

**Автономная некоммерческая общеобразовательная
организация "Физтех-лицей"
(АНОО «Физтех-лицей» им. П.Л. Капицы)**

XX научно-практическая конференция

«Старт в инновации»

**Разработка эффективного метода
получения таксола**

Выполнили:

Валялов Даниил 9А
Иванов Илья 10Г
Артем Саверчук 10Г

Руководитель:

Зверева С.Д

Московская область, г. Долгопрудный

2021 г.

Оглавление	
Введение.....	3
1. Литературный обзор.....	4
1.1. Описание механизма действия таксола.....	4
1.2. Методы производства таксола и их усовершенствование.....	4
1.3. Пути химического синтеза.....	4
1.4. Рак и сфера применения таксола.....	4
2. Практическая часть.....	5
2.1. Общий план эксперимента.....	5
2.2.Методики молекулярной биологии.....	5
2.2.1. ПЦР – полимеразная реакция.....	5
2.2.2. Электрофорез нуклеиновых кислот.....	6
2.2.3.Crispr/Cas9.....	6
2.2.4. Культивирование суспензионной культуры растительных клеток.....	6
2.3. Протоколы экспериментов.....	7
Вывод.....	12
Список литературы.....	13
Приложения.....	14

Введение

В настоящее время особенно актуален вопрос о борьбе с такими неизлечимыми заболеваниями как рак, ВИЧ и т.д. Для этого необходимо разрабатывать и тестировать новые лекарственные средства, а также оптимизировать и удешевлять производство старых, надежных методов. Наша работа направлена на поиск наиболее доступного метода синтеза таксола - одного из наиболее эффективных в настоящее время противораковых лекарств. Существующие способы получения таксола (будут подробнее описаны далее) не всегда способны удовлетворить возрастающую потребность в этом веществе, поэтому мы решили разработать альтернативу. Одно из лучших решений в данном случае - вырастить суспензионную культуру клеток тиса ягодного и отрегулировать экспрессию генов [8], участвующих в биосинтезе таксола, чтобы увеличить количество получаемого вещества. Однако существует сложность с получением больших количеств таксола в растительной культуре: он оказывает цитотоксическое влияние на сами растительные клетки [6], а значит требует особых механизмов синтеза и транспорта. Но один из химических предшественников таксола в пути его биосинтеза - 10-деацетилбаккатин 3 - не обладает цитотоксической активностью и может быть использован для последующего получения таксола. Таким образом, необходимо остановить синтез таксола на данном предшественнике. В дальнейшем, для получения самого таксола из 10-деацетилбаккатина-3, будут применены различные методы химического синтеза, описанные в работе.

Область исследования: молекулярная биология

Цель работы: создать удобный и производительный путь получения таксола с помощью модифицированной клеточной культуры и химического семи-синтеза

Задачи:

1. Изучить пути биосинтеза таксола.
2. Выбрать целевой ген, нокаутирование которого прервет путь биосинтеза таксола на одном из его предшественников.
3. Подобрать праймеры для наработки целевого гена.
4. Поставить ПЦР на ДНК растения тиса ягодного, используя праймеры из п.3
5. Отсеквенировать полученный фрагмент.
6. Подобрать гидовые РНК для Crispr/Cas9 и собрать генетическую конструкцию.
7. Вырастить клеточную культуру тиса ягодного и модифицировать при помощи Crispr/Cas9.
8. Выделить из культуры клеток 10-деацетилбаккатин-3 и превратить в таксол путём семисинтеза.
9. Оценить результат.

1. Литературный обзор

1.1. Описание механизма действия таксола

Таксол (паклитаксел), высокоокисленный дитерпеноидный природный продукт, впервые выделенный из тиса тихоокеанского, возможно, является одним из самых успешных противораковых препаратов всех времен. Ограниченные поставки таксола и родственных соединений сделали фармацевтическую разработку серьезной проблемой. Поэтому вскоре после того, как был обнаружен его уникальный способ действия, был начат обширный поиск альтернативных источников, потому что тихоокеанский тис растет медленно и редко. Механизм действия таксола основан на стимулировании синтеза микротрубочек из димеров тубулина и стабилизации микротрубочек за счет подавления деполимеризации, что приводит к подавлению нормального процесса динамической реорганизации сети микротрубочек, который важен для клеточных функций на этапе митоза и интерфазы клеточного цикла. Кроме того, паклитаксел индуцирует образование аномальных скоплений или «связок» микротрубочек на протяжении клеточного цикла и вызывает образование множественных звёзд микротрубочек во время митоза. Тем самым, применение препарата приводит к ингибированию развития и метастазирования раковой опухоли

