

*Дондик Е. И., Соловьев Е. В.*  
**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМЫ CRISPR-CAS В КАЧЕСТВЕ МЕТОДОВ ДЛЯ  
ЛОКУС-СПЕЦИФИЧЕСКОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА**

*Научные руководители: канд. биол. наук, доц. Мезен Н. И.*

*Кафедра биологии*

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

В последние несколько лет появились новейшие методы редактирования геномов – это системы CRISPR/Cas9 (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats). Эти появившиеся относительно недавно системы уже зарекомендовали себя как эффективные и надежные инструменты геномной инженерии.

Целью нашего исследования являлся анализ литературных данных по использованию системы CRISPR-Cas в качестве методов для локус-специализированного редактирования генома.

CRISPR — это система специфического иммунитета прокариот, которая обеспечивает защиту микроорганизмов от проникновения чужеродной ДНК. Локусы CRISPR представлены короткими прямыми повторами, которые отделяются друг от друга спейсерами, произошедшими из ДНК чужеродных генетических элементов. Перед рядом повторов и спейсеров располагается лидерная последовательность, содержащая, промотор, с которого начинается однонаправленная транскрипция повторов и спейсеров CRISPR. Главной компонент системы редактирования генома – комплекс из белка-«ножниц» Cas9 и «гидовой» РНК, способной найти участок целевой ДНК, который нужно «отредактировать». Присоединившись к «мишени», Cas9 разрезает ее в одном, строго определенном месте. Механизм защиты включает три основные стадии: адаптация, транскрипция, интерференция. На первой стадии – адаптации – небольшой фрагмент чужеродной ДНК, проникшей в бактериальную клетку, встраивается в CRISPR-локус генома хозяина, формируя новый спейсер. На второй стадии – транскрипции – весь CRISPR-локус транскрибируется в длинную pre-crRNA (poly-spacer precursor crRNA; полиспейсерный предшественник CRISPR РНК). Третья стадия – интерференция чужеродной ДНК или РНК – обеспечивается за счет взаимодействия crRNA и комплекса Cas-белков.

В Лаборатории Фенга Занга (США) были созданы новые плазмидные конструкции, содержащие элементы, необходимые для работы CRISPR/Cas9. Плазмиды pX260/pX334 содержат три экспрессионные кассеты (Cas9-нуклеаза, CRISPR РНК матрица и tracrRNA (транспортная РНК)). Чтобы изменить последовательность-мишень, из такой конструкции необходимо всего единая химерная sgRNA для внесения двухцепочечных разрывов в целевых локусах.

Системы CRISPR активно применяются для различных манипуляций с геномами, позволяют решать сложные задачи, включая получение мутантных и трансгенных растений и животных, создание и исследование моделей заболеваний на основе культивируемых плюрипотентных клеток человека.

Общая стратегия геномной инженерии с помощью сайт-специфических нуклеаз включает четыре этапа: выбор целевой нуклеотидной последовательности в геноме; создание нуклеазной конструкции, направленной на выбранную мишень; доставка этой конструкции в клеточное ядро; анализ полученных мутаций.

Эта система отличается относительной простотой конструирования и высокой эффективностью работы в клетках человека, животных и растений. В последние годы инструментарий геномной инженерии стремительно расширяется, и разработанный в 2012—2013 гг. метод редактирования генома CRISPR/Cas открыл принципиально новые возможности для манипуляций с геномом высших организмов.