

«Сейфуллин окулары – 18: « Жастар және ғылым – болашаққа көзқарас» халықаралық ғылыми -практикалық конференция материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 18: « Молодежь и наука – взгляд в будущее» - 2022.- Т.І, Ч.ІІІ. - С. 211-214

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ CRISPR/CAS СИСТЕМЫ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ.

*Аманжолова М.Ж., младший научный сотрудник
Национальный Центр Биотехнологии г. Нур-Султан*

Развитие пандемии подтолкнуло научное сообщество на бурное развитие исследований в области ранней диагностики COVID-19. Одним из таких методов стала технология, основанная на CRISPR/Cas системах.

На сегодняшний день CRISPR/Cas (сгруппированные, регулярно расположенные короткие полиндромные повторы) системы получили широкое распространение в области геномного редактирования. Главным инструментом являются CRISPR ассоциированные белки (Cas белки). Данные белки способны быстро и эффективно редактировать геномы различных организмов [1]. Несмотря на то, что данный метод был открыт сравнительно недавно, уже имеется возможность его использования в генной терапии.

CRISPR/Cas является адаптивной иммунной системой, представленной в виде защиты, которая препятствует развитию и распространению чужеродных нуклеиновых кислот в клетке [2]. Эта система является мощным инструментом для борьбы со многими инфекционными агентами [3].

Исследователь Ишино в 1987 обнаружил данные повторы у *Escherichia coli*, и они были описаны как «интересные участки» [4], позже, такие же участки были найдены у *Haloferax* и *Haloarcula* архей [5], и у *Mycobacterium tuberculosis* [6]. Позже эти же повторяющиеся последовательности были найдены у более 40% бактерий и у более 90% у архей [7]. Промежутки между этими участками отличаются друг от друга. Функция данных CRISPR/Cas систем была неизвестна, но с развитием эпохи секвенирования, было обнаружено, что эти участки имеются у бактериофагов и бактерий, к которым они резистентны.

В настоящее время наиболее охарактеризованным и наиболее используемым белком является Cas9. Cas9 это эндонуклеаза, которая разрезает ДНК в специфичном месте. Помимо Cas9 существуют также и эндонуклеазы Cas12a, Cas13a, Cas14 и др [8], выступающими альтернативой данному белку. Cas9 и Cas12a отличаются друг от друга по эволюционному происхождению, по структурной характеристике и по молекулярному механизму. В 2018 г. было обнаружено, что помимо эндонуклеазной активности белок Cas12a способен деградировать любые неспецифические оцДНК. Это свойство позволило использовать Cas12a в диагностике бактериальных и ви-

русных инфекций [9]. Диагностика основывается на двух главных компонентах: направляющая РНК, которая задает нуклеотидную последовательность и эндонуклеаза, которая ее разрезает [10].

Механизм CRISPR/Cas12a в диагностике выглядит следующим образом: на первом этапе создается комплекс, состоящий из самого белка Cas12a и направляющей РНК, на втором этапе РНК направляет фермент, определяя специфичную последовательность в ДНК. Далее комплекс Cas-гРНК связывается с целевой ДНК, после чего, белок разрезает целевую ДНК, претерпевает конформационные изменения и разрезает оцДНК [11]. Данная оцДНК может служить в качестве детектора на визуальное определение изменений конформационной активности комплекса фермента. На одном конце детектора расположена флуоресцентная метка и гаситель сигнала на другом.

Преимущество данного метода в небольшом наборе используемых реактивов. Отсутствие необходимости в дорогостоящем оборудовании, высококвалифицированном персонале и соблюдении высоких стандартов диагностических лабораторий делает данный метод диагностики простым, удобным и легким в использовании, что расширяет возможность «полевой диагностики».

Целью данной работы являлось получение гомолога Cas12a, обладающего эндонуклеазной активностью, для дальнейшего использования в качестве альтернативы для диагностики коронавирусной инфекции.

Материалы и методы: Ген Cas12a идентифицировали в бактериях с помощью поиска по гомологии геномных последовательностей, доступных в базе данных GenBank. Были использованы стандартные методы генетической инженерии для клонирования и секвенирования гена *Moraxella bovis*, кодирующего фермент Cas12a. Анализ трансформированных колоний, производили методом ПЦР-скрининга, с использованием рекомбинантной *Taq* ДНК полимеразы, синтезированной в лаборатории [12]. Были оптимизированы условия индукции белка по штамму, температуре, времени индукции, концентрации ИПТГ (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид) и частоте вращения шейкера.

Компетентные штаммы *E. coli*, а также плазмидные конструкции были использованы из лабораторной коллекции. Реактивы, которые были использованы в данной работе, являлись производства компаний Sigma-Aldrich, AppliChem, Promega, Amresco с категорией чистоты - «Для молекулярной биологии». Ферменты эндонуклеазы рестрикции и T4 ДНК-лигаза были производства Thermo Scientific (США). Для амплификации гена-мишени был использован фермент Phusion High-Fidelity ДНК-полимераза (Thermo Scientific, США). Для хроматографической очистки белка были использованы Ni^{2+} HiTrap HP и HiTrap Heparin HP колонки (GE Healthcare, USA).

