Казахский Национальный Университет имени аль-Фараби

УДК: 606(043)

На правах рукописи

ШАЙЗАДИНОВА АЙША МАРАТОВНА

Изучение новых программируемых РНК-направляемых эндонуклеаз CRISPR/Cas систем для применения в диагностике

8D05105 – Биотехнология

Диссертация на соискание степени
доктора философии (Ph.D.)

Отечественный научный консультант:
Абельденов С.К., PhD

Зарубежный научный консультант:
Сапарбаев М.К., д.б.н., профессор

Республика Казахстан
Алматы, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ **5**
ОПРЕДЕЛЕНИЯ **6**
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ **7**
ВВЕДЕНИЕ **8**
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ **12**
1.1 Введение в инновационную технологию CRISPR/Cas 12
1.1.1 История открытия и развития CRISPR/Cas 12
1.1.2 Классификация систем CRISPR/Cas 14
1.1.3 Характеристика белка Cas12a, сравнение с Cas9 16
1.1.4 Роль, структура и функции crРНК 19
1.1.5 Механизм действия Cas12a 20
1.2 Применение технологии CRISPR/Cas 21
1.2.1 Использование системы CRISPR/Cas в диагностике 23
1.3 Современные методы диагностики 24
1.3.1 Молекулярные методы диагностики. ПЦР. 25
1.3.2 Петлевая изотермическая амплификация 27
1.3.3 Рекомбинантная полимеразная амплификация 28
1.3.4 Иммунохроматографический анализ (ИХА) 31
1.4 Значение диагностики патогенов и заболеваний 33
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ **36**
2.1 Олигонуклеотиды 36
2.2 Клонирование, вектора и штаммы 36
2.3 Реактивы и среды 36
2.4 Приготовление хемокомпетентных и электрокомпетентных клеток 37
2.5 Трансформация методом теплового шока 38
2.6 Электропорация 38
2.7 Полимеразная цепная реакция 38
2.8 Секвенирование 39
2.9 Приготовление агарозного геля 39
2.10 Приготовление полиакриламидного геля 39
2.11 Выделение ДНК 40
2.12 Экспрессия и очистка белка 40
2.13 Дизайн, *in vitro* транскрипция и очистка crРНК 41
2.14 Сайт-направленный мутагенез 41
2.15 Рекомбиназная полимеразная амплификация (РПА) 42
2.16 Изотермическая петлевая амплификация (LAMP) 42
2.17 Флуоресцентный анализ на основе метода CRISPR/Cas12a 43
2.18 Иммунохроматографический анализ на основе метода CRISPR/Cas12a 43
2.19 Статистический анализ 43
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ **44**
3.1. Получение, очистка и характеристика рекомбинантных белков MbCas12a и MeCas12a 44

3.2 Дизайн и синтез направляющей РНК (crРНК). Оценка активности рибонуклеинового комплекса 47
3.2.1 Определение оптимальной длины таргетной области crРНК 51
3.2.2 Определение активности рибонуклеинового комплекса при укорочении «ручки» crРНК 53
3.3 Подбор оптимальной последовательности протоспейсер-смежных мотивов (PAM) для CRISPR/Cas12a систем 56
3.4 Оптимизация условий биохимической реакции CRISPR/Cas12a 58
3.5 Структурный анализ и определение активных центров MbCas12a и MeCas12a 61
3.6 Детекция *Escherichia coli* (*E. coli)* методом CRISPR/MbCas12a 67
3.6.1 Подбор генов и оптимальных условий LAMP 68
3.6.2 Подбор PAM-сайтов и дизайн специфической crРНК для детекции гена *phoA* у *E. coli* 71
3.6.3 Определение чувствительности методом LAMP/CRISPR/MbCas12a и считывание флуоресценции в реальном времени 72
3.6.4 Определение специфичности методом LAMP/CRISPR/MbCas12a 77
3.6.5 Детекция клинических образцов *E. coli* из маститного молока коров методом LAMP/CRISPR/MbCas12a 79
3.7 Детекция *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) методом RPA/CRISPR/MbCas12a 83
3.7.1 Подбор генов и оптимальных условий РПА 84
3.7.2 Дизайн crРНК и подбор PAM-участка для точной диагностики гена *nuc* у *S. aureus* 86
3.7.3 Определение чувствительности *S. aureus* с помощью метода RPA/CRISPR/MbCas12a 87
3.7.4 Детекция клинических образцов *S. aureus* из маститного молока с использованием метода РПА и CRISPR/MbCas12a-LFA 89
3.8 Детекция *Alternaria spp.* методом CRISPR/MbCas12a 92
3.8.1 Выбор штаммов, подбор генов и оптимизация реакции РПА 93
3.8.2 Дизайн crРНК и выбор PAM-участка для детекции гена *β-tubulin* у *Alternaria spp.* 96
3.8.3 Определение чувствительности методом RPA/CRISPR/MbCas12a и считывание флуоресценции в реальном времени 97
3.8.4 Определение специфичности методом RPA/CRISPR/MbCas12a 100
3.8.5 Детекция образцов *Alternaria spp.* из зараженной пшеницы методом RPA/CRISPR/MbCas12a 101
3.9 Портативное устройство CRISPR-Kaz для флуоресцентной визуализации и детекции патогенов 103
3.10 Результаты статистического анализа 104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 116
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 120
ПРИЛОЖЕНИЕ А 133
ПРИЛОЖЕНИЕ Б 137

ПРИЛОЖЕНИЕ В **148**
ПРИЛОЖЕНИЕ Г **150**
ПРИЛОЖЕНИЕ Д **152**
ПРИЛОЖЕНИЕ Е **156**
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж **158**
ПРИЛОЖЕНИЕ З **161**
ПРИЛОЖЕНИЕ И **162**

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты: Закон Республики Казахстан «О науке» от 18.02.2011 г. №407-IVЗРК;

ГОСО РК 5.04.034-2011. Государственный общеобразовательный стандарт образования Республики Казахстан. Послевузовское образование. Докторантура. Основные положения (изменения от 23 августа 2012 г. №1080);

ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяются следующие термины с соответствующими определениями:

crРНК (crRNA) - РНК-гид, направляющая РНК в системе CRISPR, ответственная за распознавание целевых последовательностей ДНК.

PAM (Protospacer adjacent motif) - Протоспейсер-смежный мотив, короткая последовательность ДНК, которая находится перед целевым участком и необходима для распознавания и расщепления чужеродной нуклеотидной последовательности CRISPR-Cas системой.

LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) - Изотермическая петлевая амплификация является методом амплификации нуклеиновых кислот, который проводится при постоянной температуре с использованием термостабильной *Bst*-полимеразы и двух или трех пар праймеров.

РПА (RPA) – Рекомбинантная полимеразная амплификация (recombinase polymerase amplification), изотермический метод амплификации ДНК, проводимый при постоянной температуре и основанный на гибридизации праймеров с матрицей при участии ферментов-рекомбиназ.

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, являются системой адаптивного иммунитета бактерий и архей, используемые в геномном редактировании.

ИХА (LFA) - Иммунохроматографический анализ (lateral flow assay) основан на капиллярном движении жидкости по тест-полоске, используемый для быстрого тестирования различных биомаркеров.

ПЦР (Полимеразная цепная реакция) - Полимеразная цепная реакция, метод амплификации ДНК, позволяющий создавать миллионы копий специфической ДНК-последовательности.

Праймер - Короткая одноцепочечная нуклеиновая кислота, используемая для начала синтеза новой цепи ДНК в процессе амплификации.

Биотин - маркер, часто используемый в диагностических тестах для маркировки молекул, обнаруживаемый через связывание со стрептавидином или авидином.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами)

РПА (RPA) – Рекомбиназная полимеразная амплификация (recombinase polymerase amplification)

LAMP - Loop-mediated isothermal amplification (изотермическая петлевая амплифицикация)

PAM - Protospacer adjacent motif (протоспейсер-смежный мотив)

ПЦР - Полимеразная цепная реакция

ПААГ - Полиакриламидный гель

ИПТГ - Изопропил-β-D-тиогалактопиранозид

ДНК - Дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК - Рибонуклеиновая кислота

crРНК - CRISPR РНК

ИХА (LFA) - Иммунохроматографический анализ (lateral flow assay)

УФ - Ультрафиолет

ЭДТА - Этилендиаминтетрауксусная кислота

п.о. - Пара оснований

кДА - Килодальтон

дНТФ - Дезоксинуклеозидтрифосфат

TBE - Tris-borate-EDTA buffer (буфер трис-борат-ЭДТА)

TAE - Tris-acetate-EDTA buffer (буфер трис-ацетат-ЭДТА)

PMSF - Phenylmethylsulfonyl Fluoride (фенилметилсульфонилфторид)

FAM - Fluorescein Amidites (флуоресцеин амида)

BHQ1 - Black hole quencher-1, неметаллический гаситель флуоресценции, эффективно подавляющий эмиссию флуорофоров в составе зондов

OD600 - Optical density at 600 нМ (оптическая плотность при 600 нм)

FIP - Forward inner primer (внутренний прямой праймер)

BIP - Backward inner primer (внутренний обратный праймер)

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика диссертационного исследования. Диссертационная работа посвящена характеристике новых программируемых РНК-направляемых эндонуклеаз CRISPR/Cas – MbCas12a и MeCas12a, а также разработке молекулярной диагностики на основе этих ферментов.

Актуальность исследования. В последние годы технологии CRISPR/Cas стали объектом активных исследований, благодаря чему их применение в различных областях науки и медицины существенно расширилось [1, 2]. Первоначально CRISPR/Cas системы были открыты как иммунный механизм архей и бактерий, используемый ими для распознавания и уничтожения чужеродных нуклеиновых кислот [3-5]. Этот механизм включает два основных компонента: кластер генов CRISPR, сохраняющий информацию о вирусных или плазмидных инвазиях, и белки Cas, обеспечивающие молекулярный механизм иммунитета, который активируется при повторной инвазии чужеродной нуклеотидной последовательности [6-11]. В дальнейшем системы CRISPR/Cas нашли широкое применение в геномном редактировании, что открыло новые горизонты в генной инженерии, включая разработку методов генотерапии и эпигенетических исследований [12-14].

Одним из наиболее перспективных направлений использования CRISPR/Cas является молекулярная диагностика инфекционных заболеваний. Благодаря способности CRISPR/Cas обнаруживать и уничтожать чужеродные ДНК- и РНК-последовательности с высокой точностью, эти системы стали основой для создания диагностических платформ, способных выявлять даже малые концентрации патогенных организмов. Эти методы отличаются высокой точностью, быстротой и простотой использования, а для некоторых платформ не требуется дорогостоящее оборудование, что делает их особенно актуальными в условиях глобальных вызовов в области здравоохранения[15-17].

Таким образом, использование систем CRISPR/Cas в молекулярной диагностике представляет собой инновационный подход, который открывает новые перспективы в борьбе с инфекционными заболеваниями и способствует развитию новых методов диагностики.

Объекты исследования. Объектами исследования являются РНК-направляемые эндонуклеазы Cas12a, полученные из штаммов *Moraxella bovis* и *Moraxella equi*; синтетические направляющие crРНК; ДНК-фрагменты патогенов *E. coli*, *S. aureus* и *Alternaria* spp.

Предмет исследования. Структурная и функциональная характеристика эндонуклеаз MbCas12a и MeCas12a и разработка эффективных методов молекулярной диагностики на их основе.

Цель исследования. Характеристика новых программируемых РНК-направляемых эндонуклеаз CRISPR/Cas, а также использование данных систем в точной идентификации участков ДНК патогенов в молекулярной диагностике.

Задачи исследования:

1. Получение и структурно-функциональное исследование рекомбинантных эндонуклеаз Cas12a из штаммов *Moraxella bovis* и *Moraxella equi*.

2. Дизайн направляющих РНК (crРНК), определение оптимальной последовательности PAM для эндонуклеаз MbCas12a и MeCas12a, получение рибонуклеопротеинового комплекса CRISPR-Cas12a, и оптимизация условий для их работы в *in vitro* условиях.

3. Проведение гомологичного моделирования и изучение мутантных форм ферментов Cas12a для идентификации активного центра эндонуклеазы.

4. Разработка диагностических систем на основе LAMP/CRISPR-Cas12a и RPA/CRISPR-Cas12a.

Методы исследования. В исследовании использованы методы молекулярной биологии (амплификация ДНК, клонирование, трансформация), биохимии (экспрессия и очистка белков), генной инженерии (создание рекомбинантных конструкций), биоинформатики (моделирование структур, анализ последовательностей), а также структурно-функционального анализа белков с использованием программных средств визуализации.

Научная новизна исследования. Научная новизна работы заключается в характеристике и получении новых ранее не изученных аналогов Cas12a, которые являются программируемыми РНК-направляемыми эндонуклеазами CRISPR/Cas систем. Также научная новизна лежит в разработке высокочувствительных и специфичных методов молекулярной диагностики на основе полученных ферментов в комбинации с предварительной изотермической амплификацией для усиления эффективности детекции.

Практическая значимость исследования. Практическая значимость данной работы заключается в создании высокоэффективных и точных диагностических платформ, способных к надежному выявлению патогенов и инфекционных заболеваний, что способствует значительному улучшению методов ранней диагностики и лечения в клинической практике, а также в полевых условиях.

Теоретическая значимость. Теоретическая значимость работы состоит в расширении знаний о механизмах работы эндонуклеаз CRISPR/Cas, их взаимодействии с ДНК и возможностях их применения в биотехнологии.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Функционально активные рекомбинантные белки MbCas12a и MeCas12a из *Moraxella bovis* и *Moraxella equi* представлены в качестве новых аналогов Cas12a, обладающих подтверждённой *in vitro* нуклеазной активностью в комплексе с направляющими crРНК. Оптимизированная схема экспрессии и очистки обеспечивает получение высокоочищенных белков.

2. Структурные параметры направляющих РНК, включая длину 46–47 нуклеотидов, таргетную область 23–24 нуклеотида и PAM-последовательность “TTTN”, определяют высокую специфичность взаимодействия с ДНК-мишенью и эффективную работу эндонуклеаз MbCas12a и MeCas12a. Биохимические условия реакции — 2 мкМ crРНК, 1 мкМ Cas12a, температурный режим 37 °C и

время инкубации 15–30 минут — обеспечивают формирование рибонуклеопротеинового комплекса и максимальную эндонуклеазную активность при расщеплении нуклеиновых кислот.

3. Функциональное значение каталитических доменов RuvC и Nuc в ферментах MbCas12a и MeCas12a подтверждено гомологичным моделированием и сайт-направленным мутагенезом. Критически важные аминокислотные остатки, в том числе в участках RuvC1, RuvC2, RuvC3 и Nuc, определяют активность фермента при расщеплении ДНК. Мутации в указанных позициях приводят к полной или частичной потере эндонуклеазной активности.

4. Разработанный и экспериментально обоснованный способ молекулярной диагностики патогенов на основе эндонуклеазы MbCas12a в сочетании с изотермической амплификацией (LAMP, РПА)**,** обеспечивает специфическое и чувствительное выявление ДНК-мишеней. Чувствительность диагностических систем достигает от 10^1 до 10^4 копий ДНК, что демонстрирует их практическую применимость для быстрой и полевой диагностики микробных и грибковых патогенов таких как *E. coli, S. aureus* и *Alternaria spp.*

Связь с планом основных научных работ. Диссертация была выполнена в лаборатории молекулярной биотехнологии ТОО «Национальный центр биотехнологии» в рамках выполнения гранта AP09259771 «Характеристика новых программируемых РНК-направляемых эндонуклеаз CRISPR/CAS систем для применения в диагностике», BR10764944 «Разработка методов аналитического контроля и проведения мониторинга безопасности пищевой продукции», AP19579275 «Разработка современной молекулярной диагностики патогенов сельскохозяйственных культур на основе метода CRISPR/Cas12a».

Апробация научно-исследовательской работы. Результаты научно-исследовательской работы были представлены на научно-техническом совете факультета биологии и биотехнологии, заседаниях кафедры генетики и молекулярной биологии КазНУ имени аль-Фараби, научных семинарах лаборатории молекулярной биотехнологии ТОО «Национальный центр биотехнологии». Результаты диссертационной работы включены в отчеты НИР по проектам AP09259771 «Характеристика новых программируемых рнк-направляемых эндонуклеаз CRISPR/CAS систем для применения в диагностике», BR10764944 «Разработка методов аналитического контроля и проведения мониторинга безопасности пищевой продукции», AP19579275 «Разработка современной молекулярной диагностики патогенов сельскохозяйственных культур на основе метода CRISPR/Cas12a».

Публикации. Основные результаты диссертационной работы представлены в 7 печатных работах, в том числе 3 статьи в журналах с ненулевым импакт-фактором входящим в базу данных Web of Science или Scopus, 3 статьи в республиканских научных изданиях, рекомендуемых ККСОН МОН РК, получен 1 патент. Оформлена 1 нормативно-техническая документация (НТД).

Личный вклад докторанта. Личный вклад докторанта включает планирование и проведение экспериментов, анализ данных, написание научных статей, обработку результатов исследования.

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов, результатов исследований и обсуждения полученных данных, заключения, списка литературы и приложений. Диссертация изложена на 163 страницах и содержит 16 таблиц, 88 рисунков, 162 источника, 9 приложений.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Введение в инновационную технологию CRISPR/Cas

Технология CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated proteins) представляет собой прорыв в области молекулярной биологии и генной инженерии. Она основана на адаптивной иммунной системе прокариот — бактерий и архей, которые используют данный механизм для защиты от инвазии бактериофагов. Ключевой особенностью этой системы является способность запоминать фрагменты чужеродной ДНК, которые интегрируются в специальные участки генома, известные как CRISPR-локусы. В естественных условиях CRISPR/Cas-системы функционируют благодаря взаимодействию белков Cas (таких как Cas9, Cas12 и других) и направляющих РНК. Эти РНК обеспечивают специфическое связывание с целевыми участками ДНК, направляя белки Cas к определённым последовательностям генома. Это позволяет точно разрезать ДНК в заданной точке, что делает систему CRISPR/Cas высокоэффективным инструментом для редактирования генома.

Высокая специфичность, относительная простота использования и универсальность системы CRISPR/Cas делают её важнейшим инструментом современной молекулярной биологии и генной инженерии. Она нашла применение в геномном редактировании, разработке лекарственных препаратов, регуляции экспрессии генов, диагностике, профилактике и лечении рака, а также в терапии генетических и инфекционных заболеваний.

1.1.1 История открытия и развития CRISPR/Cas

История CRISPR начинается в 1987 году, когда японская группа учёных под руководством Ёсидзуми Исино обнаружила необычные повторяющиеся последовательности в геноме бактерии *Escherichia coli*. Эти элементы состояли из регулярно чередующихся повторов, разделённых уникальными участками, позже названными спейсерами [3, с.8].