1.2. Методы производства таксола и их усовершенствование:

Существующие способы синтеза таксола основаны на экстракции из растений рода тис или же на частичном воспроизводстве путей биосинтеза таксола в генетически модифицированных колониях *E. Coli* [4], но не всегда они достигают достаточной эффективности. При этом таксол можно получать химическим путём из 10-деацетилбаккатина-3, который можно в больших количествах производить при помощи генетически модифицированной культуры каллусных клеток. Для того чтобы совершить такую модификацию, мы изучили механизм биосинтеза таксола (см. Приложения №2,3) и выбрали ген, который необходимо нокаутить - *10-deacetylbaecatin III-10-O-acetyl transferase*. Именно белок, который он кодирует, катализирует превращение 10-деацетилбаккатина-3 в таксол. При нокауте этого гена и, возможно, некоторой регуляции профиля экспрессии остальных генов, участвующих в биосинтезе таксола [8] мы получим культуру растительных клеток, играющую роль 'биофабрики сырья' для производства таксола. При этом не стоит забывать о следующем шаге - химической обработке 10-деацетилбаккатина-3 с целью превращения в паклитаксел. Нами было найдено 2 способа синтеза таксола из 10-DAB (10-деацетилбаккатина-3)

1.3. Пути химического синтеза:

1) 10-DAB => 7-triethylsilyl-10-DAB => 7-triethylsilylbaccatin III => protected Taxol derivative => Taxol (выход примерно равен 80%) [1]

2) 10-DAB => (100%) baccatin III => 7-Triethylsilyl baccatin => taxol side-chain protected => Taxol (выход примерно равен 58%) [5]

1.4. Рак и сфера применения таксола:

Раковые опухоли - злокачественные опухоли, возникающие в результате злокачественной трансформации нормальных клеток, которые начинают бесконтрольное размножение и теряют способность к апоптозу.

Среди основных показаний к применению таксола в качестве лекарства первой линии — такие серьезные заболевания, как рак яичников, молочной железы, лёгкого

(особенно его немелкоклеточная разновидность), шейки матки, поджелудочной железы, саркома Капоши.

2. Практическая часть:

2.1. Общий план эксперимента: Перед началом работы мы составили общий план эксперимента и разделили его на 2 этапа. Разделение было произведено с учетом предполагаемых масштабов работы, которая не может быть выполнена полностью за один год даже по самым оптимистичным прогнозам.

В первой серии опытов нам необходимо:

1. Ввести в культуру *in vitro* ягодный тис и получить каллусную ткань для дальнейшей работы по модификации генома.
2. Выделить ДНК *Taxus baccata*, амплифицировать целевой ген с помощью подобранных нами праймеров и отсеквенировать ген для уточнения нуклеотидной последовательности и сравнения ее с последовательностями, представленными в базах данных.
3. На основании полученной нами нуклеотидной последовательности произвести дизайн гидовых РНК, необходимых для нокаутирования целевого гена с помощью технологии CRISPR/Cas9.
4. Создать конструкции для доставки инструментов редактирования в клетки ягодного тиса.
5. Произвести модификацию растительных клеток и получить суспензионную культуру, нокаутированную по гену *10-deacetylbaecatin III-10-O-acetyl transferase*.

Во второй серии опытов мы планируем произвести 10-деацетилбаккатин-3 при помощи модифицированной культуры клеток, химическим путем синтезировать таксол и оценить общий выход синтеза, тем самым подведя итоги работы.

2. 2. Методики исследования:

2.2.1. ПЦР - полимеразная цепная реакция. Цель ПЦР заключается в значительном увеличении концентрации определенных фрагментов ДНК, называемых ампликонами, в реакционной смеси.

Чтобы этого добиться нужно иметь в своем распоряжении два праймера, каждый из которых будет гибридизоваться с одной из цепей на противоположных концах подлежащего амплификации фрагмента ДНК, достаточное количество дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и фермент ДНК-полимеразу. Праймер синтезируют, а полимеразу получают из термофильных бактерий.

ПЦР включает в себя несколько этапов:

- На первом этапе реакционную смесь нагревают до 95°C, это необходимо чтобы двухцепочечная молекула ДНК денатурировалась, то есть распалась на две одноцепочечные.
- Далее следует понижение температуры и отжиг праймеров, важно чтобы температуры отжига последних не слишком разнились, иначе один из них может только начать присоединяться, в то время как второй слетит с цепи.
- После отжига праймеров молекулы полимеразы при определенной температуре наращивают комплементарные цепи ДНК. Этот процесс называется элонгация.

