Хепатитийн В вирусийн гадаргуугийн жижиг антигенийн генийн дарааллыг CRISPR-CAS9 ашиглан өөрчлөх нь

Ж.Буджав[1,2], Б.Эрдэнэ[3], Ч.Гансүх[1], Л.Энхсайхан[1], Ц.Билэгтсайхан[2], Д.Лхагвасүрэн[3]

[1]Анагаахын Шинжлэх Ухааны Их Сургууль
[2]Улсын Хоёрдугаар Төв Эмнэлэг
[3]Монгол Улсын Их Сургууль
Цахим хаяг: lkhagvasuren.d¡num.edu.mn, Утас: 98000599

Түлхүүр үг:
HBV
Гадаргуугийн жижиг S антиген
CRISPR/Cas9
HepG2 шугаман эс

Товч утга: Дэлхийн эрүүл мэндийн байгууллагын мэдээгээр 2015 оны байдлаар дэлхий даяар 257 сая хүн хепатитийн В вирус (HBV)-ийн архаг халдвартай, мөн онд 887000 хүн уг вирусийн шалтгаант элэгний цирроз, элэгний эсийн хорт хавдраар нас барсан байна. Одоогоор хэрэглэж буй HBV-ийн эсрэг эмийн эмчилгээ нь хязгаарлагдмал байсаар байна. Бактери архейн РНХ-ээр хөтлөгдсөн өвөрмөц дархлааны систем болох clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) системийг сүүлийн жилүүдэд ген инженерчилэлд өргөөр ашиглаж байна. Бид HBV халдварлуулсан HepG2 шугаман эсэд HBV-ийн гадаргуугийн жижиг S антигенийг кодлох генийн өвөрмөц бай дарааллалд CRISPR-Cas9 систем ашиглан делеци үүсгэн богиносгож, түүнийг ПГУ-ын аргаар шалгалаа.

Үндэслэл: Дэлхийн эрүүл мэндийн байгууллагын тоон мэдээгээр 2015 оны байдлаар дэлхий даяар 257 сая хүн хепатитийн В вирус (HBV)-ийн архаг халдвартай, мөн онд 887000 хүн уг вирусийн шалтгаант элэгний цирроз, элэгний эсийн хорт хавдраар нас барсан байна.[1] Дэлхийн олон улс оронд HBV-ийн эсрэг интерферонд суурилсан болон нуклеозидын анолог эмийн эмчилгээг хэрэглэж байгаа хэдий ч интерферонд суурилсан эмийн эмчилгээний үр дүн 40%-аас бага, нуклеотидын аналог эмэнд HBV хурдан хугацаанд тэсвэртэй болж буй нь эдгээр эмийн эмчилгээний үр дүнг бууруулж байна.[2-4]

HBV нь Hepadnaviridae вирусийн бүлэгт хамаарах, хос утаслаг цагираг ДНХ бүхий жижиг хэмжээтэй, хүнд зөвхөн элэгний эсэд өвөрмөцөөр халдварлаж улмаар элэгний эмгэг үүсгэдэг. HBV-ийн бүрхүүлийн уураг нь үндсэн 3 хэлбрээс тогтох ба бүрхүүлийн жижиг уураг (small HBsAg) 24 кД молекул жинтэй, 226 амин хүчлийн урттай, С-терминаль төгсгөлдөө 2 урт бүрхүүлийн антигентэй холбоотой бүтэцтэй. Бүрхүүлийн жижиг уураг HBV-ийн гадаргууг бүхэлд нь хучиж байрлахын зэрэгцээ бүрхүүлийн том болон дунд уургийн тодорхой хэсэгт генийн дараалал нь давхардсан бүтэцтэй байдаг.[5]

