

## CAS13A: ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСНОЙ РНК

А. С. Савинова<sup>1,2</sup>, Е. Ю. Коптев<sup>1</sup>, Е. В. Усачев<sup>1</sup>, А. П. Ткачук<sup>1</sup>, В. А. Гушчин<sup>1,3</sup> ✉

<sup>1</sup> Лаборатория трансляционной медицины, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва

<sup>2</sup> Кафедра биотехнологии, факультет биотехнологии и промышленной экологии, Российский химико-технологический факультет имени Д. И. Менделеева, Москва

<sup>3</sup> Кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Использование CRISPR-Cas систем для редактирования геномов организмов в последнее время стало одним из магистральных научных направлений. Между тем белки системы CAS можно применять для разработки методов молекулярной диагностики. Традиционные подходы к идентификации микроорганизмов имеют ряд недостатков: они времязатратны (культуральные методы диагностики), недостаточно чувствительны (иммунологические методы), имеют высокую себестоимость и методически сложны (ПЦР, секвенирование). Целью работы было получение функционально активного препарата белка Cas13a и изучение его поведения в различных условиях, в том числе при изменении концентрации мишени, для дальнейшего использования в диагностических целях. Была создана генетическая экспрессионная конструкция, имеющая на 5'-конце T7-промотор и ген *cas13a* бактерии *Leptotrichia wadei*. Получены препараты функционально активной программируемой РНКазы белка Cas13a, направляющей РНК, а также РНК вируса гриппа В (РНК-мишень). Функциональную активность РНКазы белка Cas13a определяли по появлению флуоресцентного сигнала в реакционной смеси, содержащей направляющую РНК, РНК-мишень, молекулярный РНК-маячок. Показано, что полученный препарат белка Cas13a способен специфически выявлять мишень на примере фрагментов РНК вируса гриппа В и не обладает неспецифическими видами РНКазной активности. Данное исследование может стать основой для создания нового быстрого специфичного и чувствительного метода идентификации микроорганизмов.

**Ключевые слова:** ПЦР, диагностика, инфекционные заболевания, CRISPR-Cas система, Cas13a

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Алексеевич Гушчин  
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098; wowaniada@gmail.com, vladimir.a.gushchin@gamaleya.org

**Статья получена:** 31.05.2018 **Статья принята к печати:** 07.06.2018

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2018.021

## CAS13A: PURIFICATION AND USE FOR DETECTION OF VIRAL RNA

Savinova AS<sup>1,2</sup>, Koptev EYu<sup>1</sup>, Usachev EV<sup>1</sup>, Tkachuk AP<sup>1</sup>, Gushchin VA<sup>1,3</sup> ✉

<sup>1</sup> Laboratory of Translational Biomedicine, Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

<sup>2</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Industrial Ecology, Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow

<sup>3</sup> Department of Virology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow

The use of CRISPR-Cas systems in genome editing has recently become one of the major research areas. Meanwhile, CAS proteins can be employed to develop novel techniques for molecular diagnostics. Traditional approaches to the identification of microorganisms have a few drawbacks: they are time-consuming (microbiological methods), insufficiently sensitive (immunoassays), expensive or labor-intensive (PCR, sequencing). The aim of this work was to obtain a functionally active Cas13a protein that could be used as a diagnostic tool and study its behavior under different conditions and at various target concentrations. We constructed an expression vector with the *cas13a* gene of *Leptotrichia wadei* under the control of T7 promoter. We obtained a functionally active Cas13a RNase with pre-programmed activity, guide RNA, and a fragment of influenza B RNA sequence serving as a target. The functional activity of Cas13 RNase was assessed by fluorescence in the reaction mix containing guide RNA, target RNA, and a molecular RNA beacon. The obtained protein Cas13a was able to specifically recognize the target and did not exhibit any non-specific RNase activity. This study can become a basis for developing a novel, rapid, specific and sensitive method for pathogen detection.