Эти этапы обычно повторяются 20-35 раз.

Далее происходит финальная достройка цепей и переход к этапу хранения при низких температурах.

Все процессы, связанные с изменениями температуры автоматизированны и проводятся в программируемом термостате-амплификаторе.

2.2.2. Для выделения фрагментов ДНК различной длины используется электрофорез.

Электрофорез - это метод разделения макромолекул — белков и нуклеиновых кислот путем перемещения их в гелеобразной среде под действием внешнего электрического поля. Существует множество разновидностей этого метода, но в нашей работе был использован именно фрез нуклеиновых кислот.

Для использования данного метода необходимо приготовить агарозный гель. Гель содержит полисахарида-агарозу, которая играет роль желирующего агента, и, в зависимости от ее концентрации, может иметь разную плотность.

Плотность геля варьируется в зависимости от длин целевых фрагментов.

Гель состоит из ТАЕ-буфера, бромистого этидия (который способен встраиваться в цепь ДНК и флуоресцировать под ультрафиолетом) и, собственно, агарозы.

Процесс приготовления прост: сначала на весах отвешивают необходимое количество агарозы и пересыпают в коническую колбу, после чего, доливают буфер до нужного объема, далее смесь следует довести до кипения в СВЧ печи, дождаться растворения агарозы и добавить бромистый этидий.

Смесь тонким слоем наливают в специальные пластмассовые формы с гребенками, образующими впоследствии лунки для размещения в геле образцов.

После застывания агарозного геля его помещают в фрезную камеру, она представляет из себя емкость с двумя электродами, заполненную все тем же ТАЕ-буфером.

В образованные гребенками лунки, с помощью автоматического дозатора помещают пробы с добавленным в них красителем, который нужен нужен для визуализации прозрачного раствора с целевым фрагментом.

На электроды подаётся постоянный ток и, так как молекулы ДНК отрицательно заряжены, они стремятся отдать электроны и продвигаются в сторону положительно заряженного электрода (поэтому важно правильно разместить агарозный гель в камере).

2.2.3. Crispr/Cas9 система - технология редактирования геномов высших организмов, базирующаяся на иммунной системе бактерий. Белок Cas9 используется в генной инженерии для создания точечных разрывов в двойной цепи ДНК с целью инактивации генов или проведению вставок в геном. Для специфичности места внесения разрыва необходима так называемая “гидовая РНК”, комплементарная целевому участку. Стоит заметить, что модификация произойдет только при наличии PAM - последовательности рядом с местом внесения разрыва. Классической PAM-последовательностью является NGG (то есть любой нуклеотид и следующие после него два гуанина).

2.2.4. Культивирование суспензионной культуры растительных клеток - Метод приготовления среды и выращивания на ней культуры растительных клеток

2.3. Протоколы экспериментов

Далее прилагаем лабораторный журнал, содержащий описание проведенных на данный момент опытов.

Протоколы экспериментов:

Эксперимент 1. Выделение ДНК из Тиса ягодного

Цель эксперимента: собрать ДНК-материал для дальнейших опытов

Методики: выделение ДНК из растительных клеток

Реактивы: Nuclei Lysis Solution, жидкий азот, RNase, protein precipitation solution, изопропанол, этиловый спирт

Оборудование: эппендорфы, колонки, штативы для эппендорфов, центрифуга, вортекс, спектрофотометр, термостат, автоматические дозаторы.

Ожидаемый результат: генетический материал для дальнейших исследований

Протокол эксперимента:

1. Набрать жидкого азота в термос.
2. Взять листья тиса ягодного (2 эппендорфа по 2 листа в каждый).
3. Заморозить эппендорфы в жидком азоте ~ 30с.
4. Истолочь замороженные листья до состояния порошка.
5. Добавить Nucl. Lis. Sol. 300 мкл
6. Инкубировать при 65 градусов по Цельсию 15 минут.
7. Охладить до 37 градусов по Цельсию.
8. Добавить 3 мкл RNase инкубировать 15'.
9. Добавить 100 мкл protein precipitation solution.
10. Инкубировать 5 минут на столе.
11. Центрифугировать 5 минут при 13.4 тысяч оборотов в минуту.
12. Слить все кроме осадка в новый эппендорф (1.5 мл)
13. Добавить 500 мкл изопропанола.
14. Центрифугировать 10 минут при 13.4 тысяч оборотов в минуту.
15. Осторожно слить изопропанол.
16. Залить осадок 70% EtOH 600 мкл.
17. Центрифугировать 5 минут на максимальных оборотах.
18. Высушить осадок.
19. Добавить 100 мкл элюирующего буфера
20. Оценить концентрацию ДНК на спектрофотометре