Энэ судалгаандаа бид 2020 оны Химийн салбарт Нобелийн шагнал хүртсэн Emmanuelle Charpentier, Jennifer A. Doudna нарын ген иженерчилэлийн салбарт шинээр нэвтрүүлсэн CRISPR-Cas9 системийг ашигласан юм. Уг систем бактери архейн геномын ~40%-д нь агуулагддаг, гадны вирус фагын халдвар бактерит анх халдварлахад түүний генийн дарааллын жижиг хэсгийг өөрийн CRISPR локуст холбон авч 20 хос нуклеотидын (хн) урттай хөтлөгч РНХ боловсрох ба дахин халдахад уг хөтлөгч РНХ халдварын геномын тодорхой дараалалтай холбогдоно. Үүний дүнд Cas9 уураг идэвхжин хөтлөгч РНХ-ийн өвөрмөцөөр холбогдсон дараалал (бай дараалал)-ыг хэрчих механизмаар гадны халдварыг эсэргүүцэх дээрх бичил биетнүүдийн өвөрмөц дархлааны систем юм.[6]

Зорилго: Бид хепатитийн В вирусийн гадаргуугийн жижиг S антигений давхардсан өвөрмөц бай дарааллыг өвөрмөцөөр таньж хэрчих хөтлөгч РНХ бүхий CRISPR-Cas9 системээр үйлчлэн HBV-ийн гадаргуугийн антигений генийн дарааллыг өөрчлөх (knock-in)-өөр зорьсон бөгөөд үүний тулд HBV-ийн бүрхүүлийн жижиг S антигений 3’ төгсгөлийн 583-602 дахь хн дарааллыг бай дараалал болгон сонгон авч элэгний хавдрын гаралтай HepG2 шугаман эсэд HBV-ын халдвартай загвар үүсгэн CRISPR-Cas9 системээр үйлчлэхээр төлөвлөн дараах дарааллын дагуу туршилтыг хийж гүйцэтгэлээ.

Зорилт:

1. Хепатитийн В вирусийн димер плазмидын вектор (pHBV dimer)-г олшируулах.
2. HBV-ийн бүрхүүлийн жижиг S антигений 3’ төгсгөлийн 583-602 дахь хос нуклеотидын дарааллыг өвөрмөцөөр таньж хэрчих хөтлөгч РНХ бүхий CRISPR/Cas9-ийн дарааллыг агуулсан pX260 плазмидын вектор угсран олшруулах.
3. Элэгний хавдрын гаралтай HepG2 шугаман эсэд pHBV dimer-г трансфекци хийн HBV-н халдвартай шугаман эс үүсгэх.
4. HBV-ийн халдвартай шугаман эсийг CRISPR/Cas9-р үйлчлэх.

Хэрэглэгдэхүүн, арга аргачлал:

1. Плазмидын векторууд: HBV-ийн геномын бүрэн дараалал, Ампицилин/Неомицинд тэсвэртэй генийн дарааллыг агуулсан pHBV dimer плазмидын векторыг HBV-ийн халдвартай шугаман эс гарган авахад ашиглав.

CRISPR/Cas-9 уургийг экспресслэгч 10203хн урттай, Ампицилин/Пюромицинд тэсвэртэй генийн дараалал агуулсан pX260 плазмидын векторыг HBV-ийн бүрхүүлийн жижиг S антигенийг knock-in хийхэд ашиглав.

2. Эсийн өсгөвөр: Хүний элэгний эпителийн шугаман эс болох HepG2 нь хавдар, эмийн судалгаанд өргөн хэрэглэгддэг ба тогтвортой фенотип, тасралтгүй шугаман ургалттай, хурдан хуваагддаг, трансфекцийн өндөр идэвхитэй эс юм. Эсийг 10% FBS, 1%-н антибиотиктой (стрептомицин, пенициллин) RPMI тэжээлт орчинд, 37ºС-д 5% нүүрс хүчлийн хий бүхий нөхцөлд инкубацилан өсгөвөрлөв.

