

## Редактирование геномов

А. А. Чиркин, профессор кафедры химии и естественнонаучного образования  
факультета химико-биологических и географических наук

Витебского государственного университета имени П. М. Машерова, доктор биологических наук

**Аннотация.** В статье изложены данные о методологии редактирования геномов с помощью системы CRISPR-Cas, за открытие которой в 2020 году Дженифер Дудна и Эммануэль Шарпантье были удостоены Нобелевской премии по химии.

**Abstract.** The article presents data on the methodology for editing genomes using the CRISPR-Cas system, for the discovery of which in 2020 Jennifer Doudna and Emmanuelle Charpentier were awarded the Nobel Prize in Chemistry.

**Keywords:** genome editing, CRISPR-Cas systems, Nobel Prize in Chemistry, Jennifer Doudna, Emmanuelle Charpentier.

С середины XX века, когда было доказано, что материальный носитель генов есть ДНК, актуальными стали исследования по созданию точных методов изучения и модификаций этой молекулы с целью понимания фундаментальных процессов жизни на уровне взаимодействия генотипа и фенотипа. Важнейшим этапом на этом пути был поиск путей целенаправленного разрезания двухцепочечной молекулы ДНК в строго определённых местах. К настоящему времени известны два способа достижения этой цели, удостоенные Нобелевских премий с дистанцией в 42 года. В 1978 году премия была присуждена Вернеру Арберу, Хамилтону Смиту и Даньелу Натансу за открытие рестриктаз — особых ферментов, точно разрезающих молекулу ДНК. На основе изучения систем рестрикции были разработаны методы клонирования ДНК, а методы генетической инженерии стали рутинными во многих областях науки, техники и народного хозяйства. В 2020 году Дженифер Дудна и Эммануэль Шарпантье были удостоены Нобелевской премии по химии за исследование метода редактирования генома с помощью системы CRISPR-Cas.

Целью статьи является обзор основных опубликованных материалов по системе CRISPR-Cas для учителей биологии и химии, учащихся старших классов, студентов и научных работников.

Система иммунитета присуща многоклеточным организмам, поскольку они обладают клеточными и гуморальными средствами неспецифической и специфической защиты, от попадания во внутреннюю среду организма чужеродной генетической информации [1]. Бактерии и археи не имеют такой системы защиты, как у животных, поскольку бактерии — существа одноклеточные. В 1987 году в геноме кишечной палочки *Escherichia coli* был обнаружен загадочный участок, состоящий из многочисленных повторов. Функция этого участка, названного CRISPR-локусом, долгое время оставалась неясной. Но в 2005 году сразу три группы учёных сообщили, что разделяющие эти повторы промежуточные последовательности зачастую бывают идентичны последовательностям, найденным в геномах бактериофагов и в плазидах. Эта находка запустила целый каскад исследований, показавших, что бактерии не беззащитны против вирусов-бактериофагов и других патогенов. Система элементов геномной последовательности, названная CRISPR (произносится «КРИСПЕР»), и ассоциированные с ней белки Cas помогают им распознавать и уничтожать чужеродный генетический материал. Упрощённая схема строения CRISPR представлена на рисунке 1.

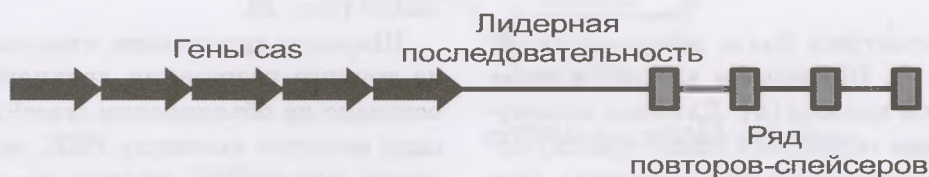


Рисунок 1 — Схема строения локуса CRISPR (Википедия)

Название локуса CRISPR «Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats» переводится как «скопление разделённых регулярными промежутками коротких симметричных повторов». В каждом конкретном локусе все повторы практически одинаковы и имеют длину от 24 до 48 пар нуклеотидов. Промежутки также примерно одинаковы по длине (21–72 п. н.), но весьма вариабельны по последовательностям ДНК. Промежуточные последовательности, или спейсеры, часто происходят из плазмид и фагов. Бактерии, выжившие после атаки фага, в результате так называемой адаптации, пополняют свой CRISPR за счёт спейсеров, идентичных небольшим «трофейным» участкам ДНК фага. Следовательно, спейсерные последовательности массива CRISPR — это память бактерии-хозяина о вирусных инфекциях и встречах с инородным генетическим материалом, напоминающая альбом сыщика, в котором на одинаковых листах прикреплены фотографии разных преступников [2–4].