**Keywords:** PCR, diagnostics, infectious diseases, CRISPR-Cas system, Cas13a

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir Gushchin  
Gamalei 18, Moscow, 123098; wowaniada@gmail.com, vladimir.a.gushchin@gamaleya.org

**Received:** 31.05.2018 **Accepted:** 07.06.2018

**DOI:** 10.24075/brsmu.2018.021

На протяжении многих лет человечество борется с инфекционными заболеваниями. Особо опасны инфекции, вызывающие вспышки и эпидемии [1]. Непрерывно ведется разработка новых методов диагностики, так как именно от точности диагностики зависит эффективность последующей терапии. Полимеразная цепная реакция

(ПЦР) в отличие от классических микробиологических методов идентификации микроорганизмов, основанных на культивировании с использованием дифференциально-диагностических сред, позволяет определять микроорганизмы быстро и независимо от особенностей их жизненного цикла. Активному внедрению ПЦР

способствует развитие методов секвенирования и легкий доступ к последовательностям геномов в открытых базах данных [2].

Тем не менее потребность в разработке новых методов молекулярной диагностики по-прежнему остается. Расширение спектра использования ПЦР ограничивают высокая стоимость оборудования, необходимость создания специализированных лабораторных помещений и отсутствие персонала, имеющего высокую квалификацию. В качестве альтернативы ПЦР предлагаются различные варианты мобильных биосенсоров использующих комбинацию физических и биохимических подходов [3–5], а также подходы, совсем не требующие сложных приборов [6, 7]. Наиболее перспективной, по нашему мнению, разработкой, сочетающей высокую специфичность и чувствительность на уровне единичных молекул, является SHERLOCK (*specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking*) [8, 9].

SHERLOCK основан на комбинировании изотермической амплификации нуклеиновых кислот исследуемого образца с работой Cas13a и позволяет детектировать как молекулы ДНК, так и РНК. Изотермическая амплификация используется для накопления мишени, а Cas13a выполняет функцию специфического сенсора, позволяющего точно распознавать заданные мишени и различать даже единичные нуклеотидные замены [9].

Активация нуклеазной активности Cas13a начинается со связывания направляющей РНК (crРНК) с Cas13a, после чего в структуре белка происходят значительные конформационные изменения, цель которых — формирование канала для дальнейшего связывания РНК-мишени [10]. Когда Cas13a встречается с РНК-мишенью, происходит образование дуплекса crРНК:РНК-мишень в положительно заряженном канале «NUC lobe». РНК-мишень служит своеобразным активатором, так как образование дуплекса катализирует сближение каталитических доменов с последующим формированием сайта расщепления РНК. Использование зонда РНК позволяет визуализировать процесс работы Cas13 по накоплению флуоресцентного сигнала.

Целью публикуемой работы было получение функционально активного препарата Cas13a, а также изучение его активности в различных условиях, в том числе при изменении концентраций мишени. В качестве мишени был использован фрагмент РНК вируса гриппа Б.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Получение рекомбинантного белка LwCas13a

Для получения препарата рекомбинантного белка Cas13a *Leptotrichia wadei* (LwCas13a) ген с оптимизированным кодоновым составом, синтезированный de novo (Евроген, Россия), был встроен в генетический экспрессионный вектор pET42b(+) под контролем *lacT7* промотора. Экспрессию гена проводили в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS, со стороны С-конца Cas13a имел октогистидиновую метку. Индукцию осуществляли с использованием изопропил-β-D-1-тиогаалактопиранозида (ИПТГ). Замороженную биомассу ресуспендировали в лизирующем буфере (20 мМ Трис-НСl pH 8,8; 500 мМ NaCl; 5 мМ β-меркаптоэтанол) и разрушали под воздействием циклических ультразвуковых импульсов. Лизат осветляли центрифугированием при 15 000 г в течение 20 мин, супернатант использовали для проведения аффинной хроматографии на автоматизированной