3. Вектор дизайн ба угсралт: Бид HBV-ийн геномийн дарааллыг өвөрмөцөөр таньж хэрчих CRISPR-Cas9 системийн бай дарааллын сайтыг сонгохдоо уг вирусийн бүрхүүлийн жижиг S уургийн хэсгийг сонгосон бөгөөд жижиг S хэсэг нь дунд, том S уургуудын кодоны хэсгүүдтэй давхцаж байгаа тул нэг бай дарааллын тусламжтайгаар бүх S антигенүүдийг саатуулах боломжтой. Ингээд жижиг S-генийн дарааллаас CRISPR генийн бай дараалалд зайлшгүй байх шаардлагатай “NGG” гэх Protospacer Adjacent Motif (PAM) дарааллуудыг жагсааж, benchling.com-ийн дагуу хамгийн оновчтой (94.8/100%) дараалал болох (-) гинжийн 583-602 дахь “CAGGTGCAATTTCCGTCCGA” дарааллыг хөтлөгч РНХ өвөрмөцөөр холбогдох дарааллаар сонголоо.

CRISPR-Cas9 уургийг экспресслэгч 10203хн урттай pX260 плазмидын векторт 23 хн урттай, бидний сонгосон бай дарааллыг хэрчих өвөрмөц хөтлөгч РНХ-ийн дарааллыг угсарсан ба үүний тулд pX260 плазмидыг BbsI энзимээр хэрчихэд ATTT, GTTT гэх наалдамхай төгсгөлүүд үүсэх тул эдгээр төгсгөлд таарах TAAA, CAAA гэх төгсгөлүүдийг хөтлөгч РНХ-д нэмж плазмидын векторыг угсарсан.

4. Плазмидын ДНХ олшруулсан арга зүй: pHBV dimer, pX260 плазмидын вектор тус бүрийг *Escherichia coli (E.coli)* бактерийн *DH5 Alpha* компетент эсэд дулааны шок үүсгэн трансформаци хийж олшруулсан ба компетент эсийг алкалинаар задлах аргын тусламжтай олшруулсан плазмидын ДНХ-ийг ялган авав.

5. HBV болон CRISPR/Cas9-р шугаман эсийг үйлчилсэн арга зүй: Бид олшруулан авсан pHBV dimer плазмидынн векторыг HepG2 шугаман эсэд Lipofectamine 3000 (Thermofischer) трансфекцийн цомгоор үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу трансфекци хийн халдварлуулж HBV(+) HepG2 шугаман эсийг гарган авсан. Уг шугаман эсэд HBV-ийн бүрхүүлийн жижиг S антигенийг өвөрмөцөөр таньж хэрчих хөтлөгч РНХ-г угсарсан CRISPR-Cas9 систем бүхий pX260 плазмидын векторыг дээрх цомгоор үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу трансфекци хийсэн.

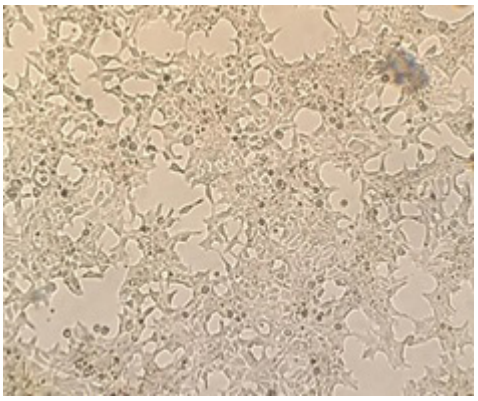
6. Колоны селекцийн арга зүй: Бид HepG2 шугаман эсэд pHBV dimer плазмидыг трансфекцийн аргаар халдварлуулсны дараа шугаман эсийг G418 (Geneticin)/(Neomycin) (500мкг/мл) антибиотикоор үйлчилж G418-д тэсвэртэй, HBV-ийн геномыг тогтвортой экспресслэгч эсүүдийг гарган авч цаашдын судалгаанд ашиглав.

7. Эсээс геномын ДНХ ялгасан арга зүй: Бид HBV-ийн геномыг агуулсан элэгний хавдрын HepG2 эсэд HBV-ийн S антигенийн генийн дарааллыг агуулж байгаа эсхийг шалгах зорилгоор дээрх шугаман эсээс геномын ДНХ ялгах цомог (Zanaspex.LLC)-ийн тусламжтай геномын ДНХ-ийг нь ялган авсан.

