

©Коллектив авторов

БИОСЕНСОРНЫЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ДНК-ДИАГНОСТИКИ НА ОСНОВЕ CRISPR/Cas-НУКЛЕАЗ: НА ПУТИ К ДЕТЕКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА УРОВНЕ ЕДИНИЧНЫХ МОЛЕКУЛ ВО ВНЕЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

С.А. Хмельва¹, К.Г. Птицын¹, Л.К. Курбатов¹, О.С. Тимошенко¹, Е.В. Супрун², С.П. Радько^{1*}, А.В. Лисица¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: gadkos@yandex.ru

²Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, 1/3

В последние годы наметился бурный рост исследований с использованием CRISPR/Cas-нуклеаз для разработки систем ДНК-диагностики во внелабораторных условиях (*англ.* point-of-need testing, PONT), началом развития которых послужила разработка в 2017–2018 гг. первых диагностических платформ, известных как DETECTR и SHERLOCK. В их основе лежит сочетание методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот с селективной CRISPR/Cas-детекцией целевых ампликонов. Это позволяет значительно улучшить чувствительность и специфичность PONT, сопоставимых с (или даже превосходящими) чувствительностью и специфичностью полимеразной цепной реакции, являющейся “золотым стандартом” ДНК-диагностики. В обзоре рассмотрены современные подходы к сопряжению CRISPR/Cas-детекции с использованием нуклеаз Cas9, Cas12a, Cas12b, Cas13a, Cas14 и Cas3 с различными методами изотермической амплификации нуклеиновых кислот, с акцентом на работы, в которых достигнута чувствительность на уровне единичных молекул (субаттомольных концентраций мишени). Коротко рассмотрены свойства CRISPR/Cas-нуклеаз, используемых для целей ДНК-диагностики, и особенности методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот, применяемых сегодня при разработке диагностических биосенсорных платформ. Обсуждаются наиболее перспективные направления развития ДНК-диагностики с использованием CRISPR/Cas-нуклеаз.

Ключевые слова: CRISPR/Cas-нуклеазы; детекция нуклеиновых кислот; единичные молекулы; ДНК-диагностика

DOI: 10.18097/PBMC20247005287

ВВЕДЕНИЕ

Изобретение Кэри Муллисом (Kary Mullis) в 1983 г. полимеразной цепной реакции (ПЦР) привело к появлению нового научно-практического направления — ДНК-диагностики, получившей сегодня широкое распространение в практической медицине и биомедицинских исследованиях для выявления нарушений в генах, определяющих наследственно обусловленные заболевания, и детекции возбудителей инфекционных заболеваний [1]. Основанная на ферментативной амплификации определённого участка генома или кДНК (комплементарной ДНК, синтезируемой *in vitro* обратной транскриптазой на РНК-матрице) как результата контролируемого многократного циклического изменения температуры реакционной смеси, ПЦР является “золотым стандартом” ДНК-диагностики, но требует наличия сложного дорогостоящего оборудования (амплификаторов/термоциклеров), что ограничивает

использование данного метода стенами специализированных лабораторий [2]. Хотя в настоящее время разрабатываются мобильные ПЦР-системы для внелабораторной диагностики (например, [3]), они пока остаются сложными и дорогостоящим оборудованием.

Наряду с ПЦР, сегодня существуют методы амплификации нуклеиновых кислот, проводимой при постоянной температуре [4, 5], использование которых позволяет значительно снизить требования к технической сложности оборудования и, соответственно, к стоимости тестирования. Такие методы объединены под общим названием “изотермическая амплификация” и рассматриваются как наиболее перспективный подход к практическому внедрению ДНК-диагностики в формате “тестирования непосредственно на месте оказания медицинской помощи” (*англ.* point-of-care testing, POCT) [6] или, в более широком контексте, в формате внелабораторной ДНК-диагностики (*англ.* point-of-need

Принятые сокращения: ПЦР – полимеразная цепная реакция; POCT – point-of-care testing; PONT – point-of-need testing; CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeats (регулярно расположенные группами короткие палиндромные повторы); Cas – CRISPR associated protein; нРНК – направляющая РНК; crRNA – CRISPR-RNA; tracrRNA – trans-activating RNA; sgRNA – single guide RNA; PAM – protospacer adjacent motif; кДНК – комплементарная ДНК; оДНК – одностречевая ДНК; днДНК – двухстречевая ДНК; LAMP – loop-mediated isothermal amplification; RPA – recombinase polymerase amplification; RT-RPA – reverse transcription-RPA; SDA – strand displacement amplification; EXPAR – exponential amplification reaction; NASBA – nucleic acid sequence based amplification; RCA – rolling circle amplification; FAM – 6-карбоксихлорофлуоресцеин; ROX – карбокси-X-родамин; LFA – Lateral Flow Assay; ВПЧ – вирус папилломы человека; ХГЧ – хорионический гонадотропин человека; DFHBI – 3,5-дифтор-4-гидроксифенилиден имидазолинон.

testing, PONT). Тренд на разработку биосенсорных систем для такого тестирования оформился в последние два десятилетия, получив недавно дополнительный импульс в результате пандемии SARS-CoV-2 [7, 8] и растущего осознания проблем, связанных с биобезопасностью населения в современном мире [9, 10].

По сравнению с ПЦР, изотермическая амплификация характеризуется в целом меньшей селективностью [11]. Это в значительной степени связано с большей длиной и композиционной сложностью используемых праймеров, что приводит к высокой вероятности формирования праймерами димеров (primer dimer) и делает подбор праймеров крайне трудоёмкой задачей без гарантированного успеха. На практике данная проблема может привести к ложноположительным результатам тестирования из-за возможности генерирования “нецелевых” ампликонов [11]. Начиная с 2016 г., CRISPR/Cas-нуклеазы (CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; Cas, CRISPR associated protein), получившие широкую известность в качестве успешного инструментария для геномного редактирования [12] (разработка была удостоена Нобелевской премией по химии 2020 года [13]), оказались в фокусе как возможно наиболее эффективное решение проблемы селективности при использовании изотермической амплификации. Сопряжение CRISPR/Cas-нуклеаз с изотермической амплификацией позволило создать новый подход к ультрачувствительной и высокоселективной детекции нуклеиновых кислот (в первую очередь ДНК и РНК молекул различных микроорганизмов и вирусов [14]), обеспечивая конечную чувствительность детекции разрабатываемых биосенсорных платформ вплоть до уровня аттомолярных и субаттомолярных концентраций мишени [14]. К настоящему времени предложено несколько диагностических платформ с использованием CRISPR/Cas-нуклеаз и различных методов изотермической амплификации: SHERLOCK [15], DETECTR [16], HOLMES [17], HUDSON [18], CARMEN [19] и ряд других, а также их различные модификации.

В обзоре рассмотрено современное развитие биосенсорных систем для PONT с использованием CRISPR/Cas-нуклеаз Cas9, Cas12a и Cas12b, Cas13a, Cas14 (она же Cas12f) и Cas3, с акцентом на работы, нацеленные на достижение чувствительности детекции на уровне единичных молекул. Также даётся краткая характеристика указанных CRISPR/Cas-нуклеаз и используемых в сопряжении с ними методов изотермической амплификации, обсуждаются наиболее перспективные направления развития биосенсорных систем на базе CRISPR/Cas-нуклеаз.

1. КЛАССИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА Cas-БЕЛКОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ДЕТЕКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В природе, CRISPR/Cas-нуклеазы участвуют в иммунном ответе бактерий и архей на попадание в клетку фагов, вирусов и других чужеродных

генетических элементов [20]. При их первом попадании в клетку участок чужеродного гена интегрируется в геном микроорганизма при участии эффекторных белков Cas1, Cas2 и ряда других и становится частью набора повторяющихся последовательностей в геноме микроорганизма, известных как CRISPR. В ходе их транскрипции происходит формирование специфических последовательностей РНК с помощью рибонуклеазы III, которые, образуя комплекс с Cas-нуклеазами, определяют узнавание комплексом чужеродных последовательностей, что приводит к активации нуклеазы и расщеплению чужеродной ДНК. Для ряда Cas-нуклеаз формирование комплекса происходит с единичной молекулой РНК (направляющая РНК; guide RNA), а для других необходимы две молекулы РНК: одна определяет взаимодействие с мишенью (CRISPR-RNA; crRNA), а другая — с Cas-нуклеазой (*trans*-activating RNA; tracrRNA) [20]. В искусственных системах эти две молекулы РНК, как правило, сшиты в единую направляющую РНК (single guide RNA; sgRNA), которая в рамках данного обзора для простоты также будет называться “направляющей РНК” (нРНК). Каждая нРНК состоит из двух участков — последовательность одного ответственного за формирование комплекса с Cas-нуклеазой (повтор), а последовательность другого (спейсер) комплементарна последовательности в мишени (протоспейсер). В диагностических платформах используют рекомбинантные CRISPR/Cas-нуклеазы, получаемые путём их гетерологической экспрессии с последующей трёх- или двухстадийной хроматографической очисткой (например, [16, 21]), хотя примеры успешного использования для ДНК-диагностики рекомбинантных CRISPR/Cas-нуклеаз, полученных одностадийной хроматографической очисткой также известны (например, [22, 23]).

В настоящее время наиболее распространена классификация Cas-нуклеаз, предложенная в [24], где они разделены на два класса, 1 и 2, в первую очередь на основе структуры эффекторных комплексов, включающих соответственно либо несколько Cas-белков (класс 1) или единственный мультидоменный Cas-белок (класс 2). Каждый класс делится на типы: класс 1 — на типы I, III и IV, различающиеся между собой композицией Cas-белков в эффекторном комплексе, а класс 2 — на типы II, V и VI, различающиеся структурной организацией Cas-эффектора, структурой нРНК и характером мишени [24]. За исключением Cas3, все рассматриваемые в данном обзоре Cas-нуклеазы (Cas9, Cas12, Cas13) относятся к классу 2, то есть входят в эффекторный комплекс с нРНК как единственный мультидоменный белок.

CRISPR/Cas9 состоит из трёх доменов — одного, узнающего нРНК, и двух, проявляющих энзиматическую активность (домены HNH и RuvC) [25]. При формировании комплекса с нРНК Cas9-нуклеаза способна узнавать таргетную последовательность в двухнитевой ДНК (днДНК) и делать разрезы в каждой из нитей в определённых местах (рис. 1А).