системе среднего давления NGC Discover™ 10 (Bio-Rad, США), использовали колонку HisPrep FF 16/10 (GE, Германия) объемом 20 мл, заряженную ионами Ni<sup>2+</sup>. Для освобождения от неспецифически связавшихся примесей в буферные растворы для хроматографии добавляли Triton X-100 до конечной концентрации 0,1%. Элюцию белка осуществляли в линейном градиенте имидазола до конечной концентрации 0,5 М. После хроматографии, фракции, содержащие Cas13a, объединяли и диализовали против буфера хранения (20 мМ Трис-НСl pH 8,0; 200 мМ NaCl; 0,1 мМ ЭДТА). Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически с помощью прибора Implen NanoPhotometer (IMPLEN, Германия) при длине волны 280 нм. Расчет концентрации проводили с учетом коэффициента экстинкции [11, 12].

### Получение РНК-мишени и направляющей РНК

Для получения направляющей РНК и РНК-мишени использовали метод ПЦР с последующей транскрипцией ПЦР-продукта с помощью qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) по протоколам производителя. Для получения направляющей РНК использовали искусственно синтезированные олигонуклеотиды-праймеры, обладающие участком самокомплементарности. Для получения РНК-мишени амплифицировали фрагмент плазмиды, несущей последовательность генома вируса гриппа Б и фага MS2. Транскрипцию *in vitro* с полученных ПЦР-продуктов проводили с использованием MEGascript® T7 Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

### Определение сторонних видов нуклеазных активностей LwCas13a

В качестве аналитического сигнала для проверки сторонних видов нуклеазных активностей LwCas13a использовали флуоресценцию, появляющуюся при расщеплении репортерной молекулы РНК RNaseAlert v2 Substrate (Thermo fisher scientific, США). Репортерная молекула РНК представляет собой олигонуклеотид-маячок с флуоресцентным красителем на 5'-конце и его гасителем на 3'-конце. При расщеплении молекулы краситель отделяется от гасителя и испускает квант света в зеленом спектре (длина волны 520 нм). Препарат LwCas13a в конечной концентрации 450 нМ инкубировали в реакционной смеси состоящей из нуклеазного буфера и репортерной РНК (40 мМ Трис-НСl pH 7,3; 60 мМ NaCl; 6 мМ MgCl<sub>2</sub>; 125 нМ RNaseAlert v2 Substrate) в течение 2 ч при 37 °С, изменение флуоресценции регистрировали в реальном времени с использованием амплификатора QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). В качестве положительного контроля использовали РНКазу А (Thermo fisher scientific, США), в качестве отрицательного — чистую репортерную РНК.

### Проверка эндонуклеазной активности белка LwCas13a

Реакционная смесь для определения эндонуклеазной активности LwCas13a состояла из нуклеазного буфера (40 мМ Трис-НСl pH 7,3; 60 мМ NaCl; 6 мМ MgCl<sub>2</sub>), 450 мМ LwCas13a, 22,5 нМ crРНК, 125 мМ RNaseAlert v2 Substrate, 2 мкл RiboLock RNase Inhibitor, 100 нг РНК вируса табачной мозаики (в качестве фона) и различных концентраций РНК-мишени. Детекцию флуоресцентного сигнала осуществляли в реальном времени в течение 2 ч при 37 °С

с использованием амплификатора QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Получение препарата рекомбинантного LwCas13a

Препарат рекомбинантного белка LwCas13a получали с применением аффинной хроматографии. Анализ фракций в системе денатурирующего электрофореза белков показал, что во время индукции клетки *E. coli* продуцируют растворимый белок с молекулярной массой, сопоставимой с расчетной для LwCas13a (139,8 кДа) (рис. 1).

### Оптимизация концентрации репортерной РНК (RNaseAlert) в реакционной смеси

Для получения оптимальных значений флуоресценции провели серию модельных экспериментов с использованием РНКазы А (рис. 2). Для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация субстрата 125 нМ, так как именно при этом значении обеспечивался максимальный динамический диапазон в 100 000 условных единиц флуоресценции.