8. HBV-ийн S антигенийн генийн дарааллыг илрүүлэх полимеразын гинжин урвал (ПГУ)-ын арга зүй: Бид HBV-ийн геномыг агуулсан элэгний хавдрын HepG2 эсэд HBV-ийн S антигенийн генийн дарааллыг агуулж байгаа эсхийг шалгах зорилгоор сонгон авсан бай дарааллын хоёр талд шалгах F -5’ACC TCC AAT CAC TCA CCA AC-3’, R- 5’-CCC CAA TAC CAC ATC ATC CA-3’-ийг праймер зохион тус тус ПГУ-д ашиглав.

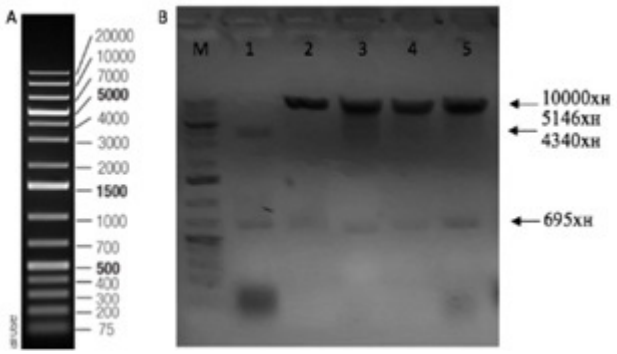
Үр дүн:

1. HepG2 шугаман эсийн өсгөвөр: Бид судалгаандаа элэгний хавдрын HepG2 шугаман эсийн өсгөвөрийг ашиглахаар сэргээж өсгөвөрлснөөс 14 хоногийн дараа эсийн өсгөвөрийн тавгийн гадаргуугийн талбайн 70%-ийг бүрхэн ургасан ба морфологийн хувьд эрүүл, ганц давхарга үүсгэнургасан бөгөөд уг эсийг цаашдын туршилтанд ашиглав. (Зураг 1)



Зураг 1. Элэгний хавдрын гаралтай HepG2 шугаман эсийн өсгөвөр
(Олимпус СК 2 микроскоп, 100Х өсгөлт)

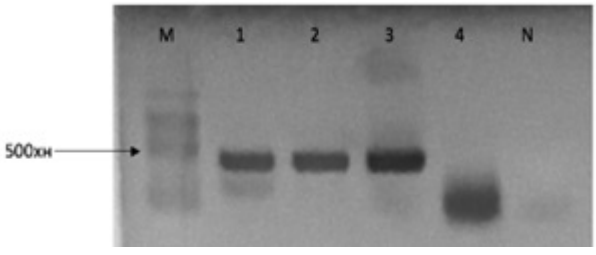
2. Вектор дизайн боловсруулалт ба угсрсан байдал: Бид HBV-ийн HBsAg экспресслэгч шугаман эсийн геномоосHBsAg-ийнгенийгknock-inхийхэдашиглахаар угсарсан pX260-HBsAg векторыг шалгахдаа *EcoRI, BbsI* энзимээр хэрчихэд pX260 вектор нь 22хн, 695хн, 4340хн, 5146хн урттай хэрчимүүд үүсэх бөгөөд хөтлөгч РНХ-ийн дарааллыг амжилттай угсарсан pX260-HBsAg векторын BbsI энзимийн сайтгүй болсноор EcoRI энзимээр 695, 9508хн урттай хоёр хэрчим үүснэ. Бид угсарсан pX260-HbsAg векторыг 2, 3, 4, 5 дугаартай замд гүйлгэсэн ба плазмидууд нь 10000хн болон 695хн орчим хэрчим үүсгэсэн тул pX260-HBsAg векторыг амжилттай угсарсан гэж үзлээ. (Зураг 2)



Зураг 2. pX260 болон pX260-HBsAg плазмидын вектор угсарсан үр дүн.

А-Молекул жингийн маркерийн хэмжээ(GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder - Thermo Fisher Scientific), B-pX260 болон pX260-HBsAg плазмидыг EcoRI, BbsI энзимээр хэрчсэн гель электрофорезын үр дүн, М-Молекул жингийн маркер (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder - Thermo Fisher Scientific), 1- pX260 плазмид, 2, 3, 4, 5- pX260-HBsAg плазмид.