Однако понимание их функции оставалось ограниченным. Значительный прогресс в понимании природы CRISPR произошёл в 1993–2005 годах благодаря Франсиско Мохике из Университета Аликанте. В 1993 году он впервые описал структуру, ныне известную как локус CRISPR, и в течение 1990-х годов продолжал её изучение. В 2000 году Мохика установил, что ранее считавшиеся разрозненными повторяющиеся последовательности обладают общими признаками, которые теперь считаются характерными чертами CRISPR. Термин «CRISPR» был предложен им в переписке с Руудом Янсеном, который ввёл его в научный оборот в 2002 году. В 2005 году Мохика показал, что спейсеры соответствуют фрагментам геномов бактериофагов, что позволило ему выдвинуть гипотезу об адаптивной иммунной функции CRISPR [4, с.8].

Параллельно в 2005 году Александр Болотин из Французского национального института сельскохозяйственных исследований (INRA) внёс вклад в развитие представлений о CRISPR, изучая бактерию *Streptococcus*

thermophilus. Анализ её генома выявил необычный CRISPR-локус, отличающийся от известных систем отсутствием ряда cas-генов и наличием новых, включая ген, кодирующий крупный белок с предполагаемой нуклеазной активностью — впоследствии идентифицированный как Cas9. Кроме того, Болотин отметил, что спейсеры, гомологичные вирусным генам, содержат общую последовательность на одном из концов, названную протоспейсерным смежным мотивом (PAM), необходимым для распознавания мишени [18].

В 2006 году Евгений Кунин из Национального центра биотехнологической информации США на основе компьютерного анализа кластеров ортологичных белков предложил гипотетическую модель функционирования CRISPR как бактериальной иммунной системы. Он предположил, что спейсеры, гомологичные ДНК фагов, играют ключевую роль в защите, отвергнув более раннюю идею о связи Cas-белков с системой репарации ДНК [19]. Позже в 2007 году Филипп Орва предоставил первое экспериментальное доказательство адаптивной природы CRISPR. Изучая *S.thermophilus*, широко используемую в молочной промышленности, он показал, что бактерии интегрируют фрагменты ДНК фагов в CRISPR-массив, что обеспечивает защиту от последующих атак. Также было установлено, что Cas9, вероятно, является единственным белком, необходимым для интерференции — процесса нейтрализации фагов [6, с.8].

Джон ван дер Оост из Университета Вагенингена в 2008 году показал, что в *E. coli* спейсеры транскрибируются в crРНК, которые направляют Cas-белки к целевой ДНК [5, с.8]. В декабре 2010 года Сильвен Муано из Университета Лаваля показал, что CRISPR-Cas9 создаёт двухцепочечные разрывы в ДНК в точных позициях — за три нуклеотида до PAM. Он подтвердил, что Cas9 — единственный белок, необходимый для этого процесса в системах II типа [20].

В 2011 году Эммануэль Шарпантье из Венского университета обнаружила малую РНК — tracrРНК — в системе CRISPR-Cas9 *Streptococcus pyogenes*. Было установлено, что tracrРНК образует дуплекс с crРНК, направляя Cas9 к мишеням [21]. В том же году Виргиниюс Шикснис из Вильнюсского университета продемонстрировал, что CRISPR-система *S. thermophilus* может быть клонирована и экспрессирована в *E. coli*, обеспечивая устойчивость к плазмидам [22]. Это подтвердило автономность системы и полноту её компонентов. Позже в 2012 году Шикснис охарактеризовал механизм действия Cas9, показав, что он разрезает ДНК в определённых сайтах и может быть перепрограммирован путём изменения последовательности crРНК [9, с.8]. Параллельно, в июне 2012 года, Эммануэль Шарпантье и Дженнифер Даудна из Калифорнийского университета в Беркли описали сходные результаты, предложив объединение crРНК и tracrРНК в единую синтетическую направляющую РНК [7, с.8]. В январе 2013 года Фэн Чжан из Института Броуда впервые адаптировал CRISPR-Cas9 для редактирования геномов эукариотических клеток, продемонстрировав его эффективность в клетках человека и мыши [23]. Впоследствии технология CRISPR была усовершенствована с появлением систем CRISPR/Cas12 и CRISPR/Cas13, расширивших её применение для работы с РНК и диагностики [24].

В 2020 году Д. Даудна и Э. Шарпантье получили Нобелевскую премию по химии за разработку метода редактирования генома, что подчеркнуло её значение для науки. Таким образом, история CRISPR-Cas отражает эволюцию от случайного открытия до революционного инструмента геномной инженерии, основанного на вкладе множества учёных и их последовательных открытиях [1, 9, с.8, 25].

1.1.2 Классификация систем CRISPR/Cas

CRISPR-системы классифицируются на основе различных структурных и функциональных характеристик, в том числе в зависимости от наличия и типа Cas-белка, который играет ключевую роль в процессе редактирования генома [26, 27].

Системы CRISPR/Cas представляют собой эволюционно разнообразные механизмы адаптивного иммунитета бактерий и архей, которые обеспечивают защиту от инвазии вирусов и мобильных генетических элементов [2, с.8, 28, 29]. Согласно эволюционной классификации, предложенной Кирой С. Макаровой и коллегами, системы CRISPR/Cas делятся на два основных класса, шесть типов и многочисленные подтипы [30]. Такая классификация основана на различиях в составе белков, архитектуре CRISPR-локусов и механизмах функционирования.

CRISPR/Cas системы подразделяются на два класса (рисунок 1).

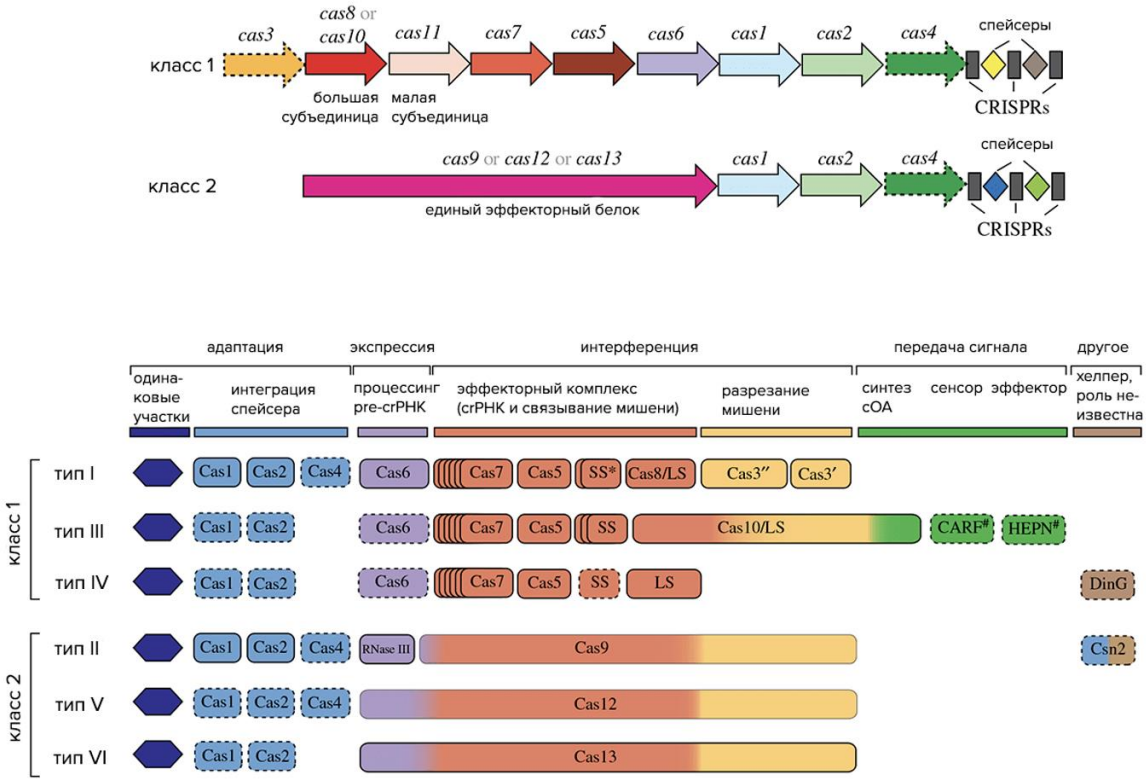


Рисунок 1 – Классификация CRISPR/Cas систем [30]

Класс 1 - отличительной чертой систем первого класса является использование мультибелковых комплексов для интерференции [31].

Тип I является самым распространенным среди CRISPR/Cas систем. Его ключевым элементом является белок Cas3, обладающий нуклеазной и хеликазной активностью. Этот тип подразделяется на семь подтипов (I-A, I-B, I-C, I-D, I-E, I-F, I-G), которые различаются по составу белков и особенностям действия [31].

Тип III характеризуется наличием мультибелковых комплексов, в состав которых входит белок Cas10. Эти системы способны к деградации как ДНК, так и РНК. Тип III подразделяется на подтипы III-A и III-B, которые различаются по специфичности к нуклеиновым кислотам [29, 32].

Системы типа IV встречаются реже и связаны с плазмидами. Их белковый состав ограничен, а функции до конца не изучены [33].

Класс 2 - в отличие от систем первого класса, системы второго класса используют одиночные многофункциональные белки для выполнения ключевых функций, что делает их более компактными и удобными для биотехнологического применения.

Тип II - наиболее известный тип благодаря белку Cas9, который широко используется для редактирования генома. Cas9 направляется к мишени при помощи направляющей РНК (gRNA) и разрезает обе цепи ДНК. Тип II имеет три подтипа (II-A, II-B, II-C), которые различаются по структуре и последовательностям CRISPR-локусов [33, 34].

Тип V включает белки Cas12 (ранее известные как Cpf1), которые способны разрезать как двуцепочечную, так и одноцепочечную ДНК. Cas12 обладает уникальной способностью к аутообработке crРНК, что расширяет его функциональные возможности. Тип V подразделяется на подтипы (V-A, V-B и др.), каждый из которых имеет свои специфические особенности[31].

Системы типа VI отличаются тем, что нацелены на РНК, а не на ДНК. Основной белок этой системы — Cas13, обладающий РНКазной активностью. Cas13 используется для разрушения специфических РНК-мишеней, что открывает перспективы для диагностики и лечения заболеваний, связанных с нарушениями в экспрессии генов [30, с.14].

Эволюционно системы CRISPR/Cas отличаются высокой степенью модульности и разнообразия. Горизонтальный перенос генов способствовал распространению этих систем среди бактерий и архей. CRISPR-локусы включают повторяющиеся последовательности (репиты) и интерспейсеры, которые представляют собой фрагменты геномов вирусов или других мобильных элементов, что позволяет организму запоминать патогенные последовательности. Белки Cas, такие как Cas9, Cas12 и Cas13, демонстрируют значительное структурное и функциональное разнообразие, что делает их универсальными инструментами для биотехнологических задач.

Классификация CRISPR/Cas систем имеет важное значение для их биотехнологического применения. Например, системы типа II (Cas9) широко используются для внесения точечных изменений в ДНК, тогда как системы типа

VI (Cas13) применяются для специфического разрушения РНК и создания методов высокочувствительной диагностики, таких как SHERLOCK. Системы типа V (Cas12) нашли применение в редактировании генома и разработке методов молекулярной детекции нуклеиновых кислот.

Таким образом, классификация CRISPR/Cas систем отражает их эволюционное разнообразие и функциональные особенности, что играет ключевую роль в разработке новых биотехнологических инструментов. Понимание структуры и механизмов действия различных типов и подтипов CRISPR/Cas открывает широкие перспективы для их применения в молекулярной биологии, медицине, сельском хозяйстве и других областях.

1.1.3 Характеристика белка Cas12a, сравнение с Cas9

Cas12a — это подтип белков Cas12 и РНК-управляемая эндонуклеаза, которая является частью системы CRISPR у некоторых бактерий и архей [34]. Основной функцией Cas12a в бактериальном иммунитете является защита бактерий от бактериофагов. Cas12a использует направляющую РНК - crРНК, которая комплементарна ДНК-мишени, для распознавания и разрезания целевой ДНК, что приводит к гибели патогенов [35].

Белок Cas12a (ранее известный как Cpf1) представляет собой важный компонент системы CRISPR/Cas, который отличается от Cas9 своими структурными и функциональными характеристиками (таблица 1). Оба белка являются мультидоменными эффекторными белками и имеют сопоставимые размеры. В комплексе с РНК оба белка формируют билиподную архитектуру, которая обеспечивает их способность связываться с ДНК-мишенью [23, 36]. Однако различия в структуре и механизмах работы выделяют их особенности. Cas9 требует двух РНК: tracrРНК (трансактивирующей CRISPR-РНК) и crРНК (специфической направляющей РНК). Эти две молекулы могут быть синтезированы отдельно или объединены в одну синтетическую направляющую РНК (sgРНК) для упрощения. В отличие от этого, Cas12a работает с одной молекулой РНК — crРНК, что делает её использование более простым в некоторых экспериментах. Существенные различия также заключаются в доменной организации и активности белков [34]. Cas9 содержит два каталитических домена — HNH и RuvC, каждый из которых разрезает одну цепь ДНК, создавая двойной разрыв [37]. В свою очередь, Cas12a имеет только один каталитический домен RuvC, который осуществляет разрезание обеих цепей ДНК. Кроме того, Cas12a обладает уникальным сайтом для процессинга РНК, который позволяет ей самостоятельно обрабатывать pre-crRNA в зрелую crРНК, что исключает необходимость tracrРНК. Cas9 и Cas12a различаются в распознавании PAM (протоспейсерного прилегающего мотива). Cas9 распознаёт последовательность PAM вида 5'-NGG-3', тогда как Cas12a работает с PAM вида 5'-TTTN-3' (где N = A, C или G). Это расширяет спектр мишеней, доступных для редактирования с использованием Cas12a, и делает её перспективным инструментом для задач, требующих высокой специфичности. Механизм связывания с мишенью и каталитическая активность также различаются. Cas9

создаёт тупые концы (blunt ends) при разрезании ДНК, что делает её подходящей для задач, не требующих вставки специфических последовательностей. Cas12a, напротив, создаёт липкие концы (sticky ends), которые облегчают лигирование и повышают точность интеграции фрагментов ДНК [34, 35, с.16].

Таблица 1 – Сравнительная характеристка Cas12a и Cas9 [38]

Параметр	Эндонуклеазы	
	Cas12a	Cas9
Размер белка	~1300 аминокислот	~1000–1600 аминокислот
РНК	Одна молекула РНК (crРНК)	Две молекулы РНК (crРНК и tracrРНК)
Нуклеазные участки	Один нуклеазный домен (RuvC-Nuc)	Два нуклеазных домена (HNH и RuvC)
Нуклеазная активность	Образует липкие концы	Образует тупые концы
Коллатеральная активность	Разрезает неспецифические одноцепочечные молекулы ДНК	Нет коллатеральной активности
PAM	5'TTTN	NGG 3'
pre-crRNA	Обладает собственной рибонуклеазной (RNase) активностью	Необходима рибонуклеаза III (RNase III) и tracrРНК

Cas12a – это белок состоящий из трех структурных доменов: Rec (домен распознавания) и Nuc (нуклеазный домен) (рисунок 2, 3).

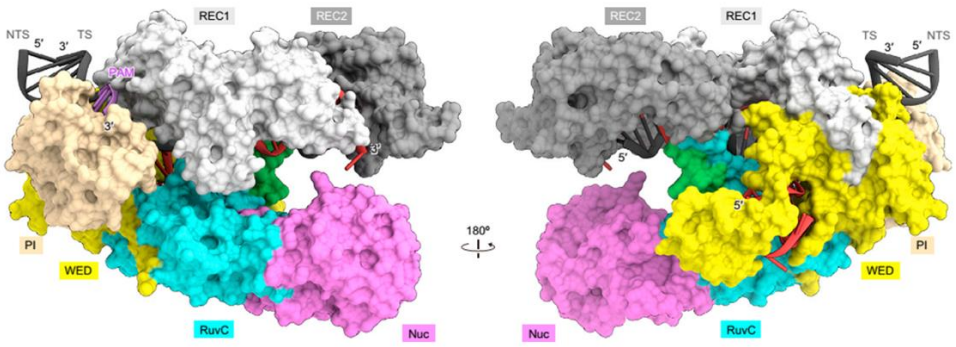
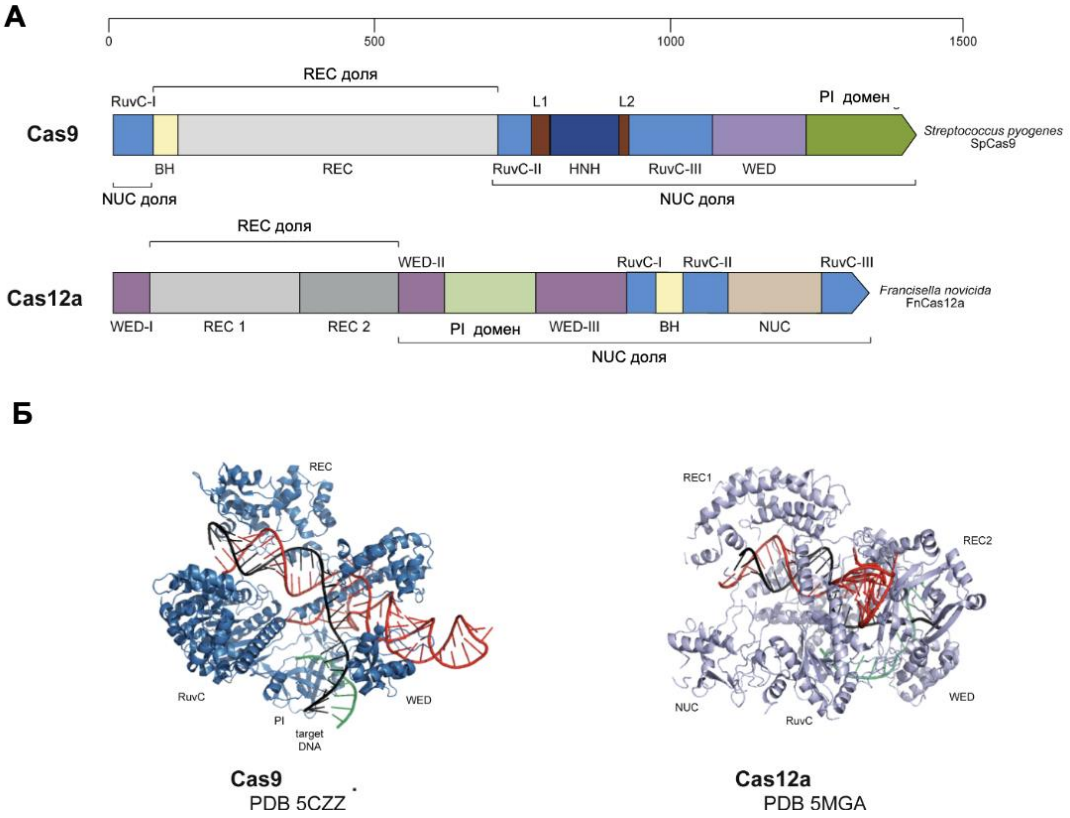


Рисунок 2 – Доменная организация фермента Cas12a [35]

Rec домен отвечает за распознавание и связывание с направляющей РНК и целевой ДНК, выполняет каталитическую функцию и содержит. Nuc домен играет ключевую роль в каталитической активности фермента и содержит активный центр для разрезания ДНК [35, 39, 40].



