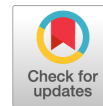


МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПЛАТФОРМЫ, СОЗДАННЫЕ НА БАЗЕ СИСТЕМ CRISPR/Cas



А.А. Волков, А.С. Долгова, В.Г. Дедков

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Последние несколько лет системы CRISPR/Cas активно исследуются и используются для широкого спектра прикладных задач. Многообразие вариантов их применения обусловлено способностью нуклеаз типа Cas направленно расщеплять заданные последовательности нуклеиновых кислот. При этом исследователь может задавать необходимую последовательность направляющих элементов системы, в роли которых выступают так называемые единые гидовые РНК, что позволяет системе воздействовать на определенные мишени. Такое свойство и стало одной из причин интереса к системам CRISPR/Cas. Одним из первых направлений применения данных систем было использование их для геномного редактирования. В дальнейшем список потенциальных возможностей расширился: например, CRISPR/Cas можно задействовать в генотерапии и эпигенетических исследованиях. Из единых гидовых РНК могут быть составлены библиотеки, выступающие основой для создания вирусных векторов с последующим трансдуцированием бактериальных клеток и нокаутингом указанных мишеней при помощи cas-белков. Такой подход позволяет осуществлять поиск бактериальных генов, ответственных за устойчивость или чувствительность к различным препаратам. Использование этих систем в молекулярной диагностике инфекционных заболеваний считается одним из наиболее многообещающих направлений. Диагностика при помощи CRISPR/Cas позволяет обнаруживать в образцах даже небольшие концентрации патогенных организмов за счет детекции их нуклеотидных последовательностей. При этом такие анализы оказываются точными, быстрыми и несложными в применении, а для функционирования ряда платформ даже не требуется дорогостоящее оборудование, поскольку уже разработаны методы быстрой и простой пробоподготовки, а современные подходы преамплификации позволяют уйти от использования термоциклических аппаратов. Примечательно, что уже открыто огромное число естественных систем CRISPR/Cas различных типов. Такое изобилие способствует разработке разнообразных искусственных систем, каждая из которых обладает своими особенными характеристиками. На их базе создается множество диагностических платформ, различающихся по свойствам, что позволяет исследователям и медицинским работникам подбирать наилучший метод для решения определенных задач. Для выбора подходящей платформы важно иметь представление об устройстве и функционировании систем CRISPR/Cas, а следовательно, необходима актуальная классификация систем, на базе которой, в свою очередь, уже удобно оценивать само многообразие платформ молекулярной диагностики и представлять типовые характеристики и нюансы устройства для каждого метода. Таким образом, данный обзор, посвященный преимущественно платформам молекулярной диагностики инфекционных заболеваний, также затрагивает вопросы функционирования, устройств и классификации систем CRISPR/Cas.

Ключевые слова: CRISPR/Cas, молекулярная диагностика, Cas12, Cas13, изотермическая амплификация.

Адрес для переписки:

Волков Артемий Андреевич
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.
Тел.: 8 921 361-73-09.
E-mail: volkov.art.andr@gmail.com

Contacts:

Artemii A. Volkov
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 921 361-73-09.
E-mail: volkov.art.andr@gmail.com

Для цитирования:

Волков А.А., Долгова А.С., Дедков В.Г. Молекулярные диагностические платформы, созданные на базе систем CRISPR/Cas // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 1. С. 9–20. doi: 10.15789/2220-7619-CCB-1843

Citation:

Volkov A.A., Dolgova A.S., Dedkov V.G. CRISPR/Cas-based diagnostic platforms // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 1, pp. 9–20. doi: 10.15789/2220-7619-CCB-1843

CRISPR/Cas-BASED DIAGNOSTIC PLATFORMS

Volkov A.A., Dolgova A.S., Dedkov V.G.

St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Over the last few years, CRISPR/Cas systems have been extensively studied and used for a wide range of applied purposes. The variety of their applications is accounted for by the ability of Cas-type nucleases to targetly cleave specified nucleic acid sequences. In this case, the researcher might set the necessary sequence of the guiding elements in the CRISPR/Cas system, played by so-called single guide RNAs allowing it to act on select targets. This potential underlies one of the reasons for exerting interest in CRISPR/Cas systems. One of the first areas for applying these systems was its use for genomic editing. Later, the list of potential opportunities has been expanded: e.g., they can be used in gene therapy and epigenetic research. It is possible to create sgRNA libraries which might be used to create a pool of viral vectors applied for bacterial cell transformation with subsequent cas-protein transduction that cause target gene knockout. This approach allows finding genes responsible for resistance or sensibility to diverse substances. Using such systems in molecular diagnostics of infectious diseases is considered as one of the most promising directions allowing to detect even extremely low concentrations of pathogenic organisms in samples due to their specific nucleotide sequences. Simultaneously, such assays turn out to be accurate, rapid and easy to utilize. In addition, some platforms may work without using expensive equipment, because methods for fast and simple sample preparation have already been developed, whereas modern pre-amplification approaches allow to avoid applying thermocycling devices. Interestingly, a great amount of diverse types of natural CRISPR/Cas systems have been already discovered. Such abundance promotes development of multiple artificial systems, each of which exerting own unique characteristics. Therefore, a variety of diagnostic platforms with different properties are created on their basis that allows researchers and physicians to choose an optimal approach for performing specific tasks. For this reason, insights into structure and operation of CRISPR/Cas systems are necessary for selecting a suitable platform. The current classification of systems is based on such principles serving as the basis, in turn, for convenient evaluation of the very variety of molecular diagnostics platforms and presentation of the typical technical characteristics and nuances for each method. Thus, this review, which is mainly devoted to the platforms for molecular diagnostics of infectious diseases, also touches upon the issues of functioning, devices, and classification of CRISPR/Cas systems.

Key words: CRISPR/Cas, molecular diagnostics, Cas12, Cas13, isothermal amplification.

Введение

Системы CRISPR/Cas уже довольно давно известны и применяются в разнообразных целях. Исходно они были обнаружены у бактерий, у которых они участвуют в иммунном ответе. Позднее системы также были выявлены у других микроорганизмов [18].

В основе таких систем — локус CRISPR, открытый еще в 1987 г. [20]. Это кластер коротких повторов ДНК, разделенных одинаково короткими некодирующими последовательностями фагового и плазмидного происхождения — спейсерами. С локусом CRISPR, в свою очередь, связаны cas-гены (CRISPR-ассоциированные). При первом контакте с чужеродной нуклеотидной последовательностью запускается процесс формирования CRISPR-опосредованного иммунитета: вирусная ДНК неспецифически разрезается, далее полученные спейсерные последовательности захватываются и интегрируются в первую позицию локуса CRISPR за счет белков так называемого адаптационного модуля — Cas1 и Cas2. При этом сама транскрипция локуса происходит постоянно, но с низкой скоростью. Попадание в клетку чужеродной ДНК является триггером, усиливающим эту транскрипцию. Осуществляемая при этом транскрипция спейсерных участков в итоге приводит

к образованию небольших РНК. Если чужеродная последовательность оказывается комплементарной этим РНК, то они действуют как антисмысловые направляющие для нуклеаз, которые обнаруживают и расщепляют последовательность-мишень в геноме вируса [36, 45].

Именно эта способность РНК с определенной последовательностью направлять нуклеазы на мишень интересна с практической точки зрения. На основе данного принципа создаются искусственные CRISPR/Cas-системы, для которых исследователи могут задавать требуемую последовательность РНК, тем самым осуществляя взаимодействие нуклеазы с желаемыми мишенями. Одна из первых работ, показавшая возможность использования искусственных систем CRISPR/Cas, была опубликована в 2012 г. [45]. Вслед за ней появилось множество других исследований, была показана применимость искусственных систем на множестве организмов, например на бактериях [21], на дрожжах [35] и на клетках млекопитающих [11].