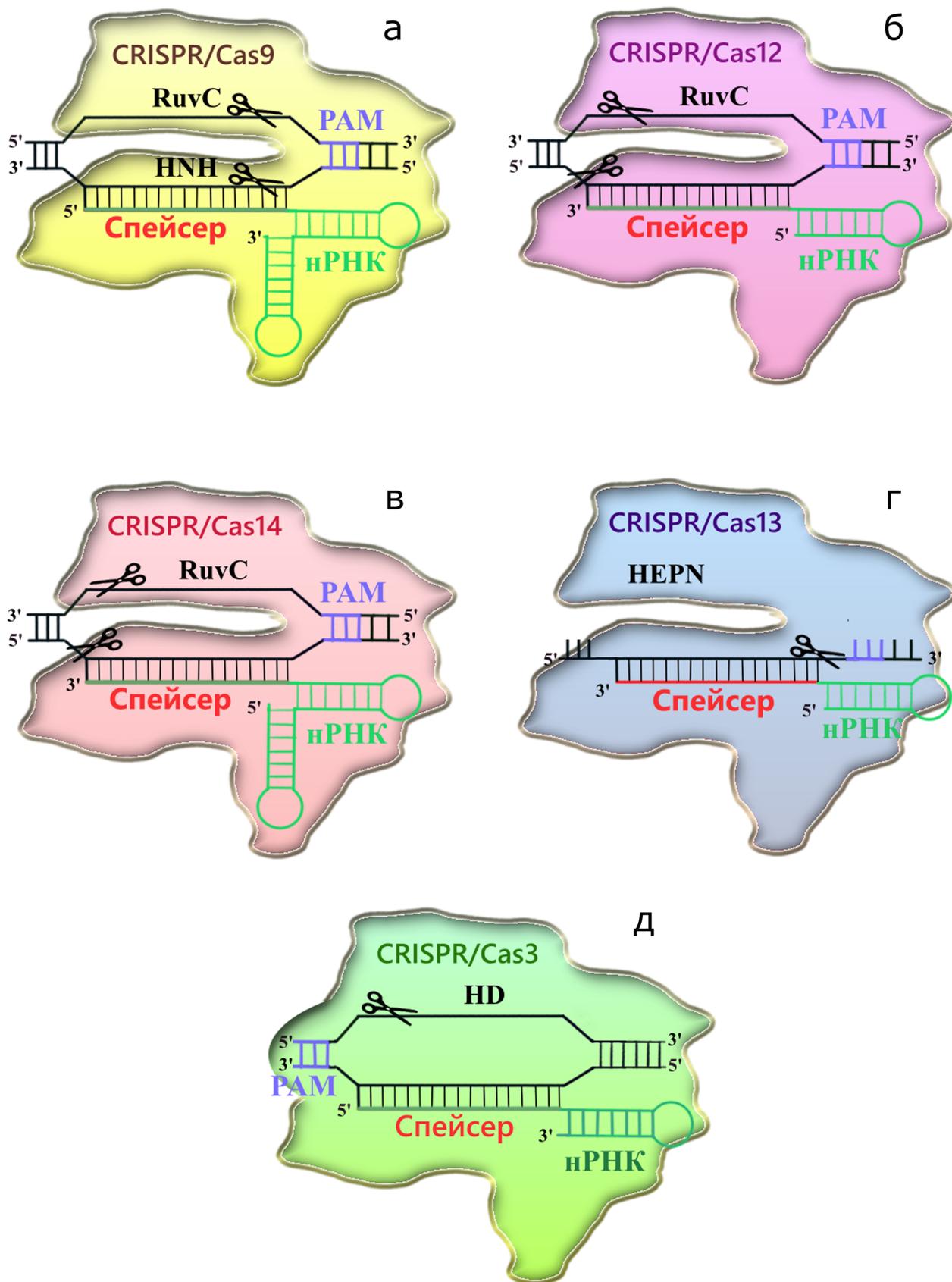


Рисунок 1. Схематическая иллюстрация узнавания ДНК- или РНК-мишени CRISPR/Cas-нуклеазами Cas9 (а), Cas12 (б), Cas14 (в), Cas13 (г) и Cas3 (д).

При использовании нРНК как единой молекулы Cas9 проявляет только *cis*-активность — нуклеазную активность в отношении мишени (в данном случае, ДНК-мишени). Однако, как недавно показано для Cas9-нуклеазы, происходящей из *Streptococcus pyogenes* (SpyCas9), использование в искусственной системе crRNA и tracrRNA приводит к появлению у неё *trans*-активности (или коллатеральной активности) — способности неспецифично расщеплять ДНК- и РНК-олигонуклеотиды, в данном случае представляющие либо политимидины, либо полиаденины — после “узнавания” спейсером crRNA последовательности протоспейсера в ДНК-мишени (формирования ими дуплекса) [26]. Важным фактором, необходимым для активации Cas9, является наличие специфического мотива с 3'-конца в последовательности мишени, комплементарной протоспейсеру — так называемого “смежного мотива протоспейсера” (protospacer adjacent motif, PAM, рис. 1А). Как правило, это NGG [25], но Cas9-нуклеазы с альтернативными PAM также известны [27]. Более того, в настоящее время получены различные рекомбинантные мутанты SpyCas9, имеющие существенно сниженные требования к PAM — для их активации достаточно наличия последовательности NRNH (R = A/G, H = A/C/T) [28, 29].

CRISPR/Cas12a- и CRISPR/Cas12b-нуклеазы (также известные как Cpf1 и C2c1, соответственно) имеют единственный домен с нуклеазной активностью — RuvC, узнают в комплексе с нРНК протоспейсерную последовательность в днДНК и разрезают обе её нити [30]. Для узнавания требуется наличие тимин-богатого PAM (TTTV, где V = A/C/G) с 5'-конца в последовательности, комплементарной протоспейсеру (рис. 1Б). Кроме того, известны ортологи Cas12a с другими PAM: RR и RVR [31]. В клетке CRISPR/Cas12a взаимодействует с единой направляющей РНК, тогда как для CRISPR/Cas12b-нуклеазы в клетке требуются crRNA и tracrRNA. Но в искусственных системах в обоих случаях используется нРНК. Они также способны узнавать последовательность протоспейсера в одонитевой ДНК (онДНК). Обе нуклеазы после активации приобретают *trans*-активность в отношении онДНК [30]. Совсем недавно было показано, что Cas12a может быть также *trans*-активирована присутствием РНК-мишени [32].

CRISPR/Cas14-нуклеаза (к настоящему времени реклассифицированная как Cas12f [33]) имеет схожую с другими CRISPR/Cas12-нуклеазами доменную организацию и свойства (в том числе также требует наличия тимин-богатого PAM [34], рис. 1В), но отличается размером: полученные из разных организмов CRISPR/Cas14 содержат 400–700 аминокислотных остатков (а.о.) в отличие от 950–1400 а.о. для Cas9 и Cas12 [35].

В противоположность вышеописанным CRISPR/Cas-нуклеазам, Cas13a в комплексе с нРНК узнаёт протоспейсер в последовательности РНК-мишени [36]. CRISPR/Cas13a имеет два домена, обладающих рибонуклеазной активностью, HEPN-1 и

HEPN-2, и после активации (при этом наличия PAM не требуется) приобретает коллатеральную активность, состоящую в способности неспецифично расщеплять молекулы РНК (рис. 1Г) [36].

В отличие от рассмотренных выше Cas-нуклеаз, Cas3 относится к CRISPR/Cas-нуклеазам 1 класса, являясь общей частью мультибелковых CRISPR/Cas-систем. Cas3 состоит из двух доменов — SF3 и HD с хеликазной и эндонуклеазной активностями соответственно [37]. Активность Cas3 зависит от наличия АТФ и направлена на расщепление некомплементарной последовательности в днДНК-мишени при наличии PAM с 5'-конца (рис. 1Д). Коллатеральная активность Cas3 приводит к расщеплению молекул онДНК [37].

2. МЕТОДЫ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В КОМБИНАЦИИ С CRISPR/Cas-ДЕТЕКЦИЕЙ АМПЛИКОНОВ

2.1. Петлевая изотермическая амплификация

Петлевая изотермическая амплификация (англ. Loop-mediated isothermal AMplification, LAMP) является наиболее распространённым методом изотермической амплификации ДНК и кДНК. Предложенный в 2000 году Т. Notomi [38], метод основан на использовании полимеразы с цепь-вытесняющей активностью (strand displacing DNA polymerase) и двух или трёх пар праймеров, в одной из которых праймеры имеют специфическую композицию. Две пары праймеров, “внутренние” и “внешние”, использованные в первоначальном варианте LAMP [38], позволяют запустить реакцию в формате “гнездовой” амплификации (рис. 2А) — удлинение “внешних” праймеров полимеразой приводит к “отодвиганию” вновь синтезируемой цепи, берущей начало на 3'-конце “внутреннего” праймера и формированию “гантелевидной” структуры, которая далее экспоненциально амплифицируется из-за взаимодействия “внутренних” праймеров и петлеобразных участков формирующихся ампликонов. Формирование гантелевидной структуры происходит в силу определённой конструкции “внутренних” праймеров: они имеют с 5'-конца участок, комплементарный участку в цепи ДНК-мишени, а с 3'-конца — участок с последовательностью, идентичной участку в другой цепи ДНК-мишени (рис. 2А). Третья пара праймеров — “петлевые” праймеры — была предложена позднее для ускорения реакции амплификации [39]. LAMP проводится при температуре 60–65°C и обеспечивает не менее чем 10⁹-кратное увеличение количества копий ДНК-мишени за 0,5–1 ч [5, 38, 39].

2.2. Рекомбиназная полимеразная амплификация

Рекомбиназная полимеразная амплификация (англ. Recombinase Polymerase Amplification, RPA) была предложена в 2006 г. [40]. Она основана на способности рекомбиназы UvsX фага T4 формировать комплексы с онДНК — в данном случае

с праймером — и осуществлять его встраивание в присутствии АМР в днДНК на участке с комплементарной праймеру последовательностью. Образующаяся структура стабилизируется белком gp32 фага T4, имеющим сродство к онДНК (рис. 2Б), после чего происходит синтез Vsu-полимеразой с цепь-вытесняющей активностью новой цепи ДНК с 3'-конца праймера. RPA проходит при 37–42°C и обеспечивает в течение 20–40 мин 10⁹-кратное увеличение количества копий ДНК-мишени [5, 40].

2.3. Амплификация с замещением цепи

Амплификация с замещением цепи (*англ.* Strand Displacement Amplification, SDA), предложенная более трёх десятилетий назад [41], основана на синтезе новой цепи полимеразой с цепь-вытесняющей активностью с 3'-конца внешнего праймера (bump primer); при этом происходит вытеснение вновь синтезируемой цепи, которая берёт начало на 3'-конце внутреннего праймера. Внутренний праймер имеет в своём составе участок, некомплементарный последовательности ДНК-мишени и несущий сайт рестрикции (рис. 2В). После появления матрицы с сайтом рестрикции он начинает узнаваться нуклеазой, что запускает экспоненциальную амплификацию матрицы. Первоначально SDA проводили при 37°C с первоначальной инкубацией смеси праймеров и мишени при 95°C [41], однако после появления термофильных ферментов SDA проводят при постоянной температуре в диапазоне 55–65°C, что приводит к 10¹⁰-кратному увеличению количества копий ДНК-мишени [5, 41].

2.4. Экспоненциальная реакция амплификации нуклеиновых кислот

Экспоненциальная реакция амплификации нуклеиновых кислот (*англ.* EXPonential Amplification Reaction, EXPAR) была разработана в 2003 г. [42]. EXPAR, также как SDA, основана на совместном действии нуклеазы и полимеразы с цепь-вытесняющей активностью. Реакция может проходить как с линейной, так и экспоненциальной амплификацией ДНК-мишени при 60°C, обеспечивая в последнем случае 10⁶-кратное увеличение числа копий короткого участка в ДНК-мишени (сигнальная последовательность) [42]. В EXPAR используется специфическая онДНК-матрица, состоящая из двух повторяющихся последовательностей, комплементарных сигнальной последовательности, между которыми находится сайт узнавания нуклеазы. В результате реакции синтезируются короткие онДНК-фрагменты, идентичные сигнальной последовательности (рис. 2Г).