А. Сравнение доменной структуры Cas9 и Cas12, В. Пространственные структуры R-Loop комплексов Cas9 и Cas12a

Рисунок 3 – Доменная организация и R-образный комплекс белков Cas9 и Cas12a [38]

Технология на основе механизма действия фермента Cas12a может использоваться для разработки диагностических тестов на различные генетические и инфекционные заболевания, включая патогены, такие как вирусы, бактерии и грибы. Cas12a обладает уникальной способностью к транс-активации [16, с.8]. Это означает, что он может резать одноцепочечные ДНК, не являющиеся его непосредственной целью, после активации целевой ДНК. Это достигается благодаря способности Cas12a активироваться при распознавании целевой последовательности с помощью специально подобранной crРНК. После активации Cas12a начинает разрезать другие одноцепочечные ДНК или РНК в образце, включая меченые репортерные молекулы, что приводит к появлению сигнала, например флуоресценции. Этот метод обладает высокой точностью и чувствительностью и может применяться для детекции разнообразных патогенов [41-44].

Эти характеристики обеспечивают значительное преимущество Cas12a по сравнению с другими CRISPR-ассоциированными белками, такими как Cas9, и расширяют возможности для достижения точных и эффективных результатов в области редактирования генома [34].

1.1.4 Роль, структура и функции crРНК

crРНК (CRISPR-РНК) представляет собой ключевой элемент системы CRISPR/Cas и играет центральную роль в обеспечении направленности и специфичности действий Cas-белков [45, 46]. Формирование crРНК начинается с транскрипции CRISPR-локуса в предварительный транскрипт, который затем подвергается процессингу, в результате чего получается зрелая crРНК. Эта РНК содержит последовательности, специфичные для целевых вирусных или плазмидных ДНК, что позволяет системе CRISPR/Cas эффективно распознавать и модифицировать определённые участки генома [39, 47].

Основные функции crРНК включают:

- Направление Cas-белков: crРНК связывается с Cas-белками и направляет их к целевым участкам ДНК, обеспечивая специфичность разрезания.

- Формирование активного комплекса: crРНК обеспечивает формирование активного комплекса с Cas-белком, который взаимодействует с целевой ДНК [48].

Структурно, crРНК состоит из двух основных частей:

- Палиндромные повторные участки: Эти участки формируют структуры, способствующие связыванию crРНК с Cas-белком.

- Интерспейсинговые последовательности: Эти участки являются уникальными для каждого вируса или плазмиды и определяют направленность системы CRISPR/Cas [48].

Процессинг crРНК зависит от типа системы CRISPR/Cas. В системах типа II, например, созревание crРНК осуществляется при участии домохозяйственного белка RNase III и трансактивирующей CRISPR-РНК (tracrРНК). tracrРНК связывается с пре-crРНК через комплементарные взаимодействия, формируя структурный комплекс, который в присутствии белка Cas9 разрезается RNase III. Этот механизм позволяет получить зрелую crРНК, готовую к участию в интерференции [9, с.8, 47].

В системах типа V (например, Cas12a), процессинг crРНК происходит иначе. Cas12a самостоятельно разрезает пре-crРНК без участия tracrРНК, что является уникальной особенностью этого белка. После транскрипции пре-crРНК Cas12a расщепляет её на 4 нуклеотида выше шпилечной структуры, образованной CRISPR-повторами. Полученные промежуточные молекулы подвергаются дальнейшему процессингу в клетке, образуя зрелую crРНК. Зрелая crРНК для Cas12a обычно имеет длину 42–44 нуклеотида, при этом первые 19–20 нуклеотидов соответствуют повторной последовательности, а оставшиеся 23–25 нуклеотидов — интерспейсерной последовательности [34, с.16].

Уникальная способность Cas12a к самостоятельному процессингу crРНК делает этот белок универсальным и эффективным инструментом для

биотехнологических приложений. Благодаря объединению эндорибонуклеазной и эндонуклеазной активностей Cas12a способен как обрабатывать пре-crRNA, так и разрезать целевые последовательности ДНК [34, с.16, 40, 49].

1.1.5 Механизм действия Cas12a

Механизм действия Cas12a можно разделить на несколько этапов, за каждый из которых отвечает определенный домен. После образование пре-crРНК, созданного из массива CRISPR, белок Cas12a в своей части WED обрабатывает пре-crРНК, формируя структуру зрелой crРНК. Далее, благодаря своей структуре crРНК связывается с ферментом Cas12a и образует комплекс Cas12a-crRNA, посредством домена Rec. После создания crРНК комплекс Cas12a-crRNA связывается с целевой ДНК. Это происходит с помощью двух доменов Cas12a: доли REC и PAM-домена. Домен REC распознает последовательность на целевой ДНК, с свою очередь PAM-домен отвечает за распознавание PAM-участка (обычно T-богатые PAM-участки, такие как 'TTTN'), который расположен непосредственно перед последовательностью целевой ДНК. После связывания комплекса с таргетной ДНК, происходит активация каталитического домена RuvC и Nuc, которые воспроизводят разрез обеих цепей ДНК-мишени нецелевой и целевой [39, с.19, 50].

Механизм действия Cas12a включает несколько ключевых этапов, которые далее рассмотрим подробнее (рисунок 4).

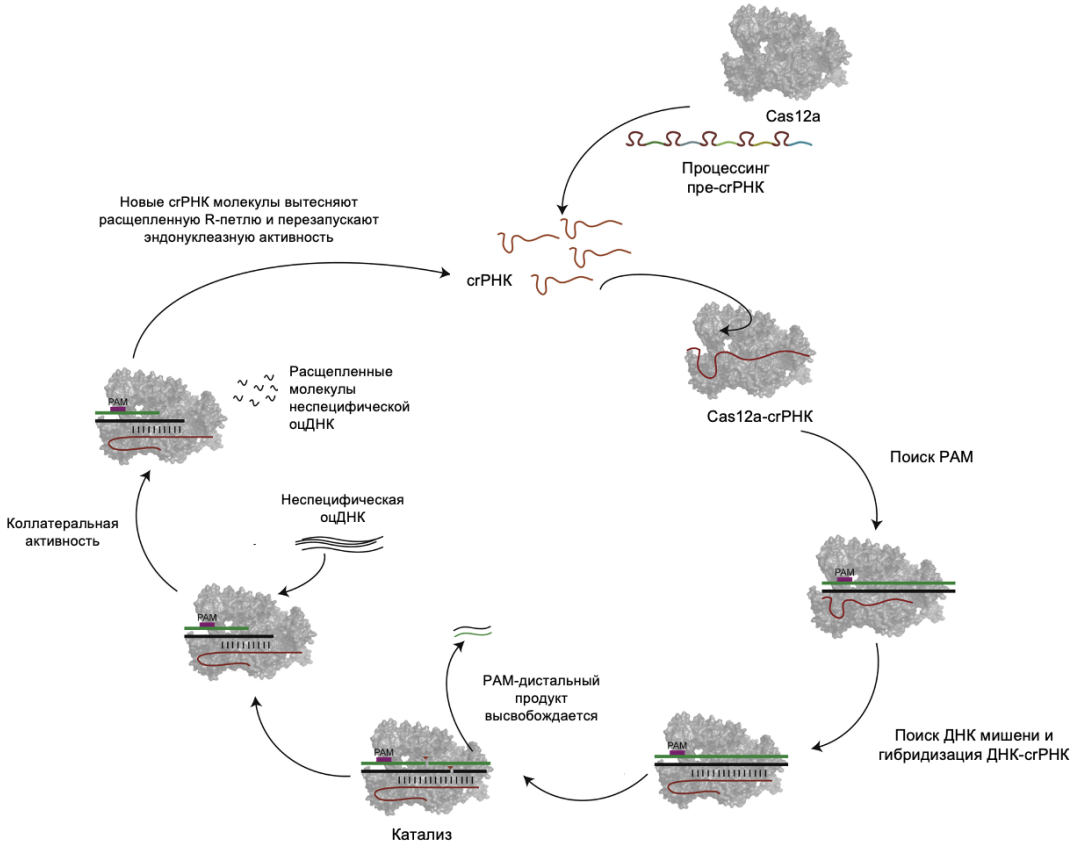


Рисунок 4 – Механизм действия и каталитического пути CRISPR-Cas12a [38]

Распознавание PAM и активация. Распознавание протоспейсерного прилегающего мотива (PAM) является критическим этапом работы Cas12a, позволяющим отличать собственную ДНК организма-хозяина от чужеродной. Cas12a распознаёт PAM-участки, обогащённые тимином (например, 5'-TTTN-3' для LbCas12a и AsCas12a, 5'-TTN-3' для FnCas12a). Процесс распознавания включает взаимодействие доменов WED II-III, REC1 и PAM-интеракционного домена с двухцепочечной ДНК (дцДНК). Лизиновая петля (LKL) в PAM-интеракционном домене способствует разворачиванию ДНК-спирали, вставляя спираль под углом 45° относительно продольной оси ДНК. Это приводит к разъединению пар оснований после PAM, что позволяет crРНК гибридизоваться с целевой цепью ДНК (TS), тогда как нецелевой цепи (NTS) направляется в каталитический сайт [38, с.20].

Механизм разрезания ДНК. После начальной гибридизации crРНК с ДНК Cas12a проверяет точность взаимодействия через прилежащий участок (3–5 нуклеотидов рядом с PAM). Несоответствие в этом участке приводит к утрате активности. После успешной проверки происходит дальнейшая гибридизация crРНК с ДНК, причём TS и NTS направляются к каталитическому центру разными путями. Каталитический сайт (домен RuvC) разрезает обе цепи ДНК с образованием «липких» концов (staggered cuts) и 5'-фосфорилированных продуктов. Особенности позиционирования TS и NTS объясняют более быстрое гидролизование NTS по сравнению с TS. После разрезания PAM-дистальный участок ДНК освобождается, а PAM-проксимальный остаётся связанным с Cas12a, формируя разрезанный R-образный комплекс.

Неспецифическая активность Cas12a. Помимо высокой специфичности к двухцепочечной ДНК, Cas12a проявляет неспецифичную активность по отношению к одноцепочечной ДНК (оцДНК). После активации crРНК-ДНК гибридом Cas12a разрезает любую оцДНК, находящуюся в каталитическом кармане. Это связано с изменениями конформации каталитического сайта, которая становится доступной после формирования гибрида crРНК-ДНК. Такая активность может быть проблематичной, так как угрожает базовым клеточным процессам, включая репликацию и транскрипцию. Для предотвращения неспецифичной активности бактериальные клетки регулируют работу Cas12a. Концентрация crРНК значительно превышает концентрацию самого белка Cas12a, что позволяет новым crРНК вытеснять разрезанные R-образные комплексы из активного центра. Это возвращает фермент в неактивное состояние, в котором каталитический карман недоступен, предотвращая деградацию оцДНК. Такой механизм также позволяет Cas12a повторно использовать свою активность для других целевых ДНК [7, с.8].

1.2 Применение технологии CRISPR/Cas

Технология CRISPR-Cas нашла широкое применение в различных областях науки и медицины благодаря своей универсальности и высокой точности. Одним из ключевых направлений её использования является медицинские исследования и терапия [8, с.8, 51]. CRISPR-Cas позволяет исследовать и корректировать

мутации, вызывающие наследственные заболевания. В клинических испытаниях уже применяются методы редактирования генов для лечения таких заболеваний, как серповидноклеточная анемия, муковисцидоз и некоторые формы рака. Также технология используется для создания моделей заболеваний в лабораторных животных, что позволяет лучше понять патогенез и разрабатывать новые методы лечения. Например, CRISPR применяется для создания мышиных моделей рака и других заболеваний, что помогает исследовать механизмы болезни и тестировать новые лекарства [52, 53]. В контексте клеточной терапии CRISPR используется для модификации иммунных клеток, таких как Т-клетки, с целью создания противораковых вакцин и терапии, направленной на усиление иммунного ответа против опухолей. Технология позволяет корректировать генетические мутации и улучшать состояние пациентов, открывая новые перспективы в лечении заболеваний, которые ранее считались неизлечимыми [52]. В клинических испытаниях уже применяются методы редактирования генов, что подтверждает потенциал CRISPR/Cas в медицинской практике.

В генной инженерии CRISPR/Cas используется для создания генетически модифицированных организмов, что позволяет исследовать функции генов и разрабатывать новые биологические модели. Эта технология значительно упрощает и ускоряет процесс редактирования генома, что открывает новые возможности для фундаментальных исследований и практических приложений [53, 54].

В сельском хозяйстве CRISPR/Cas используется для создания сельскохозяйственных культур и животных с улучшенными характеристиками. Эти модификации включают устойчивость к болезням, повышение урожайности и улучшение качества продуктов. Технология помогает развивать новые сорта растений и породы животных, которые могут существенно повысить эффективность сельского хозяйства и обеспечить продовольственную безопасность [53].

В экологических исследованиях CRISPR/Cas играет важную роль в разработке новых методов борьбы с инвазивными видами и улучшении экосистем. Эта технология может быть использована для создания организмов, которые помогут в восстановлении экосистем и поддержании биоразнообразия. Применение CRISPR/Cas в экологии открывает возможности для более эффективного управления природными ресурсами и сохранения экосистемных услуг [53].

Технология CRISPR/Cas также находит важное применение в диагностике благодаря своей высокой чувствительности и специфичности. В области диагностики CRISPR/Cas используется для создания инновационных тестов, которые позволяют точно и быстро выявлять генетические мутации, инфекционные агенты и другие биомаркеры.

Одним из ключевых направлений применения CRISPR/Cas в диагностике является создание высокочувствительных тестов для выявления различных заболеваний и инфекций. Технология CRISPR/Cas позволяет разработать методы, которые могут обнаруживать даже минимальные концентрации

вирусов, бактерий или других патогенов в образцах. Это особенно важно для раннего обнаружения инфекционных заболеваний и точного определения их возбудителей. Например, системы на основе CRISPR, такие как SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing) и DETECTR, продемонстрировали свою способность к быстрой и точной диагностике вирусных инфекций, включая COVID-19. Эти технологии основываются на использовании CRISPR-ферментов, которые разрезают целевые молекулы РНК или ДНК, что активирует сигнализацию, легко обнаружимую с помощью простых тестов [55, 56]. Кроме того, CRISPR/Cas может использоваться для выявления генетических мутаций, связанных с наследственными заболеваниями или раковыми заболеваниями. Это позволяет проводить скрининг на наличие предрасположенности к определённым заболеваниям и разрабатывать персонализированные подходы к лечению. Разработка таких диагностических тестов улучшает возможности раннего выявления заболеваний и позволяет более точно подбирать терапевтические стратегии [57]. Технология CRISPR/Cas также применяется в разработке новых диагностических платформ, которые обеспечивают высокую точность и простоту использования [58]. Например, диагностические тесты, основанные на CRISPR-технологиях, могут быть интегрированы в мобильные устройства или портативные приборы, что делает диагностику доступной для широкого круга пользователей, включая использование в полевых условиях или в ограниченных ресурсных ситуациях [16, с.8].

1.2.1 Использование системы CRISPR/Cas в диагностике

Диагностика с использованием системы CRISPR/Cas представляет собой один из наиболее инновационных и перспективных методов в области молекулярной биологии и медицины. Одним из ключевых преимуществ использования CRISPR/Cas в диагностике является возможность точного и быстрого выявления специфических последовательностей нуклеиновых кислот. Это достигается за счет использования направляющих РНК (gRNA), которые связываются с целевыми последовательностями, что позволяет Cas-белку разрезать ДНК или РНК в строго определенных местах. Благодаря этой особенности, система CRISPR/Cas может быть адаптирована для детекции различных патогенов, генетических мутаций и других биомаркеров, что особенно важно для ранней диагностики и лечения различных заболеваний, включая инфекционные и генетические расстройства [56].

Важным аспектом является развитие технологий, таких как SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing) и DETECTR (DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter), которые основаны на использовании CRISPR/Cas для диагностики. SHERLOCK позволяет обнаруживать нуклеиновые кислоты с чрезвычайно высокой чувствительностью, достигающей одного молекула-мишени, благодаря применению флуоресцентных репортеров и амплификации сигнала [57, 59]. DETECTR использует аналогичный подход, но с применением системы Cas12,

которая распознает и разрезает одноцепочечные ДНК, что также позволяет точно и быстро идентифицировать целевые последовательности [24, с.13].

Эти методы имеют несколько преимуществ по сравнению с традиционными диагностическими техниками, такими как ПЦР (полимеразная цепная реакция) и секвенирование. Во-первых, CRISPR/Cas системы обеспечивают высокую специфичность за счет использования направляющих РНК, что минимизирует ложноположительные результаты. Во-вторых, такие системы могут работать при низкой концентрации нуклеиновых кислот, что делает их идеальными для ранней диагностики, когда количество биомаркеров в образцах минимально. В-третьих, технология CRISPR/Cas позволяет проводить детекцию непосредственно в пробе без необходимости сложной и длительной подготовки образцов, что сокращает время и затраты на диагностику [60].

1.3 Современные методы диагностики

Современная диагностика патогенов и заболеваний базируется на различных методах, которые можно классифицировать на несколько основных категорий: микробиологические, молекулярные, иммунологические и серологические [61-64]. Каждая из этих категорий включает в себя множество подходов и технологий, которые используются в зависимости от специфики патогена и клинической ситуации [65, 66].

Микробиологические методы являются традиционным подходом к диагностике инфекционных заболеваний и включают выделение и культивирование патогенов на специальных питательных средах. Этот метод позволяет не только идентифицировать патоген, но и провести тесты на чувствительность к антибиотикам, что критически важно для выбора эффективной терапии. Выделение и культивирование микроорганизмов на питательных средах позволяют их идентифицировать по морфологическим и биохимическим признакам, что является золотым стандартом для диагностики бактериальных инфекций, таких как туберкулез и сепсис. Кроме того, антибиограмма позволяет определить чувствительность выделенного патогена к различным антибиотикам, что помогает подобрать наиболее эффективное лечение для конкретного пациента [67-69].