Возвращаясь к устройству системы, стоит отметить, что в искусственных вариантах CRISPR/Cas можно выделить две основные части, наиболее важные для исследователя. Первая включает в себя одну или несколько нуклеаз, непосредственно осуществляющих связывание и расщепление мишени. Вторая

представляет собой последовательность РНК, которая ориентирует нуклеазу на мишень. При этом используется две РНК: одна требуется непосредственно для взаимодействия с мишенью, которой она комплементарна. Эта последовательность носит название крРНК (КРИСПР-РНК). Вторая же последовательность, необходимая для связи крРНК с нуклеазой, то есть для образования рибонуклеопротеина (РНП), называется транскриптивной крРНК, или же тракрРНК. В искусственных CRISPR/Cas-системах для удобства обе РНК могут быть сшиты в одну молекулу — в единую гидовую РНК (егРНК). Итак, две составные части егРНК: спейсер — участок, комплементарный мишени, и петля для взаимодействия с нуклеазой [13]. В большинстве систем CRISPR/Cas требуется наличие в ДНК-мишени участка PAM (protospacer adjacent motif — смежный с протоспейсером мотив). Эта небольшая последовательность располагается на целевой ДНК и распознается нуклеазой. Данный участок находится рядом с протоспейсером — последовательностью, с которой взаимодействует спейсерная последовательность егРНК. В ДНК бактерий PAM отсутствуют, предполагается, что это обеспечивает защиту собственных нуклеотидных последовательностей от расщепления CRISPR/Cas-системой. Следовательно, если PAM будет отсутствовать и в целевых последовательностях, то система не сможет распознать мишень [14].

Итак, вышеперечисленные характеристики делают из CRISPR/Cas крайне удобный инструмент для манипуляций с последовательностями нуклеиновых кислот. Исследователь может подобрать необходимую последовательность егРНК, что позволит ему вносить разрыв в желаемый участок мишени при помощи нуклеазы. Неудивительно, что было найдено множество применений данным системам. Ныне они широко используются не только для геномного редактирования, но и для других целей. Их используют в генотерапии и эпигенетических исследованиях. Из егРНК могут быть составлены библиотеки, которые далее служат основой для создания вирусных векторов с последующим трансдуцированием бактериальных клеток и нокаутингом указанных мишеней при помощи cas-белков. Этот подход используется для поиска бактериальных генов, ответственных за устойчивость или чувствительность к различным препаратам.

В последнее время интерес вызывает использование таких систем для диагностики. Разработанные платформы позволяют детектировать наличие в образцах тех или иных нуклеотидных последовательностей, принадлежащих, например, вирусам. Многие способы

такой диагностики не уступают по точности методам, основанным на ПЦР, скорость же проведения анализа может быть и выше. При этом указывается возможность использования данных подходов в полевых условиях. Допускается мультиплексная диагностика, то есть имеется возможность выявлять несколько мишеней в одной реакционной смеси [27].

Таким образом, актуальность подобного применения систем CRISPR/Cas не представляет сомнений. В связи с этим в настоящем обзоре будет рассмотрен ряд наиболее известных и перспективных платформ молекулярной диагностики.

Разнообразие систем CRISPR/Cas

Для более быстрого и точного понимания механизмов работы диагностических платформ стоит помнить об основах актуальной классификации естественных систем CRISPR/Cas, на многообразии которых рассматриваемые платформы базируются. Составляющие естественные системы CRISPR/Cas белки объединяют в отдельные функциональные модули. Различным составом данных модулей и происхождением их содержимого обуславливается многообразие систем CRISPR/Cas. Именно по принципу наличия или отсутствия тех или иных cas-генов, структуры cas-оперона и устройства белков строят классификации [10, 47].

Основными модулями являются адаптационный и эффекторный. Адаптационный, как уже упоминалось выше, нужен для внедрения новых спейсеров в массив CRISPR. Обычно он состоит из белков Cas1 и Cas2. Эффекторный модуль содержит одну или несколько нуклеаз и ответственен за распознавание и расщепление мишени. Также могут существовать элементы, обеспечивающие процессинг РНК. Для некоторых систем отмечают наличие вспомогательных белков и участников сигнальной трансдукции [26]. Существует несколько вариантов классификации систем CRISPR-Cas. По последним данным, их можно разделить на два больших класса. Такой вариант классификации получил распространение после 2015 г. [33].

Ключевой особенностью систем первого класса является наличие мультисубъединичных эффекторных комплексов, состоящих из 4–7 белков cas. Представители этого класса широко распространены у архей и бактерий, к нему относят 90% всех идентифицированных локусов CRISPR. Первый класс включает типы I, III и IV. Между собой типы систем CRISPR/Cas различаются по белковому составу модулей [2]. Для эффекторных модулей систем первого класса характерно наличие общих белков: Cas7, Cas5. Эти белки выполняют функцию рас-

познавания мишени. Остальные компоненты могут отличаться. Например, в системе I типа расщепляющей активностью обладает Cas3, а в системе III типа такую активность проявляет Cas10 [19]. Системы IV типа изучены меньше, для них характерно наличие уникального небольшого белка Cas8. Интересно отметить, что для них также свойственно отсутствие белков адаптационного модуля, что принципиально отличает их от прочих типов. При этом не описывается наличие PAM, который связан с работой этого модуля. Предполагается, что в таком случае могут задействоваться Cas1 и Cas2 из других систем, сосуществующих в клетке с данной [41].

В системах второго класса в качестве эффектора выступает единственный мультидоменный белок. По этой причине такие системы представляют наибольший интерес при практическом использовании. Они обнаруживаются преимущественно у бактерий [19, 26]. Второй класс включает типы II, V, VI. Ко II типу относят системы с известной нуклеазой Cas9 в качестве эффектора. Для систем V типа характерны нуклеазы Cas12, Cas14 и ряд других. Эти нуклеазы хоть и родственны Cas9, но имеют существенные структурные отличия и требуют иной формы eгРНК для образования комплекса. Системы VI типа с эффекторным белком Cas13 интересны тем, что их мишенью является оцРНК, тогда как для большинства cas-нуклеаз иных типов характерно взаимодействие с ДНК [19]. Такое отличие обеспечивается наличием у Cas13 двух доменов HEPN (Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding), способных связывать РНК. У эффекторных белков II и V типов при этом имеются домены RuvC, расщепляющие ДНК. Cas9 также содержит эндонуклеазный HNH, получивший свое название из-за наличия остатков аспарагина и гистидина [29, 39, 50]. Крайне примечательной особенностью систем V и VI типов является способность нуклеаз проводить не только цис-расщепление мишени, но и осуществление неспецифической транс-активности. Такое явление называется коллатеральным эффектом [47].

Хотя основа классификации — два класса, содержащих по три типа — пока принципиально не меняется, постоянно появляются новые сведения, позволяющие дополнять ее и выделять отдельные подтипы внутри установленных типов. Было выявлено свыше 33 подтипов [34]. Особенно большое количество подтипов наблюдается среди систем V типа. А обнаружение у нуклеазы Cas12g рибонуклеазной активности делает взаимодействие с РНК прерогативой не только эффекторов VI типа [32].