2.5. Амплификация на основе последовательности нуклеиновой кислоты

Амплификация на основе последовательности нуклеиновой кислоты (*англ.* Nucleic Acid Sequence Based Amplification, NASBA) позволяет проводить прямую амплификацию РНК — в качестве мишени выступают молекулы РНК, и они же являются ампликонами, генерируемыми

в результате реакции (при этом последовательность РНК-ампликонов комплементарна последовательности РНК-матрицы) [43]. Амплификация достигается совместным действием комбинации ферментов — обратной транскриптазы, РНКазы H и T7 РНК-полимеразы, при этом один из праймеров имеет в своём составе участок, представляющий промотор T7 РНК-полимеразы (рис. 2Д). Амплификация РНК-молекул опосредована образованием промежуточного продукта — днДНК-матрицы, содержащей промотор T7 РНК-полимеразы. Реакция проводится при температуре 41°C и обеспечивает 10⁷-кратное увеличение числа копий РНК-матрицы в течение 1,5–2 ч [5, 43].

2.6. Амплификация по типу катящегося кольца

Амплификация по типу катящегося кольца (*англ.* Rolling Circle Amplification, RCA) протекает на кольцевой (ковалентно замкнутой) матрице с участком ДНК-полимеразы phi29 или Bst с цепь-вытесняющей активностью [44]. Линейная молекула онДНК длиной 70–100 нт (padlock) взаимодействует с онДНК- или РНК-мишенью так, что 3'- и 5'-концы оказываются рядом и могут быть ковалентно соединены лигазой. Для этого последовательности 10–15 нуклеотидов на концах padlock делаются комплементарными последовательности мишени (рис. 2Е). Праймер, комплементарный участку на кольцевой матрице, удлиняется ДНК-полимеразой с цепь-вытесняющей активностью с образованием длинной (как правило, более 10000 нуклеотидов) онДНК, состоящей из повторяющихся последовательностей матрицы (рис. 2Е). Присутствие в реакции ещё одного праймера, комплементарного синтезируемой онДНК, приводит к экспоненциальному росту количества продукта за счёт синтеза новых нитей ДНК на синтезированных онДНК (branched RCA) [5, 44].

3. БИОСЕНСОРНЫЕ ПЛАТФОРМЫ НА ОСНОВЕ СОПРЯЖЕНИЯ CRISPR/Cas-НУКЛЕАЗ С ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИЕЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

3.1. CRISPR/Cas9

Cas9 была первой CRISPR/Cas-нуклеазой, использованной для создания детекторной платформы, получившей название NASBACC (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification CRISPR-Cas Cleavage), для ДНК-диагностики вируса Зика в формате ПОСТ [45]. При создании NASBACC, CRISPR/Cas-детекция была сопряжена с NASBA. Фактически, результат NASBA — появление или отсутствие РНК-ампликонов — определялся с помощью биосенсорной системы, основанной на использовании РНК-переключателей (toehold switches [46]), а Cas9 узнавала участок в промежуточном продукте NASBA — днДНК — и расщепляла его, что приводило к появлению укороченных РНК-ампликонов, не способных взаимодействовать с РНК-переключателем [45]. Использование Cas9 позволяло дискриминировать штаммы вируса Зика,

отличающиеся однонуклеотидной заменой. Однако в целом детекторная система NASBACC была крайне сложной, а предел определения составлял только ≈ 3 фМ.

Наилучшие значения предела определения были получены при сочетании Cas9 с такими методами изотермической амплификации, как EXPAR и SDA [47, 48]. В обоих случаях в реакции амплификации играют роль никазы, которые вносят разрыв в одну из цепей ДНК, делая возможным её элонгацию с 3'-конца цепь-вытесняющей ДНК-полимеразой. В качестве никазы, специфически узнающей последовательность мишени, была использована мутантная форма Cas9-нуклеазы — nCas9, с аминокислотной заменой Asp10Ala, которая вносит разрыв только в одну нить ДНК-мишени, тем самым запуская её амплификацию. Биосенсорная система с такой селективной инициацией SDA получила название CRISDA (CRISPR Cas9-triggered nicking endonuclease-mediated Strand Displacement Amplification) [48] и позволила детектировать однонуклеотидный полиморфизм (ОНП), ассоциированный с раком молочной железы, в клеточных линиях с пределом определения 0,25 аМ (3 копии молекулы-мишени на реакцию). Сопряжение инициации амплификации нуклеазой nCas9 с методом EXPAR, известное как CAS-EXPAR (CRISPR/Cas9 triggered isothermal EXponential Amplification Reaction) [47], также позволило достичь сопоставимого предела определения — 0,82 аМ (около 5 копий молекулы-мишени на реакцию). При этом в качестве мишени выступала онДНК, а в реакционной смеси присутствовал комплементарный мишени олигонуклеотид с PAM-последовательностью (PAMmer, PAM-presenting oligonucleotide). Была также показана способность CAS-EXPAR дискриминировать с высокой специфичностью однонуклеотидные замены, что было положено в основу детекции с помощью данного метода сайтов метилирования ДНК [47].

Наряду с селективной инициацией амплификации, Cas9-нуклеаза была использована в сопряжении с изотермической амплификацией и в другом формате — для специфической детекции целевых ампликонов. Так, в методе, получившем наименование FELUDA (FnCas9 Editor Linked Uniform Detection Assay) [49], получаемые в результате ПЦР с обратной транскрипцией или RT-RPA (reverse transcription — RPA) ампликоны несли на концах молекулы биотина и флуоресцентного красителя 6-карбоксифлуоресцеина (6-carboxyfluorescein, FAM). При узнавании спейсером нРНК участка в последовательности ампликонов, Cas9 вносила в них разрывы, приводящие к разъединению пары биотин/FAM, что детектировалось с помощью иммунохроматографических тест-полосок (Lateral Flow Assay, LFA). Хотя в случае RT-RPA предел определения РНК вируса SARS-CoV-2 составил только ~ 400 вирусных геномов на реакцию, в комбинации с ПЦР с обратной транскрипцией он был определён как ~ 10 копий генома на реакцию, что соответствует концентрации мишени ~ 1 аМ [49]. Очевидно, что при сопряжении Cas9-нуклеаз

с тем или иным методом амплификации нуклеиновых кислот, предел определения полностью обусловлен эффективностью самой амплификации (зависящей в большой степени от того, насколько успешно подобраны праймеры), поскольку Cas9 при этом не проявляла коллатеральной активности, которая могла бы привести к усилению детектируемого сигнала (например, уровня флуоресценции). Использование Cas9, тем не менее, позволяет существенно усилить селективность детекции. Так, в работе [49], сильная зависимость *cis*-активности Cas9-нуклеаз от наличия неспаренных оснований в дуплексе “спейсер-протоспейсер” позволила успешно дискриминировать образцы ДНК доноров и пациентов с серповидноклеточной анемией, отличающихся однонуклеотидной заменой в анализируемом участке генома [49].

3.2. CRISPR/Cas12a

Нуклеазы семейства CRISPR/Cas12 наиболее широко использованы при разработке биосенсорных платформ, особенно в сочетании с такими изотермическими методами амплификации, как LAMP и RPA. К настоящему времени опубликовано значительное количество работ, посвящённых сопряжению изотермической амплификации с CRISPR/Cas12-нуклеазами, в особенности с нуклеазой Cas12a, в том числе демонстрирующих высокий потенциал данного подхода для достижения чувствительности детекции нуклеиновых кислот на уровне единичных молекул. Как правило, CRISPR/Cas12a-нуклеазы используются для селективного узнавания целевых ампликонов, что приводит к их *trans*-активации и усилению детектируемого сигнала, в качестве которого используется интенсивность флуоресценции. Рост интенсивности флуоресценции происходит за счёт расщепления каждой активированной нуклеазой множества молекул “репортёров” — коротких ДНК-олигонуклеотидов, несущих на концах FAM и “гаситель” флуоресценции (в качестве последнего наиболее часто используются химические соединения, известные как Black Hole Quencher — BHQ1, BHQ2 или BHQ3) [50].

Впервые Cas12a-нуклеаза была использована в сочетании с RPA для детекции вируса папилломы человека (ВПЧ) в 2018 году в работе [16] — метод получил название DETECTR (DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter). Авторы [16] сразу же продемонстрировали возможность проведения обеих реакций — амплификации (RPA) и Cas-детекции целевых ампликонов — одновременно в одной реакционной пробирке, что является несомненным достоинством метода, поскольку позволяет устранить потенциальную возможность контаминации места проведения тестирования продуктами амплификации. DETECTR позволял дискриминировать различные типы ВПЧ на основе ОНП их геномов, при этом предел определения составлял несколько ДНК-мишеней на реакцию (аттомолярная концентрация) [16]. Годом позже успешность данного подхода была показана также для детекции бактериальных

патогенов, а именно микобактерий *M. tuberculosis* [51]; однако первоначально в формате двух пробирок RPA и последующая Cas-детекция целевых ампликонов проводились раздельно. После проведения RPA к тест-пробирке, содержащей предварительно сформированный комплекс Cas12a-нуклеазы и нРНК в реакционном буфере с “репортёрами”, добавляли аликвоту RPA-пробы, и изменение флуоресценции во времени определялось на флуориметре (инструментальная детекция). При этом предел обнаружения составил 5 копий бактериального генома в микролитре образца (или около 12 копий на RPA-реакцию объёмом 25 мкл), что соответствует субатомолярной концентрации [51]. В том же 2019 г. была продемонстрирована возможность неинструментальной ультрачувствительной детекции комбинированием RPA и Cas12a-нуклеазы [52]. Метод получил наименование Cas12aVDet (Cas12a-based Visual Detection) и позволил определять присутствие плазмиды с встроенным в неё участком гена рибосомной РНК 16S микоплазмы в тестируемых образцах с пределом обнаружения 10 аМ (6 копий плазмиды в 25 мкл реакционной пробы) визуально, невооружённым глазом, освещая тест-пробирки синим светом (например, помещая их на рабочую поверхность трансиллюминатора с длиной волны 400–500 нм или используя любой другой источник света с такими же характеристиками). При этом реакционная смесь в пробирке с положительным тестом приобретала интенсивный жёлто-зелёный цвет (типичный вид тест-пробирок при таком виде детекции представлен на рис. 3).