Молекулярные методы диагностики основаны на выявлении нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) патогена в образце. Эти методы являются высоко специфичными и чувствительными, что делает их особенно полезными для диагностики вирусных инфекций и других заболеваний, где микробиологические методы менее эффективны. Одним из наиболее распространённых методов является полимеразная цепная реакция (ПЦР). ПЦР является золотым стандартом для диагностики многих инфекционных заболеваний благодаря её высокой чувствительности и специфичности. Этот метод позволяет амплифицировать небольшие фрагменты ДНК или РНК, что делает возможным выявление патогенов даже при низкой концентрации их генетического материала. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет амплифицировать и обнаруживать специфические фрагменты ДНК или РНК

патогенов, таких как ВИЧ, вирус гепатита С, вирус SARS-CoV-2 и других. Также метод гибридизации нуклеиновых кислот, который включает использование зондов, комплементарных к специфическим последовательностям ДНК или РНК патогена, используется для диагностики инфекционных агентов [70-72].

Иммунологические методы основаны на взаимодействии антигенов и антител, что позволяет выявить наличие специфических патогенов или реакций организма на них. Эти методы широко применяются для диагностики вирусных и бактериальных инфекций, а также аутоиммунных заболеваний. Иммуноферментный анализ (ИФА) используется для выявления антител или антигенов в образцах пациента, таких как сыворотка крови, что делает его популярным для диагностики инфекций, таких как ВИЧ, гепатит и сифилис. Иммунофлуоресцентный анализ (ИФА) позволяет визуализировать патогены в клинических образцах с помощью антител, меченых флуоресцентными метками, и часто используется в диагностике паразитарных инфекций и вирусов [73, 74].

Таким образом, современные методы диагностики заболеваний и патогенов играют ключевую роль в медицине, обеспечивая точность и эффективность в диагностике. Интеграция различных диагностических подходов становится все более важной, способствуя созданию персонализированных подходов к лечению и повышению качества медицинской помощи.

1.3.1 Молекулярные методы диагностики. ПЦР.

Молекулярные методы диагностики играют важную роль в современных подходах к идентификации и мониторингу инфекционных заболеваний, наследственных патологий, онкологических состояний, предрасположенности к заболеваниям, а также для изучения полиморфизмов, связанных с патологическими состояниями. Эти методы базируются на анализе биомаркеров, таких как ДНК, РНК, белки и другие молекулы, и включают как аналитическую, так и клиническую оценку [75].

Молекулярная диагностика охватывает широкий спектр исследований, включая тестирование на инфекционные заболевания, онкологические маркеры, генетические тесты для выявления наследственных патологий, а также определение предрасположенности к заболеваниям или полиморфизмов, связанных с различными состояниями здоровья. В области онкологии молекулярные тесты, такие как анализ ДНК, применяются для скрининга раковых заболеваний (например, многоцелевой тест ДНК из стула для диагностики колоректального рака) [71]. Микробиологические анализы используются для диагностики инфекционных заболеваний, таких как скрининг на группу B *Streptococcus* в пренатальных образцах [76]. Качественные нуклеиновые тесты применяются для подтверждения инфекций, таких как вирус гепатита С, и для скрининга донорской крови. Генетические тесты, такие как секвенирование нового поколения, используются для анализа наследственных заболеваний, например, диагностики муковисцидоза [77].

Молекулярная диагностика также позволяет анализировать биомаркеры, которые включают генетические коды организмов, геномы и протеомы. Эти

методы применяются для медицинского тестирования, диагностики симптоматических пациентов, скрининга бессимптомных индивидов, мониторинга заболеваний, прогностической оценки, выявления рисков и подбора терапий. Для обнаружения биомаркеров молекулярная диагностика использует биологические тесты, которые включают ПЦР, иммуноферментный анализ (ELISA), гибридизацию *in situ* и микрочипы [73, 78].

ПЦР (полимеразная цепная реакция) является одной из ключевых технологий молекулярной диагностики. Метод основан на многократном увеличении количества специфических последовательностей ДНК с использованием в условиях *in vitro* ферментативного синтеза. С момента своего изобретения ПЦР оказала значительное влияние на развитие биологических и медицинских наук, а также нашла широкое применение в криминалистике и юридической практике. Эта технология позволяет получить более 100 миллиардов копий молекулы ДНК всего за несколько часов [79, 80].

Ключевой механизм ПЦР заключается в амплификации целевой последовательности ДНК с использованием двух праймеров, комплементарных противоположным цепям целевой области. Реакция проходит в три основных этапа: денатурация - нагревание образца для разрыва водородных связей между цепями ДНК, отжиг праймеров - охлаждение, позволяющее праймерам связываться с комплементарными участками целевой ДНК, элонгация - синтез новых цепей ДНК с использованием ДНК-полимеразы [81].

Этот цикл повторяется многократно, что обеспечивает экспоненциальное увеличение количества целевой последовательности. Современные модификации ПЦР, такие как количественная ПЦР в реальном времени (qPCR), позволяют не только качественно, но и количественно определять содержание целевых молекул [58, с.23].

ПЦР-технологии нашли широкое применение в различных областях медицины и науки [82, 83]. В онкологии они используются для скрининга раковых заболеваний (например, тест ДНК для колоректального рака). В инфекционной диагностике ПЦР позволяет выявлять патогены, такие как вирус гепатита С, группа В Streptococcus в образцах для пренатального скрининга и другие микроорганизмы [84]. Кроме того, метод применяется для анализа генетических мутаций, связанных с наследственными заболеваниями (например, для диагностики муковисцидоза с использованием технологий нового поколения секвенирования) [85].

Преимущества ПЦР включают высокую чувствительность, специфичность и возможность работы с минимальными количествами образца. Тем не менее, технология имеет и ограничения. Например, стандартная ПЦР не всегда позволяет достичь точной количественной оценки, что потребовало разработки методов, таких как qPCR [86-88]. Кроме того, качество результатов зависит от качества образцов, точности выполнения процедур и отсутствия контаминации.

1.3.2 Петлевая изотермическая амплификация

Метод петлевой изотермической амплификации (LAMP, Loop-Mediated Isothermal Amplification) представляет собой один из наиболее изученных методов изотермической амплификации, обеспечивающий высокую чувствительность и специфичность [89, 90]. Эта методика основывается на использовании набора из четырёх-шести праймеров, которые распознают различные участки в целевой последовательности ДНК [91-93]. Ключевые преимущества LAMP включают высокую специфичность, быстроту реакции, простоту реагентов и оборудования, высокую продуктивность и устойчивость к ингибиторам. LAMP достигает исключительной точности благодаря использованию до шести праймеров, каждый из которых распознаёт уникальные области целевой ДНК [94-97]. Экспоненциальное накопление продуктов амплификации достигается в течение 30–45 минут, что значительно ускоряет процесс по сравнению с традиционной ПЦР. Реакция LAMP требует минимального набора компонентов, таких как *Bst*-полимераза, MgSO4 и специфические праймеры. Реакцию можно проводить без необходимости в сложных термоциклических устройствах, что делает метод доступным даже в условиях ограниченных ресурсов. Метод LAMP обеспечивает продуктивность амплификации до 10 мкг ДНК на 25 мкл реакции, что значительно превышает производительность стандартной ПЦР, составляющую около 0,2 мкг на 25 мкл. Метод сохраняет чувствительность и специфичность даже при использовании необработанных биологических жидкостей, таких как сыворотка крови, слюна или моча, которые обычно ингибируют амплификацию в ПЦР [98].

Принцип работы метода LAMP основан на использовании специфического набора праймеров, включающего внутренние (FIP и BIP) и внешние (F3 и B3) праймеры, а также дополнительные петлевые праймеры для ускорения реакции. Процесс включает следующие этапы [99]. Первый этап инициация реакции: Внутренний праймер (например, FIP) связывается с целевой последовательностью ДНК, инициируя синтез комплементарной цепи. Второй этап - синтез и высвобождение цепей: Внешний праймер (F3) вытесняет синтезированную цепь, высвобождая её в качестве матрицы для дальнейшей амплификации. Третий этап - формирование петлевой структуры: Петлевая структура формируется благодаря комплементарности 3′- и 5′-концов целевой последовательности, что обеспечивает экспоненциальное накопление продуктов амплификации [100]. Четвертый этап - экспоненциальная амплификация: Петлевые структуры самопримируют дальнейшую амплификацию, что приводит к накоплению большого количества ДНК продуктов за короткое время (рисунок 5) [90].

Bst-полимераза, используемая в LAMP, обладает уникальной способностью к разделению цепей ДНК, аналогичной хеликазе, что исключает необходимость в этапах денатурации, характерных для ПЦР. Важное преимущество этой полимеразы заключается в отсутствии 5′→3′ экзонуклеазной активности, предотвращающей деградацию ранее синтезированных цепей [101].

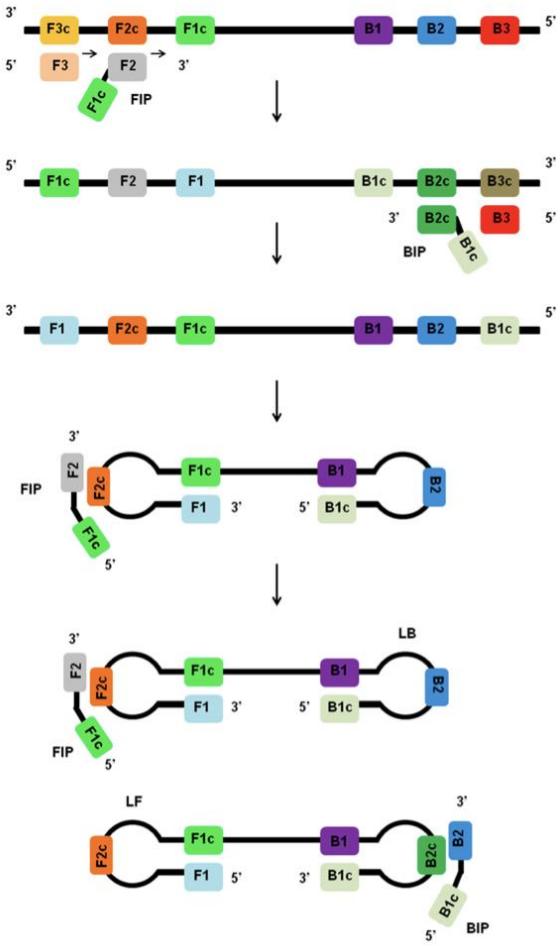


Рисунок 5 – Схематическое представление механизма работы метода петлевой изотермической амплификации (LAMP) [90]

Метод активно используется для диагностики инфекционных заболеваний, таких как малярия, туберкулёз и COVID-19 и т.д. Благодаря своей устойчивости к ингибиторам и способности работать с необработанными образцами, метод идеально подходит для точечной диагностики в клинических и полевых условиях [89, 102].

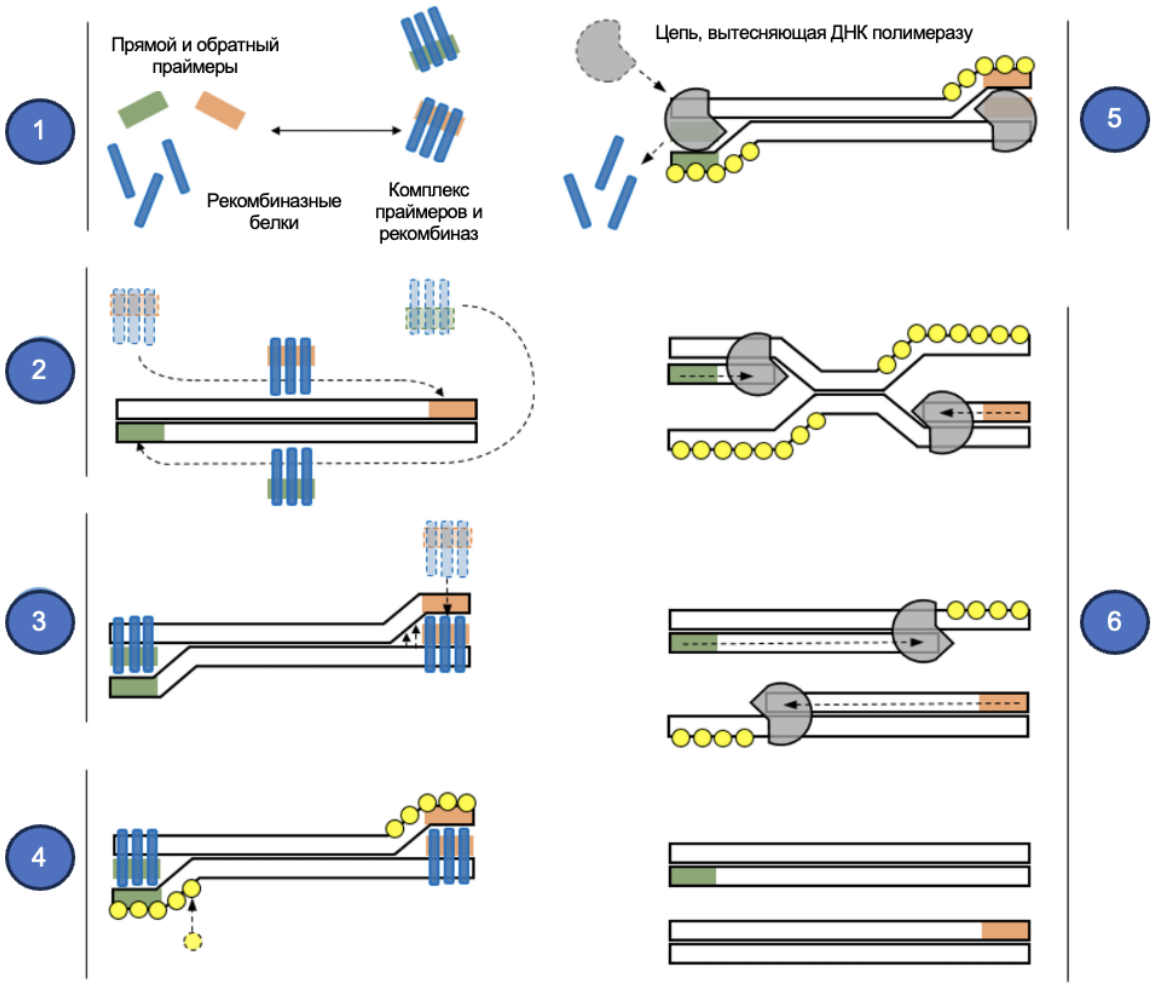
Хотя метод LAMP обладает высокой чувствительностью и специфичностью, дизайн праймеров требует тщательной валидации. Даже с использованием программного обеспечения, такого как Primer-Explorer, существует риск неспецифичных реакций, что делает обязательной проверку экспериментальной эффективности. Интеграция LAMP с системами CRISPR/Cas12a позволяет дополнительно повысить чувствительность и точность диагностики, что делает метод перспективным инструментом для молекулярной диагностики [101, 103].

1.3.3 Рекомбинантная полимеразная амплификация

Рекомбинантная полимеразная амплификация является одной из наиболее быстро развивающихся методик изотермической амплификации нуклеиновых

кислот, позволяя проводить амплификацию вне лабораторных условий и даже в формате самостоятельного тестирования [104-106]. Этот метод, впервые представленный в 2006 году, характеризуется высокой доступностью, чувствительностью и возможностью работы при постоянной температуре без использования сложного оборудования [107]. За более чем десятилетие развития РПА завоевала широкую популярность благодаря своей простоте, скорости реакции и высокой специфичности [108, 109].

Механизм РПА основан на взаимодействии рекомбиназ, таких как T4 UvsX, с праймерами, что приводит к образованию нуклеопротеинового комплекса (рисунок 6).



(1) Компоненты РПА: прямой и обратный праймеры, рекомбиназные белки, аденозинтрифосфат (АТФ), белок загрузки одноцепочечной ДНК и агент, стабилизирующий реакционную среду (2) Связывание рекомбиназно-праймерного комплекса с целевой ДНК. (3) Удлинение праймеров ДНК-полимеразой с вытеснением цепи. (4) Стабилизация одноцепочечной ДНК белками, связывающими одноцепочечную ДНК. (5) Циклическое удлинение и амплификация. (6) Конечный продукт — амплифицированные двухцепочечные молекулы ДНК.

Рисунок 6 – Схема механизма рекомбинантной полимеразной амплификации (РПА) [110]

Этот комплекс находит гомологичные последовательности в двуцепочечной ДНК и инициирует процесс замещения цепей, создавая D-петлю. Одинарные цепи, высвобождающиеся в результате этого процесса, стабилизируются белками SSB, что предотвращает повторное соединение цепей. ДНК-полимераза связывается с 3’-OH-концом праймера и синтезирует комплементарную цепь, обеспечивая экспоненциальную амплификацию целевого участка. Все этапы реакции происходят при постоянной температуре, что исключает необходимость использования термоциклеров [111].

Процесс РПА не требует этапа денатурации, как это характерно для ПЦР, что позволяет проводить реакцию при низких температурах (около 37–42 °C). В отличие от ПЦР, которая требует сложного термоциклирования, РПА выполняется при постоянной температуре, что значительно упрощает процесс. Более того, реакция занимает всего 20–30 минут, что делает метод особенно привлекательным для быстрого тестирования. Это делает метод особенно привлекательным для использования в условиях ограниченных ресурсов, где отсутствует доступ к специализированным лабораториям. Кроме того, метод РПА демонстрирует высокую устойчивость к ингибиторам, которые могут присутствовать в необработанных биологических образцах, таких как кровь, слюна или моча, что значительно упрощает подготовку образцов. Ампликоны, полученные в результате РПА, обычно имеют длину менее 500 нуклеотидов, что обеспечивает быструю и эффективную амплификацию. Оптимальная длина праймеров для РПА составляет 30–35 нуклеотидов, что больше, чем для ПЦР. Более короткие праймеры также могут быть использованы, но это может снизить скорость реакции и её чувствительность [112].

Коммерчески доступные наборы для РПА, такие как TwistAmp™ от компании TwistDx, включают различные модифицированные зонды для флуорогенного детектирования. Например, зонды TwistAmp™ exo и TwistAmp™ fpg содержат флуорофор и тушитель, которые обеспечивают временное подавление сигнала до момента специфического расщепления. Этот подход позволяет проводить детекцию в режиме реального времени и обеспечивает дополнительную специфичность реакции [111].

Одним из ключевых преимуществ РПА является её способность конкурировать с ПЦР за счёт простоты использования и меньших требований к оборудованию [107, с.29]. Тем не менее, РПА не предназначена для замены ПЦР, а скорее служит её дополнением, предоставляя возможность проводить диагностику в полевых условиях. Среди перспективных направлений развития РПА можно выделить создание полностью автоматизированных портативных устройств для диагностики, интеграцию с микрофлюидными системами, а также разработку носимых сенсоров, использующих тепло тела для проведения реакции. Эти новшества позволят расширить сферу применения РПА, сделав её доступной для широкого круга пользователей, включая жителей регионов с ограниченным доступом к медицинской помощи [112, 113]. С момента своего появления РПА активно используется для диагностики бактерий, вирусов, грибов, паразитов, а также для выявления генетически модифицированных

организмов и генов лекарственной устойчивости. Пандемия COVID-19 дополнительно ускорила внедрение РПА в области молекулярной диагностики, особенно для тестирования на наличие вирусной РНК SARS-CoV-2. Быстрота и надёжность метода позволяют использовать его для массового скрининга и контроля эпидемий.