В настоящее время строение локуса CRISPR представляется следующим образом. К локусу CRISPR примыкает лидерная последовательность (длиной до 550 п. н.), а также CRISPR-ассоциированные гены (*CAS*), кодирующие белки семейства Cas. Лидерная последовательность играет роль промотора, откуда начинается транскрипция массива CRISPR, т. е. «переписывание» последовательности на РНК. Кроме того, возможно, что лидерная последовательность узнаёт белки, участвующие во встраивании новых спейсеров: как новые участки ДНК от нападавших микроорганизмов, так и новые повторы обычно встраиваются на границе между ней и CRISPR. После расщепления ДНК фага или плазмиды «трофейный» фрагмент вставляется в локус CRISPR в качестве спейсера. Затем он будет использован как шаблон для создания малых молекул crРНК. С помощью комплексов crРНК и белка Cas9 бактерия защищается от инфекций.

Теперь рассмотрим более детально вклад Дж. Дудны и Э. Шарпантье в присуждение им Нобелевской премии [5]. Длинная молекула РНК, которая образуется после транскрипции CRISPR, разрезается на фрагменты. Они называются CRISPR РНК (crРНК), причём

каждый содержит спейсер и часть повтора. В этом процессе участвует небольшая РНК, комплементарная повторам, — tracrРНК: она необходима для точной работы белка Cas9 в комплексе с ферментом РНКазы III, катализирующим разрывы длинной молекулы двухцепочечной РНК. Затем РНКазы III отделяется, и организуется комплекс двух молекул crРНК и tracrРНК с белком Cas9. Белок Cas9 является дезоксирибонуклеазой. Белок Cas9 после связывания с tracrРНК за счёт изменения третичной структуры приобретает способность осуществлять двухцепочечные разрывы в молекуле ДНК.

Фермент РНКазы III и белок Cas9 распознают tracrРНК, комплементарную последовательностям повторов в цельной молекуле РНК-предшественника (pre-crРНК). Расщепление, вероятно, происходит в середине повтора. Образуются crРНК, каждая из 42 нуклеотидов: 22 «хвостовых» — остаток повтора, остальные 20 — уникальный спейсерный фрагмент, который помогает белку Cas9 искать чужеродную ДНК. Итак, комплекс crРНК/tracrРНК — Cas9 обеспечивает поиск и деградацию чужеродной ДНК в два этапа: 1) спейсерные участки crРНК находят комплементарные им участки чужеродной ДНК и приносят к ним активированные Cas-белки; 2) Cas-белки вызывают их расщепление и последующую деградацию. (Эта последовательность событий напоминает РНК-интерференцию.) Таким образом, crРНК выполняет роль проводника, направляющего нуклеазу к цели, за что она и получила своё другое название: «РНК-гид».

В описываемом процессе деградации чужеродной ДНК необходимо учесть возможность повреждения собственных генов бактерии. Для этого имеется механизм, согласно которому белки Cas узнают и затем деградируют опознанную РНК-гидом последовательность ДНК только при наличии после сайта-мишени короткой (от трёх до девяти нуклеотидов) последовательности PAM (protospacer adjacent motif) (рис. 2).

Широкое применение предложенного метода точного разрезания двухцепочечной ДНК основано на объединении tracrРНК и crРНК в одну цельную молекулу РНК, названную РНК-гидом, или sgРНК, от англ. single-guide RNA, и изобретения вектора для клонирования этой