Следует отметить, что в методе Cas12aVDet обе реакции проводятся в одной тестовой пробирке, хотя и последовательно. Для этого аликвота смеси нРНК и Cas12a помещается на крышке тест-пробирки, где проводится RPA, и объединяется с RPA-пробой центрифугированием пробирки после завершения амплификации [52]. Альтернативно, реакцию можно проводить одновременно, смешивая в одной тест-пробирке реагенты для RPA и

Cas12a-детекции. Такой подход был применён, например, в работе [53] для детекции бактерии *B. pseudomallei*, вызывающей мелиоидоз у человека и животных. В сочетании с визуальной детекцией результата теста, предел обнаружения составил 2,2 копии плазмиды с встроенным фрагментом гена *T6ss* бактерии *B. pseudomallei* на реакцию (или 2,2 копии плазмиды в микролитре образца). При детекции ДНК бактерий, пределы обнаружения составили 12,5 и 61,5 колониеобразующих элементов (КОЭ) в 1 мл бактериальной культуры или крови соответственно (0,013 и 0,06 КОЭ на реакцию) [53]. Сопоставимый предел обнаружения бактерий *E. coli* патогенного штамма O157:H7 — около 1,2 КОЭ в 1 мл бактериальной культуры и 4,8 КОЭ в 1 грамме растительного материала (0,006 и 0,024 КОЭ на реакцию) — был определён и при сопряжении Cas12a-детекции с другим методом изотермической амплификации — LAMP [54]. При этом реакции были проведены последовательно в разных тест-пробирках в силу несовместимости их температурных режимов.

Кроме “репортёров”, несущих на концах FAM и BHQ1, могут применяться и другие комбинации флуорофор-“гаситель”. В работе [55] в качестве “репортёров” были использованы ДНК-олигонуклеотиды, несущие на концах ROX (карбокси-X-родамин) и BHQ2. При этом цвет пробы при положительном тесте менялся с голубого на красный, что определялось визуально без использования какого-либо специального освещения. Тест, проведённый в одной пробирке (RPA и Cas12a-детекция целевых ампликонов как в [52]), позволил детектировать бактериальный патоген *P. multocida* (вызывает пастереллёз у человека и животных) в клинических образцах с чувствительностью, не уступающей ПЦР. При использовании плазмиды, несущей фрагмент гена *Kmt1* бактерии *P. multocida*, предел определения составил 2 копии плазмиды в 1 мкл образца (4 копии в тест-пробе) [55].

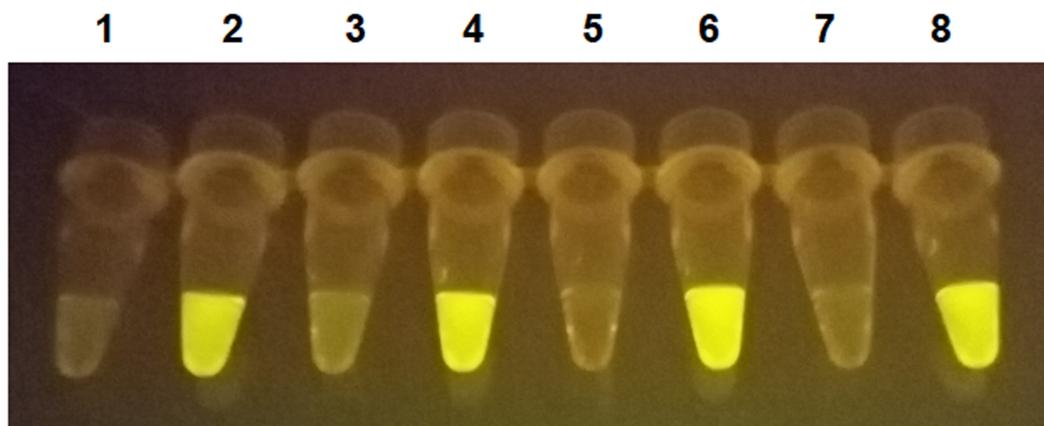


Рисунок 3. Пример визуального (неинструментального) определения результата тестирования. Участок геномной ДНК фитопатогена *Dickeya solani* амплифицирован методом RPA и присутствие целевых ампликонов определено с помощью Cas12a-нуклеазы, используя ДНК-олигонуклеотиды, несущие FAM и BHQ1. Тест-пробирки освещены синим светом. Нечётные номера – контроль (RPA в отсутствии геномной ДНК *D. solani*), чётные номера – RPA в присутствии 10 копий генома *D. solani* в реакции. Показаны результаты четырёх независимых тестирований (неопубликованные результаты авторов).

Наряду с колориметрическим способом, основанным на изменении цвета тест-пробы при её освещении синим светом, было показано, что LFA может быть также использован как способ неинструментальной детекции при комбинировании Cas12a-нуклеазы с изотермической амплификацией. Так, сочетание LAMP с Cas12a-детекцией целевых ампликонов позволило определить бактериального возбудителя внутрибольничных инфекций *P. aeruginosa* с ультравысокой чувствительностью [56]. Метод получил наименование CIA (CRISPR/Cas and loop-mediated Isothermal Amplification) и для плазмиды, несущий специфический для данной бактерии участок гена ацетилтрансферазы, имел предел определения 1 аМ в тестируемых образцах (или 1 копия плазмиды в LAMP-пробе). Для образцов бактериальной ДНК *P. aeruginosa*, предел определения составил 3,4 аМ [56]. Следует отметить, что для визуализации авторы использовали иммунохроматографические тест-полоски собственного изготовления, где тест-зона представляла иммобилизованные на пористой мембране поли(dA)-олигонуклеотиды, а контрольная зона — биотинилированные антитела. При этом наночастицы золота несли на поверхности молекулы стрептавидина, а в качестве “репортёров” использовали биотинилированные на 3'-конце ДНК-олигонуклеотиды с сайтом предпочтительного расщепления *trans*-активированной Cas12a-нуклеазой (TTATT) с 3'-конца и участком поли(dT) с 5'-конца [56]. Наряду с этим, для неинструментальной детекции могут использоваться коммерческие тест-полоски различных типов. Например, в работе [57], авторы применили коммерческие тест-полоски, предназначенные для определения беременности. Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) был конъюгирован с молекулами днДНК большого размера через онДНК-линкер, формируя ковалентный комплекс, который в силу своего размера не мог проходить через поры мембраны тест-полоски. *Trans*-активация Cas12a-нуклеазы, вызываемая появлением целевых ампликонов, приводила к высвобождению ХГЧ, что определялось с помощью тест-полоски. Такой метод детекции получил наименование CLIPON (CRISPR and Large DNA assembly Induced Pregnancy strips for signal-ON detection). В сочетании с RT-RPA, он позволил детектировать геном вируса SARS-CoV-2 с пределом обнаружения 1 копия/мкл [57]. Для неинструментальной детекции также использовали коммерческие тест-полоски, разработанные для обнаружения ДНК-фрагментов, несущих одновременно молекулы FAM и биотина (как правило, ампликонов, получаемых с использованием FAM- и биотин-меченных праймеров, как, например, в [58]). Используя такие тест-полоски, предел определения копий генома вируса SARS-CoV-2 в искусственных и клинических образцах комбинацией RT-RPA с Cas12a-детекцией целевых ампликонов составил 2,5 копии/мкл (или около 10 копий генома в реакционной смеси) [59]. При этом все реакции проводили в формате одной тест-пробирки, используя подход, аналогичный использованному в [52].

Применение Cas12a-нуклеаз для селективной детекции целевых ампликонов требует наличия в них PAM, что может накладывать ограничения на подбор праймеров для амплификации ДНК. Как показано в работе [60], это ограничение может быть обойдено использованием мутантов Cas12a с “ослабленными требованиями” к PAM. Так, полученной направленным мутагенезом рекомбинантной нуклеазе Mb2Cas12a-RRVRR, которая является мутантной формой (замены D156R, G532R, K538V, Y542R и K595R) Cas12a-нуклеазы, обнаруженной в одном из штаммов *M. bovoculi*, необходимо наличие в ампликонах последовательностей NTTV, NTCV и NCTV как PAM-сайтов. Её использование при сопряжении Cas12a-детекции с RPA позволило обнаружить ДНК-мишень с пределом определения 2,4 копии в реакционной смеси; при этом RPA и Cas12a-детекция были выполнены последовательно, но в одной тест-пробирке, а результат теста определялся с использованием коммерческих тест-полосок. Интересно, что этот предел определения был достигнут при температуре 35°C, что позволяет — и это было показано авторами [60] — проводить тестирование без использования термоблока, просто помещая тест-пробирку в подмышечную ямку. Следует отметить, что при одновременном выполнении RPA и Cas12a-детекции в одной тест-пробирке, высокая *trans*-активность нуклеазы может иметь негативный эффект, а именно ингибировать амплификацию (предположительно, за счёт расщепления праймеров и односторонних участков ДНК-мишени, образующихся при инкорпорировании праймеров рекомбиназой в днДНК), снижая таким образом общую чувствительность метода [61, 62]. Вероятно, *cis*-активность Cas12a-нуклеазы, проявляемая в присутствии PAM, также может негативно влиять на эффективность RPA за счёт расщепления днДНК-мишени и днДНК-ампликонов. Использование субоптимальных последовательностей PAM позволяет в таком случае понизить активности Cas12a-нуклеазы и в целом увеличить чувствительность тестирования за счёт более эффективной амплификации мишени. Так, было показано [63], что Cas12a-нуклеаза из *Lachnospiraceae bacterium* ND2006 может использовать последовательности TCC, TCG, CCT, CTC, GTC и CTG как субоптимальные PAM. Их присутствие в ампликонах вместо канонического PAM (TTTN) позволило оптимизировать детекцию, достигнув предела определения 0,2 и 0,4 копии/мкл для ДНК- и РНК-мишени (в последнем случае использовалась RT-RPA), что соответствовало 1 и 2 копиям мишени в реакционной смеси [63]. При этом амплификация и Cas12a-детекция были проведены одновременно в одной тест-пробирке, а результат теста определяли визуально, при освещении пробы синим светом.

Одновременное определение нескольких мишеней (мультиплексная детекция) является несомненным достоинством биосенсорной платформы. Возможность такой детекции комбинированием мультиплексной RPA и Cas12a-нуклеазы была показана в [64]. Продукты одновременной

амплификации фрагментов генов *tcdA* и *tcdB* бактерии *S. difficile* (кодируют соответственно бактериальные токсины А и В), возбудителя псевдомембранозного колита, были детектированы в разных тест-пробирках, каждая из которых содержала комплекс Cas12a-нуклеазы с нРНК, узнающей последовательность либо в гене *tcdA*, либо в гене *tcdB*. Результат *trans*-активации Cas12a визуализировали как инструментальным методом (на флуориметре), так и неинструментальными — визуально по изменению цвета пробы при её освещении синим светом и с помощью коммерческих тест-полосок. Во всех случаях предел определения составил 10 и 1 копий в реакционной (RPA) смеси при использовании плазмиды со встроенными фрагментами генов для *tcdA* и *tcdB* соответственно, а при тестировании клинических образцов чувствительность метода не уступала ПЦР [64].