### Проверка сторонних видов РНКазной активности препарата LwCas13a

Проверку препарата белка LwCas13a на наличие неспецифических видов РНКазной активности проводили с помощью инкубации белка LwCas13a с флуоресцентным субстратом RNaseAlert v2 Substrate в отсутствие сРНК и РНК-мишени в течение 2 ч, изменения флуоресцентного сигнала при этом не наблюдалось. В качестве положительного контроля инкубировали флуоресцентный субстрат с РНКазой А, в качестве отрицательного контроля — с препаратом репортерной РНК (рис.3). Можно заключить, что по разработанной методике был получен препарат белка LwCas13a, не проявляющий

неспецифических видов РНКазной активности, что позволило перейти к изучению свойств программируемой РНКазы.

### Определение чувствительности метода детекции на основе препарата белка LwCas13a на примере вируса гриппа Б

Определение чувствительности системы детекции с использованием белка LwCas13a проводили в модельных экспериментах с вирусной РНК-мишенью фрагмента генома вируса гриппа Б. В ходе экспериментов с препаратами LwCas13a нижним детектируемым порогом чувствительности оказалось множество  $10^7$  молекул вирусных РНК-мишеней (рис. 4 и рис. 5).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование LwCas13a для детекции патогенных микроорганизмов открывает большие перспективы. Методика, адаптированная в 2017 г. [7, 9] и названная SHERLOCK, основана на сочетании распознавания белком Cas13a молекул РНК, полученных в результате предварительной амплификации с использованием рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA) и T7-транскрипции. Все реакции проходят в одной смеси. Используя такой подход, исследователи создали платформу для диагностики вируса Зика, обладающую аттомолярной чувствительностью и специфичностью, не уступающую количественной ПЦР (qПЦР) и цифровой капельной ПЦР. В первую очередь ученые исследовали ортологи белка Cas13a, для получения надежного флуоресцентного сигнала при активации РНКазной активности белка Cas13a. Cas13a *Leptotrichia wadei*, способен детектировать до 50 пМ РНК-мишени [7]. Именно этот фермент был взят за основу при разработке платформы SHERLOCK. Несмотря на высокую чувствительность, авторы исследовали возможность совмещения Cas13a-детектирования с различными вариантами изотермической амплификации,