1.3.4 Иммунохроматографический анализ (ИХА)

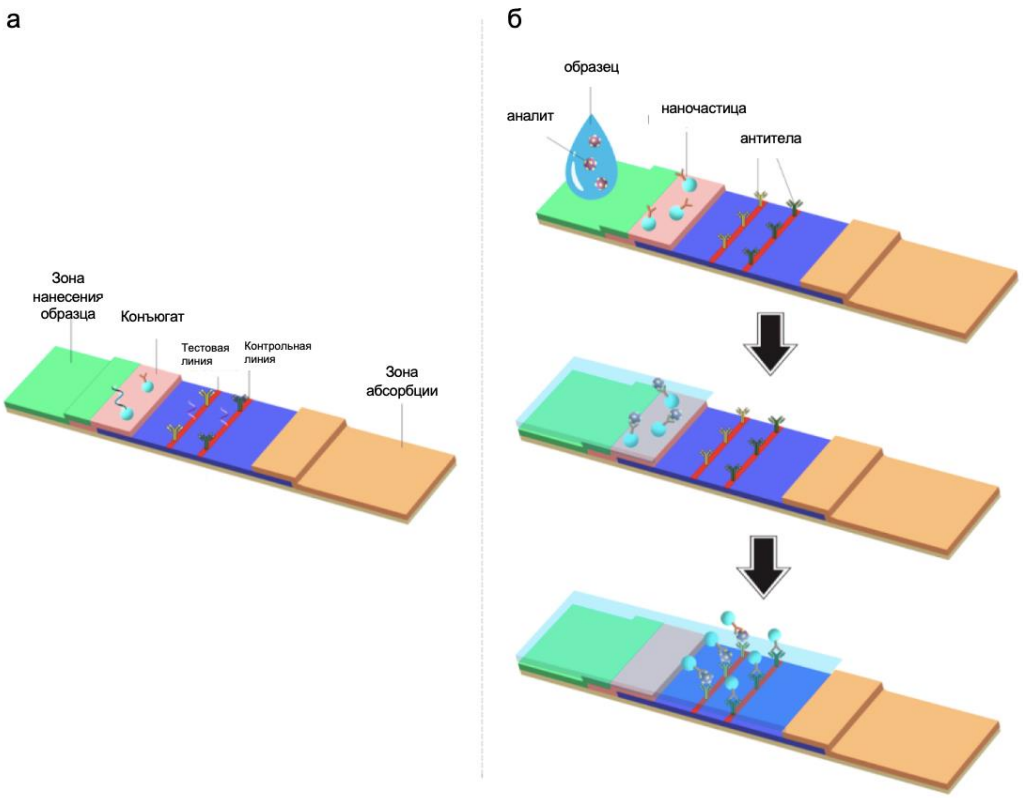
Иммунохроматографический анализ (LFA – lateral flow assay), представляет собой одну из наиболее широко используемых технологий экспресс-диагностики, основанных на бумажных носителях. Эти тесты обладают значительным потенциалом для быстрого скрининга и управления инфекциями, особенно в условиях глобальных пандемий или других нарушений здоровья, где доступ к сложным лабораторным услугам отсутствует [114].

Использование ИХА требует минимального уровня подготовки персонала и позволяет получить результаты за короткое время при низкой стоимости. Они способны обнаруживать различные типы биомаркеров в биологических образцах, таких как кровь, моча, слюна, и предоставляют результаты быстро и эффективно [114, 115].

Одним из ключевых преимуществ ИХА является простота его выполнения и возможность использования в местах, где отсутствует доступ к сложному лабораторному оборудованию. Анализ требует минимального объема образца и предоставляет результаты в течение 5–15 минут. Тесты ИХА могут быть качественными (определяющими наличие или отсутствие аналита), полуколичественными или количественными, что расширяет их применение в диагностике. Однако традиционные ИХА сталкиваются с ограничениями в плане чувствительности и специфичности, что является вызовом для их дальнейшего развития [115].

Классический ИХА включает несколько ключевых компонентов: подушечку для образца, конъюгатную подушечку, реакционную мембрану и абсорбирующую подушечку, которые собираются вместе и поддерживаются пластиковой подложкой. Принцип работы заключается в том, что жидкий образец, содержащий целевой анализируемый компонент, перемещается по бумажной полоске под действием капиллярных сил [116-118].

Во время этого процесса анализируемый компонент взаимодействует с метками, связанными с антителами, и далее движется к тестовой и контрольной линиям. На тестовой линии происходит связывание комплекса антитело-антиген, что формирует визуальный сигнал, подтверждающий наличие целевого аналита. Контрольная линия подтверждает корректность выполнения теста (рисунок 7) [114].



(а) Типичная схема устройства теста латерального потока с ключевыми компонентами: подушечкой для образца, конъюгатной подушечкой, тестовой и контрольной линиями на мембране, а также абсорбирующей подушечкой. (б) Начало анализа включает добавление жидкого образца, в котором целевые аналиты специфически связываются с наномеченными детекционными зондами. С потоком образца комплекс аналита и зонда связывается с захватывающим зондом на тестовой линии (положительный результат) и контрольной линии (проверка корректности анализа)

Рисунок 7 – Механизм действия ИХА [114]

Для повышения чувствительности и специфичности метода используется два основных подхода: улучшение самого анализа и обогащение целевого аналита. Улучшение анализа включает оптимизацию условий реакции, использование методов усиления сигнала, модификацию системы захвата и развитие новых меток. Обогащение аналита осуществляется за счёт предварительной подготовки образца, извлечения и концентрирования целевых молекул. Также в последние годы активно разрабатываются интеграции с изотермическими методами амплификации, такими как РПА и LAMP, что значительно повышает эффективность метода.

Благодаря своей простоте и универсальности, ИХА широко используются для выявления биомаркеров, таких как белки, малые молекулы и нуклеиновые кислоты. Одним из первых широко известных применений стал тест на беременность, который определяет уровень хорионического гонадотропина в моче. Сегодня ИХА активно применяются для диагностики инфекционных заболеваний, выявления аллергенов, токсинов, а также мониторинга состояния окружающей среды.

Интеграция технологии CRISPR/Cas с ИХА открыла новые горизонты в молекулярной диагностике. Системы CRISPR/Cas, такие как Cas12a, позволяют значительно повысить чувствительность за счёт их коллатеральной активности, которая разрушает репортерные молекулы. Эти репортеры, меченные биотином и флуорофором, формируют визуальный сигнал, фиксируемый на тестовой линии. Данный подход совмещает преимущества CRISPR с простотой использования ИХА, делая их особенно актуальными для полевых исследований и точечной диагностики.

ИХА остаётся одним из самых перспективных инструментов в диагностике благодаря низкой стоимости, простоте выполнения и высокой скорости получения результата. Разработка методов с интеграцией CRISPR и изотермической амплификации продолжает улучшать их точность и чувствительность.

1.4 Значение диагностики патогенов и заболеваний

Инфекционные болезни представляют собой обширную группу заболеваний, поражающих как животных, так и человека, и вызванных различными патогенами, такими как бактерии, вирусы, грибы и паразиты. Острые инфекции характеризуются цикличным течением, а некоторые из них могут переходить в хроническую форму при определенных условиях. Первым шагом для предотвращения или лечения таких заболеваний является своевременная диагностика [119].

Диагностика патогенов и заболеваний является ключевым элементом в медицине и ветеринарии, поскольку точное и своевременное выявление инфекционных агентов позволяет предотвратить их распространение, обеспечить адекватное лечение и снизить заболеваемость и смертность. Точные диагностические методы способствуют улучшению клинических исходов, снижению затрат на здравоохранение и предотвращению распространения инфекций [120]. Особенно важна ранняя диагностика заболеваний имеет ключевое значение для го лечения и профилактики осложнений. Раннее выявление инфекционных заболеваний позволяет своевременно начать терапию, что снижает риск тяжелых осложнений и распространения инфекции. Исследования показывают, что своевременная диагностика и лечение туберкулеза, ВИЧ и гепатита С значительно улучшают прогнозы для пациентов и уменьшают смертность.

Кроме того, диагностика играет важную роль в управлении антимикробной резистентностью. Использование точных диагностических тестов позволяет рационально назначать антибиотики, что помогает предотвратить развитие резистентных штаммов патогенов. Исследования показывают, что улучшение диагностических методов и стратегий управления антибиотиками могут значительно снизить уровень антимикробной резистентности и улучшить результаты лечения [121].

Современные методы диагностики, включая молекулярные, серологические и методы визуализации, играют ключевую роль в медицине. Они обеспечивают

высокую точность и скорость выявления заболеваний, что способствует улучшению клинических исходов и снижению затрат на здравоохранение. Развитие и внедрение этих технологий продолжается, что открывает новые возможности для диагностики и лечения заболеваний. Особое значение точная диагностика приобретает при выявлении патогенов, вызывающих заболевания у человека, животных и растений. Наиболее актуальными объектами современных исследований являются представители родов *Escherichia*, *Staphylococcus* и *Alternaria*, часто встречающиеся в клинической и аграрной практике.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), кишечная палочка *Escherichia coli (E.coli)* является одной из значимых бактериальных инфекций, способных причинить значительный вред. *E.coli* — это грамотрицательные палочковидные бактерии, которые обычно обитают в нижней части кишечника человека и теплокровных животных и в норме являются безвредными [122, 123]. Однако при снижении иммунитета и вследствие генетических изменений, некоторые штаммы *E.coli* приобретают патогенные свойства и, попадая в организм человека или животного, могут вызывать различные заболевания [124-126]. Согласно статистике, ежегодно штаммы *E.coli* вызывают до 73 000 случаев пищевых отравлений по всему миру. Основными источниками заражения являются продукты питания, такие как мясо и молочные продукты [127-129].

Особое внимание в настоящем исследовании уделено *E. coli*, выделяемой из молока коров с маститом — воспалением молочной железы, которое приводит к снижению качества молока, экономическим потерям и рискам для здоровья потребителей. Основными симптомами мастита являются воспаление вымени, ухудшение дконсистенции и цвета молока, повышение температуры тела животных. Ухудшение качества молока и молочных продуктов, вызванное маститом, приводит не только к проблемам в животноводстве и экономическим потерям, но и к массовым интоксикациям у людей, которые могут быть смертельными [130], [131].

Стафилококки представляют собой группу грамположительных аэробных микроорганизмов, которые в норме колонизируют слизистые оболочки и кожные покровы млекопитающих [130, 132]. Известно около 40 видов стафилококков, большинство из которых являются комменсалами. Однако *Staphyloccus aureus (S. aureus)* выделяется как клинически значимый патоген, ответственный за широкий спектр инфекционных заболеваний [130, 133].

Особенностью *S. aureus* является высокая степень устойчивости к антибиотикам, включая метициллин, что значительно усложняет терапию инфекций [133-135]. Рост числа случаев инфекций, вызванных метициллин-резистентным *S. aureus* (CA-MRSA), сопровождается увеличением использования антибиотиков, что влечёт за собой появление новых, более устойчивых штаммов [136-138]. Патоген способен вызывать тяжёлые системные заболевания, такие как сепсис, пневмония, мастит, инфекции центральной нервной системы и кишечные инфекции, что подчёркивает важность его своевременной и точной диагностики [139, 140].

Род грибов *Alternaria* включает в себя виды и штаммы, которые могут быть сапрофитами, эндофитами или патогенами для растений, животных и человека [141-143]. В настоящее время известно более 300 типов микотоксинов, и виды *Alternaria* могут производить около 70 из них [144-146]. Эти токсины проявляют разнообразные биологические активности, включая фитотоксические, цитотоксические и противомикробные свойства. Грибы рода *Alternaria* считаются одними из главных патогенов растений, поражая различные сельскохозяйственные культуры и вызывая значительные убытки в аграрном секторе. Эти виды также способны загрязнять зерно различными микотоксинами, которые представляют опасность как для человека, так и для животных. *Alternaria alternata* (*A. alternata*)– это плесневый гриб, широко распространенный в окружающей среде и известный своими патогенными свойствами, влияющими на растения, животных и людей [147]. Этот гриб продуцирует многочисленные вторичные метаболиты, среди которых важное место занимают токсины, такие как альтернариол, тенуазоновая кислота и альтернариолметиловый эфир, которые обладают фитотоксическими и цитотоксическими свойствами. Эти токсины могут вызывать некроз тканей растений, нарушая их нормальные физиологические процессы и снижая урожайность [148, 149].

Для человека *Alternaria spp* представляет опасность как аллерген и инфекционный агент. Споры *Alternaria spp* являются распространенными аллергенами, вызывающими респираторные заболевания, такие как аллергический ринит и астма, а также может вызывать онкологические заболевания [150]. Эти заболевания особенно распространены среди людей, проживающих в условиях повышенной влажности или вблизи сельскохозяйственных угодий, где концентрация спор в воздухе может быть особенно высокой. Иммуноскомпрометированные пациенты подвержены риску инвазивных инфекций, вызванных *Alternaria spp*. Такие инфекции могут проявляться в виде синуситов, кератитов, кожных и ногтевых инфекций, а также системных микозов. У пациентов с иммунодефицитами, таких как ВИЧ-инфицированные или пациенты после трансплантации органов, эти инфекции могут принимать тяжелое и иногда жизнеугрожающее течение [151].

Эффективное управление вредителями требует своевременного обнаружения и идентификации фитопатогенов в растениях и зерновых образцах, что позволяет оперативно выбрать стратегию защиты культур. Диагностика инфекций, вызванных фитопатогенным грибком, включает несколько подходов: микробиологические, молекулярные и серологические методы [152], [153].

Таким образом, точная и своевременная диагностика патогенов, таких как *E. coli*, *S. aureus* и представители рода *Alternaria*, играет решающую роль в предупреждении и контроле инфекционных заболеваний у человека, животных и растений. Применение современных молекулярных методов позволяет не только повысить чувствительность и специфичность выявления возбудителей, но и своевременно реагировать на угрозы, связанные с антимикробной резистентностью и токсигенностью микроорганизмов.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Олигонуклеотиды

В данной работе использовались синтетические олигонуклеотиды, разработанные для проведения ключевых экспериментов, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), клонирование, секвенирование и другие молекулярно-биологические методы.

Все олигонуклеотиды, примененные в работе, указаны в Приложении Д, где приведены их последовательности. Для каждого конкретного эксперимента была выбрана оптимальная последовательность, обеспечивающая специфичность и эффективность реакций. Дизайн олигонуклеотидов проводился с использованием программного пакета Vector NTI версии 11.

2.2 Клонирование, вектора и штаммы

В ходе исследования были использованы следующие нуклеиновые последовательности: плазмидные ДНК pET-28c/Mbovis Cas12a и pET-28c/Mequi Cas12a, фрагменты генов S-gene COVID-19, *phoA E. coli*, *uidA E. coli*, *nuc S. aureus*, а также фрагмент гена бета-тубулина *Alternaria spp.* (приложение Г).

Для трансформации генов S-gene, *phoA, uidA, nuc, beta-tubulin* методом теплового шока применялись штаммы *E. coli DH5α*. Клонирование генов S-gene, *phoA, uidA, nuc, beta-tubulin* осуществлялось с использованием набора CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) в вектор pJET1.2/blunt.

Ген *cas12a* из *Moraxella equi* был синтезирован компанией GenScript с учетом оптимизации кодонов для экспрессии в бактериальной системе. Ген *cas12a* из *Moraxella bovis* был амплифицирован в лабораторных условиях с использованием разработанных праймеров MbovisCas12aNdeIFW и MbovisCas12aBamHIRV. Ссылка на нуклеотидную последователь cas12a *Moraxella bovis* была получена из опубликованной последовательности генома NZ_CP087840.1 (диапазон: 623690 – 627475). Все работы, включая амплификацию, создание конструкций и сборку плазмид pET-28c/Mbovis Cas12a и pET-28c/Mequi Cas12a, выполнялись в лаборатории молекулярной биотехнологии ТОО «Национальный центр биотехнологии».

С целью экспрессии и получения рекомбинантных белков Cas12a из *Moraxella bovis* и *Moraxella equi* использовались штаммы *E. coli* ArcticExpress (DE3). Отбор колоний трансформантов проводился методом ПЦР-скрининга с использованием рекомбинантной *Taq* ДНК-полимеразы, синтезированной в лаборатории.

Все штаммы и плазмидные вектора, применяемые в исследовании, были взяты из лабораторной коллекции.

2.3 Реактивы и среды

В работе использовались реактивы с категорией чистоты «Для молекулярной биологии» от Sigma-Aldrich, AppliChem, Promega и Amresco. Ферменты рестрикции и Т4 ДНК-лигаза были предоставлены компанией Thermo

Scientific (США). Для амплификации гена-мишени применялась *Bst*-полимераза от New England Biolabs. Для проведения РПА-реакции использовался набор TwistAmp Basic Kit (TwistDx, Великобритания), а синтез crРНК осуществлялся с помощью HiScribe™ T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs). Очистка транскрибированной РНК проводилась с использованием Monarch® RNA Cleanup Kit (New England Biolabs, MA, США), а активация лиофилизированного фермента РПА осуществлялась с помощью магния ацетата (280 мМ).

Также в данной работе использовались два варианта бульона Лурия-Бертани: нормально-солевой для культивирования клеток *E. coli* (1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl) и низко-солевой (1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5 % NaCl). Для инкубирования трансформированных клеток, использовалась среда SOC (2% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,05% NaCl, 2,5 мМ KCl, 20 мМ $MgSO_4$, 20мМ глюкозы, pH7,5). Концентрация антибиотиков канамицина и ампициллина в средах составляла 50 мкг/мл и 100 мкг/мл, соответственно.

2.4 Приготовление хемокомпетентных и электрокомпетентных клеток

Приготовление электрокомпетеных клеток

Для подготовки электрокомпетентных клеток Arctic Express (DE3) из единичной колонии 50 мкл клеточного раствора инкубировали в 950 мкл SOC-среды при 37°C в шейкере при 160 об/мин в течение 1 часа. Затем 50 мкл клеточной суспензии высевали на агар ЛБ с 20 мкг/мл гентамицина. На следующий вечер из единичной колонии инокулировали 5 мл ЛБ-бульона с антибиотиком и инкубировали в шейкере при 180 об/мин и 37°C в течение 16 часов. Утром следующего дня 1 мл ночной культуры переносили в 200 мл ЛБ-бульона с антибиотиком и инкубировали при 150 об/мин и 37°C до достижения OD600 = 0,6. При достижении OD600 = 0,6 клетки центрифугировали при 6000×g, 4°C, 7 минут. После этого клетки ресуспендировали в охлажденном 10% глицероле (150 мл на 1 литр культуры), повторно центрифугировали и ресуспендировали в 10% глицероле еще 4 раза. Для приготовления финального стока клеток осадок ресуспендировали в 10% глицероле в пропорциях 3 мл на 1,5 литра культуры и 2 мл на 1 литр культуры, а затем аликвотировали по 50 мкл и хранили при -80°C.