Результаты: две пробирки с растворами ДНК (с концентрациями 8 нг/мкл и 30 нг/мкл)

Эксперимент 2. Приготовление питательной среды

Цель эксперимента: приготовить питательную среду для культивирования каллусной культуры клеток тиса ягодного

Методики: приготовление питательных сред

Реактивы: сухая смесь компонентов среды Мурасиге-Скуга (4.4 г/л), Гидролизат казеина (500 мг/л), PVP (1 г/л), Сахароза (30 г/л), 2.4D (2 мг/л), Агар (6 г/л, 0.6%), dH₂O 1л,

Оборудование: автоклав, весы, мерный цилиндр.

Ожидаемый результат: стерильная твердая питательная среда для выращивания каллусной ткани

Протокол эксперимента:

1. Взвесить необходимые компоненты и поместить их в стеклянную банку с закручивающейся крышкой.
2. Добавить в банку 1 л дистиллированной воды.
3. Неплотно закрутить крышку.
4. Автоклавировать при давлении 2 атмосферы и температуре примерно 130°C в течение 40 минут.

Результаты: 1 литр твердой питательной среды

Эксперимент 3. Получение каллусной культуры

Цель эксперимента: получить каллусную культуру тиса ягодного для дальнейшей модификации растительных клеток

Методики: посадка каллусной культуры на среду

Реактивы: парафин, Доместос (10%), dH₂O, растение (тис ягодный)

Оборудование: пинцет, скальпель, спиртовка, ламинар, чашка Петри

Ожидаемый результат: чашки Петри с каллусом тиса ягодного

Протокол эксперимента:

1. Отрезать кусочек растения (верхушку побега ~1 см).
2. Выдержать экспланты в 10% растворе Доместоса в течение 10 мин. для их стерилизации.
3. Промыть экспланты стерильной дистиллированной водой для удаления Доместоса 5 раз.
4. От кусочка растения прокаленным стерильным скальпелем и пинцетом отделить листья и части стебля, сделать на них надрезы и положить на среду в чашки Петри.
5. Замотать парафином чашки Петри
6. Чашки петри с эксплантами выращивать при 24С
7. При признаках активного каллусогенеза отсадить каллус от эксплантов

Результаты: Чашки петри с каллусом тиса ягодного

Эксперимент 4. ПЦР для наработки целевого гена

Цель эксперимента: наработка целевого гена для его дальнейшего секвенирования

Методики: ПЦР, электрофорез нуклеиновых кислот

Реактивы:

Три пары праймеров:

№	Форвард/Реверс	Ожидаемая длина продукта	Температура отжига
1	F GGCAGGGTCGACAGAATCTG R CGGGGGCATGAACGATAGGA	1255	F 62.5C R 62.5C
2	F CAGCCATCGCCCAAAGCTTTCC R CCATCGGGGTATTCTTGGGAGG	1169	F 65.8C R 66.6C
3	F ATTCGGCAGGCTCTCTCCAAGG	953	F 65.8C

R ACATTATCTGCATGTCCCCACCCA	R 65.2C
----------------------------	---------

PCR Mix (3 мкл), DNA (3 мкл), forward и reverse праймеры (по 0, 5 мкл), H₂O (8 мкл), агарозный гель

Оборудование: амплификатор, эппендорфы, штативы, автоматические дозаторы, форезная камера

Ожидаемый результат: продукт ПЦР с большим количеством целевого гена для секвенирования

Протокол эксперимента:

1. Приготовить ПЦР-смесь с использованием вышеуказанных реактивов
2. Задать программу для амплификатора:
 - T0 95C 3'
 - T1 95C 30'' |
 - T2 56C 30'' | 32 цикла
 - T3 72C 30' |
 - T4 72C 2'
 - T5 12C ∞
3. Поместить пробирки в амплификатор и запустить программу.
4. Провести электрофорез для оценки результата

Результаты (см. Форез №1 в приложениях):

Примечание: В результате эксперимента обнаружилось, что продукт даёт только вторая пара праймеров (правда, в небольших количествах), для первой и третьей пары праймеров ПЦР продукт не был детектирован.