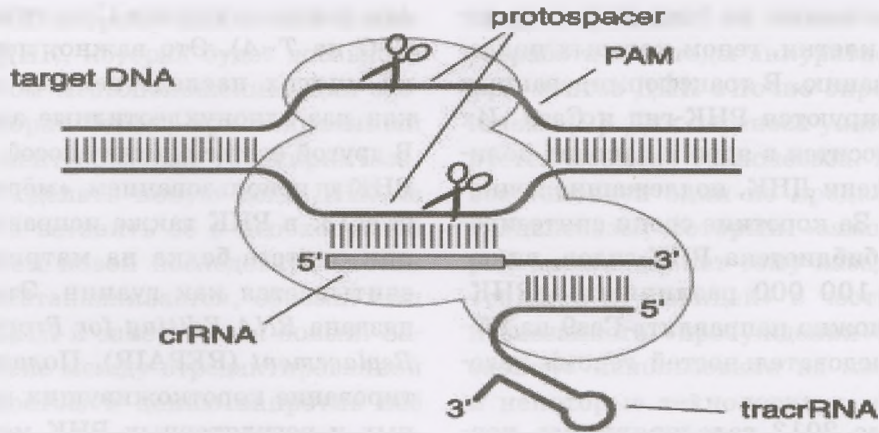


Рисунок 2 — Механизм точного разрезания двухцепочечной ДНК-мишени дезоксирибонуклеазой Cas9 [5]. Cas9 распознаёт мишень с помощью crРНК, которая удерживается в молекуле Cas9 благодаря посредничеству tracrРНК. Места разрезов обозначены ножницами. Фермент разрезает обе цепи ДНК

РНК. Оказалось, что такая синтетическая sgРНК образует комплекс с белком Cas9 так же, как tracrРНК и crРНК по отдельности. Эта синтетическая молекула находит комплементарные ДНК и правильно размещает Cas9 для их точного разрезания (рис. 3).

Создание различных sgРНК обеспечило развитие прорывных исследований в рамках проблемы редактирования геномов. Создаваемый фирмами-производителями фрагмент sgРНК должен быть комплементарен участку ДНК-мишени для точного разрезания с последующей направленной модификацией генов. После того как разрез в нужном месте сделан, клетка сама стремится его ликвидировать с помощью процесса, называемого репаративным синтезом ДНК.

В современной биотехнологии широко используется высокоточный генный скальпель,

состоящий из sgРНК и Cas9. Для этого применяют CRISPR-Cas9 клонирующий вектор, т. е. кольцевую молекулу ДНК, которая кодирует sgРНК и матричную РНК белка Cas9. Такие векторы предлагаются биотехнологическими фирмами для точной вставки с возможностью вставить в нужное место участок, комплементарный ДНК-мишени. В таком векторе, кроме кодирующих последовательностей, будут и управляющие, которые определяют начало транскрипции РНК. В коммерческий вектор вставляют изучаемую последовательность ДНК, и её внедряют в клетки специального лабораторного штамма кишечной палочки. В результате культивирования делящиеся клетки многократно копируют вектор (процесс молекулярного клонирования). Копируют, но «не читают», так как sgРНК и Cas9 в бактериальных клетках не синтезируются. После

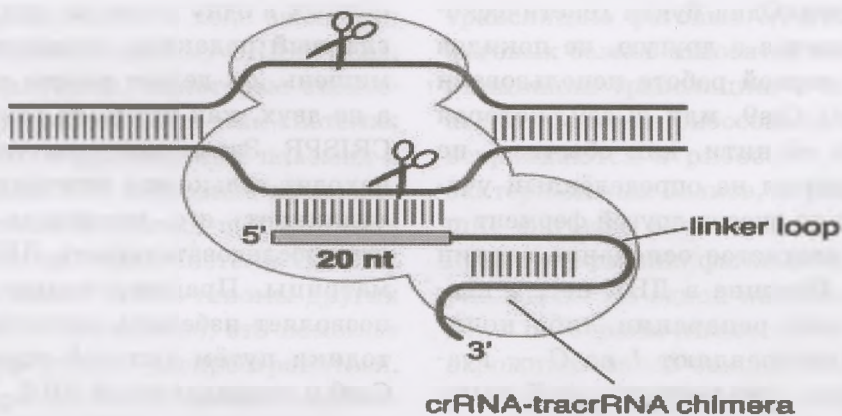


Рисунок 3 — Механизм точного разрезания двухцепочечной ДНК-мишени дезоксирибонуклеазой Cas9, регулируемым химерной РНК, состоящей из crРНК и tracrРНК [5]

этого вектор выделяют из бактерий и трансформируют им клетки, геном которых подлежит редактированию. В трансформированных клетках синтезируются РНК-гид и Cas9. Их комплекс переносится в ядро и находит полинуклеотидные цепи ДНК, подлежащие точному разрезанию. За короткие сроки синтезирована огромная библиотека РНК-гидов, включающая более 100 000 различных sgРНК. С её помощью можно направлять Cas9 на 85–95 % всех последовательностей генома человека.