Протокол выделения белка выглядит следующим образом: штамм BL21(DE3) культивировали в среде Лурия-Бертани (1% триптона, 0.5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl), объемом 1 л, который был приготовлен в соответствии с протоколом [13]. По достижению $\text{OD}_{600} = 0,6$ добавляли ИПТГ с

конечной концентрацией 1 мМ. Время индукции составило 16 часов. Наличие в плазмиде гексагистидиновой метки, позволило провести очистку с помощью металло-аффинной хроматографии в градиенте имидазола. Благодаря тому, что Cas12a является ДНК-связывающим белком, имелась возможность провести дополнительную очистку на гепариновой колонке в градиенте хлорида натрия.

Электрофоретическое разделение белков проводили по протоколу [14] в 12% ПААГ в денатурирующих условиях. Концентрацию белков определяли по Бредфорду [15].

Методом ПЦР из *M. bovis* был получен ген длиной 3783 п.о. и был клонирован в плазмиду pET-28c(+). При сравнении гена Cas12a *M. bovis* с Cas12a *Lachnospiraceae bacterium*, идентичность последовательности белка составила 38.6 %. В полученном рекомбинантном векторе целевой ген клонирован под контроль промотора РНК полимеразы бактериофага Т7. В ходе секвенирования рекомбинантного вектора делеции, дубликации, инсерции и другие мутации обнаружены не были.

При помощи штамма *E. coli* BL21 была проведена электропорация экспрессионным рекомбинантным вектором pET-28c (+)/Cas12a. Благодаря высокой способности к накоплению рекомбинантного белка Cas12a в водорастворимой фракции в течение всего периода индукции, с использованием двухступенчатой хроматографии, удалось провести очистку 10 мг рекомбинантного белка Cas12a, обладающего более 95% степенью чистоты. Фермент хранили в 50% глицерине при -20°C.

Активность белка была проверена на рекомбинантной плазмиде, содержащей ген нуклеокапсида коронавируса. Результаты показали высокую специфичность и высокую чувствительность данного метода.

Метод CRISPR\Cas является перспективным направлением в разработке ранней диагностики многих заболеваний бактериального и вирусного характера. Этот быстрый и точный способ определения нуклеиновых кислот позволяет увеличить спектр диагностируемых заболеваний за короткий срок времени, что позволяет быстро определить очаги заражения инфекционных агентов. Простота и отсутствие дорогостоящих реагентов и оборудования, а также отсутствие необходимости в специально обученном персонале, обеспечивает практически безграничное использование в труднодоступных регионах, что особенно остро ощущалось во время пандемии. Потенциал данного метода наиболее перспективен в биомедицине и биотехнологии.

Список использованной литературы

1. Ma, Y., Zhang, L., & Huang, X. Genome modification by CRISPR/Cas9. [электронный ресурс] *FEBS Journal*, 281(23), 2014. 5186–5193. <https://doi.org/10.1111/febs.13110>
2. Makarova, K. S., & Koonin, E. V. Annotation and classification of CRISPR-Cas Systems. [электронный ресурс] *Methods in Molecular Biology*, 2015. 47–75. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9_4

- 3 3.Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., & Timlin, J. A. DELIVERING CRISPR: A review of the challenges and approaches. [электронный ресурс] *Drug Delivery*, 2018. 25(1), 1234–1257. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>
- 4 4.Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. [text] *J Bacteriol* 1987. 169:5429–33.
- 5 5.Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. [text] *J Mol Evol* 2005. 60:174–82.
- 6 6.van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, et al. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. [text] *J Clin Microbiol* 1993. 31:1987–95.
- 7 7.Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. [text] *Mol Microbiol* (2000). 36:244–6
- 8 8.Ding, X., Yin, K., Li, Z., Lalla, R. V., Ballesteros, E., Sfeir, M. M., & Liu, C. Ultrasensitive and visual detection of SARS-COV-2 using all-in-one dual CRISPR-CAS12A assay. [электронный ресурс] *Nature Communications*, (2020). 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18575-6>
- 9 9.Swartz, D. C., & Jinek, M. Cas9 versus CAS12A/Cpf1: Structure–function comparisons and implications for genome editing. [электронный ресурс] *WIREs RNA*, (2018). 9(5). <https://doi.org/10.1002/wrna.1481>
- 10 10.Redman, M., King, A., Watson, C., & King, D. What is CRISPR/cas9? [электронный ресурс] *Archives of Disease in Childhood - Education & Practice Edition*, (2016). 101(4), 213–215. <https://doi.org/10.1136/archdis-child-2016-310459>
- 11 11.Zhang, K., Fan, Z., Yao, B., Ding, Y., Zhao, J., Xie, M., & Pan, J. Exploring the trans-cleavage activity of CRISPR-CAS12A for the development of a Mxene based electrochemiluminescence biosensor for the detection of SIGLEC-5. [электронный ресурс] *Biosensors and Bioelectronics*, (2021). 178, 113019. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113019>
- 12 12.Abeldenov S. K. B. Cloning, expression and purification of recombinant analog of Taq DNA polymerase [text] // *Biotechnology. Theory and Practice*. – 2014. № 1. – P. 12-16.
- 13 13.Molecular cloning. A laboratory manual. [text] / Maniatis T. F. E. E., Sambrook J.: New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. – 545 p.
- 14 14.Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [text] // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680-685.

15 15. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [text] // Anal Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.