Эксперимент 5. Повторная ПЦР

Цель эксперимента: наработка целевого гена для его дальнейшего секвенирования

Методики: ПЦР, электрофорез нуклеиновых кислот

Реактивы: 3 пары праймеров (те же, что и в предыдущем опыте); NEB PCR Q5 Mix (7.5 мкл), DNA (3 мкл), H₂O (8 мкл), по 0,5 мкл forward и reverse праймеров

Оборудование: амплификатор, эппендорфы, штативы, автоматические дозаторы, форезная камера

Протокол эксперимента (повтор ПЦР с другим миксом, содержащим более точную и производительную Q5-полимеразу и с другой температурой отжига):

1. Задать программу для амплификатора:
 - T0 98C 3'
 - T1 98C 30'' |
 - T2 65C 30'' | 30 циклов
 - T3 72C 30' |
 - T4 72C 2'
 - T5 4C ∞
2. Поместить пробирки в амплификатор и запустить
3. Провести электрофорез для оценки результата

Результаты (см. Форез №2 в приложениях):

Продукт дают вторая и третья пары праймеров. В результате оценки было принято решение использовать продукт, полученный при помощи пары праймеров №3.

Эксперимент 6 (В стадии разработки). Применение технологии Crispr/Cas9

Примечание: для подборки гидовых РНК будет использована последовательность, полученная в результате секвенирования ПЦР-продукта из эксперимента №5 и онлайн-инструмент, позволяющий автоматически генерировать и оценивать гидовые РНК ([WU-CRISPR](#))

Цель эксперимента: Нокаутировать ген *10-deacetylbaecatin III-10-O-acetyl transferase* для остановки пути биосинтеза таксола на 10-деацетилбаккатине-3

Реактивы: плаزمида pSL1180, содержащая нуклеазу Cas9 и гидовые РНК, среда В, среда С, среда Е, среда F, среда G, раствор для плазмолиза, промывочный раствор, раствор полиэтиленгликоля, Floating solution, Releasing solution

Оборудование: скальпель, чашки Петри, парафильм, стерильные фильтры, центрифужные пробирки, эппендорфы, автоматические дозаторы, пипетка Пастера, пинцет, термостат

Протокол эксперимента [7]:

1. Каллус разрезать на кусочки (1-2 мм) с помощью стерильного лезвия в стеклянной чашке Петри, содержащей несколько мл среды В, и собрать в свежую пластиковую чашку Петри, содержащую 10 мл среды В.
2. Среду В удалить, инкубировать срезы в 20 мл раствора для плазмолиза в течение 30 мин, чашку Петри необходимо держать накрытой алюминиевой фольгой при комнатной температуре.
3. Раствор для плазмолиза удалить и заменить 25 мл среды С, чашку Петри замотать парафильмом, обернуть алюминиевой фольгой и инкубировать в течение ночи при 25 ° С без встряхивания.
4. На следующий день чашку Петри инкубировать в течение 10 мин при комнатной температуре при очень осторожном встряхивании; раствор станет зеленым из-за высвободившихся протопластов.
5. Два стерильных фильтра 100 мкм и 70 мкм установить вместе в пробирку на 50 мл, предварительно смочив 5 мл промывочного раствора. Раствор, содержащий высвободившиеся протопласты, осторожно отсосать пипеткой и пропустить через фильтры, оставшиеся протопласты смыть с фильтров, используя другие 5 мл промывочного раствора
6. Суспензию просеянных протопластов перенести в стерильные центрифужные пробирки на 15 мл (8 мл на пробирку), заполнить пробирки до 15 мл дополнительным промывочным раствором. Центрифугировать суспензию при

50g в течение 5 мин. Затем удалить супернатант, а протопласты осторожно ресуспендировать в 2 мл промывочного раствора.