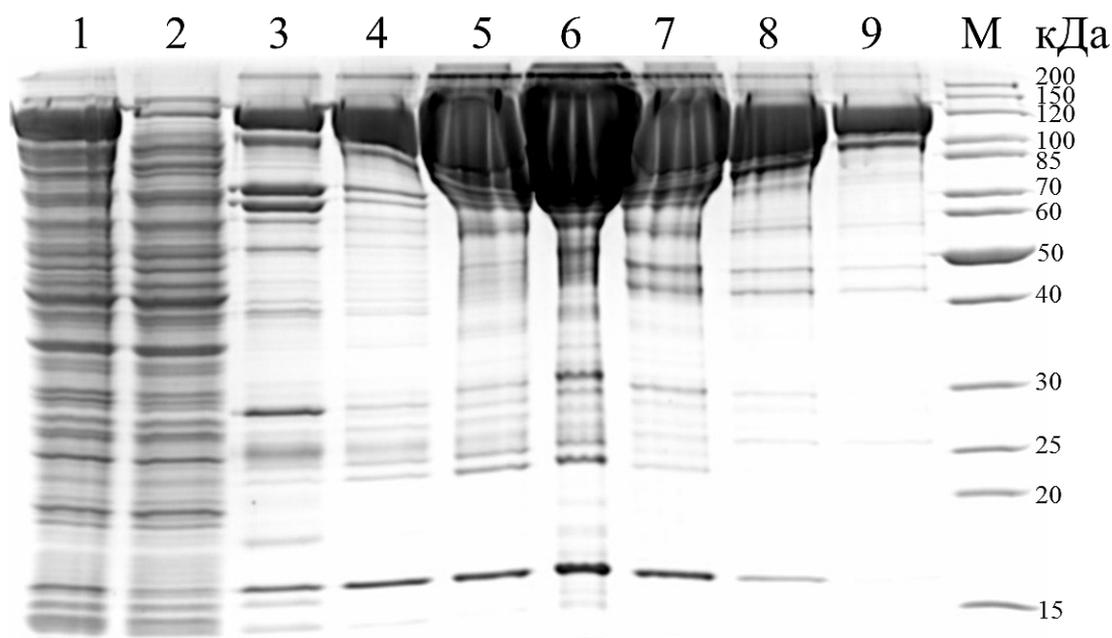


Рис. 1. Получение препарата рекомбинантного белка LwCas13a. Анализ фракций после аффинной хроматографии в системе денатурирующего электрофореза белков: 1 — клеточный лизат до хроматографии; 2 — белки не связавшиеся с хроматографическим носителем; 3–9 — фракции элюата; М — маркер молекулярного веса

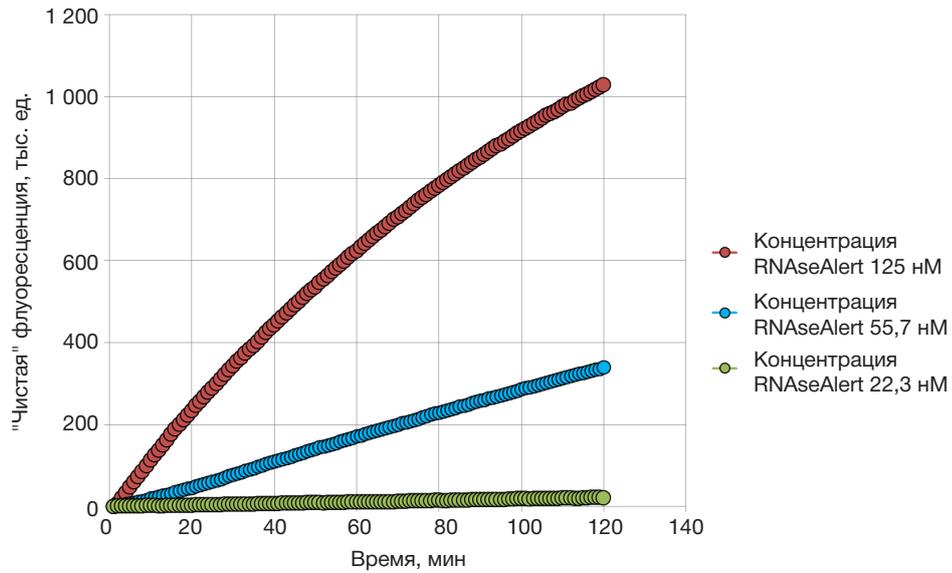


Рис. 2. Кинетика изменения сигнала флуоресценции при инкубировании различных концентраций RNaseAlert с РНКазой А