Приготовление хемокомпетеных клеток

Приготовление хемокомпетентных клеток *DH5α* включало следующие этапы. Сначала были подготовлены буферы с $CaCl_2$. Для этого был приготовлен 1M $CaCl_2$, который представляет собой стоковый раствор с 10х рабочей концентрацией. Для его приготовления взвесили 11,1 г безводного $CaCl_2$ и добавили в 80 мл дистиллированной воды (dH_2O). Раствор тщательно перемешали до полного растворения $CaCl_2$, после чего довели объем до 100 мл и отфильтровали через стерильный фильтр с порой 0,22 мкм. Для получения рабочего раствора 0,1M $CaCl_2$ 10 мл 1M $CaCl_2$ добавили в 90 мл dH_2O, а затем раствор также отфильтровали через стерильный фильтр с порой 0,22 мкм.

Рабочий раствор 0,1M $CaCl_2$ с 15% глицерола был приготовлен смешиванием 6 мл 1M $CaCl_2$, 9 мл стерильного глицерола и 45 мл dH_2O. Процесс подготовки хемокомпетентных клеток *DH5α* начинался с подготовки ночной культуры клеток, которая инкубировалась при 200 об/мин (RPM) в течение 12-16 часов. На следующий день 1 мл ночной культуры пересевали в 99 мл LB-среды и инкубировали при 200 RPM до достижения OD600 = 0,4. После этого колба охлаждалась на льду в течение 20 минут. Затем производилась центрифугирование всего объема при 4°C и 4000 RPM в течение 10 минут, после чего весь супернатант удаляли, перевернув пробирку на фильтровальную бумагу. К клеточному осадку добавляли 20 мл 0,1M $CaCl_2$ и инкубировали на льду в течение 30 минут. Следующим этапом было центрифугирование всего объема при 4°C и 4000 RPM в течение 10 минут и удаление супернатанта. Осадок ресуспендировали в 5 мл 0,1M $CaCl_2$ + 15% глицерол. Полученные клетки распределяли по 50 мкл в отдельные пробирки и хранили при -80°C. Этот метод обеспечивает получение хемокомпетентных клеток *DH5α*, которые могут быть использованы для трансформации.

2.5 Трансформация методом теплового шока

Плазмидную ДНК в количестве 100 нг добавляли в 50 мкл суспензии хемокомпетентных клеток и инкубировали на льду в течение 30 минут. Затем клетки подвергали температурному шоку при 42°C в течение 45 секунд в водяной бане GFL 1003 (GFL, Германия), после чего снова охлаждали на льду в течение 2 минут. В клеточную суспензию добавляли 950 мкл среды SOC и инкубировали в термостатируемом шейкере при 37°C и 180 об/мин в течение 1 часа без антибиотика. Затем культуру высевали на твердую питательную среду с антибиотиком для селекции и инкубировали в суховоздушном термостате при 37°C в течение 16 часов до появления выраженных колоний.

2.6 Электропорация

Для трансформации методом электропорации электрокомпетентные клетки размораживают на льду в течение 15 минут. Устанавливают электропоратор (Bio-Rad, США) на режим EC-2 (V = 2500 В). В 50-55 мкл размороженной клеточной суспензии добавляют 100-300 нг плазмидной ДНК и перемешивают. Переносят суспензию в охлажденную кювету, удаляют влагу, помещают кювету в туннель прибора и проводят один импульс, проверяя значение константы 4.5-5.5. После импульса добавляют 950 мкл среды SOC и инкубируют на шейкере при 150 об/мин, 37°C, в течение 60 минут. Затем 50 мкл клеточной суспензии высеивают на твердую питательную среду с соответствующим антибиотиком и инкубируют при 37°C до появления колоний.

2.7 Полимеразная цепная реакция

Для проведения ПЦР реакции были использованы следующие компоненты. В 50 мкл реакции включены: 1,5 мкл 50 мМ $MgCl_2$, 1 мкл прямого праймера (концентрация 10 мкМ), 1 мкл обратного праймера (концентрация 10 мкМ), 5

мкл 10х буфера, 5 мкл смеси dNTP (концентрация 0,2 мМ), 35,5 мкл деионизированной воды и 1 мкл плазмиды в зависимости от требуемой концентрации. В качестве источника ДНК полимеразы использована *Taq* ДНК полимераза, добавленная в последнюю очередь в объеме 1 мкл, при этом она была предварительно охлаждена. Реакционная смесь была тщательно перемешана и перенесена в амплификатор. Установлены необходимые параметры амплификации. После завершения ПЦР, продукты реакции были проанализированы с помощью электрофореза на агарозном геле. ПЦР амплификация проводилась на термоциклерах SimpliAmp™ (Thermo Fisher Scientific, США) и термоциклере T100™ (Bio-Rad, США)**.**

2.8 Секвенирование

Определение нуклеотидной последовательности было выполнено методом секвенирования по Сэнгеру с использованием набора реагентов «BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit». В состав реакции входили: 5 мкл плазмидной ДНК, 2 мкл прямого праймера или 2 мкл обратного праймера (концентрация 3,2 мкМ), 1,5 мкл Terminator Ready Reaction Mix, 3,5 мкл Reaction Buffer 5x и 6 мкл безнуклеазной воды. Амплификация проводилась в соответствии со следующей программой: начальная денатурация при 96°C в течение 1 мин, затем 10 секунд при 96°C, 5 секунд при 55°C, и элонгация при 60°C в течение 4 минут в течение 25 циклов, окончательное хранение при 10°C. После амплификации реакционная смесь очищалась ацетатно-спиртовым осаждением. Полученные фрагменты разделялись на автоматическом секвенаторе ABI 3730xl (Applied Biosystems, США). Хроматограммы анализировались и сравнивались с референсной последовательностью с использованием программного пакета Vector NTI версии 11.

2.9 Приготовление агарозного геля

Для приготовления агарозного геля взвешивали 1 г агарозы и растворяли ее в 100 мл буферного раствора TAE (для получения 1% агарозного геля). Раствор готовили, прогревая его в микроволновой печи до полного растворения агарозы. После этого охлаждали раствор до температуры, безопасной для прикосновения внутренней части кисти. Затем в жидкий гель добавляли 1 мкл бромистого этидия (EtBr) или 3 мкл GelRed на 100 мл агарозного геля и тщательно перемешивали. Полученную смесь заливали в форму с формованными лунками и оставляли до полного охлаждения и затвердения геля.

2.10 Приготовление полиакриламидного геля

Для приготовления полиакриламидного геля растворили 87,6 г акриламида и 2,4 г N,N'-бис(метиленакриламида) в воде до общего объема 300 мл. Для приготовления 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, растворили 27,23 г Tris-базы в 80 мл деионизированной воды, корректировали pH до 8.8 с помощью 6 N HCl и доводили объем до 150 мл деионизированной водой. Хранили при 4°C. Использовали также готовые растворы Tris-HCl, если это необходимо. Для

приготовления 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, растворили 6 г Tris-базы в 60 мл деионизированной воды, корректировали pH до 6.8 с помощью 6 N HCl и доводили объем до 100 мл деионизированной водой. Хранили при 4°C. В качестве альтернативы применяли готовые растворы Tris-HCl. Для приготовления 10% (w/v) раствора APS, растворяли 100 мг аммонийного персульфата в 1 мл деионизированной воды и использовали свежеприготовленный. Приготовление 10% (w/v) раствора SDS осуществляли, растворяя 10 г SDS в 90 мл воды с осторожным перемешиванием и доводя объем до 100 мл деионизированной водой. Использовали также готовые растворы SDS, если это необходимо.

2.11 Выделение ДНК

Выделение плазмидной ДНК осуществляли с использованием наборов MiniPrep (Promega) и MidiPrep (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителей. В протокол были внесены следующие изменения: так как используемые векторы серии pET являются низкокопийными плазмидами, для выделения применяли 5 мл плотной культуры, выращенной в течение 15-18 часов. Культуру клеток с плазмидной ДНК доращивали до плотности OD600=1,2-1,5. Время инкубации колонок с элюирующим буфером увеличили с 1 минуты до 5 минут, и элюция ДНК проводилась в два этапа.

2.12 Экспрессия и очистка белка

Бактериальные клетки *E. coli ArcticExpress (DE3)* трансформировали плазмидными конструкциями pET-28c/*Moraxella bovis* Cas12a и pET-28c/*Moraxella equi* Cas12a методом электропорации, обеспечивающим проникновение ДНК через мембрану под действием электрического импульса. Трансформанты культивировали на среде LB с 50 мкг/мл канамицина при 37°C с интенсивным перемешиванием до OD600 = 0,6. Экспрессию индуцировали добавлением 0,5 мМ IPTG, активирующего промотор T7 lac, после чего клетки инкубировали при 20–25°C и 100 об/мин в течение 16 часов для получения растворимого белка. Клетки осаждали центрифугированием (+4°C, 6000 × g, 7 мин), ресуспендировали в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 150 мМ NaCl и коктейль ингибиторов протеаз (RocheDiagnostics). Лизис проводили с использованием лизоцима (3 мг/мл, 20 мин, 20–25°C) и ультразвуковой обработки (50 кГц, импульсный режим, на льду). Лизат центрифугировали (+4°C, 40000 × g, 1 ч) для выделения растворимой фракции.

Очистка белков проводилась в два этапа. На первом этапе применяли металл-хелатную хроматографию (IMAC) на никелесодержащей колонке HisTrap HP (GE Healthcare), которая связывает His-tag, встроенный в белки через pET-28c. Элюцию выполняли линейным градиентом имидазола (50–500 мМ) в буфере (20 мМ Tris-HCl, pH 8,0; 150 мМ NaCl), где имидазол конкурентно вытесняет His-tag-белки из Ni^{2+}-комплекса. Второй этап включал аффинную хроматографию на колонке HiTrap Heparin HP (GE Healthcare) с гепарином, обладающим ДНК-связывающими свойствами, аналогичными Cas12a. Элюцию

проводили градиентом NaCl (50–1000 мМ) в том же буфере на системе FPLC AKTA Purifier 10. Фракции с целевым белком идентифицировали по пикам поглощения при 280 нм и собирали.

Анализ белковых фракций, содержащих Cas12a, проводили методом электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле, что позволило определить молекулярную массу и степень чистоты целевого белка. Фракции, содержащие рекомбинантный белок, хранили при -20°C в присутствии 50% глицерина. Идентичность белка подтверждена методом обратной фазовой жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (LC-MS/MS).

2.13 Дизайн, *in vitro* транскрипция и очистка crРНК

Для дизайна crРНК использовались геномные данные из базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information), включающие следующие фрагменты генов: S-gene COVID-19, *phoA E. coli, uidA E. coli, nuc S. aureus,* а также фрагмент гена бета-тубулина *Alternaria spp*. Фрагменты ДНК в формате GenBank были выбраны в качестве исходной матрицы. Из хромосом патогенов были амплифицированы участки ДНК размером 20-100 нуклеотидов, которые рассматривались как потенциальные мишени для дизайна направляющих РНК. Эти участки послужили основой для создания crРНК, с учетом их размера и специфичности.

Для синтеза crРНК использовался набор «HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit» (New England Biolabs). Для подготовки ДНК-шаблона для *in vitro* транскрипции применялись синтетические ДНК-олигонуклеотиды различной длины, содержащие двуцепочечный регион промотора Т7 перед транскрипционной последовательностью. Использовалась минимальная последовательность промотора Т7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG. Короткий олигонуклеотид (10 мкМ) отжигали с комплементарным олигонуклеотидом (10 мкМ) при 75°C в течение 3 минут, затем охлаждали до комнатной температуры в течение 1 часа. Полученный дуплексный олигонуклеотид использовался как шаблон для *in vitro* транскрипции.

Очистка транскрибированной РНК была проведена с использованием набора «Monarch RNA Cleanup» (New England Biolabs) в соответствии с протоколом производителя, включая обработку ДНКазой I для удаления матричной ДНК. Количественное определение РНК проводилось с помощью спектрофотометра Nanodrop (Thermo Scientific) и разбавлялось водой, обработанной DEPC, до рабочих концентраций без нуклеаз. Элюированную РНК либо использовали немедленно, либо хранили при -80°C.

2.14 Сайт-направленный мутагенез

Сайт-направленный мутагенез (site-directed mutagenesis) – метод введения *in vitro* мутации в конкретный участок клонированной нуклеотидной последовательности ДНК. Для анализа эффективности и специфичности системы CRISPR-Cas12a в отношении различных PAM-участков, а также для идентификации активных центров Cas12a, ответственных за разрезание ДНК,

был применен метод сайт-направленного мутагенеза. Этот метод позволил синтезировать варианты целевой последовательности, содержащие модифицированные участки. Реакция QuickChange PCR проводилась в объеме 25 мкл. Компоненты реакционной смеси включали: 5x буфер (5 мкл), плазмида (40 нг/мкл, 0.5 мкл), смешанные праймеры (5 мкМ каждого, 2 мкл), dNTP микс (10 мМ, 1 мкл), вода (H_2O, 16 мкл), фермент Phusion Hot Start II (0.5 мкл). Программа амплификации включала инициализацию при 98°C в течение 30 секунд, денатурацию при 98°C в течение 10 секунд, отжиг при 55°C в течение 30 секунд, элонгацию при 72°C в течение 5 минут 30 секунд на протяжении 22 циклов, финальную элонгацию при 72°C в течение 10 минут и окончание реакции при 4°C на ночь. Проверка и обработка ПЦР-продуктов включала нанесение 3 мкл ПЦР смеси на агарозный гель для проверки сти амплификации, обработку 20 мкл ПЦР смеси 1 мкл фермента Dpn1 при 37°C в течение 1 часа (в термостате с воздушным нагревом), трансформацию 1 мкл обработанной смеси в компетентные клетки *DH5α* методом теплового шока, высевание на чашки с LB-агаром и антибиотиком, инкубацию при 37°C на ночь. На следующий день одиночную колонию инокулировали в 6 мл LB-бульона и инкубировали при 37°C на ночь. Затем проводили очистку плазмидной ДНК и секвенирование для подтверждения наличия мутаций.

2.15 Рекомбиназная полимеразная амплификация (РПА)

Рекомбиназную полимеразную амплификацию проводили с использованием набора TwistAmp Basic Kit от компании TwistDx, Великобритания. Для проведения реакции смешивали 2,4 мкл 10 мкМ растворов обоих праймеров, 29,5 мкл буфера для регидратации (без праймеров) и 13,2 мкл матричной ДНК с водой, доводя общий объем до 47,5 мкл. Затем лиофилизированный фермент РПА восстанавливали добавлением 2,5 мкл 280 мМ ацетата магния. Реакционную смесь инкубировали при 37-39°C в течение 20-30 минут для проведения амплификации.

2.16 Изотермическая петлевая амплификация (LAMP)

Для проведения изотермической амплификации с петлевой структурой (LAMP) реакционный объем составлял 25 мкл. Для амплификации использовались праймеры FIP и BIP в концентрации 1,6 мкМ, праймеры F3 и B3 в концентрации 0,2 мкМ, а также праймеры LF и LB в концентрации 0,8 мкМ. Комплекс дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTPs) имел концентрацию 1,4 мкМ. В состав реакционной смеси входил бетаин в концентрации 0,8 М и буфер для изотермической амплификации в пропорции 1×. Количество сульфата магния (MgSO4) достигало 6 мМ, и были добавлены 4 единицы фермента *Bst* ДНК-полимеразы (New England Biolabs). Концентрация и количество шаблонной ДНК варьировались в зависимости от целей эксперимента. Инкубация реакционной смеси проходила при температуре 62 °C в течение 45 минут, после чего реакцию прекращали нагреванием до 95 °C на 5 минут.

2.17 Флуоресцентный анализ на основе метода CRISPR/Cas12a

Для проведения флуоресцентного анализа CRISPR/Cas12a-LAMP, комплекс MbCas12a и crРНК готовили путем инкубации 1 мкМ MbCas12a (из лабораторного запаса) и 1 мкМ crРНК при 25°C в течение 15 минут. Реакцию транс-расщепления Cas12a выполняли в объеме 30 мкл, содержащем буфер NEB 2.1 (New England Biolabs), 100 нМ crРНК, 100 нМ MbCas12a, 5 мкМ репортерной молекулы и 3 мкл продуктов амплификации LAMP или РПА. Затем смесь инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Результаты реакции визуализировали с помощью трансиллюминатора Vilber Lourmat (Франция) при длине волны 320 нм, а изображения фиксировали с помощью камеры смартфона для последующего анализа.

2.18 Иммунохроматографический анализ на основе метода CRISPR/Cas12a

Иммунохроматографический анализ (ИХА) основанный на колориметрическом обнаружении с использованием золотых наночастиц, включает применение одноцепочечного ДНК-зонда, меченного флуоресцеином (FAM) и биотином на 5'- и 3'-концах соответственно. Зонд перемещается по тест полоске к контрольной линии, содержащей иммобилизованный стрептавидин, образуя видимую окрашенную линию в случае отрицательного результата (несвязанный репортер). При положительном результате окрашенная линия появляется на тестовой линии, что указывает на присутствие целевой последовательности в исходном образце. Для проведения реакции использовался фермент MbCas12a совместно с репортерной молекулой FAM-TTATTATT-Biotin для расщепления продуктов, полученных методом LAMP. Реакция проводилась в буфере NEB Buffer 2.1, в который добавляли фермент Cas12a в концентрации 500 нМ, а также 1 мкМ crРНК и 1 мкМ одноцепочечного ДНК-репортера. В смесь вводили 2 мкл продукта амплификации LAMP или РПА. Реакция осуществлялась при 37°C в течение 30 минут. После этого обработанные продукты наносили на тест-полоску на протяжении трех минут, а затем погружали в 100 мкл буфера HybriDetect от компании Milenia HybriDetect (Milenia Biotec, Гейзен, Германия) и смешивали в течение пяти минут при комнатной температуре для последующего анализа результатов.