На основе дополнительных сигнатурных генов и их расположения можно выделять под-

типы, например, следующим образом: в первом классе тип I подразделяется на подтипы A–E, F1–F3, тип III состоит из подтипов A–F, а тип IV — из подтипов A–C. Во втором классе тип II подразделяется на подтипы A, B, C1–C2, тип V — на подтипы A, B1–B2, C–E, F1–F3, G, U1–U5, тип VI содержит подтипы A, B1–B2, C, D [6, 34, 44]. Таким образом, существует множество типов естественных систем CRISPR/Cas. Подобное изобилие служит источником для разработки и создания систем искусственных. В практическом применении при создании платформ диагностики это позволяет оптимально подобрать в качестве исходной основы тот или иной тип CRISPR/Cas, удовлетворяющий поставленным задачам и выдвигаемым для них требованиям.

Диагностические платформы на основе CRISPR/Cas

Итак, как было указано выше, существует великое множество вариантов систем CRISPR/Cas. Системы второго класса с единственным эффекторным белком оказываются наиболее удобными при практическом применении. Благодаря этому на их основе уже создано большое количество диагностических платформ, характеризующихся применением различных белков, их ортологов и модификаций, разнообразными способами преамплификации и анализа получаемых результатов, что обеспечивает разные уровни чувствительности этих платформ — платформы и их характеристики представлены в табл. [23].

Платформы диагностики на основе систем CRISPR/Cas II типа

NASBACC (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification CRISPR-Cas Cleavage — CRISPR/Cas-опосредованное расщепление продуктов реакции транскрипционной амплификации) — один из ранних методов CRISPR/Cas-диагностики. Его особенность заключается в том, что при работе кДНК используется специфический для последовательности праймер, к которому присоединена триггерная последовательность, распознаваемая сенсором. Образуется РНК/ДНК-гибрид, РНК элиминируется РНКазой, что позволяет праймеру, содержащему T7-промотор, связываться, создавая тем самым комплементарную вторую цепь ДНК. T7-транскрипция двунитевой ДНК создает последовательность целевой РНК, которая может быть или использована в качестве стартового материала для нового цикла NASBA, или распознана сенсором. Если последовательность PAM представлена в дцДНК ампликоне, то Cas9-опосредованное расщепление приво-

Таблица. Многообразие платформ молекулярной диагностики на основе CRISPR/Cas

Table. Variety of molecular diagnostic platforms based on CRISPR/Cas

Платформа Platform	Белок- эффектор Effector protein	Метод амплификации Amplification method	Метод анализа результатов Assay readout	Предел детекции на мл LOD per ml	Предел детекции моль/л LOD mol/L
CRISPR/Cas II типа CRISPR/Cas type II					
NASBACC	Cas9	NASBA	Колориметрия Colorimetry	6 × 10 ⁶ копий 6 × 10 ⁶ copies	1 × 10 ⁻¹⁵
CRISPR-Chip	Cas9	Не применяется Not used	Электрохимический Electrochemical	1,4 × 10 ⁶ копий 1.4 × 10 ⁶ copies	2,3 × 10 ⁻¹⁵
CRISDA	Cas9-никаза Cas9 nickase	SDA	Флуоресценция Fluorescence	1,5 × 10 ² копий 1.5 × 10 ² copies	2,5 × 10 ⁻¹⁹
FLASH	Cas9	PCR	Секвенирование нового поколения NGS	1,1 × 10 ³ копий 1.1 × 10 ³ copies	1,9 × 10 ⁻¹⁸
CAS-EXPAR	Cas9	EXPAR	Флуоресценция Fluorescence	4,9 × 10 ² копий 4.9 × 10 ² copies	8,2 × 10 ⁻¹⁸
Cas9nAR	Cas9-никаза Cas9 nickase	При помощи никазы By nickase	Флуоресценция Fluorescence	10 ² копий 10 ² copies	1,7 × 10 ⁻¹⁹
CRISPR/Cas V типа CRISPR/Cas type V					
DETECTR	Cas12a	RPA	Флуоресценция/ иммунохроматография Fluorescence/ immunochromatography	6 × 10 ² копий 6 × 10 ² copies	1 × 10 ⁻¹⁸
Cas14-DETECTR	Cas14	PCR	Флуоресценция Fluorescence	6 × 10 ³ копий 6 × 10 ³ copies	–
HOLMES	Cas12a	PCR	Флуоресценция Fluorescence	6,6 × 10 ³ копий 6.6 × 10 ³ copies	1 × 10 ⁻¹⁷
HOLMESv2	Cas12b	LAMP	Флуоресценция Fluorescence	6 × 10 ³ копий 6 × 10 ³ copies	1 × 10 ⁻¹⁷
CDetection	Cas12b	RPA	Флуоресценция Fluorescence	6 × 10 ² копий 6 × 10 ² copies	1 × 10 ⁻¹⁸
E-CRISPR	Cas12a	Не применяется Not used	Электрохимический Electrochemical	3 × 10 ¹⁰ копий 3 × 10 ¹⁰ copies	5 × 10 ⁻¹¹
STOPCovid	Cas12b	LAMP	Флуоресценция/ иммунохроматография Fluorescence/ immunochromatography	2 × 10 ³ копий 2 × 10 ³ copies	3,3 × 10 ⁻¹⁸
CRISPR/Cas VI типа CRISPR/Cas type VI					
SHERLOCK	Cas13	NASBA/RPA	Флуоресценция/ иммунохроматография Fluorescence/ immunochromatography	1,2 × 10 ³ копий 1.2 × 10 ³ copies	2 × 10 ⁻¹⁸
SHERLOCKv2	Cas13	RPA	Флуоресценция/ иммунохроматография Fluorescence/ immunochromatography	4,8 копий 4.8 copies	8 × 10 ⁻²¹
HUDSON	Cas13	RPA	Флуоресценция/колориметрия Fluorescence/colorimetry	4,5 × 10 ⁴ копий 4.5 × 10 ⁴ copies	–
SHINE	Cas13	RPA	Флуоресценция/ иммунохроматография Fluorescence/ immunochromatography	5 × 10 ³ копий 5 × 10 ³ copies	8,3 × 10 ⁻¹⁸
CARMEN	Cas13	PCR/RPA	Флуоресценция Fluorescence	5,4 × 10 ² копий 5.4 × 10 ² copies	9 × 10 ⁻¹⁹
APC-Cas	Cas13	При помощи аллостерического зонда By allosteric probe	Флуоресценция Fluorescence	1 КОЕ 1 CFU	–
PECL-CRISPR	Cas13	EXPAR	Электрохемилюминесценция Electrochemiluminescence	6 × 10 ⁵ копий 6 × 10 ⁵ copies	1 × 10 ⁻¹⁵

дит к появлению укороченной матрицы для T7-транскрипции. Это, в свою очередь, приводит к образованию короткой РНК-мишени, которая неспособна активировать сенсор. В отсутствии же РАМ-последовательности не происходит разрезания дцДНК. В результате транскрибируется полноразмерная РНК-мишень, содержащая триггер. С последним взаимодействует сенсор, который меняет свою конформацию, что позволяет рибосоме связываться с ним и осуществлять трансляцию репортерной последовательности. Вследствие этого регистрируется флуоресценция [23].

Данный метод хоть и заявлен как недорогой и быстрый, но все же требует больше времени на проведение, чем другие подходы. Также для него характерна не самая высокая чувствительность [48].

CRISPR-Chip оказалась одной из интересных технологий в области детекции, примечательной использованием физического явления электропроводности. Примечательным является то, что данный метод не только требует небольших временных затрат, но и может осуществляться без преамплификации. В платформе задействуется «мертвый» белок, dCas9, способный связывать последовательности мишени, но лишенный возможности их расщеплять. В результате такого связывания в системе изменяется электрическая проводимость, тем самым осуществляется быстрая и точная детекция. Одним из первых исследований, проведенных при помощи данного метода, было обнаружение мутации в клинических образцах пациентов с мышечной дистрофией Дюшенна [16].