Уже в начале 2013 года появились первые экспериментальные подтверждения, что CRISPR/Cas9 представляет собой жизнеспособную технологию, которая работает в дрожжах, у дрозофил, у круглых червей *Caenorhabditis elegans*, у рыбок данио-рерио, у растения резуховидки Таля. Удалось получить варианты Cas9 с особыми требованиями к PAM и обеспечить ингибирование экспрессии генов без их уничтожения. В основе технологии лежит четырёхстадийный процесс: целевая последовательность ДНК → направляющая РНК связывается с целевой последовательностью → фермент Cas9 связывается с направляющей РНК → фермент Cas9 разрезает обе цепи ДНК → разрез восстанавливается путём введения мутации.

В октябре 2017 года практически одновременно были опубликованы две статьи о двух новых модификациях метода CRISPR-Cas9. В отличие от классического метода они не предполагают разрезания нуклеиновой кислоты, не расщепляют дезоксирибофосфатные связи в цепях ДНК (или рибозофосфатные, в случае РНК), а исправляют азотистое основание нуклеотидов. Одна буква генетического кода превращается в другую, не покидая своего места. В первой работе использовали «мёртвую» (dead) Cas9, или dCas9, которая не разрезает обе её нити, как обычная, но точно так же садится на определённый участок. Модификацию вносит другой фермент — он превращает азотистое основание аденин (A) в инозин I. Инозина в ДНК нет, и клеточные механизмы репарации либо копирования ДНК переправляют I на G — гуанин. В итоге пара нуклеотидов A–T заменяется на G–C. Основания нуклеотидов в ДНК корректировали и раньше: в 2016 году была опубликована статья об инструменте

для замены цитозина C на тимин T (т. е. пары C–G на T–A). Это важно, поскольку причина многих наследственных заболеваний — как раз однонуклеотидные замены в геноме. В другой статье описан способ редактирования РНК с использованием «мёртвой» нуклеазы dCas13: в РНК также исправляется A на I, а при синтезе белка на матрице РНК инозин считывается как гуанин. Эта система была названа *RNA Editing for Programmable A to I Replacement* (REPAIR). Полагают, что редактирование короткоживущих молекул матричных и регуляторных РНК может быть более безопасным терапевтическим методом, чем редактирование ДНК [6; 7].

При использовании базового метода CRISPR-Cas9 «сломать ген» легко, но сложно его «починить». Химик Джордж Макдональд Чёрч (George McDonald Church), занимающийся в настоящее время воссозданием «шерстистых слономамонтов», публично заявил, что большинство систем CRISPR основаны на молекулярном комплексе, соединяющем направляющую РНК в определённом месте в геноме с ферментом Cas9, который разрезает обе нити ДНК. Когда клетка пытается восстановить соединение ДНК, её репарационный механизм может вводить или удалять нуклеотиды. Поэтому возможны негативные изменения в последовательностях цепей ДНК, которые приведут к генетически зависимым заболеваниям. Поэтому он считает двунитиевые разрывы ДНК «вандализмом». Праймированное редактирование было создано для устранения этого недостатка базового CRISPR-Cas9. Согласно этому методу главный редактор (*prime editor*, PE) содержит несколько ферментов, соединённых в одну длинную цепь. После того как главный редактор определит генетическую мишень, он делает разрез одной нити ДНК, а не двух, как это было раньше при работе с CRISPR. Затем ещё одна часть молекулы PE находит только что отсечённый конец ДНК и «удлиняет» его, производя отредактированную последовательность ДНК из имеющейся матрицы. Праймированное редактирование позволяет избежать недостатков базовой методики путём сильной модификации белка Cas9 и направляющей РНК. Изменённый Cas9 рассекает только одну часть двойной спирали вместо того, чтобы разрезать обе. Новый тип РНК-гида, названный «pegRNA», содержит

удлинённую РНК-матрицу для новой последовательности ДНК, которая будет добавлена в геном в целевом местоположении. Для этого требуется второй белок, присоединённый к Cas9, — фермент обратная транскриптаза, которая может сделать новую цепь ДНК из матрицы РНК и вставить её в необходимый сайт. С созданием новой последовательности ДНК клетка восстанавливается, обрезая старый фрагмент ДНК и запечатывая новый. Затем несоответствие между отредактированной последовательностью и цепью напротив неё устраняется внутриклеточными механизмами. В эксперименте были созданы, а затем исправлены мутации, которые вызывают серповидноклеточную анемию и болезнь Тея-Сакса, абerrации ДНК, которые предыдущие системы редактирования генома, такие как CRISPR, либо не могли исправить, либо делали это крайне неэффективно. Изменения произошли в большом проценте случаев и вызвали относительно небольшое количество нецелевых изменений. Показано, что предложенная технология «может исправить около 89 % известных патогенных генетических абerrаций в геноме человека» [8].