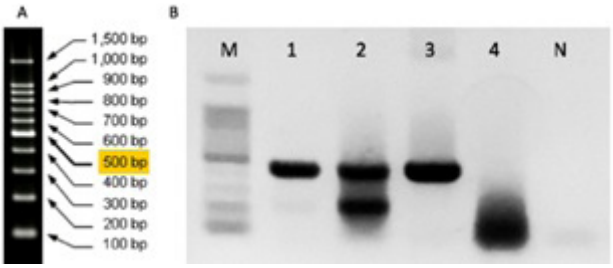
3. HepG2 эсийн HBV-ийн S антиген шалгасан дүн: Бид HBV-ийн димер плазмидыг шугаман эсэд трансфекци хийн халдваруулж HBV(+) HepG2 эсийг гарган авсан. Үйлчилсэн HBV-ийн димер плазмидын вектор нь неомицин (G418)-д тэсвэртэй генийн дараалал агуулсан тул HBV(+) HepG2 эсийн ургалт тогтворжсоны дараа уг эсийг неомицинээр (500мкг/мл) үйлчилж уг антибиотикт тэсвэртэй, HBV-ийн геномыг тогтвортой экспресслэгч эсүүдийг гарган авсан бөгөөд эдгээр эсийн S антигенийн 437 хн уртай хэсгийг өвөрмөцөөр олшруулан шалгав. (Зураг 3)



Зураг 3. HBV(+) HepG2 эсийн HBsAg-ний генийн дарааллыг шалгасан ПГУ-ын үр дүн.

М-молекул жингийн маркер, 1-pHBV dimer плазмид трансфекци хийсэн HepG2 эсийн геномын ДНХ, 2- pHBV dimer плазмид трансфекци хийсэн HepG2 эсийн геномын ДНХ, 3-р (+) хяналт (pHBV dimer плазмидын ДНХ) 4-(-) хяналт (HepG2 эсийн геномын ДНХ), N-(-) хяналт

4. HBV(+) эсийг CRISPR-Cas9 системээр үйлчилж бай дарааллыг knock-in хийсэн хийсэн дүн: Бид HBV-ийн гадаргуугийн жижиг S антигений бай дарааллыг өвөрмөцөөр таньж хэрчих хөтлөгч РНХ агуулсан CRISPR-Cas9 системээр HBV(+) HepG2 эсийн геномд HBV-ийн геномийн тодорхой дарааллыг хэрчин өөрчлөх туршилтыг өөрсдийн угсарсан pX260-HBsAg плазмидын вектор ашиглан трансфекци хийж гүйцэтгэсэн. Тухайн бай дараалал хэрчигдсний дараагаар эсийн ДНХ-ийн засварын механизм идэвхжин гомолог бус төгсгөлүүдийг холбох зарчмын тусламжтайгаар эс өөрийн геномыг эргүүлэн нийлүүлэх бөгөөд уг үйл явцын дүнд тухайн хэрчигдсэн сайтаас янз бүрийн урттай дараалал делецид орж, генийн дараалал өөрчлөгдөх шинж чанарыг илрүүлэхэд үндэслэлээ. Дээрх туршилтын үр дүнг шалгахдаа HBsAg-ийн дарааллын 437 хн хэрчмийг олшруулах F -5’ACC TCC AAT CAC TCA CCA AC-3’, R- 5’-CCC CAA TAC CAC ATC ATC CA- 3’-ийг тус тус ашиглан ПГУ-ыг явуулахад бидний knock-in хийсэн эсээс ялгасан геномын ДНХ-ээс 437 хн, түүнээс ялгаатай 200хн болон янз бүрийн урттай прагментын зурвас үүссэн нь уг туршилтыг амжилттай болсныг батлан харуулж байна. (Зураг 4)