Дополнительно к RPA и LAMP, ультравысокая чувствительность детекции была показана при комбинировании Cas12a и RCA — пределы определения для микроРНК (miR-21) и парвовируса В19 (может приводить к развитию хронической анемии у человека) составили соответственно 0,83 аМ и 0,52 аМ мишени в образце [65]. Однако схема детекции в целом была сложной. Амплификацию проводили в отдельной пробирке и аликвоту, содержащую продукт RCA, добавляли в тест-пробирку с Cas12a-нуклеазой. При этом в реакционной смеси с Cas12a-нуклеазой присутствовал ДНК-олигонуклеотид, комплементарный участку повторяющейся последовательности в ультрадлинной онДНК, являющейся продуктом RCA. Формирующиеся многочисленные дуплексы представляли участки днДНК, узнаваемые спейсером нРНК, что приводило к появлению *trans*-активности у Cas12a-нуклеазы. Также в реакционной смеси присутствовал второй ДНК-олигонуклеотид (universal blocker probe, BP), который расщеплялся при активации Cas12a. Аликвоту, содержащую продукты реакции, смешивали с равным объёмом раствора, содержащего “репортёры” (universal reporter probe, RP) — ДНК-олигонуклеотид, комплементарный BP и несущий на конце молекулу красителя метиленовый синий с высокой электрохимической активностью. Полученную смесь помещали на поверхность стеклоглеродного электрода, модифицированного восстановленным оксидом графена. Если BP был деградирован, то дуплекс BP/RP не формировался, RP адсорбировался на поверхности электрода и детектировался сигнал электрохимического окисления метиленового синего. В противном случае формировался дуплекс, который не имел сродства к поверхности электрода и, соответственно, сигнал окисления отсутствовал [65].

Таким образом, к настоящему времени на многочисленных примерах показана возможность создания диагностических биосенсорных платформ комбинированием методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот RPA и LAMP с детекцией целевых продуктов амплификации с помощью Cas12a-нуклеазы. Следует отметить,

что во всех указанных выше работах была также продемонстрирована исключительная селективность детекции. При высокой чувствительности (на уровне единичных молекул), такие платформы будут отличаться простотой использования, что важно для ДНК-диагностики в формате PONT: реакция может быть проведена в одной реакционной пробирке без использования сложного оборудования, а результат определён либо визуально по изменению цвета реакционной смеси, либо с помощью коммерческих тест-полосок.

3.3. CRISPR/Cas12b

Cas12b-нуклеаза, полученная из термофильных бактерий, может проявлять нуклеазную активность при более высоких температурах, чем Cas12a. Это свойство Cas12b-нуклеазы оказалось востребованным при разработке диагностических биосенсорных платформ, основанных на комбинировании Cas-детекции с LAMP, поскольку позволяло проводить тестирование в формате одной тест-пробы. Впервые Cas12b-нуклеаза (полученная из термофильной бактерии *A. acidoterrestris*) была использована в 2019 г. [66]. Однако она обладала приемлемой *trans*-активностью только при температуре, не превышающей 55°C, что существенно ограничивало эффективность LAMP и приводило к сильному увеличению времени тестирования. Позднее стали использовать Cas12b из семейства бактерий *Brevibacillus*, что позволило проводить LAMP при более высокой температуре — 60–62°C (метод получил название HOLMESv2) [67]. Недавно была предложена рекомбинантная Cas12b-нуклеаза, модифицированная генно-инженерными методами, которая обладает приемлемой *trans*-активностью до температуры 67°C [68], что позволяет проводить LAMP в оптимальном для метода диапазоне температур 60–65°C.

Как и в случае с Cas12a, использование Cas12b-нуклеазы позволяет достичь ультравысокой чувствительности детекции. Так, в работе [69] при использовании Cas12b из термофильной бактерии *A. acidiphilus* был получен предел определения 10 копий в 1 мкл образца (10 копий в реакционной смеси) для детекции вируса гепатита В человека, что по данным авторов соответствовало 25 копиям генома вируса в 1 мл крови. Тестирование проводили в одной тест-пробирке (LAMP и Cas-детекция проходили одновременно) при 60°C с последующим инструментальным (использовался флуориметр) определением результата реакции [69]. Высокая чувствительность тестов на основе комбинации LAMP и Cas12b-нуклеазы была продемонстрирована также и в других исследованиях, например [70–72]. В работе [70] было показано, что детекция парвовируса, вызывающего энтерит у собак, может быть проведена как в формате двух, так и одной тест-пробы. В обоих случаях она характеризовалась пределом определения ДНК-мишени на уровне 1 копии в реакционной смеси (0,1 копия/мкл в тестируемом образце), что было в 100 раз меньше, чем в случае ПЦР или только LAMP. Предел определения для вируса оспы обезьян

(зоонозная инфекция, которая может передаваться человеку от животных или при близком контакте между людьми) составлял 10 копий геномной ДНК вируса в реакционной смеси при использовании LAMP/Cas12b-системы; при этом результат теста определяли с помощью тест-полоски [71]. Такой же предел определения был найден при детекции бактериального патогена *P. aeruginosa* комбинацией LAMP и Cas12b в формате одной тест-пробирки [72].

Таким образом, использование Cas12b-нуклеазы позволяет комбинировать Cas12b-детекцию с LAMP, обеспечивая проведение тестирования в формате одной пробирки с чувствительностью на уровне аттомолярной концентрации мишени. Интересно, что Cas12b также была использована и в сочетании с RPA: предел определения синтетических фрагментов ДНК, имитирующих участок генома высоко онкогенного типа ВПЧ — ВПЧ16, составил 1 аМ [73].

3.4. CRISPR/Cas14 (Cas12f)

Несмотря на то, что Cas14-нуклеаза имеет небольшой размер в сравнении с другими Cas-нуклеазами, что рассматривается как преимущество [74], она не часто используется при создании биосенсорных диагностических платформ на основе CRISPR/Cas-нуклеаз. Это может быть связано с тем, что в практическом отношении больший размер Cas12a- и Cas12b-нуклеаз не оказался критическим фактором при их использовании в диагностических биосенсорных системах. Тем не менее, использование Cas14-нуклеазы для селективной детекции RPA-ампликонов показало, что возможно достижение низких значений предела определения [75]. При использовании в качестве мишени плазмид, содержащих фрагменты либо гена бактерии *M. pneumoniae*, либо вируса гепатита В, были получены значения для пределов определения 10 копий плазмиды в 1 мкл (20 копий в RPA-пробе). При этом RPA и Cas14-детекция были проведены последовательно в разных тест-пробирках, а результат оценивали с помощью измерения уровня флуоресценции на флуориметре [75].

3.5. CRISPR/Cas3

Как и Cas14, Cas3-нуклеаза в настоящее время широко не используется для создания диагностических биосенсорных систем, что скорее всего связано с необходимостью использования сложных рибопротеиновых комплексов, требующих экспрессии и очистки. Действительно, в работе [76], для создания диагностической платформы на основе Cas3-нуклеазы (получившей наименование CONAN — Cas3-Operated Nucleic Acid detection), авторы использовали мультикомпонентный рибопротеиновый комплекс EcoCascade (включающий crRNA и несколько Cas-белков из *E. coli*), полученный хроматографической очисткой после со-экспрессии в бакуловирусной векторной системе, и рекомбинантную EcoCas3-нуклеазу из *E. coli*. При сочетании с RPA (при последовательном выполнении реакций в двух тест-пробирках)

удалось показать высокую чувствительность детекции синтетических фрагментов ДНК, представляющих участки гена *EMX1* человека и гена *Tur* мыши: пределы определения лежали на уровне единичных копий фрагментов (аттомолярная концентрация). Однако для синтетических фрагментов, представляющих участки кДНК геномов вирусов гриппа H1N1 и SARS-CoV-2, достичь высокой чувствительности не получилось. По мнению авторов, это было связано с неудачным выбором праймеров для RPA (были использованы известные последовательности праймеров, используемых для ПЦР-детекции данных вирусов). CONAN позволял выполнять детекцию как с использованием флуориметра, так и в неинструментальном формате с помощью тест-полосок [76]. В целом, сопряжение Cas3-нуклеазы с изотермической амплификацией не даёт каких-либо значимых преимуществ по сравнению с Cas12-нуклеазами; при этом необходимость получения и очистки мультикомпонентных рибопротеиновых комплексов существенно снижает потенциал её практического применения.

3.6. CRISPR/Cas13a

Cas13a была первой CRISPR/Cas-нуклеазой, использованной в 2017 г. для создания диагностической биосенсорной платформы, которая получила наименование SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing) [15]. SHERLOCK основан на проведении RT-RPA с праймерами, последовательность одного из которых дополнена промотором T7 РНК-полимеразы, последующем синтезе РНК-фрагментов на RPA-ампликонах как матрице, и селективной детекции целевых РНК-фрагментов комплексом нРНК/Cas13a. В качестве “репортёров” были использованы короткие РНК-олигонуклеотиды, несущие на концах FAM и “гаситель”. Платформа получила дальнейшее развитие как SHERLOCKv2 [77] и HUDSON (Heating Unextracted Diagnostic Samples to Obliterate Nucleases) [18] с возможностями проведения тестирования в одной тест-пробе с использованием лиофилизированных реактивов и неинструментальной детекции результата реакции с использованием коммерческих тест-полосок (в этом случае “репортёры” несли на концах FAM и биотин), а также возможностью мультиплексного тестирования (SHERLOCKv2). С её использованием были достигнуты пределы определения вирусов денге и Зика на уровне аттомолярных концентраций (1–2 копии вируса на реакцию) [18, 77].

Схемы детекции, положенные в основу диагностических платформ SHERLOCK, SHERLOCKv2 и HUDSON, стали широко использоваться в дальнейшем для создания высокочувствительных и селективных тестов для детекции различных патогенов. Так, последовательно выполняя RT-RPA, синтез РНК с T7 РНК-полимеразой и Cas13a-детекцию целевых РНК-фрагментов с визуальной регистрацией результата реакции при освещении тест-пробы синим светом, был достигнут предел определения вируса трансмиссивного гастроэнтерита 10 копий

на реакцию [78]. Тест показал высокую селективность и не уступал по чувствительности ПЦР-тесту. Используя последовательно выполняемые реакции, бактериальный патоген *V. parahaemolyticus* был детектирован с пределом определения 1 копия/мкл (1 копия генома на реакцию RPA) с использованием коммерческих тест-полосок для визуализации результата теста [79]. Было также показано, что тестирование может быть выполнено в одной тест-пробе: вирус птичьего гриппа H9N2 был детектирован с пределом определения 1 копия/мкл (5 копий генома вируса в реакционной пробе) с высокой селективностью, измеряя уровень флуоресценции в пробе на флуориметре [80].