2.19 Статистический анализ

Статистический анализ данных чувствительности, а также результатов денситометрического анализа электрофореграмм включал односторонний дисперсионный анализ (one-way ANOVA), выполненный с использованием языка программирования R (версия 4.3.1; https://www.r-project.org/) и программного обеспечения RStudio (https://posit.co/). Данные, не соответствующие данным допущениям, анализировались с использованием непараметрического аналога ANOVA — критерия Крускала–Уоллиса (Kruskal–Wallis).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Получение, очистка и характеристика рекомбинантных белков MbCas12a и MeCas12a

Ген cas12a из *Moraxella equi* был синтезирован компанией GenScript с оптимизацией кодонов (приложение Б). Ген cas12a из *Moraxella bovis* был получен с использованием праймеров MbovisCas12aNdeIFW и MbovisCas12aBamHIRV в лаборатории молекулярной биотехнологии ТОО «Национальный центр биотехнологии», где также были получены и сконструированы плазмиды pET-28c/Mbovis Cas12a и pET-28c/Mequi Cas12a (рисунок 8).

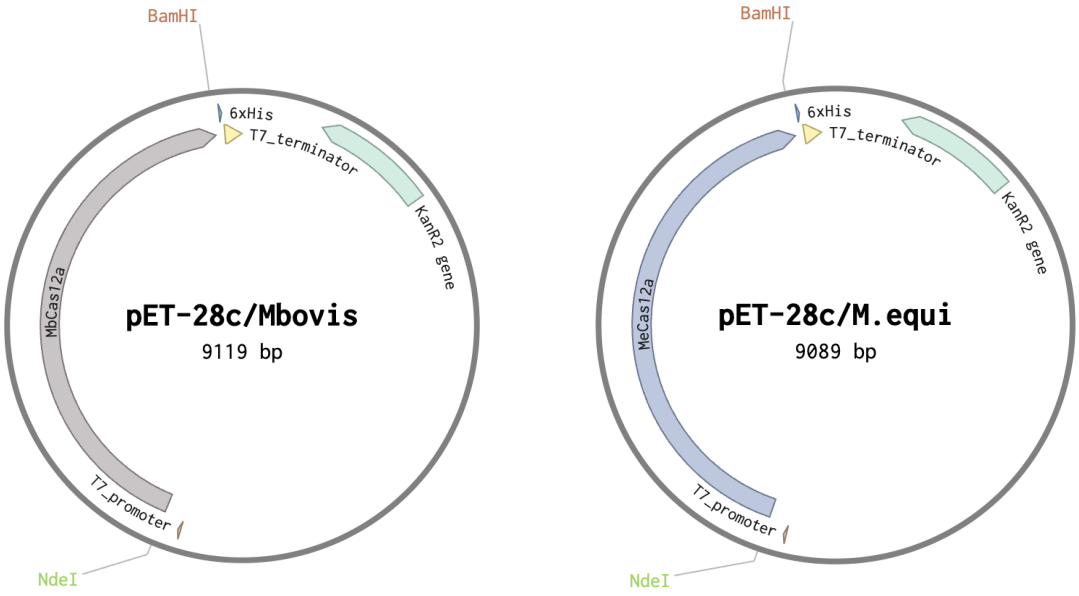


Рисунок 8 – Плазмидные карты векторов pET-28c/Mbovis Cas12a pET-28c/Mequi Cas12a

В синтезированной генетической конструкции pET-28c(+)/Cas12a белок Cas12a включает дополнительный домен из 20 аминокислот на N-конце, содержащий шестигистидиновую метку. Это добавление приводит к тому, что рекомбинантный белок MeCas12a состоит из 1250 аминокислотных остатков с расчетной молекулярной массой 144 кДа, а рекомбинантный белок MbCas12a — из 1271 аминокислотного остатка с общей молекулярной массой 147 кДа (приложение В).

Плазмиды pET-28c/Mbovis Cas12a и pET-28c/Mequi Cas12a были трансформированы в штаммы *E. coli* Arctic Express (DE3) с использованием метода электропорации. После трансформации бактериальная культура была выращена в объеме 600 мл. Рекомбинантный фермент Cas12a был очищен с использованием метода металлохелатной хроматографии с использованием ионов Ni^{2+} на колонке HisTrap HP объемом 1 мл. Осветленный лизат, полученный после выращивания культуры, был нанесен на колонку HisTrap HP для хроматографической очистки белка Cas12a, используя ионы Ni^{2+} (рисунок 9).

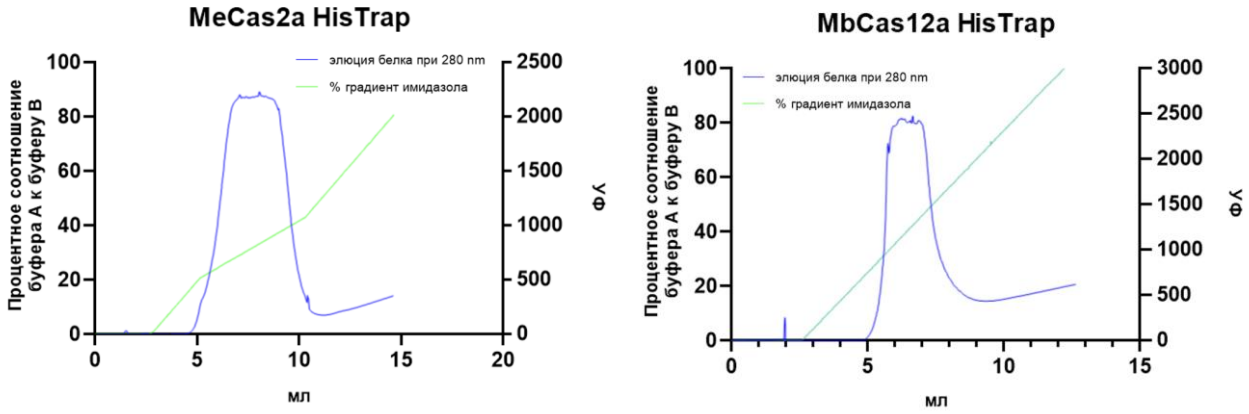
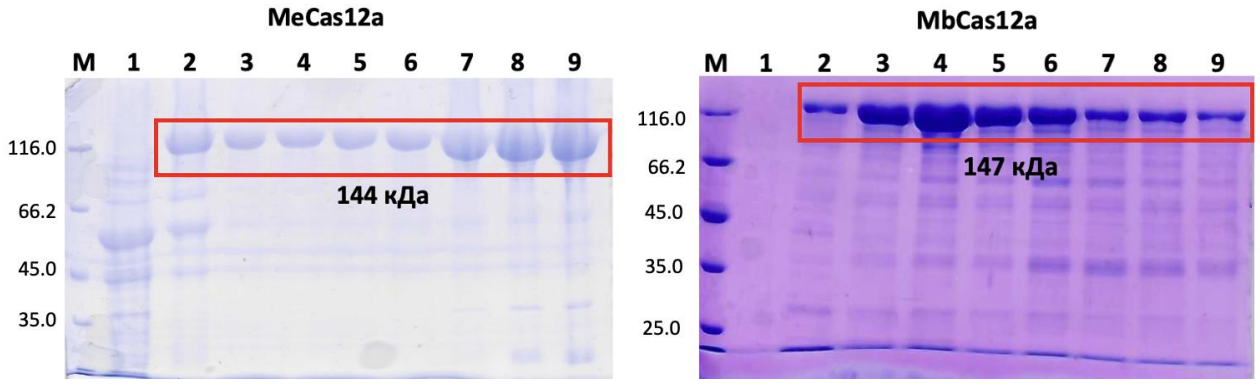


Рисунок 9 – Хроматограмма очистки MeCas12a и MbCas12a на HisTrap HP колонке

Эффективность очистки и качество рекомбинантных белков MeCas12a и MbCas12a были исследованы с применением метода электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с использованием додецилсульфата натрия (SDS-PAGE), который является широко признанным стандартом для оценки чистоты и молекулярной массы белков. Метод SDS-PAGE основан на разделении белковых молекул в электрическом поле в зависимости от их молекулярной массы, где додецилсульфат натрия обеспечивает унификацию заряда молекул, а полиакриламидный гель создаёт молекулярное сито для разделения. Анализ выявил чёткие бэнды, соответствующие молекулярным массам MeCas12a (144 кДа) и MbCas12a (147 кДа), что подтверждает успешность очистки рекомбинантных белков (рисунок 10).



M – название маркера; 116.0, 66.2, 45.0, 35.0 – длина маркера, 1-9 фракции белков, собранные в объёме по 0,5 мл в процессе хроматографической очистки

Рисунок 10 – Электрофореограмма фракций (1-9), полученных в ходе хроматографической очистки рекомбинантной эндонуклеазы MeCas12a (144 кДа) и MbCas12a (147 кДа) на HisTrap HP колонке

Анализ результатов очистки показал, что целевые белки Cas12a, несмотря на использование металлохелатной хроматографии на колонке HisTrap HP, содержат примеси других белков, что указывает на недостаточную степень очистки. Для решения этой проблемы был проведён дополнительный этап хроматографической очистки с использованием гепариновой колонки. Данный метод был выбран на основании того, что белки Cas12a являются ДНК-связывающими ферментами, а гепарин, иммобилизованный на колонке, обладает свойствами, имитирующими ДНК, что позволяет эффективно выделять целевые белки за счёт их специфического связывания с гепарином. Для рекомбинантного белка MeCas12a были объединены фракции 1-9, полученные после первой стадии очистки, для MbCas12a также объединяли фракции 1-9. Полученные объединённые образцы были загружены на колонку, заполненную гепарином, и подвергнуты дополнительной хроматографической очистке. Элюирование белков с колонки осуществлялось с использованием градиента солей, что позволило избирательно высвободить связавшиеся белки, включая целевые Cas12a (рисунок 11).

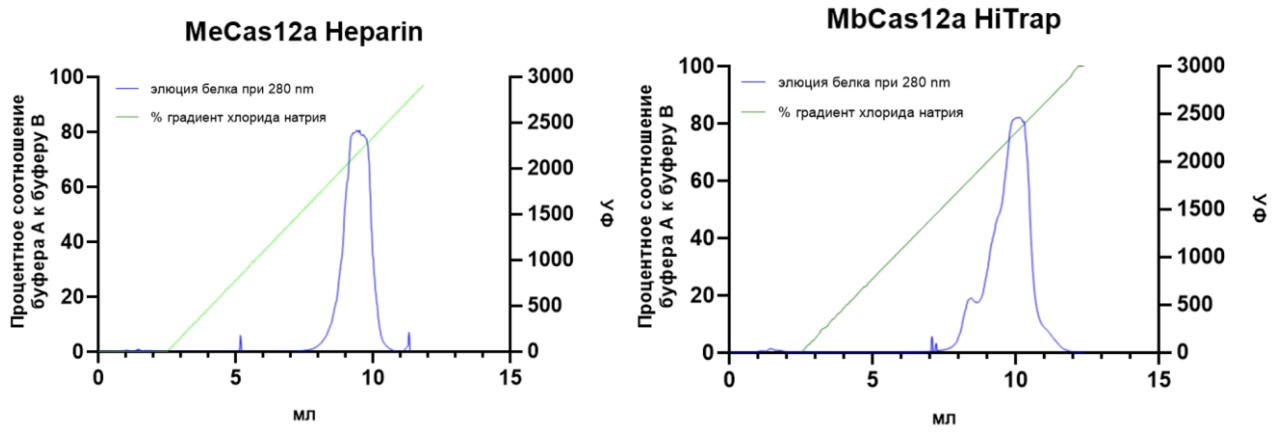
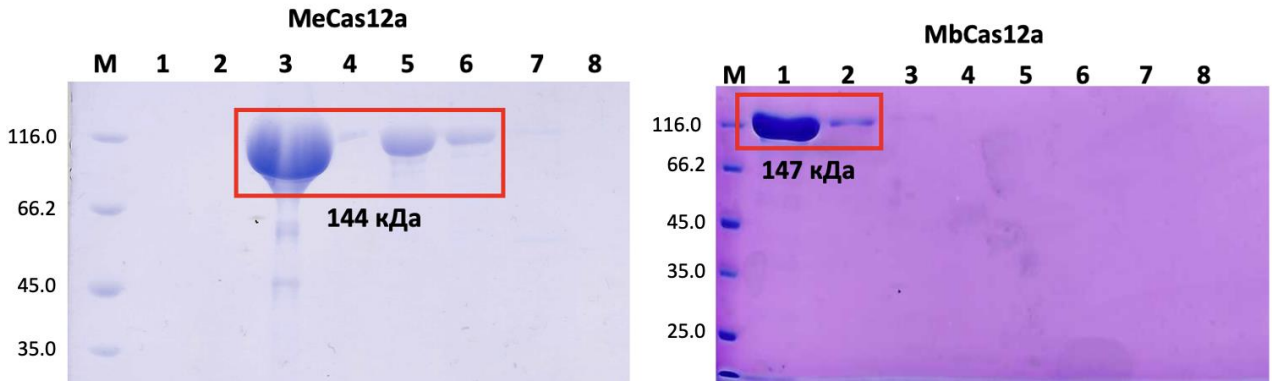


Рисунок 11 – Хроматограмма очистки MeCas12a и MbCas12a на гепариновой колонке (HiTrap Heparin HP)

Эффективность дополнительной очистки была проанализирована методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS PAGE). В очищенных фракциях наблюдались чёткие бэнды, соответствующие ожидаемым молекулярным массам MeCas12a (144 кДа) и MbCas12a (147 кДа), с минимальными примесями.

Анализ подтвердил, что использование гепариновой колонки является эффективным дополнительным этапом очистки для получения высокочищенных белков Cas12a, пригодных для дальнейших функциональных и структурных исследований. Применение гепариновой хроматографии в качестве дополнительного этапа очистки позволило значительно повысить гомогенность белковых препаратов, что является критически важным для их дальнейшего использования в функциональных и структурных исследованиях (рисунок 12).



M – название маркера; 116.0, 66.2, 45.0, 35.0 – длина маркера, 1-9 фракции белков, собранные в объёме по 0,5 мл в процессе хроматографической очистки

Рисунок 12 – Электрофореограмма фракций, полученных в ходе хроматографической очистки рекомбинантной эндонуклеазы MeCas12a и MbCas12a на гепариновой колонке (HiTrap Heparin HP)

В результате хроматографической очистки из 600 мл индуцированной культуры удалось выделить по 5 мг каждого из рекомбинантных белков Cas12a. Очищенные белки Cas12a демонстрировали высокую степень чистоты, составляющую около 99%, что подтверждено данными хроматографического разделения и визуальной оценкой результатов электрофореза в ПААГ. На геле наблюдалась одна доминирующая полоса соответствующего молекулярного веса, без видимых примесей [154].

Было проведено аминокислотное выравнивание полученных рекомбинатных белков, где выявлена идентичность в 92.4%.

3.2 Дизайн и синтез направляющей РНК (crРНК). Оценка активности рибонуклеинового комплекса

Для получения crРНК был проведен поиск CRISPR-локуса с использованием доступной в базе данных NCBI геномной последовательности (GenBank: CP030241.1).

В обнаруженном CRISPR-локусе присутствует несколько десятков прямых повторов и спейсерных последовательностей.

На рисунке 13 представлена схематическая структура CRISPR-массива бактерии *Moraxella bovis*. Данная схема демонстрирует организацию чередующихся повторов (DR – direct repeats) и спейсеров. Визуально повторы обозначены синими вертикальными линиями в нижней части схемы, между которыми расположены уникальные спейсерные последовательности, направленные вверх и пронумерованные от DR1 до DR34. На рисунке 14 представлена нуклеотидная последовательность CRISPR-массива, характерного для бактерий, содержащего чередующиеся повторяющиеся элементы (Direct Repeats) и спейсеры (Spacers). Повторы обозначены стрелками оранжевого цвета с подписью Direct Repeat, а уникальные спейсерные вставки — разноцветными сегментами с надписью Spacer.

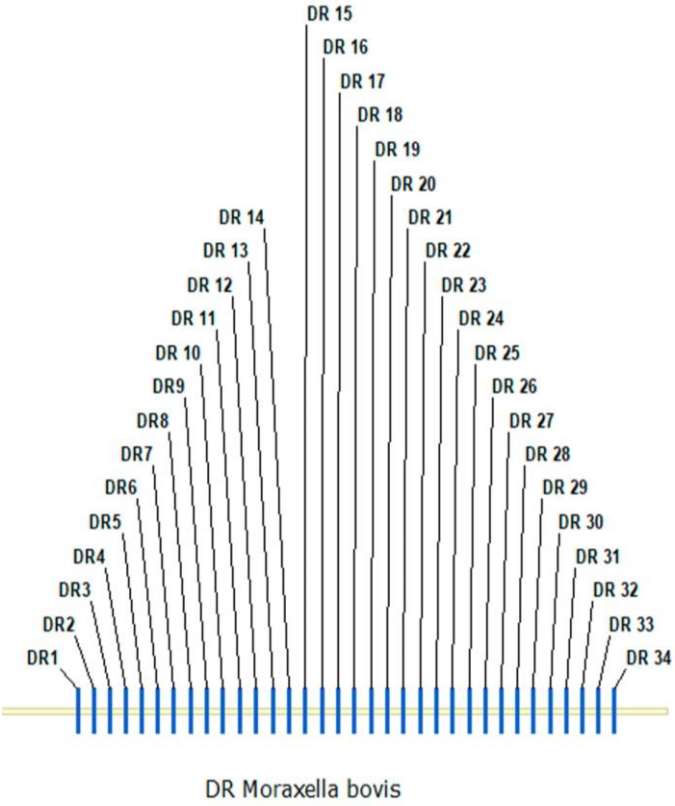
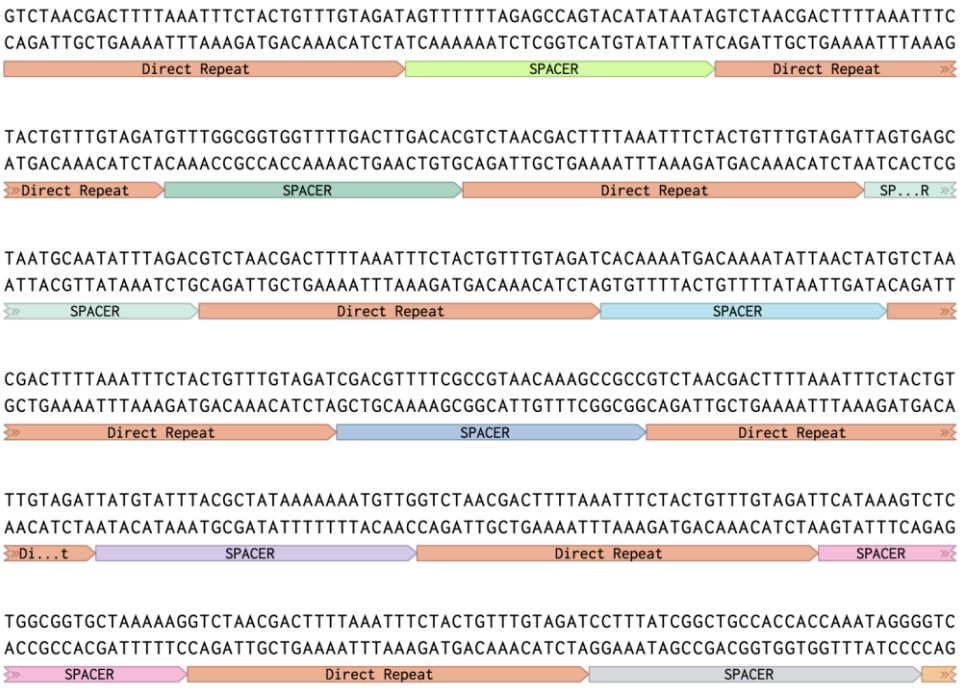


Рисунок 13 – CRISPR-локус, включающий в себя область прямых повторов (DR – direct repeat)



Прямые повторы (Direct Repeat, оранжевый цвет) и спейсеры (Spacer, различные цвета).