Зураг 4. HBV(+) эсийг CRISPR-Cas9 системээр үйлчилсэн дүн

А-Молекул жингийн маркерийн хэмжээ (Loading Quick™ 100 bp DNA Ladder, Toyobo). B- HBV(+) эсийг CRISPR-Cas9 системээр үйлчилсний дараа HBV-ийн S антигений генийн 437 хн дарааллыг олшруулсан ПГУ-ын дүн. B-М-молекул жингийн маркер, 1-pHBV dimer плазмид трансфекци хийсэн HepG2 эсийн геномын ДНХ, 2-pX260-HBsAg плазмидаар knock-in хийсэн HBV (+) HepG2 эсийн геномын ДНХ, 3- (+) хяналт (pHBV dimer плазмидын ДНХ) 4-(-) хяналт (HepG2 эсийн геномын ДНХ), N-(-) хяналт (Ус),

Хэлцэмж: Бид судалгаандаа сүүлийн жилүүдэд өргөн ашиглагдаж буй ген инженерчлэлийн шинэ систем болох CRISPR-Cas9 системийг сонгон авсан бөгөөд энэхүү систем нь “NGG” гэх PAM дараалалтай бай дарааллыг таних өвөрмөц дараалал бүхий хөтлөгч РНХ-н тусламжтайгаар геномд сонгосон газар өөрчлөлт оруулдаг билээ.[7] Уг систем нь бусад ген инженерчлэлийн аргуудтай харьцуулахад хялбар, цаг хэмнэсэн, үнэ өртөг багатай төдийгүй бай дарааллыг алдаагүй өвөрмөцөөр таних байдал нь харьцангуй илүү байдаг.

Бид судалгааны явцад элэгний хавдрын шугаман эс HepG2-д HBV амжилттайгаар халдварлуулж, HBsAg нийлэгжүүлж байгааг нь тогтоон цааш судалгаанд ашигласан нь голчлон Hep3B HBV(+) шугаман эс ашигладаг HBV-ын судалгаануудаас ялгаатай юм.

Энэ судалгаатай адилаар CRISPR/Cas-9 систем ашиглан HBV-ийн HBsAg-д өөрчлөлт оруулсан судалгаанд бидний ашигласан хөтлөгч РНХ-ээс гадна 11 өөр дараалын нөлөөг шалгасан ба бидний ашигласан дараалал хамгийн өндөр үр ашигтай байна.[8] CRISPR ашиглан HBsAg-д өөрчлөлт оруулснаар бид HBV вирусийг генийн эмчилгээгээр анагаах боломж байгааг илтгэх үр дүнд хүрсэн ба үүнээс цааш CRISPR/Cas-9-р шугаман эсийг үйлчилсний дараа пюромицин ашиглан селекци хийх, HBV халдварлуулсан шугаман эсийг CRISPR/Cas-9-ээр үйлчлэхэд геномын дараалал хэрхэн өөрчлөгдөж байгааг генийн дараалал тогтоох аргачилалаар нарийн тогтоох шаардлагатай байна.

Дүгнэлт:

1. Бид 10203 хн урттай pX260 плазмид векторыг EcoRI, BbsI энзимээр хэрчин HBsAg-ийг өвөрмөцөөр таних хөтлөгч РНХ-ийн дараалыг агуулсан pX260-HBsAg плазмид векорыг амжилттай угсарч чадлаа.
2. Мөн элэгний хавдрын HepG2 шугаман эсийг өсгөвөрлөж, pHBV dimer плазмидыг трансфекцийн аргаар халдаан HBV-ийн генийг агуулсан HBV(+) HepG2 эс гарган авч, түүнийг HBsAg-ийн өвөрмөц дараалыг хэрчих РНХ-гээр хөтлөгдөгч CRISPR уураг экспресслэгч pX260-HBsAg вектороор үйлчилж улмаар CRISPR-Cas9 системийн тусламжтай бай дараалыг хэрчиж knock-in хийсэн.
3. Үүний дараа эсээс геномын ДНХ ялган HBV-ийн гадаргуугийн жижиг S антигений генийн 437 хн дараалыг олшруулахад 437 хн болон түүнээс ялгаатай урттай ПГУ-ын бүтээгдэхүүн үүсч байгаа нь уг векторыг ашиглан HBV-ийн генийг эсэд өөрчлөх боломжтой гэдгийг харуулж байна.