Наряду с RPA, предпринимались попытки сопряжения Cas13a-детекции с NASBA. Такое сопряжение имеет несомненное преимущество в том, что продуктом NASBA являются РНК-ампликоны, которые могут узнаваться комплексом нРНК/Cas13a, так что необходимость в синтезе РНК-фрагментов отпадает. Другим преимуществом является то, что можно детектировать непосредственно транскрипты, количество которых может на порядки превышать количество копий гена, при этом отпадает необходимость в этапе обратной транскрипции для получения кДНК. Однако до настоящего времени диагностические биосенсорные платформы, основанные на комбинировании NASBA и Cas13a-детекции, не показали чувствительности, сопоставимой с чувствительностью RPA/Cas13a-платформы. При сопряжении NASBA и Cas13a-детекции в формате одной тест-пробирки, пределы определения для РНК-фрагментов, представляющих различные участки генома вируса SARS-CoV-2, составили 20–200 аМ [81]. В другой работе, предел определения числа геномов вируса SARS-CoV-2 составлял 40 аМ при комбинировании NASBA и Cas13a (метод получил название CASCADE — CRISPR/CAS-based Colorimetric nucleic Acid Detection) [82]. Результат тестирования определялся визуально, для чего использовали наночастицы, функционализированные ДНК-олигонуклеотидами. Деградация иммобилизованных на наночастицах ДНК-олигонуклеотидов в результате Cas13a-нуклеазной *trans*-активности приводит к агрегации наночастиц и изменению цвета пробы с красного на фиолетовый. Интересно, что использование данного метода колориметрической детекции результата тестирования при сопряжении Cas13a с RT-RPA на том же объекте дало предел обнаружения только 3 фМ [82]. В ещё одной работе была использована сложная схема усиления сигнала, основанная на иницируемом активированной Cas13a синтезе так называемого “брокколи”-аптамера [83]. “Брокколи”-аптамер является РНК-аптамером, который способен образовывать стабильные комплексы с флуоресцентным красителем DFHBI (3,5-дифтор-4-гидроксibenзилиден имидазолинон), вызывая его флуоресцентное свечение [84]. После проведения NASBA (мишенью служил участок генома вируса SARS-CoV-2), продукты амплификации вносили в тест-пробу с комплексом нРНК/Cas13a, содержащую

ДНК-олигонуклеотид с вставкой, представляющей два уридина. *Trans*-активированная Cas13a расщепляла олигонуклеотид между уридинами, превращая его в праймер, элонгация которого на другом ДНК-олигонуклеотиде (также присутствующим в тест-пробе) создавала матрицу для синтеза “брокколи”-аптамера Т7 РНК-полимеразой. Появление в системе “брокколи”-аптамера приводило к связыванию с ним DFHBI и развитию флуоресценции, которую регистрировали на флуориметре [83]. Несмотря на использование столь сложного подхода, который предполагает несколько последовательных этапов усиления сигнала, предел определения составил только 216 аМ [83].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание биосенсорных платформ на основе CRISPR/Cas-нуклеаз представляется одним из наиболее перспективных направлений развития внелабораторной ДНК-диагностики, способным обеспечивать чувствительность детекции на уровне единичных молекул (аттомольных и субаттомольных концентраций мишени). Использование CRISPR/Cas-нуклеаз обеспечивает специфичность детекции, что связано с селективным узнаванием целевых ампликонов комплексом нРНК/Cas-нуклеазы. CRISPR/Cas-нуклеазы Cas12a, Cas12b и Cas13a получили наибольшее распространение при разработке диагностических биосенсорных платформ, что связано с возможностью усиления детектируемого сигнала в десятки и сотни раз при обретении ими *trans*-активности. Данные нуклеазы показали совместимость с широко используемыми методами изотермической амплификации нуклеиновых кислот (LAMP, RPA и NASBA) и неинструментальными методами детекции (визуальная по изменению цвета тест-пробы и с помощью коммерческих тест-полосок), отвечающих требованиям PONT. Тестирование возможно в формате одной тест-пробы, что снимает проблему контаминации образцов продуктами амплификации. Несмотря на меньшие молекулярные размеры, нуклеаза Cas14 (Cas12f) не получила широкого применения при разработке биосенсорных платформ. Отсутствие возможности усилить сигнал в случае Cas9-нуклеазы является основным сдерживающим фактором в использовании для целей ДНК-диагностики, несмотря на её доступность и широкое применение в геномном редактировании. Однако недавно обнаруженная способность Cas9-нуклеазы приобретать *trans*-активность в определённых условиях *in vitro* может изменить её место в разработке биосенсорных платформ. Использование Cas3-нуклеазы не представляется перспективным в силу сложности ферментативной системы без очевидных преимуществ в чувствительности детекции. Дальнейшее развитие данного направления будет связано в первую очередь с созданием и распространением генно-модифицированных Cas12-нуклеаз со сниженными потребностями в наличии РАМ (или, в идеале, полным отсутствием

такой потребности), а также с повышенной термостабильностью. Развитие новых подходов, позволяющих усилить сигнал, генерируемый *trans*-активированной Cas-нуклеазой, будет также в фокусе исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100170-5).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Erdmann V.A., Jurga S., Barciszewski J. (2015) RNA and DNA diagnostics, Springer Cham, Switzerland, 359 p.
- Rolfs A., Schuller I., Finckh U., Weber-Rolfs I. (2011) PCR: Clinical diagnostics and research, Springer Berlin, Heidelberg, 386 p.
- Nguyen P.Q.M., Wang M., Ann Maria N., Li A.Y., Tan H.Y., Xiong G.M., Tan M.-K.M., Bhagat A.A.S., Ong C.W.M., Lim C.T. (2022) Modular micro-PCR system for the onsite rapid diagnosis of COVID-19. *Microsyst. Nanoeng.*, **8**, 82. DOI: 10.1038/s41378-022-00400-3
- Zhao Y., Chen F., Li Q., Wang L., Fan C. (2015) Isothermal amplification of nucleic acids. *Chem. Rev.*, **115**(22), 12491–12545. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00428
- Бодулев О.Л., Сахаров И.Ю. (2020) Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот и их применение в биоанализе. *Биохимия*, **85**(2), 174–196. DOI: 10.31857/S0320972520020037 [Bodulev O.L., Sakharov I.Yu. (2020) Isothermal nucleic acid amplification techniques and their use in bioanalysis. *Biochemistry (Moscow)*, **85**(2), 147–166. DOI: 10.1134/S0006297920020030]
- Abel G. (2015) Current status and future prospects of point-of-care testing around the globe. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **15**(7), 853–855. DOI: 10.1586/14737159.2015.1060126
- Fernandes R.S., de Oliveira Silva J., Gomes K.B., Azevedo R.B., Townsend D.M., de Paula Sabino A., Branco de Barros A.L. (2022) Recent advances in point of care testing for COVID-19 detection. *Biomed. Pharmacother.*, **153**, 113538. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113538
- de Felice M., de Falco M., Zappi D., Antonacci A., Scognamiglio V. (2022) Isothermal amplification-assisted diagnostics for COVID-19. *Biosens. Bioelectron.*, **205**, 114101. DOI: 10.1016/j.bios.2022.114101
- Hu B., Guo H., Si H., Shi Z. (2024) Emergence of SARS and COVID-19 and preparedness for the next emerging disease X. *Front. Med.*, **18**(1), 1–18. DOI: 10.1007/s11684-024-1066-6
- Yang H., Ledesma-Amaro R., Gao H., Ren Y., Deng R. (2023) CRISPR-based biosensors for pathogenic biosafety. *Biosens. Bioelectron.*, **228**, 115189. DOI: 10.1016/j.bios.2023.115189
- Oliveira B.B., Veigas B., Baptista P.V. (2021) Isothermal amplification of nucleic acids: The race for the next “gold standard.” *Front. Sens.*, **2**, 752600. DOI: 10.3389/fsens.2021.752600
- Lee Y., Oh Y., Lee S.H. (2024) Recent advances in genome engineering by CRISPR technology. *BMB Reports*, **57**(1), 12–18. DOI: 10.5483/BMBRep.2023-0157
- Westermann L., Neubauer B., Köttgen M. (2021) Nobel Prize 2020 in Chemistry honors CRISPR: A tool for rewriting the code of life. *Eur. J. Physiol.*, **473**(1), 1–2. DOI: 10.1007/s00424-020-02497-9
- Fapohunda F.O., Qiao S., Pan Y., Wang H., Liu Y., Chen Q., Lü P. (2022) CRISPR Cas system: A strategic approach in detection of nucleic acids. *Microbiol. Res.*, **259**, 127000. DOI: 10.1016/j.micres.2022.127000
- Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Lee J.W., Essletzbichler P., Dy A.J., Joung J., Verdine V., Donghia N., Daringer N.M., Freije C.A., Myhrvold C., Bhattacharyya R.P., Livny J., Regev A., Koonin E.V., Hung D.T., Sabeti P.C., Collins J.J., Zhang F. (2017) Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, **356**(6336), 438–442. DOI: 10.1126/science.aam9321
- Chen J.S., Ma E., Harrington L.B., da Costa M., Tian X., Palefsky J.M., Doudna J.A. (2018) CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, **360**(6387), 436–439. DOI: 10.1126/science.aar6245
- Li S.-Y., Cheng Q.-X., Liu J.-K., Nie X.-Q., Zhao G.-P., Wang J. (2018) CRISPR-Cas12a has both *cis*- and *trans*-cleavage activities on single-stranded DNA. *Cell Res.*, **28**(4), 491–493. DOI: 10.1038/s41422-018-0022-x
- Myhrvold C., Freije C.A., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Metsky H.C., Durbin A.F., Kellner M.J., Tan A.L., Paul L.M., Parham L.A., Garcia K.F., Barnes K.G., Chak B., Mondini A., Nogueira M.L., Isern S., Michael S.F., Lorenzana I., Yozwiak N.L., MacInnis B.L., Bosch I., Gehrke L., Zhang F., Sabeti P.C. (2018) Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*, **360**(6387), 444–448. DOI: 10.1126/science.aas8836
- Ackerman C.M., Myhrvold C., Thakku S.G., Freije C.A., Metsky H.C., Yang D.K., Ye S.H., Boehm C.K., Kosoko-Thoroddsen T.-S.F., Kehe J., Nguyen T.G., Carter A., Kulesa A., Barnes J.R., Dugan V.G., Hung D.T., Blainey P.C., Sabeti P.C. (2020) Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13. *Nature*, **582**(7811), 277–282. DOI: 10.1038/s41586-020-2279-8
- Koonin E.V., Makarova K.S. (2019) Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **374**(1772), 20180087. DOI: 10.1098/rstb.2018.0087
- Chen J., Huang Y., Xiao B., Deng H., Gong K., Li K., Li L., Hao W. (2022) Development of a RPA-CRISPR-Cas12a assay for rapid, simple, and sensitive detection of *Mycoplasma hominis*. *Front. Microbiol.*, **13**, 842415. DOI: 10.3389/fmicb.2022.842415
- Курбатов Л.К., Радько С.П., Хмельва С.А., Птицын К.Г., Тимошенко О.С., Лисица А.В. (2024) Применение технологии DETECTR для селективной детекции бактериального фитопатогена *Dickeya solani* с использованием рекомбинантной CRISPR-нуклеазы Cas12a, полученной одностадийной хроматографической очисткой. *Прикладная биохимия и микробиология*, **60**(1), 20–28. DOI: 10.31857/S0555109924010025