CRISDA (CRISPR-Cas9-triggered nicking endonuclease-mediated Strand Displacement Amplification — запускаемая CRISPR/Cas9 цепезамещающая изотермическая амплификация, опосредованная никелирующей эндонуклеазой) — в основе данного метода применяется способ SDA, цепезамещающая изотермическая амплификация. Особенностью CRISDA является крайне высокая специфичность. Она достигается сначала за счет использования пары нуклеаз Cas9 со своими РАМ, фланкирующими мишень. Затем полученный фрагмент амплифицируется. На финальной стадии используется пептидо-нуклеиновая кислота (ПНК), комплементарная центральному участку наработанного фрагмента. С ПНК связана метка, которая при наличии мишени распознается методом анализа флуоресценции. Таким образом, CRISDA позволяет эффективно находить мишени при анализе геномов, за счет высокой специфичности результат получается точным и чистым. С другой стороны, существенно возрастают и требования к выбору мишени, что вносит ограничения в метод [48, 54].

FLASH (Finding Low Abundance Sequences by Hybridization — поиск последовательностей с низкой численностью при помощи гибридизации) — в данном подходе используют набор eРНК вместе с Cas9. Последовательность интереса нарезается на несколько фрагментов, которые далее могут быть секвенированы при помощи Illumina. Сначала концы ДНК блокируются фосфатазой для предотвращения лигирования с адаптерами, а затем разрезаются Cas9. ДНК-мишень расщепляется с образованием фрагментов с неблокированными концами и, таким образом, может быть связана с универсальными адаптерами, амплифицирована при помощи ПЦР и секвенирована. Методика была продемонстрирована на *Staphylococcus aureus*, возбудителе пневмонии, и на *Plasmodium falciparum*, вызывающем малярию [42].

CAS-EXPAR (CRISPR/Cas9 triggered isothermal exponential amplification reaction — метод экспоненциальной реакции амплификации (EXPAR), запускаемой при помощи CRISPR/Cas9). Для такой амплификации требуются короткие праймеры. Они генерируются при разрезании нуклеазой исходной оцДНК, содержащей РАМ. Праймеры участвуют в EXPAR, образуется дцДНК, которая может быть распознана при помощи методов флуоресценции.

Несмотря на такие сложности, методика по чувствительности не уступает ПЦР. Между тем данный подход характеризуется высокой специфичностью, позволяющей распознавать метилированную ДНК [12, 31]. По сравнению с другими методами изотермической амплификации, такими как NASBA, RCA (Rolling circle amplification — репликация по типу катящегося кольца), SDA (Strand displacement amplification — цепезамещающая амплификация), LAMP (Loop-mediated isothermal amplification — петлевая изотермическая амплификация) или RPA (recombinase polymerase amplification — рекомбиназная полимеразная амплификация), EXPAR характеризуется относительно высокой эффективностью и скоростью амплификации продукта [27, 52].

Cas9nAR (Cas9 nickase-based amplification reaction — амплификация на основе никазы Cas9). Как и в случае с CRISDA, важную роль в этом методе играет никаза. Ее функции здесь выполняет модифицированная нуклеаза Cas9 — вместо двунитевого она стала вносить одноцепочечный разрыв. При помощи этой никазы в дцДНК-мишень вносят два однонитевых разрыва, которые затем расширяются фрагментами Кленова. Далее при помощи праймера 1, содержащего последовательность, комплементарную РАМ мишени, происходит наращивание цепи. Вновь образуется дцДНК, которая снова надрезается никазой. Праймер 2, также комплементарный

РАМ, гибридизуется с образовавшейся оцДНК. Происходит новый надрез, оцДНК будет связываться снова с праймером 1. Цикл замыкается. При помощи интеркалирующего красителя можно получать данные о прохождении таких циклов активности никазы и праймирования последовательности. Платформа Cas9nAR продемонстрировала чувствительность на уровне до одной молекулы благодаря эффективному механизму экспоненциальной амплификации и специфичности к одному нуклеотиду за счет свойств Cas9 [48, 49].

Платформы диагностики на основе систем CRISPR/Cas V типа

DETECTR (DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter — направляемое дезоксирибонуклеазой транс-расщепление репортера). В данном подходе используют ДНК-нуклеазу Cas12a. Платформа включает следующие этапы. На первой стадии подготавливается нуклеазный белок, проводится дизайн и синтез крРНК и праймеров. Далее из образца извлекается таргетная ДНК или РНК. Затем ее преамплифицируют, в случае РНК перед этим проводят обратную транскрипцию. Далее наступает этап детекции. Если участок одной из цепей наработанной дцДНК совпадает с гидовой РНК, связанной с Cas12a, то нуклеаза активируется. Как уже указывалось выше, этот белок способен к транс-активности. На этом свойстве и основана платформа. В результате при связывании с амплифицированной мишенью осуществляется транс-расщепление олигонуклеотида зонда из гасителя и флуорофора. Флуорофор может связываться в ходе иммунохроматографического анализа, либо же флуоресценция может быть непосредственно зарегистрирована прибором. Метод позволяет проводить мультиплексный анализ. Чувствительность и скорость у метода довольно высокие, однако для работы Cas12a требуется РАМ [25, 37].

Стоит отметить, что наработка ДНК осуществляется при помощи RPA (recombinase polymerase amplification — рекомбиназная полимеразная амплификация). При RPA праймеры образуют комплексы с рекомбиназными белками, после чего гибридизуются с ДНК. Такое состояние поддерживается SSB-белками. Затем рекомбиназа распадается, запускается процесс элонгации. Поскольку RPA осуществляется при невысоких температурах, то все основные этапы платформы можно выполнять в одной пробирке (one-pot), что снижает риски контаминации и ускоряет процесс [40].

Cas14-DETECTR — это вариация подхода *DETECTR* с использованием нуклеазы Cas14 вместо C12a. Этот относительно небольшой белок также обладает коллатеральной активностью,

однако в цис-положении он связывается не с двунитевой, а с оцДНК. Также для его работы не требуется РАМ [8, 17].

HOLMES (one-hour lowcost multipurpose highly efficient system — многоцелевая система эффективной одночасовой недорогой диагностики). Данный способ принципиально отличается от стандартного *DETECTR* лишь тем, что вместо изотермической амплификации используется ПЦР. Эффектором в данной платформе также выступает Cas12a.

Существует модификация метода, *HOLMESv2*, которая характеризуется использованием Cas12b. Примечательно для этого ортолога то, что запускать его коллатеральную активность может не только двухцепочечная, но и оцДНК. Более того, Cas12b в целом более активен при использовании оцДНК в качестве мишени. Также в данной модификации метода предполагается использование изотермической амплификации LAMP, что позволяет проводить анализ в одной пробирке. При этом несколько повышается чувствительность [30].

CDetection является очередной модификацией диагностической платформы на основе Cas12. В данном случае применяется ортолог AaCas12b, а в качестве мишени используется дцДНК. Авторы сообщают, что такой белок позволяет проводить детекцию с более высокой чувствительностью, чем Cas12a; есть успешные попытки использования без амплификации [46].

В платформе *E-CRISPR* тоже применяется Cas12a, при этом для детекции используется электрохимический анализ. Первые этапы схожи с протоколом для *DETECTR*, однако в качестве репортера используется конструкция, состоящая из части с метиленовым синим и тиоловой составляющей. Последняя нужна для закрепления репортеров на сенсорных электродах системы. В присутствии мишени фрагмент с метиленовым синим отщепляется от репортера, сигнал на электродах меняется. При отсутствии мишени репортер остается целым, изменений сигнала не регистрируется. Платформа характеризуется как точный и простой метод детекции целевых последовательностей. При этом преамплификация не требуется [14, 51].