Талархал: Уг судалгааны ажлыг хийж гүйцэтгэхэд гүн туслалцаа үзүүлсэн МУИС-ийн Биологийн тэнхимийн Биологи, Биотехнологийн хөтөлбөрийн хамт олон; ШУА-ийн Биологийн хүрээлэнгийн Молекул биологийн лабораторийн хамт олон; АШУҮИС-ийн Молекул биологийн тэнхимийн магистрант Г.Есөнзаяа; Т.Шагдарсүрэнгийн Нэрэмжит Анагаах Ухааны Хүрээлэнгийн эрдэм шинжилгээний ажилтан анагаах ухааны магистр Т.Балжинням; БНСУ-ын Хавдар Судлалын Үндэсний Төвийн докторант С.Энхжин; АШУҮИС-ийн харьяа Цөм лабораторийн Л.Содномцогт эрхлэгчтэй хамт олонд, УХТЭ-ийн С.Анхтуяа эрхлэгчтэй Нэгдсэн Лабораторийн тасгийн хамт олонд, НЛТ-ийн эмгэг судлалын лабораторийн лаборант О.Ренчинбямба нарт гүн талархал илэрхийлье.

Ном зүй:

1. *Word Health Organization, Hepatitis B virus, 27 July 2020. https://www.who.int/*
2. *Li MH, Xie Y, Zhang L, et al. Hepatitis B surface antigen clearance in inactive hepatitis B surface antigen carriers treated with peginterferon alfa-2a. World J Hepatol. 2016;8(15):637-643. doi:10.4254/wjh.v815.637*
3. *Zoulim F, Perrillo R. Hepatitis B: reflections on the current approach to antiviral therapy. J Hepatol. 2008;48 Suppl 1:S2-19. doi: 10.1016/j.jhep.2008.01.011. Epub 2008 Feb 4. PMID: 18304680.*
4. *Watashi K, Urban S, Li W, Wakita T. NTCP and beyond: opening the door to unveil hepatitis B virus entry. Int J Mol Sci. 2014;15(2):2892-2905. Published 2014 Feb 19. doi:10.3390/ijms15022892*
5. *Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. Hepatology. 2009;49(5 Suppl):S13-S21. doi:10.1002/hep.22881*
6. *Nishimasu H. [Structure and function of CRISPR-Cas9]. Seikagaku. 2015 Dec;87(6):686-92. Japanese. PMID: 26863746.*
7. *Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Yang L, Church GM. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. Nat Biotechnol. 2013 Sep;31(9):833-8. doi: 10.1038/nbt.2675. Epub 2013 Aug 1. PMID: 23907171; PMCID: PMC3818127.*
8. *Zhen S, Hua L, Liu YH, Gao LC, Fu J, Wan DY, Dong LH, Song HF, Gao X. Harnessing the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 system to disrupt the hepatitis B virus. Gene Ther. 2015 May;22(5):404-12. doi: 10.1038/gt.2015.2. Epub 2015 Feb 5. PMID: 25652100.*

Hepatitis B virus small surface antigen's gene sequence disruption by CRISPR- CAS9 system

Budjav.J[1,2], Erdene.B[3], Gansukh.Ch[1], Enkhsaikhan.L[1], Bilegtsaikhan.Ts[2], Lkhagvasuren.D[3]

[1]Mongolian National University of Medical Science,
[2]State Second Central Hospital
[3]National University of Mongolia
Email: lkhagvasuren.d¡num.edu.mn

Introduction: World Health Organization estimates that in 2015, 257 million people were living with chronic hepatitis B infection also in 2015, hepatitis B resulted in an estimated 887 000 deaths, mostly from cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The current therapies to treat hepatitis B virus (HBV) infection are limited. Material and methods: In the last decade, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) system, originally identified in bacteria and archaea, have been extensive study for genetic engineering to consist of an RNA-based adaptive immune system. Here, we deleted specific sequence of surface small antigen (small HBsAg)-encoding region of HBV infected HepG2 cell line, using the CRISPR-Cas9 system and checked by PCR analysis.

Key words: HBV, surface small S antigen, CRISPR/Cas9, HepG2 cell line.