В 2017-м и 2019 годах были обнаружены Tn7-подобные транспозоны, встречающиеся в бактериальных геномах нитчатой цианобактерии *Scytonema hofmanni* и холерного вибриона, которые содержат тот или иной упрощённый вариант бактериальной системы CRISPR-Cas. Эти упрощённые варианты, судя по их нуклеотидным последовательностям, не умеют разрезать ДНК, но вполне способны находить протоспейсер и прикрепляться к нему. Филогенетический анализ показал, что Tn7-подобные транспозоны в ходе эволюции независимо приобретали систему CRISPR-Cas, заимствуя её у бактерий. Некоторые спейсеры, имеющиеся у транспозонов в их системах CRISPR, совпадают с фрагментами плазмид и других транспозонов. Это позволило предположить, что транспозонам удалось приспособить заимствованную у бактерий систему CRISPR для встраивания самих себя в геномы других геномных паразитов. Возможно, это помогает транспозонам эффективно распространяться. С её помощью транспозоны находят определённые места в чужой ДНК, чтобы встроиться в них. Это открывает перед геной инженерией новые заманчивые перспективы, показав

общий принцип, на основе которого можно разработать методы аккуратного встраивания фрагментов ДНК в точно определённые места генома [9]. Для переноса участков ДНК кодируется фермент транспозаза. В 1997 году был восстановлен один из предковых вариантов транспозазы, который «замолчал» в геноме рыб миллионы лет тому назад, и назвали его «спящей красавицей» в честь долгого «сна» и внезапного «пробуждения». «Спящую красавицу» использовали на клетках человека, и некоторые технологии с её применением дошли до 1–2-й фазы клинических испытаний. Создание системы редактирования геномов на основе CRISPR-Cas и транспозонов-транспозазы может существенно повысить точность и безопасность манипуляций с ДНК [10].

В некоторых геномах фагов нашли компоненты системы CRISPR-Cas, которую бактерии используют для борьбы с вирусами. Фаговая CRISPR-Cas отличалась от бактериальной, поскольку в ней был найден новый небольшой белок семейства Cas12. Его называли Cas $\emptyset$  (фи). Полагают, что обнаруженные бактериофаги запускают внутри клетки-хозяйки свою систему CRISPR-Cas, чтобы эффективнее уничтожать другие фаги, которые инфицируют ту же клетку. Огромные фаги не имеют собственного аппарата вставки новых спейсеров в локус CRISPR, а также ферментов, которые разрушают ДНК, комплементарно взаимодействующую с sgРНК. Для этих целей они заимствуют соответствующие ферменты у бактерии-хозяина. Многие белки огромных фагов служат для «переманивания» аппарата трансляции клетки-хозяина на трансляцию фаговых мРНК. К числу таких фаговых белков относятся некоторые факторы инициации трансляции, а также рибосомные белки. Фаговые рибосомные белки, вероятно, встраиваются в рибосомы бактерий вместо бактериальных белков, и рибосомы, содержащие фаговые белки, начинают трансляцию преимущественно фаговых мРНК, а не бактериальных. Но одной инициацией трансляции дело не ограничивается: в геномах многих огромных фагов закодированы собственные факторы элонгации трансляции, что, вероятно, повышает эффективность синтеза вирусных белков в ходе инфекции. Весьма вероятно, что нетипичные варианты CRISPR-Cas из

крупных бактериофагов лягут в основу новых средств редактирования генома [11]. Следует отметить, что чаще применяемыми являются системы с эндонуклеазами Cas9 и Cas12a, а также Cas12b из бактерии *Bacillus hisashii*, которые работают и в клетках человека. Фермент Cas12b меньше используемых ранее, поэтому его легче ввести в клетки с помощью вирусного вектора.