7. Приготовить свежие стерильные центрифужные пробирки на 15 мл, каждая из которых содержит 6 мл раствора сахарозы, и сверху с помощью стерильной пипетки Пастера медленно нанести максимум 6 мл ресуспендированных протопластов, следя за тем, чтобы граница раздела не нарушалась. Затем центрифугировать пробирки при 50g в течение 15 мин, на границе раздела двух растворов должна появиться толстая темная полоса протопластов.
8. Приготовить свежую стерильную центрифужную пробирку на 15 мл, содержащую 3 мл буфера для трансформации 1. Используя пипетку с острым кончиком, плавающие протопласты аккуратно перенести в пробирку. Небольшое количество (10-20 мкл) протопластов используют для количественной оценки плотности (протопластов / мл) с помощью гемоцитометра; протопласты в буфере трансформации 1 хранят при 4 ° C в темноте.
9. Центрифугировать протопласты при 50g в течение 10 минут, удалить супернатант и осторожно ресуспендировать протопласты в буфере трансформации 2 в концентрации $1,6 \times 10^6$ (протопластов/мл)
10. Приготовить свежие стерильные центрифужные пробирки на 15 мл для каждой трансфекции или контроля (т.е. PEG + / pDNA +; PEG + / pDNA -; PEG - / pDNA -). Около 10 мкг плазмидной ДНК (от 10 мкл до 20 мкл) внести в каждую пробирку с последующим внесением 100 мкл протопластов в буфере для трансформации 2 (приблизительно 160 000 протопластов).
11. Объем от 110 мкл до 120 мкл раствора полиэтиленгликоля, в соответствии с объемом используемой плазмидной ДНК, осторожно добавить в каждую пробирку (пробирки осторожно встряхивают до и после добавления раствора ПЭГ). Образцы инкубировать при комнатной температуре в течение 3 мин.
12. Остановить реакцию трансфекции, осторожно добавляя 5 мл промывочного раствора в каждую пробирку, а затем центрифугировать при 50g в течение 5 мин.
13. Удалить супернатант, а трансфицированные протопласты или контроли осторожно ресуспендировать в 1 мл среды E. Добавить такой же объем раствора альгината, чтобы получить концентрацию 8×10^4 (протопластов / мл).
14. Два раствора осторожно перемешать, переворачивая пробирки, и перенести раствор аликвотами (обычно 4 больших капли) на поверхность твердого агара для закрепления. Капли оставляют при комнатной температуре максимум на 2 часа, чтобы альгинат затвердел.
15. Затем, с помощью 2-3 мл Floating solution, альгинатную линзу отделить от поверхности агара и переместить в новые чашки Петри, содержащие 10 мл

среды E. Чашки Петри запечатать парафильмом, покрыть алюминиевой фольгой и инкубировать при 25 ° C в течение 3 дней.

16. Через 3 дня постепенно увеличивают свет, заменяя алюминиевую фольгу белой бумажной фольгой. Как только протопластные мини-каллусы становятся видимыми невооруженным глазом (обычно через 3 недели), среду E заменить 10 мл среды F, и на этом этапе каллусы подвергаются полному освещению (свежая среда F предоставляется каждую неделю).
17. После 4-6 недель пребывания в среде F каллусы высвобождаются из альгинатных капель с добавлением 5 мл Releasing solution и инкубируются не более 10 мин; можно осторожно использовать щипцы для облегчения высвобождения. Releasing solution осторожно аспирируют и каллусы промывают 10 мл среды F, высвободившиеся каллусы затем инкубируют в 10 мл среды G в течение других 4-6 недель (свежая среда G предоставляется каждую неделю).

Ожидаемые результаты: Чашки петри с модифицированной культурой растительных клеток

Вывод

Работа была разделена на 2 этапа: проведение экспериментов с целью выращивания и модификации(при помощи Crispr/Cas системы) клеток каллуса тиса ягодного, химический синтез паклитаксела одним из предложенных путей и оценка выхода целевого вещества. На данный момент выполнен первый этап.

Мы планируем продолжать работу над проектом. И, по самой благоприятной оценке, получить конкурентоспособный коммерческий продукт, который поможет сделать данное противораковое лекарство (паклитаксел) доступнее по всему миру. Но даже в ином случае, работа имеет ценность с научно-исследовательской точки зрения, так как вносит свой вклад в борьбу с одним из наиболее трудноизлечимых заболеваний современности.

Список литературы:

1. Erkan Baloglu, Dr. David G. I. Kingston, Dr. Michael A. Calter, Dr. Paul A. Deck. 'A New Synthesis of Taxol® from Baccatin III'

Режим доступа:

<https://vtechworks.lib.vt.edu/bitstream/handle/10919/36930/thesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Название ресурса: VTechWorks

Дата обращения: Декабрь 2020 года

2. Kasidet Hiranniramol, Yuhao Chen, Weijun Liu, Xiaowei Wang. 'Generalizable sgRNA design for improved CRISPR/Cas9 editing efficiency'

Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31971562/>

Название ресурса: PubMed

Дата обращения: Декабрь 2020 года

3. Benedikt Engels, Pia Dahm, Stefan Jennewein. 'Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production'

Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18485776/>

Название ресурса: PubMed

Дата обращения: Декабрь 2020 года

4. Kevin Walker, Rodney Croteau. 'Molecular cloning of a 10-deacetylbaaccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*'
Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC15373/>

Название ресурса: ncbi

Дата обращения: Декабрь 2020 года

5. Radomir Saicic, Radomir Matovic, Živorad Čeković. 'Semisynthesis of Taxol®: An improved procedure for the isolation of 10-deacetylbaaccatin III'

Режим доступа:

https://www.researchgate.net/publication/26403864_Semisynthesis_of_TaxolR_An_improved_procedure_for_the_isolation_of_10-deacetylbaaccatin_III