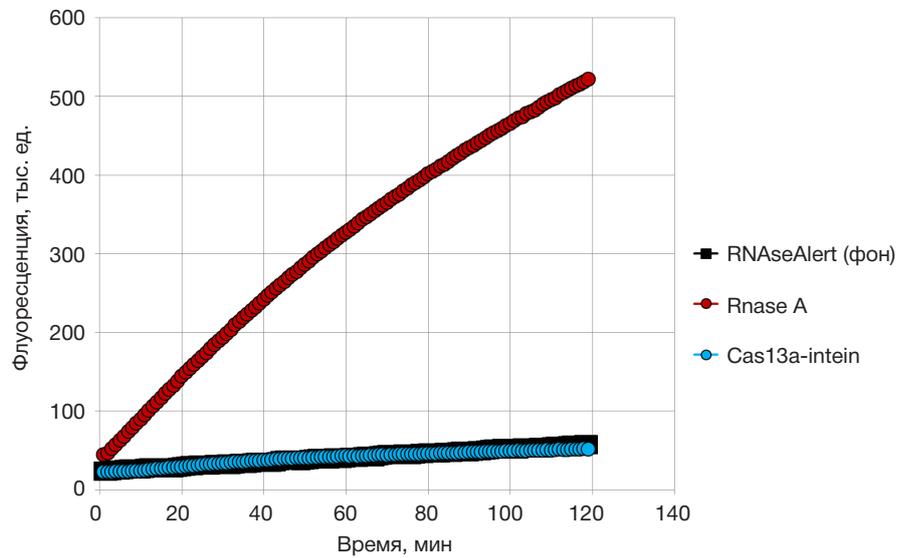


Рис. 3. Кинетика изменения сигнала флуоресценции при исследовании наличия сторонних РНКазных активностей препарата LwCas13a

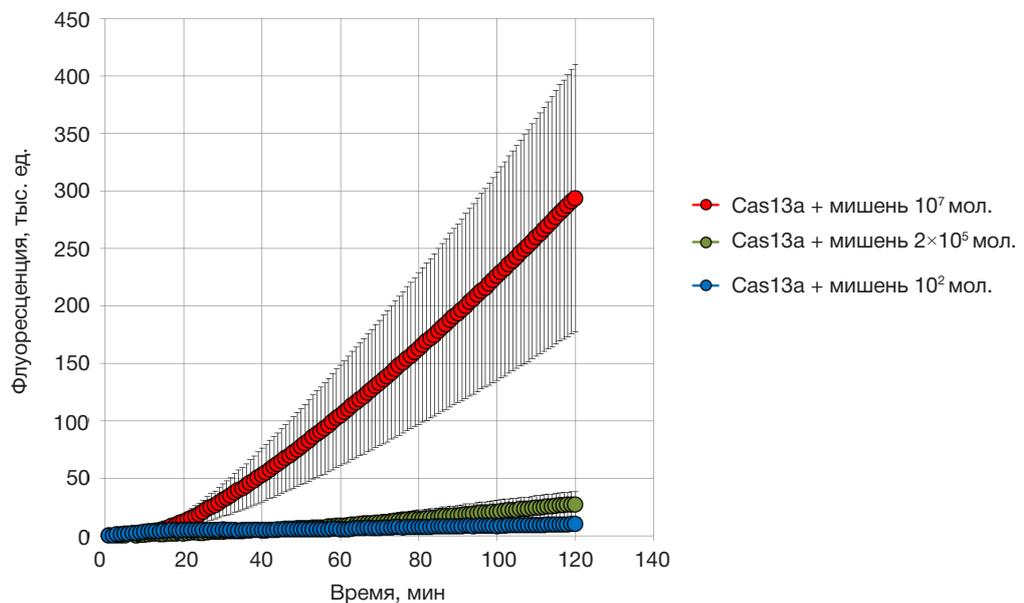


Рис. 4. Кинетика изменения сигнала флуоресценции при добавлении различных концентраций РНК-мишени