28 ноября 2018 года на научном симпозиуме в Гонконге Хэ Цзянькуй из Шэньчжэньского университета объявил о рождении двух детей, чей геном был отредактирован с помощью технологии CRISPR-Cas9. Цель эксперимента — создать у младенцев иммунитет к вирусу ВИЧ, носителем которого являлся их отец, для этого учёный пытался «отключить» у эмбрионов один единственный ген *CCR5*, ответственный за кодировку белка, который позволяет ВИЧ проникнуть в клетку. *CCR5* (C-C chemokine receptor type 5) — белок человека, кодированный данным геном, относится к подклассу рецепторов бета-хемокинов из класса интегральных белков. В феврале 2018 года проректор по научной работе РНИМУ им. Н. И. Пирогова Д. В. Ребриков и его коллеги опубликовали аналогичное исследование, в рамках которого были созданы устойчивые к ВИЧ эмбрионы [12]. В своём интервью Д. В. Ребриков отметил, что «Цзянькуй Хэ опередил всех, потому что никто до него не рискнул родить “ГМО-детей”. С научной точки зрения никаких фундаментальных прорывов не совершил. Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) применяется в медицине уже много лет, а с использованием технологии редактирования генома методом CRISPR только в 2017 году вышло более 3 тысяч научных публикаций. Чисто технически наша группа в России могла бы ещё в феврале 2018 года пересадить эмбрионы, и тогда наш генетически модифицированный ребёнок родился бы раньше». Но не сделала этого по этическим и правовым причинам. Целью данного исследования группы Д. В. Ребрикова была оптимизация системы CRISPR-Cas9 под создание гомозиготной 32-нуклеотидной делеции (аналогичной природному варианту *CCR5delta32*) в S-фазе зиготы человека. Для редактирования генома были использованы зиготы с аномальным числом

пронуклеусов (более двух), непригодные для ЭКО. 16 аномальных зигот от доноров с WT *CCR5* были инъецированы разработанной системой CRISPR-Cas9 в S-фазе. После инъекции зиготы помещали в культуральную среду Blastocyst и культивировали в течение 5 дней в CO<sub>2</sub>-инкубаторе до стадии бластоцисты (приблизительно 250 клеток). Для анализа эффективности редактирования генома 8 успешно развивавшихся эмбрионов были генотипированы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Из 16 зигот, инъецированных системой CRISPR-Cas9, лишь 8 достигли стадии бластоцисты. ПЦР-генотипирование показало отсутствие исходного варианта WT *CCR5* в 5 из 8 бластоцист. Дальнейшее развитие эмбрионов было прекращено из-за отсутствия разрешения на работы с человеческой зиготой.

Остановимся на некоторых экспериментально-вычислительных аспектах использования системы CRISPR-Cas. Группа исследователей под руководством М. Фуссенеггера создаёт биологический компьютер путём использования биологических компонентов для гибкого процессорного ядра, или центрального процессора (CPU), который можно программировать различными способами. Этот процессор основан на модифицированной системе CRISPR-Cas9. Он может работать с любым количеством данных на входе в виде молекул РНК (известных как РНК-проводники). Ядро процессора образуется специальной разновидностью белка Cas9. В ответ на сигнал на входе, поступающий от последовательностей РНК-проводников, центральный процессор регулирует экспрессию конкретного гена, из которого, в свою очередь, получается определённый белок. При таком подходе исследователи могут программировать схемы разного масштаба в клетках человека. Например, цифровые полусумматоры, состоящие из двух входов и двух выходов, складывающие два одноразрядных двоичных числа. Исследователи пошли ещё дальше — они создали биологический двухъядерный процессор, похожий на электронный, интегрировав в клетку два ядра. Для этого они использовали компоненты CRISPR-Cas9 из двух различных бактерий. Фактически был создан первый клеточный компьютер с несколькими процессорами. Этот биологический компьютер

крайне маленький, но теоретически может быть масштабирован до любого мыслимого размера: микроткань с миллиардами клеток, каждая из которых оснащена двухъядерным процессором. Такой «вычислительный орган» может достичь вычислительной мощности, намного превышающей мощность цифрового суперкомпьютера, используя лишь немного энергии, например «кусочек хлеба». С помощью клеточного компьютера можно будет оценивать биологические сигналы в организме (метаболом, протеом, транскриптом) [13].

Актуальной проблемой текущего времени является усовершенствование методологий диагностики вирусной патологии SARS-CoV-2 (*Severe acute respiratory syndrome related coronavirus*), ранее 2019-nCoV (2019 novel coronavirus) — оболочечный одноцепочный (+) РНК-вирус, относящийся к роду Betacoronaviruses. Вызывает опасное инфекционное заболевание — COVID-19. Весной 2020 года для диагностики инфицирования был предложен метод с использованием системы CRISPR-Cas: из мазка пациента быстро экстрагируют РНК и затем добавляют направляющую РНК, комплементарную к последовательностям вируса. Эта РНК связывается с вирусным геномом и активирует фермент группы Cas, который начинает резать вирусную РНК, а заодно и все молекулы одноцепочечной РНК, с которыми встречается. Если добавить в раствор молекулу РНК, связанную с красителем, то при расщеплении он будет высвобождаться и подавать цветовой сигнал о том, что вирус в пробе обнаружен [14]. Вся эта процедура занимала около часа — что быстрее, чем ПЦР в реальном времени, но ещё недостаточно быстро

