точністю, що дозволяє робити те, що раніше було просто неможливо.

CRISPR/Cas9 широко використовується для редагування геномів в генній інженерії рослин, тварин і навіть людини. Прикладом таких генів є ген рису, який відповідає за довжину і колір проростка. В результаті цього експерименту були отримані незвичайні проростки – карликові альбіноси.

Методи, засновані на CRISPR/Cas9, можуть знайти застосування і в медицині для лікування різних захворювань: вірусних, імунологічних (в тому числі, алергії, ревматизму), онкологічних, серцево-судинних, а також спадкових вад – таких, як синдром Дауна, серповидноклітинна анемія та ін.

Нещодавно китайські вчені продемонстрували можливість використання технології CRISPR навіть для зміни генів ембріонів людини. Але проект був тимчасово призупинений для того, щоб був час ретельно розглянути всі можливі наслідки цього. На даний момент експерименти над людськими ембріонами припинені в зв'язку з етичним питанням, яке зараз гостро стоїть в наукових колах.

Вчені прагнуть розширити розуміння того, як можна контролювати спосіб відновлення ДНК після її розриву, і з'ясувати, як можна контролювати й

обмежувати нецільовий вплив або ненавмисні ефекти при використанні цієї технології [4, с. 167].

Можливість здійснювати редагування генома таким чином накладає на вчених велику відповідальність і необхідність враховувати як небажані наслідки, так і роль навмисного використання цього наукового прориву на шкоду людства.

Підводячи підсумок слідус відзначити, що в плані редагування геномів технологія CRISPR/Cas9 на даний момент є найбільш потрібною та перспективною.

Завдяки точності технології вчені зможуть з більшою ймовірністю вбудовувати гени в потрібне місце в геномі. І за допомогою CRISPR/Cas9 ці дослідження будуть займати менше часу. А також вчені знайдуть спосіб побороти генетичні захворювання, і вже в найближче десятиліття з'являться методи клінічної терапії, засновані на цій технології.

Список використаних джерел:

1. Heler R. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation / R. Heler, P. Samai, J. W. Modell, C. Weiner, G. W. Goldberg, D. Bikard // *Nature*. – 2015. – 519. – 199–202.
2. Jinek. M. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity / M. Jinek // *Science*. – 2012. – 337. – 816–821.
3. Makarova K.S. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems / K.S. Makarova, Y.I. Wolf, O.S. Alkhnbashi, S.A. Shah, S.J. Saunders // *Nature Reviews Microbiology*. – 2015. – 13. – 722–736.
4. Horvath P. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea / P. Horvath, R. Barrangou // *Science*. – 2010. – 327. – 167 p.
5. Немудрый А.А. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas – инструменты открытий / А.А. Немудрый, К.Р. Валетдинова, С.П. Медведев, С.М. Закиян // *Acta naturae*. – 2014. – 6, № 3. – С. 20-42.