В платформе *STOPCovid* также используются принципы *DETECTR*. При этом мишенью является РНК. Для амплификации авторы предлагают LAMP. Поскольку этот подход работает в температурном диапазоне 55–70°C, то используют AaCas12b — этот белок обладает термостабильными свойствами. Выделение РНК производят при помощи лизиса и магнитных шариков, тем самым временные затраты на этом этапе удается свести к 15 минутам. Далее к пробам добавляется реакционная смесь, содержащая нуклеазу и ре-

портеры. Затем проводят или анализ флуоресценции, или иммунохроматографический тест. По чувствительности, специфичности и уровню ложных результатов метод не уступает ПЦР в реальном времени [22].

Платформы диагностики на основе систем CRISPR/Cas VI типа

SHERLOCK (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking — специфическое высокочувствительное ферментативное отщепление репортера). По общему принципу платформа не слишком отличается от DETECTR. Отличие заключается в эффекторном белке — для SHERLOCK это Cas13. Как уже упоминалось, в отличие от Cas12 этот белок является рибонуклеазой, осуществляющей разрезание оцРНК. Для Cas13 также характерна коллатеральная активность. При этом нарабатанная в ходе преамплификации ДНК должна быть транскрибирована в РНК. Необходимость этого подразумевает использование для амплификации праймеров, содержащих сайт промотора T7. Далее следует детекция последовательности мишени и анализ флуоресценции, как в DETECTR. Платформу можно применять для анализа в одной пробирке. Метод быстрый, высокочувствительный. Важный момент заключается в том, что для Cas13a не требуется PAM. Вместо этого значение играет PFS (protospacer flanking site — фланкирующий протоспейсер участок). PFS обычно не вносит столь строгого ограничения, как PAM, — его последовательность может быть переменной [24, 28].

Интересно, что модификация метода, *SHERLOCKv2*, допускает использование нескольких нуклеаз — это позволяет проводить мультиплексный анализ. Подход предусматривает распознавание до четырех мишеней в одной пробирке [15].

HUDSON (heating unextracted diagnostic samples to obliterate nucleases — нагревание неэкстрагированных диагностических образцов для уничтожения нуклеаз) — способ быстрой подготовки образцов, позволяющей сэкономить время на этапе экстракции нуклеиновых кислот. Нагревание и химическое восстановление приводит к инактивации нуклеаз, содержащихся в пробах, далее производится лизис вирусных частиц — и таким образом получается раствор, в котором можно проводить детекцию мишеней. Сочетание данного метода с SHERLOCK позволяет проводить всю диагностику за 2 часа [38].

SHINE (streamlined highlighting of infections to navigate epidemics — модифицированное определение инфекций с целью борьбы с эпидемиями). Эта платформа была разработана в результате сочетания вышеуказанных подходов для

CRISPR/Cas-систем VI типа. Сначала образцы подвергают обработке, как в методе HUDSON, тем самым инактивируя клеточные ферменты, а затем высвобожденные нуклеиновые кислоты подвергают диагностике SHERLOCK. Метод применим для детекции SARS-CoV-2 [9].

CARMEN (Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic acids — мультиплексный анализ нуклеиновых кислот при помощи комбинаций реакций). На первом этапе нуклеиновые кислоты амплифицируют при помощи ПЦР или RPA. Далее к каждому образцу добавляют уникальный краситель. Смесь разделяют на капли. При этом также создаются смеси, содержащие Cas13 с определенными егРНК с флуорофорами. Далее капли из каждой смеси попарно загружают в микролунки чипа. При совпадении спейсера егРНК с мишенью Cas13 высвобождает флуорофор. Нужная комбинация капель детектируется. CARMEN не уступает по чувствительности SHERLOCK и разработан для мультиплексного анализа [5].

APC-Cas (allosteric probe-initiated catalysis and CRISPR-Cas13a — иницируемый аллостерическим зондом запуск амплификации, сочетаемый с CRISPR/Cas13a). Для данного подхода характерно использование специфического аллостерического зонда, представляющего собой оцДНК. В зонде различают три участка: аптамер для распознавания мишени, сайт связывания праймера и последовательность промотора T7. При отсутствии мишени зонд находится в неактивном состоянии: представляет собой шпильку, при этом сайт связывания праймера и участок промотора T7 оказываются заблокированными, и запуск амплификации невозможен. В присутствии патогена-мишени аптамерный участок зонда может специфически распознавать мишень и связываться с ней. В результате шпилька зонда будет разворачиваться, становясь активной, что позволяет праймерам отжигаться. Зонд работает в качестве матрицы, при помощи полимеразы формируется дцДНК, которая может участвовать в последующих циклах связывания с зондом и амплификации. Далее при помощи РНК-полимеразы T7 образуется множество оцРНК. Полученный продукт взаимодействует с Cas13a, запуская коллатеральную активность, что приводит к расщеплению репортера и флуоресценции [43].

PECL-CRISPR (portable electrochemiluminescence chip — портативный электрохемилюминесцентный чип). Данная платформа разработана для определения микроРНК, потенциальных маркеров ранней диагностики онкологических заболеваний. После связывания микроРНК с эффектором платформы, белком LbuCas13a, запускается коллатеральная активность последнего. В качестве репортера при-

меняется так называемый претриггер. После расщепления его 5'-фрагмент может выступать в качестве праймера для амплификации. Нарбатывается дцДНК, которая распознается никелирующей эндонуклеазой, вносящей разрывы. За счет чередования циклов расщепления и удлинения нарабатываются большие количества ДНК. Разумеется, при отсутствии мишени такого не происходит. Таким образом, на этом этапе используется подход CAS-EXPAR. Далее добавляется рутениумный комплекс, в присутствии ДНК способный к люминесценции. При этом осуществляется окисление ком-

плекса на аноде, регистрируемое платформой. Полученные показатели пропорциональны количеству мишени, поэтому метод позволяет определять не только наличие микроРНК, но и их число [53].

Заключение

Итак, были рассмотрены основные применяемые на данный момент методики молекулярной диагностики на основе систем CRISPR/Cas. Каждый из этих подходов обладает своими интересными особенностями, преимуществами и не-