для массовых тестирований, а главное — требует сложного оборудования и реагентов. Поэтому группа учёных под руководством Дж. Дудны занялась разработкой ещё более быстрого и простого теста на SARS-CoV-2. Исследователи создали десяток направляющих РНК (все они были комплементарны к разным участкам вирусного генома) и отобрали из них наиболее эффективно работающую пару. Система, в которой направляющих РНК стало две, позволила сразу решить несколько проблем.

Во-первых, каждая копия вирусной РНК запускает работу не одного фермента Cas13, а сразу нескольких. А это, в свою очередь, позволяет обойтись без предварительного копирования всей РНК в образце — сигнал и так оказывается достаточно сильным. В полной версии новый тест занимает полчаса, но уже по первым пяти минутам наблюдения учёным удалось однозначно определить, какие образцы положительны, а какие — отрицательны.

Во-вторых, теперь тест-система работает ещё точнее и не реагирует на РНК других вирусов: исследователи проверили её на нескольких родственных SARS-CoV-2 коронавирусах (в том числе MERS) и не получили сигнала. Чувствительность при этом осталась приемлемой — около сотни вирусных РНК на микролитр. Когда же учёные попробовали добавить в систему третью направляющую РНК, то чувствительность оказалась ещё выше — до 31 копии на микролитр.

В-третьих, теперь тест позволяет оценить не только наличие, но и количество вирусной РНК. Поскольку из метода исчез этап копирования РНК, то число копий РНК в образце

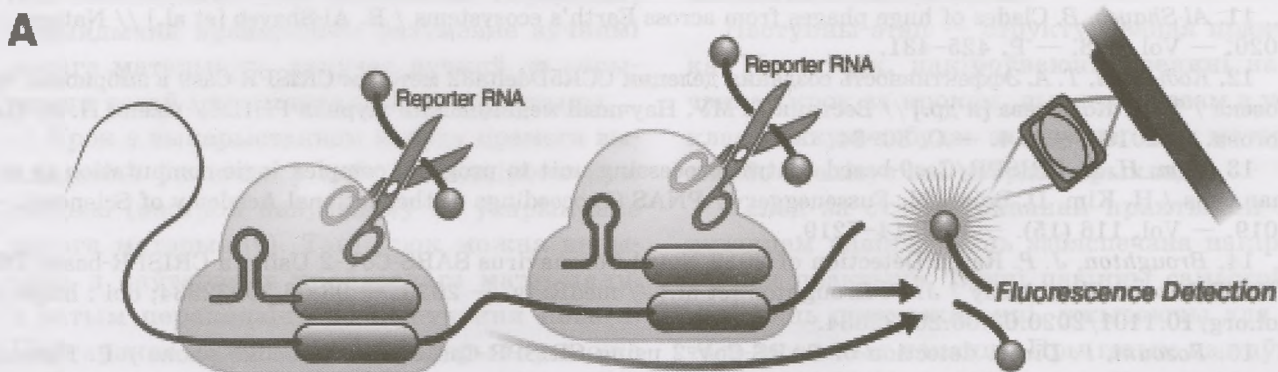


Рисунок 4 — Принцип работы теста на основе CRISPR/Cas с двумя направляющими РНК [15]

не мяняецца, і о нём можна судзіць па інтэнсіўнасці сігнала. Ісследователі пагаджаюцца, што такая тэхналогія могла б дапамагчы адслежваць развіццё захворвання ў асобных пацыентаў.

Наконец, у якасці дэтэктара ўчыныя іспользавалі камеру смартфона, на аснове якой сконструіравалі лазерны флуорэсцэнтны мікраскоп, дадаўшы крыніцу лазернага луча і фільтр. Оказалася, што чутлівасць камеры дастаткова, каб абыцца без громздых прыбораў і адрозніваць сігналы рознай інтэнсіўнасці з зразка.

Прапанаваны метад яшчэ доўгае час будзе заставацца актуальным: нават калі вакцына ад каранавіруса з'явіцца ў бліжэйшыя месяцы, пакуль няма ніякай гарантыі, што выклічаны ёю імунны адказ акажацца доўгасрочным, а значыць, заставацца патрэбнасць у масавым тэставанні,

каб адслежваць лакальныя выспышкі інфекцыі [15].