- [Kurbatov L.K., Radko S.P., Khmeleva S.A., Ptitsyn K.G., Timoshenko O.S., Lisitsa A.V. (2024) Application of DETECTR for selective detection of bacterial phytopathogen *Dickeya solani* using recombinant CRISPR-nuclease Cas12a obtained by single-stage chromatographic purification. Applied Biochemistry and Microbiology, **60**(1), 17–25. DOI: 10.1134/S0003683824010095]
23. Курбатов Л.К., Радко С.П., Кравченко С.В., Киселева О.И., Дурманов Н.Д., Лисица А.В. (2020) Одностадийная очистка CRISPR-нуклеазы Cas13a методом металл-хелатной хроматографии после гетерологичной экспрессии с сохранением коллатеральной рибонуклеазной активности. Прикладная биохимия и микробиология, **56**(6), 587–594. DOI: 10.31857/S0555109920060070 [Kurbatov L.K., Radko S.P., Kravchenko S.V., Kiseleva O.I., Durmanov N.D., Lisitsa A.V. (2020) Single stage purification of CRISPR/Cas13a nuclease via metal-chelating chromatography following heterologous expression with the preservation of collateral ribonuclease activity. Applied Biochemistry and Microbiology, **56**(6), 671–677. DOI: 10.1134/S0003683820060071]
24. Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Terns R.M., Terns M.P., White M.F., Yakunin A.F., Garrett R.A., van der Oost J., Backofen R., Koonin E.V. (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. Nat. Rev. Microbiol., **13**(11), 722–736. DOI: 10.1038/nrmicro3569
25. Zhu Y. (2022) Advances in CRISPR/Cas9. BioMed Res. Int., **2022**, 1–13. DOI: 10.1155/2022/9978571
26. Chen J., Chen Y., Huang L., Lin X., Chen H., Xiang W., Liu L. (2024) Trans-nuclease activity of Cas9 activated by DNA or RNA target binding. Nat. Biotechnol., DOI: 10.1038/s41587-024-02255-7
27. Ding Y., Li H., Chen L.-L., Xie K. (2016) Recent advances in genome editing using CRISPR/Cas9. Front. Plant Sci., **7**, 703. DOI: 10.3389/fpls.2016.00703
28. Hu J.H., Miller S.M., Geurts M.H., Tang W., Chen L., Sun N., Zeina C.M., Gao X., Rees H.A., Lin Z., Liu D.R. (2018) Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. Nature, **556**(7699), 57–63. DOI: 10.1038/nature26155
29. Miller S.M., Wang T., Randolph P.B., Arbab M., Shen M.W., Huang T.P., Matuszek Z., Newby G.A., Rees H.A., Liu D.R. (2020) Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs. Nat. Biotechnol., **38**(4), 471–481. DOI: 10.1038/s41587-020-0412-8
30. Das A., Goswami H.N., Whymys C.T., Sridhara S., Li H. (2022) Structural principles of CRISPR-Cas enzymes used in nucleic acid detection. J. Struct. Biol., **214**(1), 107838. DOI: 10.1016/j.jsb.2022.107838
31. Yamano T., Zetsche B., Ishitani R., Zhang F., Nishimasu H., Nureki O. (2017) Structural basis for the canonical and non-canonical PAM recognition by CRISPR-Cpf1. Mol. Cell, **67**(4), 633–645.e3. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.06.035
32. Zhang J., Li Z., Guo C., Guan X., Avery L., Banach D., Liu C. (2024) Intrinsic RNA targeting triggers indiscriminate DNase activity of CRISPR-Cas12a. Angewandte Chemie International Edition, **63**(20), e202403123. DOI: 10.1002/anie.202403123
33. Makarova K.S., Wolf Y.I., Iranzo J., Shmakov S.A., Alkhnbashi O.S., Brouns S.J.J., Charpentier E., Cheng D., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Scott D., Shah S.A., Siksnys V., Terns M.P., Venclovas Č., White M.F., Yakunin A.F., Yan W., Zhang F., Garrett R.A., Backofen R., van der Oost J., Barrangou R., Koonin E.V. (2020) Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: A burst of class 2 and derived variants. Nat. Rev. Microbiol., **18**(2), 67–83. DOI: 10.1038/s41579-019-0299-x
34. Karvelis T., Bigelyte G., Young J.K., Hou Z., Zedaveinyte R., Budre K., Paulraj S., Djukanovic V., Gasior S., Silanskas A., Venclovas Č., Siksnys V. (2020) PAM recognition by miniature CRISPR-Cas12f nucleases triggers programmable double-stranded DNA target cleavage. Nucleic Acids Res., **48**(9), 5016–5023. DOI: 10.1093/nar/gkaa208
35. Takeda S.N., Nakagawa R., Okazaki S., Hirano H., Kobayashi K., Kusakizako T., Nishizawa T., Yamashita K., Nishimasu H., Nureki O. (2021) Structure of the miniature type V-F CRISPR-Cas effector enzyme. Mol. Cell, **81**(3), 558–570.e3. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.11.035
36. Yang H., Patel D.J. (2024) Structures, mechanisms and applications of RNA-centric CRISPR-Cas13. Nat. Chem. Biol., **20**(6), 673–688. DOI: 10.1038/s41589-024-01593-6
37. He L., St. John James M., Radovic M., Ivancic-Bace I., Bolt E.L. (2020) Cas3 Protein — A review of a multi-tasking machine. Genes, **11**(2), 208. DOI: 10.3390/genes11020208
38. Notomi T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res., **28**(12), E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
39. Nagamine K., Hase T., Notomi T. (2002) Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol. Cell. Probes., **16**(3), 223–229. DOI: 10.1006/mcpr.2002.0415
40. Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L., Armes N.A. (2006) DNA detection using recombination proteins. PLoS Biol., **4**(7), e204. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040204
41. Walker G.T., Little M.C., Nadeau J.G., Shank D.D. (1992) Isothermal *in vitro* amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**(1), 392–396. DOI: 10.1073/pnas.89.1.392
42. van Ness J., van Ness L.K., Galas D.J. (2003) Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**(8), 4504–4509. DOI: 10.1073/pnas.0730811100
43. Compton J. (1991) Nucleic acid sequence-based amplification. Nature, **350**(6313), 91–92. DOI: 10.1038/350091a0
44. Mohsen M.G., Kool E.T. (2016) The discovery of rolling circle amplification and rolling circle transcription. Acc. Chem. Res., **49**(11), 2540–2550. DOI: 10.1021/acs.accounts.6b00417
45. Pardee K., Green A.A., Takahashi M.K., Braff D., Lambert G., Lee J.W., Ferrante T., Ma D., Donghia N., Fan M., Daringer N.M., Bosch I., Dudley D.M., O'Connor D.H., Gehrke L., Collins J.J. (2016) Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components. Cell, **165**(5), 1255–1266. DOI: 10.1016/j.cell.2016.04.059
46. Koksaldi I.C., Park D., Atilla A., Kang H., Kim J., Seker U.O.S. (2024) RNA-based sensor systems for affordable diagnostics in the age of pandemics. ACS Synth. Biol., **13**(4), 1026–1037. DOI: 10.1021/acssynbio.3c00698
47. Huang M., Zhou X., Wang H., Xing D. (2018) Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 triggered isothermal amplification for site-specific nucleic acid detection. Anal. Chem., **90**(3), 2193–2200. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b04542
48. Zhou W., Hu L., Ying L., Zhao Z., Chu P.K., Yu X.-F. (2018) A CRISPR-Cas9-triggered strand displacement amplification method for ultrasensitive DNA detection. Nat. Commun., **9**(1), 5012. DOI: 10.1038/s41467-018-07324-5

49. Mohd A., Phutela R., Kumar M., Ansari A.H., Rauthan R., Gulati S., Sharma N., Sinha D., Sharma S., Singh S., Acharya S., Sarkar S., Paul D., Kathpalia P., Aich M., Sehgal P., Ranjan G., Bhojar R.C., Indian CoV2 Genomics & Genetic Epidemiology (IndiCovGEN) Consortium, Singhal K., Lad H., Patra P.K., Makharia G., Chandak G.R., Pesala B., Chakraborty D., Maiti S. (2021) Rapid and accurate nucleobase detection using FnCas9 and its application in COVID-19 diagnosis. *Biosens. Bioelectron.*, **183**, 113207. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113207
50. Курбатов Л.К., Птицын К.Г., Хмелёва С.А., Радько С.П., Лисица А.В., Супрун В.Е. (2024) Рекомбиназная полимеразная и петлевая изотермическая амплификация в ДНК-диагностике инфекционных заболеваний. *Журнал аналитической химии*, **79**(3), 210–228. DOI: 10.31857/S0044450224030025 [Kurbatov L.K., Ptityn K.G., Khmeleva S.A., Radko S.P., Lisitsa A.V., Suprun E.V. (2024) Recombinase polymerase and loop-mediated isothermal amplification in the DNA diagnostics of infectious diseases. *Journal of Analytical Chemistry*, **79**(3), 273–286. DOI: 10.1134/S1061934824030080]
51. Ai J.-W., Zhou X., Xu T., Yang M., Chen Y., He G.-Q., Pan N., Cai Y., Li Y., Wang X., Su H., Wang T., Zeng W., Zhang W.-H. (2019) CRISPR-based rapid and ultra-sensitive diagnostic test for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg. Microb. Infect.*, **8**(1), 1361–1369. DOI: 10.1080/22221751.2019.1664939
52. Wang B., Wang R., Wang D., Wu J., Li J., Wang J., Liu H., Wang Y. (2019) Cas12aVDet: A CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection. *Anal. Chem.*, **91**(19), 12156–12161. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b01526
53. Deng L., He X., Liu K., Li Y., Xia H., Qian H., Lu X., Mao X., Xiang Y. (2023) One-pot RPA-Cas12a assay for instant and visual detection of *Burkholderia pseudomallei*. *Anal. Chim. Acta*, **1252**, 341059. DOI: 10.1016/j.aca.2023.341059
54. Sy L., Sw O. (2022) Filtration-based LAMP-CRISPR/Cas12a system for the rapid, sensitive and visualized detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Talanta*, **241**, 123186. DOI: 10.1016/j.talanta.2021.123186
55. Hao J., Xie L., Yang T., Huo Z., Liu G., Liu Y., Xiong W., Zeng Z. (2023) Naked-eye on-site detection platform for *Pasteurella multocida* based on the CRISPR-Cas12a system coupled with recombinase polymerase amplification. *Talanta*, **255**, 124220. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.124220
56. Mukama O., Wu J., Li Z., Liang Q., Yi Z., Lu X., Liu Y., Liu Y., Hussain M., Makafe G.G., Liu J., Xu N., Zeng L. (2020) An ultrasensitive and specific point-of-care CRISPR/Cas12 based lateral flow biosensor for the rapid detection of nucleic acids. *Biosens. Bioelectron.*, **159**, 112143. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112143
57. Tang Y., Qi L., Liu Y., Guo L., Zhao R., Yang M., Du Y., Li B. (2022) CLIPON: A CRISPR-enabled strategy that turns commercial pregnancy test strips into general point-of-need test devices. *Angewandte Chemie International Edition*, **61**(12), e202115907. DOI: 10.1002/anie.202115907
58. Liu D., Zheng Y., Yang Y., Xu X., Kang H., Jiang Q., Yang M., Qu L., Liu J. (2022) Establishment and application of ERA-LFD method for rapid detection of feline calicivirus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **106**(4), 1651–1661. DOI: 10.1007/s00253-022-11785-6
59. Sun Y., Yu L., Liu C., Ye S., Chen W., Li D., Huang W. (2021) One-tube SARS-CoV-2 detection platform based on RT-RPA and CRISPR/Cas12a. *J. Transl. Med.*, **19**(1), 74. DOI: 10.1186/s12967-021-02741-5
60. Jiao J., Liu Y., Yang M., Zheng J., Liu C., Ye W., Song S., Bai T., Song C., Wang M., Shi J., Wan R., Zhang K., Hao P., Feng J., Zheng X. (2023) The engineered CRISPR-Mb2Cas12a variant enables sensitive and fast nucleic acid-based pathogens diagnostics in the field. *Plant Biotechnol. J.*, **21**(7), 1465–1478. DOI: 10.1111/pbi.14051
61. Shao F., Park J.S., Zhao G., Hsieh K., Wang T.-H. (2023) Elucidating the role of CRISPR/Cas in single-step isothermal nucleic acid amplification testing assays. *Anal. Chem.*, **95**(7), 3873–3882. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c05632
62. Lin M., Yue H., Tian T., Xiong E., Zhu D., Jiang Y., Zhou X. (2022) Glycerol additive boosts 100-fold sensitivity enhancement for one-pot RPA-CRISPR/Cas12a assay. *Anal. Chem.*, **94**(23), 8277–8284. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c00616
63. Lin K., Guo J., Guo X., Li Q., Li X., Sun Z., Zhao Z., Weng J., Wu J., Zhang R., Li B. (2023) Fast and visual detection of nucleic acids using a one-step RPA-CRISPR detection (ORCD) system unrestricted by the PAM. *Anal. Chim. Acta*, **1248**, 340938. DOI: 10.1016/j.aca.2023.340938
64. Jiang T., Hu X., Lin C., Xia Z., Yang W., Zhu Y., Xu H., Tang H., Shen J. (2023) Rapid visualization of *Clostridioides difficile* toxins A and B by multiplex RPA combined with CRISPR-Cas12a. *Front. Microbiol.*, **14**, 1119395. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1119395
65. Qing M., Chen S.L., Sun Z., Fan Y., Luo H.Q., Li N.B. (2021) Universal and programmable rolling circle amplification-CRISPR/Cas12a-mediated immobilization-free electrochemical biosensor. *Anal. Chem.*, **93**(20), 7499–7507. DOI: 10.1021/acs.analchem.1c00805
66. Li L., Li S., Wu N., Wu J., Wang G., Zhao G., Wang J. (2019) HOLMESv2: A CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation. *ACS Synth. Biol.*, **8**(10), 2228–2237. DOI: 10.1021/acssynbio.9b00209
67. Nguyen L.T., Macaluso N.C., Pizzano B.L.M., Cash M.N., Spacek J., Karasek J., Miller M.R., Lednický J.A., Dinglasan R.R., Salemi M., Jain P.K. (2022) A thermostable Cas12b from *Brevibacillus* leverages one-pot discrimination of SARS-CoV-2 variants of concern. *EBioMedicine*, **77**, 103926. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.103926
68. Nguyen L.T., Rananaware S.R., Yang L.G., Macaluso N.C., Ocana-Ortiz J.E., Meister K.S., Pizzano B.L.M., Sandoval L.S.W., Hautamaki R.C., Fang Z.R., Joseph S.M., Shoemaker G.M., Carman D.R., Chang L., Rakestraw N.R., Zachary J.F., Guerra S., Perez A., Jain P.K. (2023) Engineering highly thermostable Cas12b via *de novo* structural analyses for one-pot detection of nucleic acids. *Cell Rep. Med.*, **4**(5), 101037. DOI: 10.1016/j.xcrm.2023.101037
69. Xu H., Lin G., Chen R., Cai Z., Sun Y., Zhang X., Zhao B., Zeng Y., Liu J., Liu X. (2024) CRISPR/Cas12b assisted loop-mediated isothermal amplification for easy, rapid and sensitive quantification of chronic HBV DNA in one-pot. *Anal. Chim. Acta*, **1310**, 342702. DOI: 10.1016/j.aca.2024.342702
70. Chen Y., Zhang X., Hu G., Pan Y., Guan Y., Yang J., Chen H. (2024) A LAMP-CRISPR/Cas12b rapid detection platform for canine parvovirus detection. *Anal. Methods*, **16**(32), 5519–5526. DOI: 10.1039/d4ay00977k
71. Chen X., Yuan W., Yang X., Shi Y., Zeng X., Huang J., Wang Y., Li S. (2023) Ultrasensitive and specific identification of monkeypox virus Congo Basin and West African strains using a CRISPR/Cas12b-based platform. *Microbiol. Spectr.*, **11**(2), e04035-22. DOI: 10.1128/spectrum.04035-22