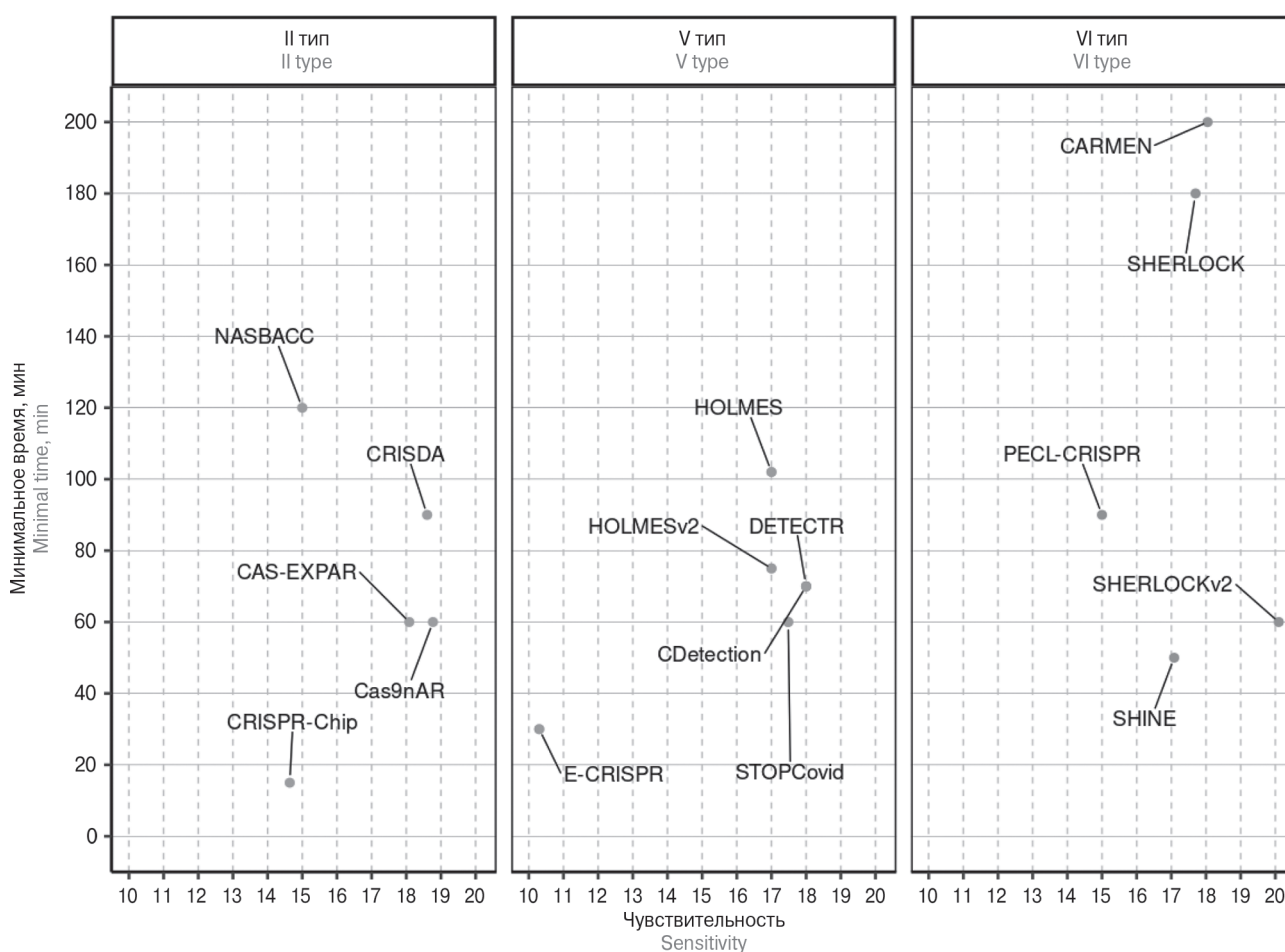


Рисунок. Чувствительность и время проведения анализа различными платформами диагностики на основе CRISPR/Cas

Figure. Sensitivity and time frame for assay execution by diagnostic CRISPR/Cas-based platforms

Примечание. На точечной диаграмме платформы разделены по типам систем CRISPR/Cas. Для платформ установлено время проведения анализа, приведены величины чувствительности методов в одинаковых величинах [23]. По вертикали — показатель минимального времени выполнения анализа в минутах, оценивался по нижнему порогу временных затрат на проведение преамплификации (если требовалась в методе) и непосредственно детекции при помощи CRISPR/Cas. По горизонтали — показатель уровня чувствительности, который определялся как модуль десятичного логарифма от предела детекции в моль/л. Чем выше этот параметр, тем меньшие концентрации последовательностей-мишеней могут быть обнаружены при помощи платформы.

Note. Scatter plot demonstrates two important characteristics for diagnostic platforms based on different types of CRISPR/Cas system [23]. The Y-axis shows minimal time period (minutes) for assay execution, it includes time of preamplification (if necessary) and detection procedure. The X-axis denotes the sensitivity level, which is defined as the modulus of the decimal logarithm of LOD (mol/L). The higher parameter, the lower ability of platform to detect decreasing concentrations of target sequences.

достатками. Например, диагностические платформы, разработанные на основе разных типов систем CRISPR/Cas второго класса [23], различаются по двум важным показателям: по чувствительности обнаружения мишеней и по времени проведения анализа (рис.).

В целом за последние несколько лет множество вариаций разработанных платформ показали свою эффективность и перспективность. Стоит ожидать активного применения данных методов и в нашей стране — силами отечественных исследовательских институтов ведутся изыскания в области их оптимизации и разработка оригинальных патентоспособных технологий [1, 3, 4].

В завершение данного обзора стоит отметить: тенденция такова, что обоснованный

интерес к системам CRISPR/Cas будет только расти в ближайшее время, поскольку конструировать и применять их относительно несложно, при этом необходимые операции производятся быстро, точно и не требуют серьезных затрат. В то же время возможности по применению систем необычайно широки, и одним из главных новых трендов выступает их использование в диагностических платформах [2]. Все это особенно актуально на данный момент в связи с непростой эпидемиологической обстановкой, выдвинувшей новые требования к подходам по выявлению возбудителей заболеваний. Уже существующие и создаваемые диагностические платформы на базе CRISPR/Cas имеют все шансы занять нишу таких инструментов за счет своих преимуществ.