**Заклученне.** У арыкуле арыкладзены данныя аб мэтадылогіі рэдакціравання геномаў з дапамогай сістэмы CRISPR-Cas, за арыкрыццё якой у 2020 годзе Джэніфер Дудна і Эммануэль Шарпант'е былі ўдасцойены Нобелевскай прэміі па хіміі. Гэтая прэмія не была атнесена да прэміяў па біялогіі і медыцыне іза-а адсутствія рэгламентацыі па іспользаванню сістэмы CRISPR-Cas пры рабоце з зыготай чалавека на ўзроўне гасударства і Царквы. Тэхналогіі на аснове сістэмы CRISPR-Cas нашлі шырокае прымяненне пры рэдакціраванні геномаў многіх мадэльных арганізмаў пракарыот, эукарыот, многаклеточных арганізмаў, млекапітаючых і чалавека. Гэтая сістэма палажана ў аснове прэцызійных дыягнастычных сістэм і біялагічных камп'ютэраў.

#### Спісок іспользаваных крыніцаў

1. Чуркін, А. А. Сістэма імунітэта і здаровы образ жыцця / А. А. Чуркін // Біялогія і хімія. — 2020. — № 4 (82). — С. 3–16.
2. Lander, E. S. The Heroes of CRISPR / E. S. Lander // Cell. — 2016. — Vol. 164. — Issue 1–2. — P. 18–28.
3. Makarova, K. S. Evolution and classification of the CRISPR-Cas system / K. S. Makarova [et al.] // Nature reviews. Microbiology. — 2011. — Vol. 9. — № 6. — P. 467–477.
4. Mojica, F. J. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements / F. J. Mojica [et al.] // Journal of Molecular Evolution. — 2005. — Vol. 60. — № 2. — P. 174–182.
5. Jinek, M. A. Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity / M. Jinek [et al.] // Science. — 2012. — Vol. 337. — Issue 6096. — P. 816–821; National Academy of Sciences. — 2012. — Vol. — 109 (39). — P. E2579–E2586.
6. Gaudelli, N. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage / N. Gaudelli [et al.] // Nature. — 2017. — Vol. 551. — P. 464–471.
7. Cox, D. B. T. RNA editing with CRISPR-Cas13 / D. B. T. Cox [et al.] // Science. — 2017. — Vol. 358. — Issue 6366. — P. 1019–1027.
8. Anzalone, A. V. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA / A. V. Anzalone, P. B. Randolph, J. R. Davis // Nature. — 2019. — Vol. 576. — P. 149–157.
9. Klompe, S. E. Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration / S. E. Klompe [et al.] // Nature. — 2019. — Vol. 571. — P. 219–225.
10. Strecker, J. RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases / J. Strecker [et al.] // Science. — 2019. — Vol. 365. — Issue 6448. — P. 48–53.
11. Al-Shayeb, B. Clades of huge phages from across Earth's ecosystems / B. Al-Shayeb [et al.] // Nature. — 2020. — Vol. 578. — P. 425–431.
12. Кодылева, Т. А. Эффектыўнасць стварэння дэлецыі CCR5Delta32 мэтадам CRISPR-Cas9 ў эмбрыонах чалавека / Т. А. Кодылева [і др.] // Вестнік РГМУ. Наўчны медыцынскі журнал РНІМУ імені Н. І. Пірогава. — 2018. — № 4. — С. 80–84.
13. Kim, H. A. CRISPR/Cas9-based central processing unit to program complex logic computation in human cells / H. Kim, D. Bojar, M. Fussenegger // PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences). — 2019. — Vol. 116 (15). — P. 7214–7219.
14. Broughton, J. P. Rapid Detection of 2019 Novel Coronavirus SARS-CoV-2 Using a CRISPR-based DETECTR Lateral Flow Assay / J. P. Broughton [et al.] // medRxiv. — 2020. — 03.06.20032334; doi : <https://doi.org/10.1101/2020.03.06.20032334>.
15. Fozouni, P. Direct detection of SARS-CoV-2 using CRISPR-Cas13a and a mobile phone / P. Fozouni [et al.] // medRxiv. — 2020. — 09.28.20201947; doi : <https://doi.org/10.1101/2020.09.28.20201947>.

Стат'я паступіла ў рэдакцыю 11.01.2021.