72. Han X., Lu M., Zhang Y., Liu X., Zhang Q., Bai X., Man S., Zhao L., Ma L. (2024) A thermostable Cas12b-powered bioassay coupled with loop-mediated isothermal amplification in a customized “one-pot” vessel for visual, rapid, sensitive, and on-site detection of genetically modified crops. *J. Agric. Food Chem.*, **72**(19), 11195–11204. DOI: 10.1021/acs.jafc.4c01028
73. Teng F., Guo L., Cui T., Wang X.-G., Xu K., Gao Q., Zhou Q., Li W. (2019) CDetection: CRISPR-Cas12b-based DNA detection with sub-attomolar sensitivity and single-base specificity. *Genome Biol.*, **20**(1), 132. DOI: 10.1186/s13059-019-1742-z
74. Aquino-Jarquín G. (2019) CRISPR-Cas14 is now part of the artillery for gene editing and molecular diagnostic. *Nanomedicine*, **18**, 428–431. DOI: 10.1016/j.nano.2019.03.006
75. He J., Hu X., Weng X., Wang H., Yu J., Jiang T., Zou L., Zhou X., Lyu Z., Liu J., Zhou P., Xiao X., Zhen D., Deng Z. (2024) Efficient, specific and direct detection of double-stranded DNA targets using Cas12f1 nucleases and engineered guide RNAs. *Biosens. Bioelectron.*, **260**, 116428. DOI: 10.1016/j.bios.2024.116428
76. Yoshimi K., Takeshita K., Yamayoshi S., Shibumura S., Yamauchi Y., Yamamoto M., Yotsuyanagi H., Kawaoka Y., Mashimo T. (2022) CRISPR-Cas3-based diagnostics for SARS-CoV-2 and influenza virus. *iScience*, **25**(2), 103830. DOI: 10.1016/j.isci.2022.103830
77. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Kellner M.J., Joung J., Collins J.J., Zhang F. (2018) Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, **360**(6387), 439–444. DOI: 10.1126/science.aaq0179
78. Wang H., Cheng Z., Luo R., Yang Q., Zeng Y., Yang Y., Chen Y., Li W., Liu X. (2024) RPA-CRISPR-Cas13a-assisted detection method of transmissible gastroenteritis virus. *Front. Vet. Sci.*, **11**, 1428591. DOI: 10.3389/fvets.2024.1428591
79. Hou Y., Liu X., Wang Y., Guo L., Wu L., Xia W., Zhao Y., Xing W., Chen J., Chen C. (2024) Establishment and application of a rapid visualization method for detecting *Vibrio parahaemolyticus* nucleic acid. *Infectious Medicine*, **3**(2), 100111. DOI: 10.1016/j.imj.2024.100111
80. Chen S.-S., Yang Y.-L., Wang H.-Y., Guo T.-K., Azeem R.-M., Shi C.-W., Yang G.-L., Huang H.-B., Jiang Y.-L., Wang J.-Z., Cao X., Wang N., Zeng Y., Yang W.-T., Wang C.-F. (2024) CRISPR/Cas13a-based genome editing for establishing the detection method of H9N2 subtype avian influenza virus. *Poultry Science*, **103**(10), 104068. DOI: 10.1016/j.psj.2024.104068
81. Jung J.K., Dreyer K.S., Dray K.E., Muldoon J.J., George J., Shirman S., Cabezas M.D., d’Aquino A.E., Verosloff M.S., Seki K., Rybnicky G.A., Alam K.K., Bagheri N., Jewett M.C., Leonard J.N., Mangan N.M., Lucks J.B. (2024) Developing, characterizing and modeling CRISPR-based point-of-use pathogen diagnostics. *bioRxiv* [Preprint], 2024.07.03.601853. DOI: 10.1101/2024.07.03.601853
82. López-Valls M., Escalona-Noguero C., Rodríguez-Díaz C., Pardo D., Castellanos M., Milán-Rois P., Martínez-Garay C., Coloma R., Abreu M., Cantón R., Galán J.C., Miranda R., Somoza Á., Sot B. (2022) CASCADE: Naked eye-detection of SARS-CoV-2 using Cas13a and gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta*, **1205**, 339749. DOI: 10.1016/j.aca.2022.339749
83. Wang Y., Xue T., Wang M., Ledesma-Amaro R., Lu Y., Hu X., Zhang T., Yang M., Li Y., Xiang J., Deng R., Ying B., Li W. (2022) CRISPR-Cas13a cascade-based viral RNA assay for detecting SARS-CoV-2 and its mutations in clinical samples. *Sens. Actuators B Chem.*, **362**, 131765. DOI: 10.1016/j.snb.2022.131765
84. Filonov G.S., Moon J.D., Svensen N., Jaffrey S.R. (2014) Broccoli: Rapid selection of an RNA mimic of green fluorescent protein by fluorescence-based selection and directed evolution. *J. Am. Chem. Soc.*, **136**(46), 16299–16308. DOI: 10.1021/ja508478x

Поступила в редакцию: 02. 08. 2024.
 После доработки: 29. 08. 2024.
 Принята к печати: 06. 09. 2024.

**BIOSENSING PLATFORMS FOR DNA DIAGNOSTICS BASED ON CRISPR/Cas NUCLEASES:
TOWARDS THE DETECTION OF NUCLEIC ACIDS AT THE LEVEL
OF SINGLE MOLECULES IN NON-LABORATORY SETTINGS**

S.A. Khmeleva¹, K.G. Ptitsyn¹, L.K. Kurbatov¹, O.S. Timoshenko¹, E.V. Suprun², S.P. Radko^{1}, A.V. Lisitsa¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: radkos@yandex.ru

²Chemistry Faculty of M.V. Lomonosov Moscow State University,
1/3 Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia

The use of CRISPR/Cas nucleases for the development of DNA diagnostic systems in out-of-laboratory conditions (point-of-need testing, PONT) has demonstrated rapid growth in the last few years, starting with the appearance in 2017–2018 of the first diagnostic platforms known as DETECTR and SHERLOCK. The platforms are based on a combination of methods of nucleic acid isothermal amplification with selective CRISPR/Cas detection of target amplicons. This significantly improves the sensitivity and specificity of PONT, making them comparable with or even superior to the sensitivity and specificity of polymerase chain reaction, considered as the “gold standard” of DNA diagnostics. The review considers modern approaches to the coupling of CRISPR/Cas detection using Cas9, Cas12a, Cas12b, Cas13a, Cas14, and Cas3 nucleases to various methods of nucleic acid isothermal amplification, with an emphasis on works in which sensitivity at the level of single molecules (attomolar and subattomolar concentrations of the target) is achieved. The properties of CRISPR/Cas nucleases used for targeted DNA diagnostics and the features of methods of nucleic acid isothermal amplification are briefly considered in the context of the development of diagnostic biosensing platforms. Special attention is paid to the most promising directions for the development of DNA diagnostics using CRISPR/Cas nuclease.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: CRISPR/Cas nucleases; nucleic acid detection; single molecules; DNA diagnostics

Funding. The study was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122030100170-5).

Received: 02.08.2024; revised: 29.08.2024; accepted: 06.09.2024.