Список литературы/References

1. Дятлов И.А. Возможности использования CRISPR-Cas-системы для диагностических целей в медицинской микробиологии // Бактериология. 2017. Т. 2, № 4. С. 5–6. [Dyatlov I.A. Possibilities of using CRISPR-Cas system for diagnostics in medical microbiology. *Bacteriologiya = Bacteriology*, 2017, vol. 2, no. 4, pp. 5–6. (In Russ.)]
2. Тюменцев А.И., Тюменцева М.А. CRISPR нуклеазы // Генетические технологии / Ю.В. Михайлова, А.М. Нагорных, В.В. Петров, А.Е. Судына, А.И. Тюменцев, М.А. Тюменцева, А.А. Шеленков; под ред. В.Г. Акимкина. М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2020. С. 63–85. [Tyumentsev A.I., Tyumentseva M.A. CRISPR nucleases. In: Genetic technologies. Yu.V. Mikhailova, A.M. Nagornyykh, V.V. Petrov, A.E. Sudyina, A.I. Tyumentsev, M.A. Tyumentseva, A.A. Shelenkov; ed. by V.G. Akimkin. Moscow: Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 2020. P. 63–85. (In Russ.)]
3. Патент № 2707542 Российская Федерация, МПК C12N 9/22, C12N 15/09, C12P 21/02, C07K 1/18, C07K 1/32, C07K 1/36 (2019.08). Способ получения препарата рекомбинантной нуклеазы CAS, по существу, свободного от бактериальных эндотоксинов, полученный данным способом препарат и содержащий его набор для использования в системе CRISPR/Cas. № 2019109018; заявлено 2019.03.28; опубликовано 2019.11.27 / Акимкин В.Г., Тюменцев А.И., Тюменцева М.А., Шагин Д.А. Патентообладатель: ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. 131 с. [Patent No. 2707542 Russian Federation, Int. Cl. C12N 9/22, C12N 15/09, C12P 21/02, C07K 1/18, C07K 1/32, C07K 1/36 (2019.08). Method of producing a recombinant nucleases essentially free of bacterial endotoxins, the preparation obtained by this method and containing a kit for use in a CRISPR/Cas system. No. 2019109018; application: 2019.03.28; date of publication 2019.11.27 / Akimkin V.G., Tyumentsev A.I., Tyumentseva M.A., Shagin D.A. Proprietors: Federalnoe byudzhethnoe uchrezhdenie nauki "Tsentralnyj nauchno-issledovatel'skij institut epidemiologii" Federalnoj sluzhby po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitel'j i blagopoluchiya cheloveka (FBUN TSNII Epidemiologii Rospotrebnadzora). 131 p. (In Russ.)]
4. Патент № 2747820 Российская Федерация, МПК C12Q 1/6816, C12N 9/22, C12N 15/113 (2021.02). Система CRISPR-Cas для выявления ДНК вируса Джона Каннингема (JCPyV) в ультранизких концентрациях. № 2020139162; заявлено 2020.11.30; опубликовано 2021.05.14 / Тюменцев А.И., Тюменцева М.А., Акимкин В.Г. Патентообладатель: ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. 21 с. [Patent No. 2747820 Russian Federation, Int. Cl. C12Q 1/6816, C12N 9/22, C12N 15/113 (2021.02). CRISPR-Cas system for detection of John Cunningham virus (JCPyV) DNA at ultralow concentrations. No. 2020139162; application: 2020.11.30; date of publication 2021.05.14 / Tyumentsev A.I., Tyumentseva M.A., Akimkin V.G. Proprietors: Federalnoe byudzhethnoe uchrezhdenie nauki "Tsentralnyj nauchno-issledovatel'skij institut epidemiologii" Federalnoj sluzhby po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitel'j i blagopoluchiya cheloveka (FBUN TSNII Epidemiologii Rospotrebnadzora). 21 p. (In Russ.)]
5. 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. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13. *Nature*, 2020, vol. 582, no. 7811, pp. 277–282. doi: 10.1038/s41586-020-2279-8
6. Agarwal N., Gupta R. History, evolution and classification of CRISPR-Cas associated systems. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2021, vol. 179, pp. 11–76. doi: 10.1016/bs.pmbts.2020.12.012
7. Anders C., Niewoehner O., Duerst A., Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 2014, vol. 513, no. 7519, pp. 569–573. doi: 10.1038/nature13579
8. Aquino-Jarquin G. CRISPR-Cas14 is now part of the artillery for gene editing and molecular diagnostic. *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.*, 2019, vol. 18, pp. 428–431. doi: 10.1016/j.nano.2019.03.006
9. Arizti-Sanz J., Freije C.A., Stanton A.C., Petros B.A., Boehm C.K., Siddiqui S., Shaw B.M., Adams G., Kosoko-Thoroddsen T.S.F., Kembal M.E., Uwanibe J.N., Ajogbasile F.V., Eromon P.E., Gross R., Wronka L., Caviness K., Hensley L.E., Bergman N.H., MacInnis B.L., Myhrvold C. Streamlined inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2. *Nature Communications*, 2020, vol. 11, no. 1: 5921. doi: 10.1038/s41467-020-19097-x
10. Barrangou R. Diversity of CRISPR-Cas immune systems and molecular machines. *Genome Biology*, 2015, vol. 16, no. 1: 247. doi: 10.1186/s13059-015-0816-9

11. Bauer D.E., Canver M.C., Orkin S.H. Generation of genomic deletions in mammalian cell lines via CRISPR/Cas9. *J. Vis. Exp.*, 2015, vol. 95: e52118. doi: 10.3791/52118
12. Bonini A., Poma N., Vivaldi F., Kirchhain A., Salvo P., Bottai D., Tavanti A., Di Francesco F. Advances in biosensing: the CRISPR/Cas system as a new powerful tool for the detection of nucleic acids. *J. Pharm. Biomed.*, 2021, vol. 192: 113645. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113645
13. Cofsky J.C., Karandur D., Huang C.J., Witte I.P., Kuriyan J., Doudna J.A. CRISPR-Cas12a exploits R-loop asymmetry to form double-strand breaks. *ELife*, 2020, vol. 9: e55143. doi: 10.7554/eLife.55143
14. Dai Y., Somoza R.A., Wang L., Welter J.F., Li Y., Caplan A.I., Liu C.C. Exploring the trans-cleavage activity of CRISPR-Cas12a (cpf1) for the development of a universal electrochemical biosensor. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2019, vol. 58, no. 48, pp. 17399–17405. doi: 10.1002/anie.201910772
15. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Kellner M.J., Joung J., Collins J.J., Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a and Csm6. *Science*, 2018, vol. 360, no. 6387, pp. 439–444. doi: 10.1126/science.aag0179
16. Hajian R., Balderston S., Tran T., DeBoer T., Etienne J., Sandhu M., Wauford N.A., Chung J.Y., Nokes J., Athaiya M., Paredes J., Peytavi R., Goldsmith B., Murthy N., Conboy I.M., Aran K. Detection of unamplified target genes via CRISPR–Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. *Nat. Biomed. Eng.*, 2019, vol. 3, no. 6, pp. 427–437. doi: 10.1038/s41551-019-0371-x
17. Harrington L.B., Burstein D., Chen J.S., Paez-Espino D., Ma E., Witte I.P., Cofsky J.C., Kyripides N.C., Banfield J.F., Doudna J.A. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*, 2018, vol. 362, no. 6416, pp. 839–842. doi: 10.1126/science.aav4294
18. Horvath P., Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of Bacteria and Archaea. *Science*, 2010, vol. 327, no. 5962, pp. 167–170. doi: 10.1126/science.1179555
19. Ishino Y., Krupovic M., Forterre P. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *J. Bacteriol.*, 2018, vol. 200, no. 7: e00580-17. doi: 10.1128/JB.00580-17
20. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakamura A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.*, 1987, vol. 169, no. 12, pp. 5429–5433. doi: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
21. Jiang Y., Chen B., Duan C., Sun B., Yang J., Yang S. Multigene editing in the Escherichia coli genome via the CRISPR-Cas9 system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015, vol. 81, no. 7, pp. 2506–2514. doi: 10.1128/AEM.04023-14
22. Joung J., Ladha A., Saito M., Kim N.-G., Woolley A.E., Segel M., Barretto R.P.J., Ranu A., Macrae R.K., Faure G., Ioannidi E.I., Krajcski R.N., Bruneau R., Huang M.-L.W., Yu X.G., Li J.Z., Walker B.D., Hung D.T., Greninger A.L., Zhang F. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing. *N. Engl. J. Med.*, 2020, vol. 383, no. 15, pp. 1492–1494. doi: 10.1056/nejmc2026172
23. Kaminski M.M., Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Zhang F., Collins J.J. CRISPR-based diagnostics. *Nat. Biomed. Eng.*, 2021, vol. 5, no. 7, pp. 643–656. doi: 10.1038/s41551-021-00760-7
24. Kellner M.J., Koob J.G., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Zhang F. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat. Protoc.*, 2019, vol. 14, no. 10, pp. 2986–3012. doi: 10.1038/s41596-019-0210-2
25. Kim S., Ji S., Koh H.R. Crispr as a diagnostic tool. *Biomolecules*, 2021, vol. 11, no. 8: 1162. doi: 10.3390/biom11081162
26. Koonin E.V., Makarova K.S. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2019, vol. 374, no. 1772: 20180087. doi: 10.1098/rstb.2018.0087
27. Lau A., Ren C., Lee L.P. Critical review on where CRISPR meets molecular diagnostics. *Progress in Biomedical Engineering*, 2020, vol. 3, no. 1: 012001. doi: 10.1088/2516-1091/abbf5e
28. Lee R.A., De Puig H., Nguyen P.Q., Angenent-Mari N.M., Donghia N.M., McGee J.P., Dvorin J.D., Klapperich C.M., Pollock N.R., Collins J.J. Ultrasensitive CRISPR-based diagnostic for field-applicable detection of Plasmodium species in symptomatic and asymptomatic malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2020, vol. 117, no. 41, pp. 25722–25731. doi: 10.1073/pnas.2010196117
29. Li C.L., Hor L.I., Chang Z.F., Tsai L.C., Yang W.Z., Yuan H.S. DNA binding and cleavage by the periplasmic nuclease Vvn: a novel structure with a known active site. *EMBO Journal*, 2003, vol. 22, no. 15, pp. 4014–4025. doi: 10.1093/emboj/cdg377
30. Li S.Y., Cheng Q.X., Li X.Y., Zhang Z.L., Gao S., Cao R.B., Zhao G.P., Wang J., Wang J.M. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell Discovery*, 2018, vol. 4: 20. doi: 10.1038/s41421-018-0028-z
31. Li Y., Li S., Wang J., Liu G. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing. *Trends Biotechnol.*, 2019, vol. 37, no. 7, pp. 730–743. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.12.005
32. Li Z., Zhang H., Xiao R., Han R., Chang L. Cryo-EM structure of the RNA-guided ribonuclease Cas12g. *Nat. Chem. Biol.*, 2021, vol. 17, no. 4, pp. 387–393. doi: 10.1038/s41589-020-00721-2
33. 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., Koonin E.V. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, vol. 13, no. 11, pp. 722–736. doi: 10.1038/nrmicro3569
34. 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. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2020, vol. 18, no. 2, pp. 67–83. doi: 10.1038/s41579-019-0299-x
35. Mans R., van Rossum H.M., Wijsman M., Backx A., Kuijpers N.G.A., van den Broek M., Daran-Lapujade P., Pronk J.T., van Maris A.J.A., Daran J.M.G. CRISPR/Cas9: a molecular Swiss army knife for simultaneous introduction of multiple genetic modifications in Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Yeast Res.*, 2015, vol. 15, no. 2: fov004. doi: 10.1093/femsyr/fov004
36. Marraffini L.A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*, 2015, vol. 526, no. 7571, pp. 55–61. doi: 10.1038/nature15386
37. Mustafa M.I., Makhawi A.M. SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-Cas systems as potential rapid diagnostic tools for emerging infectious diseases and cancer-associated mutations. *Preprints*, 2020, 2020040080. doi: 10.20944/preprints202004.0080.v1