Название ресурса: ResearchGate

Дата обращения: Декабрь 2020 года

6. S.M.Soliman, N.Raizada. 'Sites of biosynthesis and storage of Taxol in *Taxus media* (Rehder) plants: Mechanism of accumulation'

Режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942220300224>

Название ресурса: ScienceDirect

Дата обращения: Декабрь 2020 года

7. Alessandro Nicolia, Estelle Proux-Wéra, Inger Åhman, Nawaporn Onkokesung, Mariette Andersson, Erik Andreasson, Li-Hua Zhu. 'Targeted gene mutation in tetraploid potato through transient TALEN expression in protoplasts'

Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25848989/>

Название ресурса: PubMed

Дата обращения: Декабрь 2020 года

8. Ying Chen, Meng Zhang, Xiaofei Jin, Haoran Tao, Yamin Wang, Bo Peng, Chunhua Fu & Longjiang Yu. 'Transcriptional reprogramming strategies and miRNA-mediated regulation networks of *Taxus media* induced into callus cells from tissues'

Режим доступа:

<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-020-6576-2>

Название ресурса: BMC Genomics

Дата обращения: Декабрь 2020 года

9. Nathan Wong , Weijun Liu, Xiaowei Wang. 'WU-CRISPR: characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system'

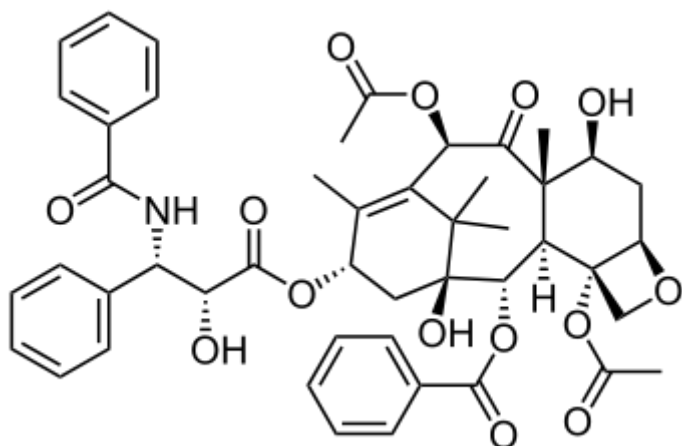
Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26521937/>

Название ресурса: PubMed

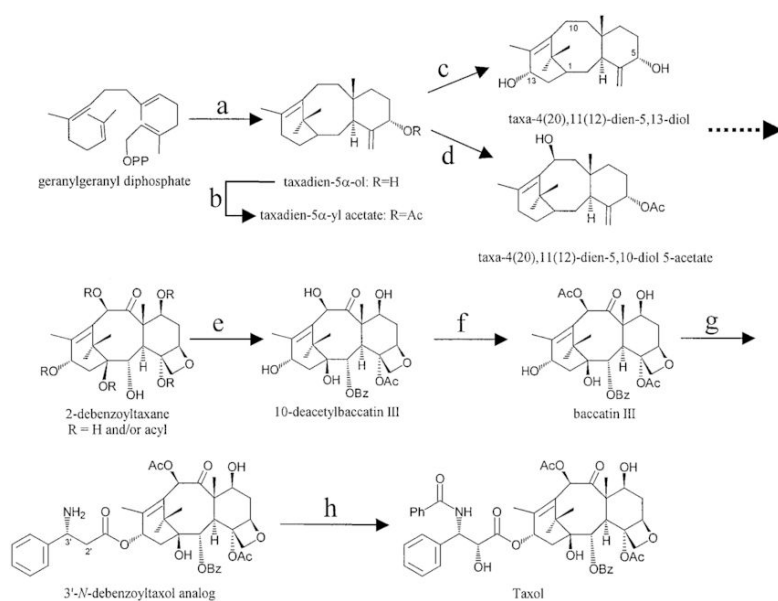
Дата обращения: Декабрь 2020 года

Приложения:

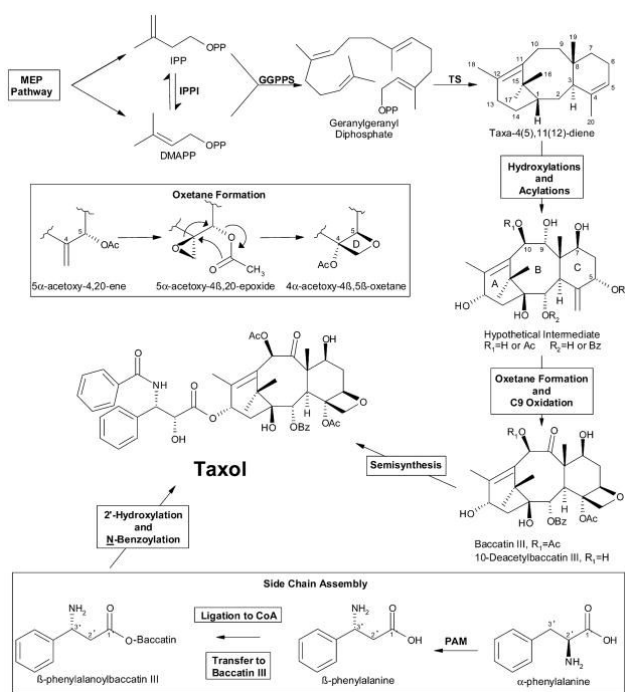
Приложение 1. Структурная формула Паклитаксела



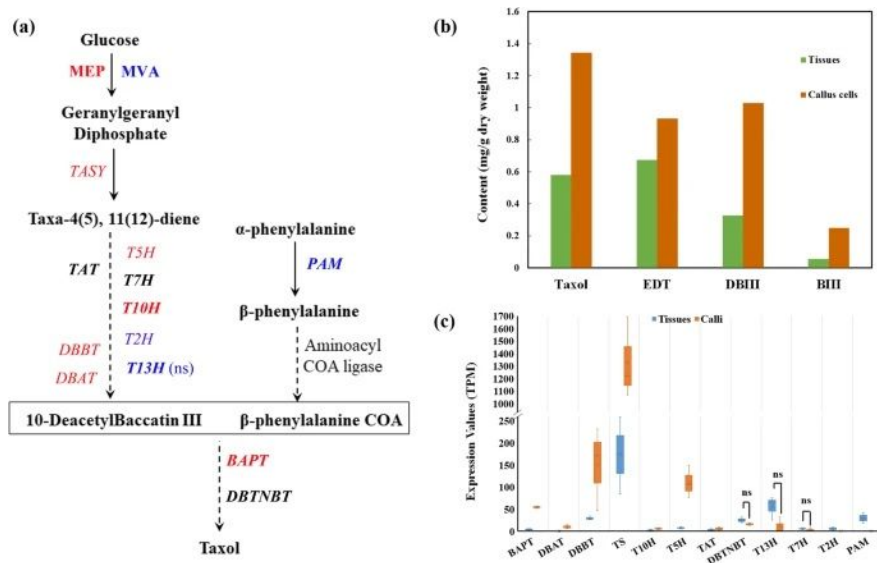
Приложение 2. Схема биосинтеза таксола 1



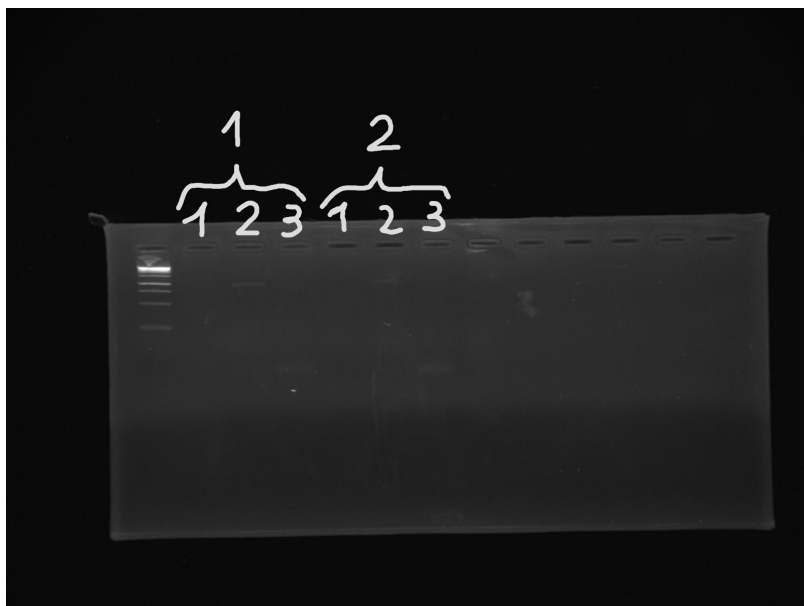
Приложение 3. Схема биосинтеза таксола 2



Приложение 4. Схема модификации профиля экспрессии генов, участвующих в биосинтезе таксола



Приложение 5. Форез №1 (два варианта матриц, различающихся по концентрации) (по три пары праймеров на каждый вариант)



Приложение 6. Форез №2 (три пары праймеров)