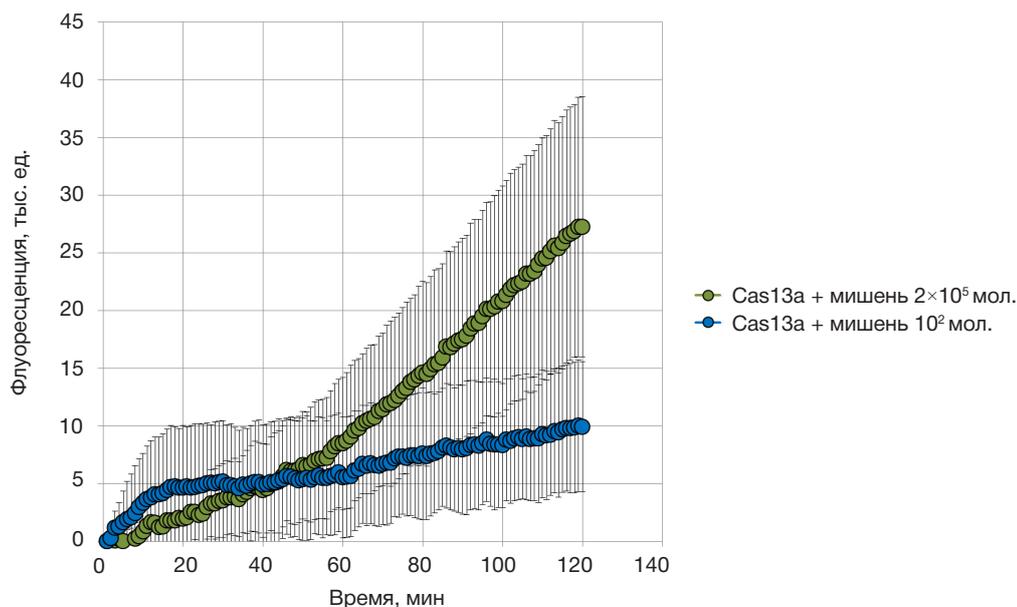


Рис. 5. Кинетика изменения сигнала флуоресценции при малых концентрациях РНК-мишени гриппа Б

и пришли к выводу, что RPA в сочетании с транскрипцией и РНКазной активностью белка Cas13a способна увеличить чувствительность метода. Было показано, что созданная платформа SHERLOCK способна различать РНК-мишени, отличающиеся друг от друга на один нуклеотид, при очень маленьких их концентрациях в растворе, а также может быть применима для портативного использования [7, 9].

В данной работе мы синтезировали вариант белка LwCas13a с оптимизированным кодоновым составом. В отличие от ранее описанного [7, 9], последовательность данного белка была изменена для его высокоэффективной продукции в клетках *E. coli*. Полученные штаммы-продуценты позволяют получать до 10 мг с 1 л культуры (рис. 1). Нами была разработана методика очистки Cas13a и проведены тесты, показывающие, что программируемая РНКаза не проявляет неспецифической РНКазной активности. Отсутствие последней свидетельствует о высокой чистоте полученного препарата. Далее мы отработали тесты по специфической *in vitro* детекции РНКазной активности белка Cas13a на основе фрагментов РНК вируса гриппа Б. Было показано, что без предварительной наработки мишени с использованием ранее описанных методик RPA и транскрипции с Т7-

полимеразой [7, 9] чувствительность детекции составляет  $10^7$  молекул.

## ВЫВОДЫ

В рамках данной работы был синтезирован вариант белка Cas13a *Leptotrichia wadei* с оптимизированным кодоновым составом, позволяющий получать функционально активный препарат программируемой РНКазы в клетках *E. coli*. Показано, что полученный препарат белка обладает специфической РНКазной активностью, не проявляет сторонних видов нуклеазной активности и способен специфически определять мишень на примере фрагментов вируса гриппа Б. Дальнейшие исследования будут направлены на совершенствование метода: повышение его чувствительности, изучение специфичности программируемой РНКазы и повышение мультиплексности. Кроме того, будет предпринята попытка по созданию на основе Cas13a полевых диагностикумов. Применение полевых методов диагностики может существенно упростить контроль инфекционных агентов в переносчиках и окружающей среде, позволяя предотвратить попадание возбудителей инфекций в человеческую популяцию [13–15].

## Литература

- Makarov VV, Khromov AV, Gushchin VA, Tkachuk AP. Emergence Of New Infections In The 21st Century And Identification Of Pathogens Using Next Generation Sequencing. Bulletin of Russian State Medical University. 2017; 01: 5–25.
- Fournier PE, Dubourg G, Raoult D. Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. Genome medicine. 2014; 6 (11): 114.
- Karadeema RJ, Stancescu M, Steidl TP, Bertot SC, Kolpashchikov DM. The owl sensor: a 'fragile' DNA nanostructure for the analysis of single nucleotide variations. Nanoscale. 2018; 10: 10116–22.
- Durmanov NN, Guliev RR, Eremenko AV, Boginskaya IA, Ryzhikov IA, Trifonova EA, et al. Non-labeled selective virus detection with novel SERS-active porous silver nanofilms fabricated by Electron Beam Physical Vapor Deposition. Sensors Actuators B: Chemical. 2018; 257: 37–47.
- Pachauri V, Ingebrandt S. Biologically sensitive field-effect transistors: from ISFETs to NanofETs. Essays Biochemistry. 2016; 60 (1): 81–90.
- Stein V, Alexandrov K. Synthetic protein switches: Design principles and applications. Trends in Biotechnology. 2015; 33 (2): 101–10.
- Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. Science. 2018; 360 (6387): 439–44.
- East-Seletsky A, O'Connell MR, Knight SC, Burstein D, Cate JHD, Tjian R, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2

- enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*. 2016; 538 (7624): 270–73.
9. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017; 356 (6336): 435–42.
  10. Liu L, Li X, Wang J, Wang M, Chen P, Yin M, et al. Two Distant Catalytic Sites Are Responsible for C2c2 RNase Activities. *Cell*. 2017; 168 (1–2): 121–34.
  11. Gill SC, von Hippel PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*. 1989; 182 (2): 319–26.
  12. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*. 1995; 4 (11): 2411–23.
  13. Li CX, Shi M, Tian JH, Lin XD, Kang YJ, Chen LJ, et al. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *Elife*. 2015; 4: 1–26.
  14. Shi M, Lin XD, Tian JH, Chen LJ, Chen X, Li CX, et al. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*. 2016; 540 (7634): 539–43.
  15. Gao GF. Commentary From “ A ” IV to “ Z ” IKV: Attacks from Emerging and Re-emerging Pathogens. *Cell*. 2018; 172 (6): 1157–59.

## References

1. Makarov VV, Khromov AV, Gushchin VA, Tkachuk AP. Emergence Of New Infections In The 21st Century And Identification Of Pathogens Using Next Generation Sequencing. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2017; 01: 5–25.
2. Fournier PE, Dubourg G, Raoult D. Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. *Genome medicine*. 2014; 6 (11): 114.
3. Karadeema RJ, Stancescu M, Steidl TP, Bertot SC, Kolpashchikov DM. The owl sensor: a 'fragile' DNA nanostructure for the analysis of single nucleotide variations. *Nanoscale*. 2018; 10: 10116–22.
4. Durmanov NN, Guliev RR, Eremenko AV, Boginskaya IA, Ryzhikov IA, Trifonova EA, et al. Non-labeled selective virus detection with novel SERS-active porous silver nanofilms fabricated by Electron Beam Physical Vapor Deposition. *Sensors Actuators B: Chemical*. 2018; 257: 37–47.
5. Pachauri V, Ingebrandt S. Biologically sensitive field-effect transistors: from ISFETs to NanoFETs. *Essays Biochemistry*. 2016; 60 (1): 81–90.
6. Stein V, Alexandrov K. Synthetic protein switches: Design principles and applications. *Trends in Biotechnology*. 2015; 33 (2): 101–10.
7. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*. 2018; 360 (6387): 439–44.
8. East-Seletsky A, O'Connell MR, Knight SC, Burstein D, Cate JHD, Tjian R, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*. 2016; 538 (7624): 270–73.
9. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017; 356 (6336): 435–42.
10. Liu L, Li X, Wang J, Wang M, Chen P, Yin M, et al. Two Distant Catalytic Sites Are Responsible for C2c2 RNase Activities. *Cell*. 2017; 168 (1–2): 121–34.
11. Gill SC, von Hippel PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*. 1989; 182 (2): 319–26.
12. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*. 1995; 4 (11): 2411–23.
13. Li CX, Shi M, Tian JH, Lin XD, Kang YJ, Chen LJ, et al. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *Elife*. 2015; 4: 1–26.
14. Shi M, Lin XD, Tian JH, Chen LJ, Chen X, Li CX, et al. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*. 2016; 540 (7634): 539–43.
15. Gao GF. Commentary From “ A ” IV to “ Z ” IKV: Attacks from Emerging and Re-emerging Pathogens. *Cell*. 2018; 172 (6): 1157–59.