38. 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. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*, 2018, vol. 360, no. 6387, pp. 444–448. doi: 10.1126/science.aas8836
39. Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., Konermann S., Shehata S.I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, vol. 156, no. 5, pp. 935–949. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001
40. Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L., Armes N.A. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biology*, 2006, vol. 4, no. 7, pp. 1115–1121. doi: 10.1371/journal.pbio.0040204
41. Pinilla-Redondo R., Mayo-Muñoz D., Russel J., Garrett R.A., Randau L., Sørensen S.J., Shah S.A. Type IV CRISPR-Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids. *Nucleic Acids Res.*, 2020, vol. 48, no. 4, pp. 2000–2012. doi: 10.1093/nar/gkz1197
42. Quan J., Langelier C., Kuchta A., Batson J., Teyssier N., Lyden A., Caldera S., McGeever A., Dimitrov B., King R., Wilhelm J., Murphy M., Ares L.P., Trivisano K.A., Sit R., Amato R., Mumbengewi D.R., Smith J.L., Bennett A., Gosling R., Mourani P.M., Calfee C.S., Neff N.F., Chow E.D., Kim P.S., Greenhouse B., DeRisi J.L., Crawford E.D. FLASH: a next-generation CRISPR diagnostic for multiplexed detection of antimicrobial resistance sequences. *Nucleic Acids Res.*, 2019, vol. 47, no. 14: e83. doi: 10.1093/nar/gkz418
43. Shen J., Zhou X., Shan Y., Yue H., Huang R., Hu J., Xing D. Sensitive detection of a bacterial pathogen using allosteric probe-initiated catalysis and CRISPR-Cas13a amplification reaction. *Nat. Commun.*, 2020, vol. 11: 267. doi: 10.1038/s41467-019-14135-9
44. Shmakov S., Smargon A., Scott D., Cox D., Pyzocha N., Yan W., Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Makarova K.S., Wolf Y.I., Severinov K., Zhang F., Koonin E.V. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2017, vol. 15, no. 3, pp. 169–182. doi: 10.1038/nrmicro.2016.184
45. Sontheimer E.J., Barrangou R. The bacterial origins of the CRISPR genome-editing revolution. *HGT*, 2015, vol. 26, no. 7, pp. 413–424. doi: 10.1089/hum.2015.091
46. Teng F., Guo L., Cui T., Wang X.G., Xu K., Gao Q., Zhou Q., Li W. CDetection: CRISPR-Cas12b-based DNA detection with sub-attomolar sensitivity and single-base specificity. *Genome Biol.*, 2019, vol. 20, no. 1: 132. doi: 10.1186/s13059-019-1742-z
47. Varble A., Marraffini L.A. Three New C's for CRISPR: collateral, communicate, cooperate. *Trends Genet.*, 2019, vol. 35, no. 6, pp. 446–456. doi: 10.1016/j.tig.2019.03.009
48. Wang M., Zhang R., Li J. CRISPR/cas systems redefine nucleic acid detection: principles and methods. *Biosens. Bioelectron.*, 2020, vol. 165: 112430. doi: 10.1016/j.bios.2020.112430
49. Wang T., Liu Y., Sun H.H., Yin B.C., Ye B.C. An RNA-Guided Cas9 nickase-based method for universal isothermal DNA amplification. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2019, vol. 58, no. 16, pp. 5382–5386. doi: 10.1002/anie.201901292
50. Yan F., Wang W., Zhang J. CRISPR-Cas12 and Cas13: the lesser known siblings of CRISPR-Cas9. *Cell Biol. Toxicol.*, 2019, vol. 35, no. 6, pp. 489–492. doi: 10.1007/s10565-019-09489-1
51. Zhang J., Lv H., Li L., Chen M., Gu D., Wang J., Xu Y. Recent improvements in CRISPR-based amplification-free pathogen detection. *Front. Microbiol.*, 2021, vol. 12: 751408. doi: 10.3389/fmicb.2021.751408
52. Zhang Y., Zhang C.Y. Sensitive detection of microRNA with isothermal amplification and a single-quantum-dot-based nanosensor. *Analytical Chemistry*, 2012, vol. 84, no. 1, pp. 224–231. doi: 10.1021/ac202405q
53. Zhou T., Huang R., Huang M., Shen J., Shan Y., Xing D. CRISPR/Cas13a powered portable electrochemiluminescence chip for ultrasensitive and specific MiRNA detection. *Advanced Science*, 2020, vol. 7, no. 13: 1903661. doi: 10.1002/adv.201903661
54. Zhou W., Hu L., Ying L., Zhao Z., Chu P.K., Yu X.F. A CRISPR-Cas9-triggered strand displacement amplification method for ultrasensitive DNA detection. *Nat. Commun.*, 2018, vol. 9, no. 1: 5012. doi: 10.1038/s41467-018-07324-5

Авторы:

Волков А.А., младший научный сотрудник группы молекулярной генетики патогенных микроорганизмов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Долгова А.С., к.б.н., старший научный сотрудник, руководитель группы молекулярной генетики патогенных микроорганизмов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Дедков В.Г., к.м.н., заместитель директора по научной работе ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Volkov A.A., Junior Researcher, Group of Molecular Genetics of Pathogenic Microorganisms, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Dolgova A.S., PhD (Biology), Senior Researcher, Head of the Group of Molecular Genetics of Pathogenic Microorganisms, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Dedkov V.G., PhD (Medicine), Deputy Director for Scientific Work, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 07.12.2021
 Отправлена на доработку 16.01.2022
 Принята к печати 22.01.2022

Received 07.12.2021
 Revision received 16.01.2022
 Accepted 22.01.2022