

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) to narzędzie do edycji genów. Umożliwia precyzyjne modyfikacje DNA. Zostało odkryte jako część systemu odpornościowego bakterii [doudnaNewFrontierGenome2014].

Główne komponenty CRISPR:

- **Białko Cas9:**

- Enzym, który przecina DNA.
- Rozpoznaje specyficzne miejsca w genomie.
- Działa jak molekularne nożyczki [jinekProgrammableDualRNAGuidedDNA2012].

- **Przewodnik RNA (gRNA):**

- Krótki fragment RNA.
- Prowadzi białko Cas9 do docelowego DNA.
- Wiąże się z wybraną sekwencją DNA [jinekProgrammableDualRNAGuidedDNA2012].

Zastosowania CRISPR:

- Modyfikacja genów:

- Knock-out genów (wyłączenie funkcji genu).
- Wprowadzenie mutacji.
- Zmiana sekwencji DNA.

Przykłady zastosowań:

- Zwiększenie odporności roślin na suszę [montecilloCRISPRCas9SystemPlant2020].
- Poprawa cech rolniczych zwierząt.
- Terapia genowa u ludzi [doudnaNewFrontierGenome2014].

Projektowanie systemu CRISPR do edycji genów *Arabidopsis* z użyciem Biopythona

Cel:

- Nauczenie projektowania sekwencji gRNA do edycji genów.
- Wykorzystanie Biopython do edycji genów odporności na suszę w *Arabidopsis thaliana*.
- Zaprojektowanie gRNA do wyciszenia lub modyfikacji genu.

Wprowadzenie:

- *Arabidopsis thaliana* to modelowy organizm w badaniach roślinnych.
- CRISPR umożliwia modyfikację genów związanych z odpornością na suszę.
- W ćwiczeniu zaprojektujesz sekwencje gRNA do modyfikacji genów.

Krok 1: Przygotowanie środowiska

- Zainstaluj Biopython:

```
1 pip install biopython
```

- Załaduj sekwencje genów *Arabidopsis* do pliku `arabidopsis_genes.fasta`.

Krok 2: Analiza sekwencji genów

- Użyj Biopython do załadowania sekwencji genów.
- Identyfikuj miejsca docelowe CRISPR w sekwencjach genów.

Przykładowy kod:

```
1 from Bio import SeqIO
2 from Bio.Seq import Seq
3
4 # Załaduj sekwencje genów z pliku FASTA
5 def load_sequences(file_path):
6     return list(SeqIO.parse(file_path, "fasta"))
7
8 # Znajdź potencjalne sekwencje gRNA (20 nukleotydów + PAM "NGG")
9 def find_crispr_sites(sequence):
10    pam = "NGG"
11    sites = []
12    for i in range(len(sequence) - 23):
13        target = sequence[i:i+20]
14        pam_site = sequence[i+20:i+23]
15        if pam_site.endswith("GG"):
16            sites.append(target + pam_site)
17    return sites
18
19 # Przykład użycia
20 genes = load_sequences("arabidopsis_genes.fasta")
21 for gene in genes:
22     print(f"Gene ID: {gene.id}")
23     crispr_sites = find_crispr_sites(str(gene.seq))
24     print(f"Potential CRISPR sites: {crispr_sites[:5]}") # wyświetl tylko 5 pierwszych
```

Krok 3: Projektowanie sekwencji gRNA

- Wyszukaj potencjalne sekwencje gRNA w sekwencjach genów.
- Zidentyfikuj najbardziej odpowiednie miejsca do modyfikacji.

Krok 4: Analiza wydajności i specyficzności gRNA

- Upewnij się, że gRNA nie ma niepożądanych miejsc docelowych w genomie.
- Użyj dodatkowych algorytmów do oceny specyficzności.

Zadanie:

- Znajdź potencjalne miejsca CRISPR w jednym z wybranych genów.
- Wybierz najlepsze gRNA do edycji genu.
- Zapisz wyniki w pliku `selected_grnas.txt`.

Przykład formatu pliku wynikowego:

```
Gene ID: AT3G02990  
Selected gRNA: ACTGACTGACTGACTGACTGGG (pos: 150-170)
```

Dodatkowe wyzwania:

- Zintegruj narzędzia Biopythona do analizy specyficzności gRNA w całym genomie *Arabidopsis*.
- Zaprojektuj gRNA do edycji wielu genów jednocześnie.

Podsumowanie:

- Poznasz, jak używać narzędzi bioinformatycznych do projektowania gRNA.
- Nauczysz się, jak zwiększać odporność roślin na stresy środowiskowe.

Referencje:

- Biopython Tutorial and Cookbook
- Zhang, H. et al. (2019). *Genome editing in plants using CRISPR-Cas9*. Nature Reviews Genetics, 20(12), 769-788.