Рисунок 14 – Структура CRISPR-локуса штамма *Moraxella bovis*.

С учётом возможной вариабельности структуры crRNA, был проведён поиск консервативной нуклеотидной последовательности, расположенной между левым и правым стеблями прямого повтора (рисунок 15).

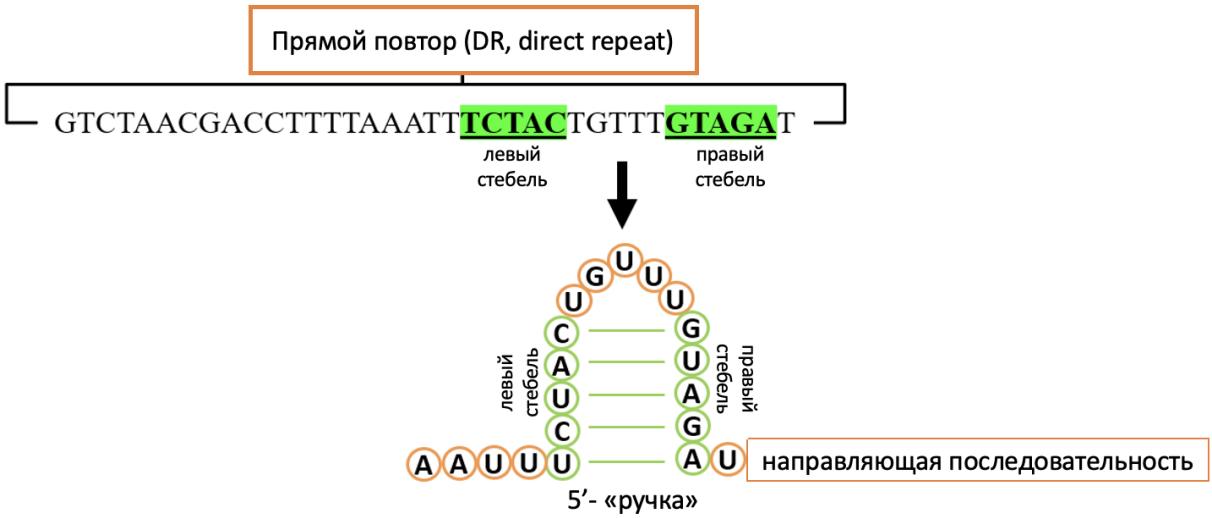


Рисунок 15 – Нуклеотидная последовательность прямого повтора со схематическим изображением «ручки» crРНК

В данном исследовании для разработки мишени были использованы геномные последовательности SARS-CoV-2 из базы данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI). С помощью избирательного анализа хромосомных последовательностей из GenBank были идентифицированы специфические участки ДНК, которые использовались в качестве матриц для синтеза crРНК. Выбор этих участков был обусловлен наличием необходимых нуклеотидных последовательностей и структурными особенностями, примыкающими к протоспейсерной прилегающей мотивной последовательности (PAM).

crRNA были синтезированы с использованием набора инструментов «HiScribe™ T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit» от компании New England Biolabs. Для этого применялись синтетические ДНК-олигонуклеотиды, которые обеспечивали формирование двухцепочечного Т7-промоторного участка, необходимого для инициирования *in vitro* транскрипции. Транскрипция активировалась минимальной промоторной последовательностью Т7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG), что способствовало высокой эффективности синтеза crРНК.

После синтеза crРНК их очистка проводилась с использованием набора «Monarch® RNA Cleanup» от New England Biolabs, включая удаление матричной ДНК с помощью ДНКазы I. Количественная оценка и анализ качества РНК выполнялись с помощью прибора Nanodrop (Thermo Scientific). РНК растворялась и разбавлялась в DEPC-обработанной воде для предотвращения нуклеазного распада. Полученная crРНК для мишени возбудителя

коронавирусной инфекции имела последовательность: 5’AAUUUCUACUGUUUGUAGAUAAAAUAUAUUCUAAGCACACGCC. Схематическое и структурное изображения crРНК в гетеродуплексе с ДНК возбудителя коронавирусной инфекции представлена на рисунках 16 и 17.

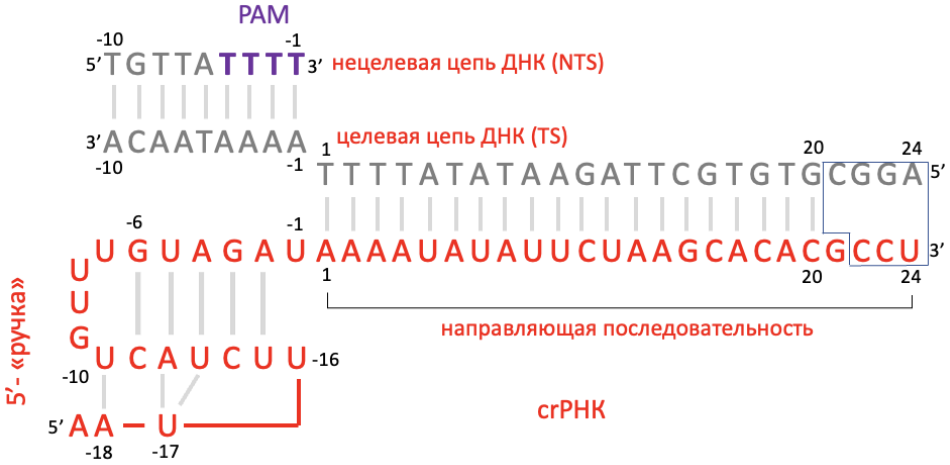


Рисунок 16 – Схематическое изображение crRNA из CRISPR-Cas системы *Moraxella bovis* и целевой ДНК коронавируса. Направляющая последовательность выделена красным цветом.

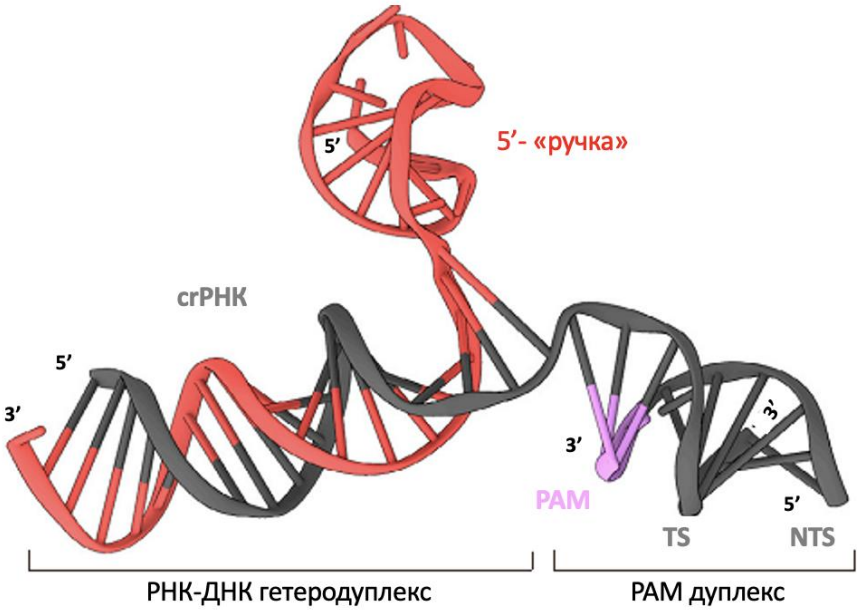


Рисунок 17 – Структура crRNA и целевой последовательности ДНК

Одним из ключевых этапов исследования было тестирование эффективности синтезированных crРНК в сочетании с MbCas12a и MeCas12a. Для этого был осуществлен синтез crРНК с использованием соответствующих праймеров для определения оптимальной длины crРНК и укорочения «ручки». Полученные рибонуклеопротеиновые комплексы Cas12a-crРНК были проверены на специфическую активность расщепления ДНК в условиях *in vitro*. Комплексы

Cas12a и crРНК готовились в концентрации 1 мкМ каждого, после чего инкубировались при 25°C в течение 15 минут для формирования активных комплексов. Эта инкубация являлась необходимым шагом для обеспечения адекватного взаимодействия между crРНК и Cas12a, что важно для точности воздействия на целевые участки ДНК. Анализ расщепления ДНК проводился с помощью агарозного гель-электрофореза. Наблюдаемые полосы в геле, соответствующие ожидаемым размерам фрагментов ДНК, указывают на расщепление целевых участков ДНК комплексом Cas12a-crРНК, что подтверждает высокую специфичность и эффективность данного комплекса.

3.2.1 Определение оптимальной длины таргетной области crРНК

Были проведены эксперименты для определения оптимальной длины направляющей РНК (crРНК) при взаимодействии с MeCas12a и MbCas12a. Для установления наилучшей длины crРНК, обеспечивающей эффективное связывание с таргетной ДНК амплифицированного продукта, исследовались различные длины crРНК с последующей оценкой их цис-активности по отношению к ПЦР-продукту. Дизайн и синтез crРНК осуществлялись таким образом, чтобы длина crРНК постепенно уменьшалась на каждые 2 нуклеотида как показано на рисунке 18.

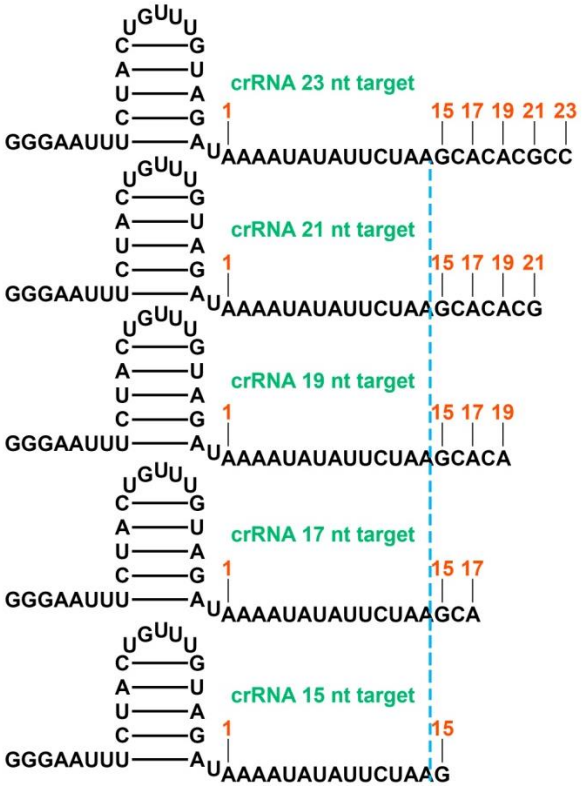


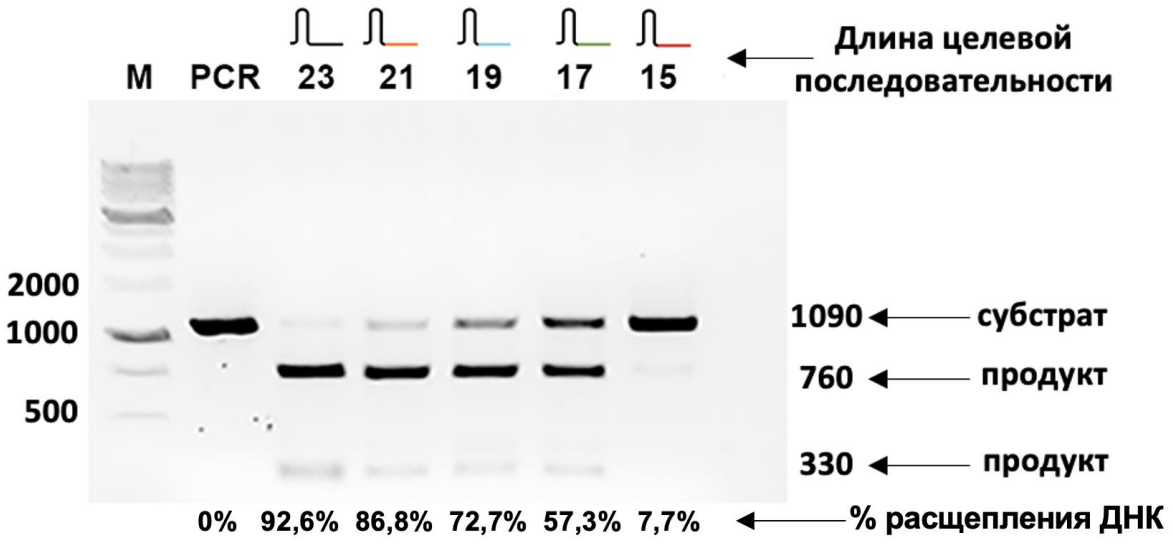
Рисунок 18 – Схематическое изображение crРНК различной длины со стороны мишени (23, 21, 19,17,15)

Далее были получены синтезированные crРНК согласно дизайну указанные в таблице 2.

Таблица 2 – Нуклеотидная последовательность crРНК различной длины со стороны мишени

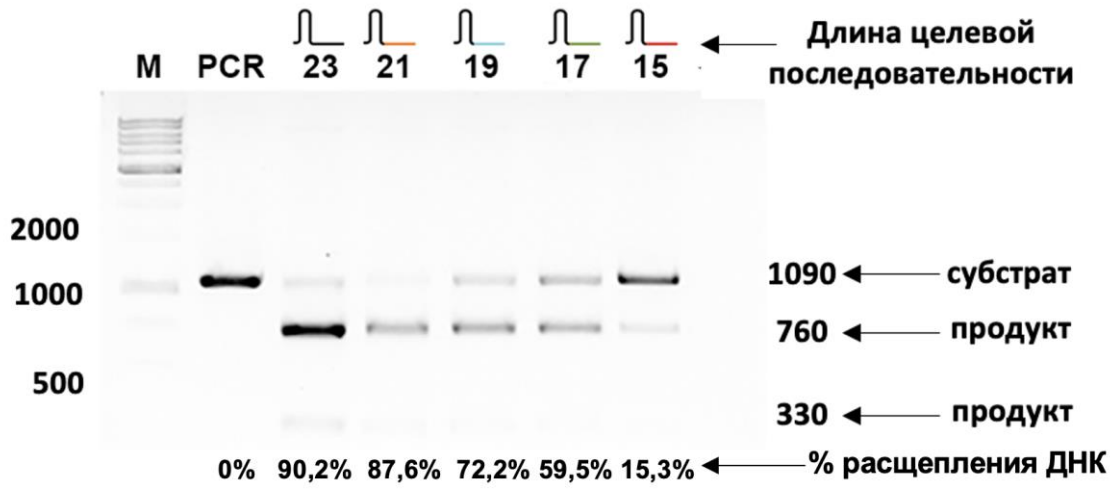
№	Название	Последовательность
1	crRNA - 23bp target	GGGAAUUUCUACUGUUUGUAGAU**AAAAUAUAUU CUAAGCACACGCC**
2	crRNA - 21bp target	GGGAAUUUCUACUGUUUGUAGAU**AAAAUAUAUU CUAAGCACACG**
3	crRNA - 19bp target	GGGAAUUUCUACUGUUUGUAGAU**AAAAUAUAUU CUAAGCACA**
4	crRNA - 17bp target	GGGAAUUUCUACUGUUUGUAGAU**AAAAUAUAUU CUAAGCA**
5	crRNA - 15bp target	GGGAAUUUCUACUGUUUGUAGAU**AAAAUAUAUU CUAAG**

В результате проведенных экспериментов по определению оптимальной длины crРНК со стороны таргетной области было установлено, что максимальная эндонуклеазная активность комплекса Cas12a-crRNA осуществляется при длине таргета равной 23 нуклеотида. Сокращение длины таргета в 2 нуклеотида и использование таргетов с длиной 21, 19, 17 нуклеотида демонстрировали снижение эндонуклеазной активности и к неполному разрезанию цепей. На рисунке 19 и 20 соответсвенно видно, что при сокращении crРНК со стороны таргетной области до 15 нуклеотидов эндонуклеазная активность практически полностью терялась.



M – название маркера; 2000, 1000, 500 – длина маркера; PCR – очищенный ПЦР-продукт; 23, 21, 19, 17, 15 – длина целевой последовательности

Рисунок 19 – Репрезентация результатов эксперимента по определению оптимальной длины таргета при дизайне crРНК в комплексе с MbCas12a



M – название маркера; 2000, 1000, 500 – длина маркера; PCR – очищенный ПЦР-продукт; 23, 21, 19, 17, 15 – длина целевой последовательности

Рисунок 20 – Репрезентация результатов эксперимента по определению оптимальной длины таргета при дизайне crРНК в комплексе с MeCas12a

Оптимальная длина таргетной последовательности crРНК для обеспечения максимальной эндонуклеазной активности комплекса Cas12a составляет 23 нуклеотида. При уменьшении длины таргетной области направляющей РНК от 23 до 15 нуклеотидов зафиксировано статистически значимое снижение эндонуклеазной активности Cas12a ($p < 0,05$, ANOVA для MeCas12a, Крускала–Уоллиса для MbCas12a). Денситометрический анализ показал, что при 15 нуклеотидов активность сохранялась на уровне 3–8%, что соответствует практически полной, но не абсолютной утрате функциональной активности фермента.

Это указывает на критическую зависимость эффективности Cas12a от длины таргетной crРНК и подчёркивает важность точного подбора параметров при разработке диагностических или геномных приложений, основанных на системе CRISPR/Cas12a.

3.2.2 Определение активности рибонуклеинового комплекса при укорочении «ручки» crРНК

В ходе экспериментов было проведено исследование влияния укорочения 5'-концевой «ручки» crРНК на её функциональную активность. Полноразмерная crРНК использовалась в качестве контрольного образца для сравнения. В каждом следующем варианте эксперимента длина crРНК последовательно уменьшалась на два нуклеотида, чтобы определить минимальную длину, при которой сохраняется активность комплекса Cas12a-crRNA. В результате были разработаны и проверены crРНК с последовательными укорочениями на 17, 15, 13, 11, 9, 7, 5 и 2 нуклеотида от 5'-конца (рисунок 21). Далее были получены синтезированные crРНК согласно дизайну указанные в таблице 3.

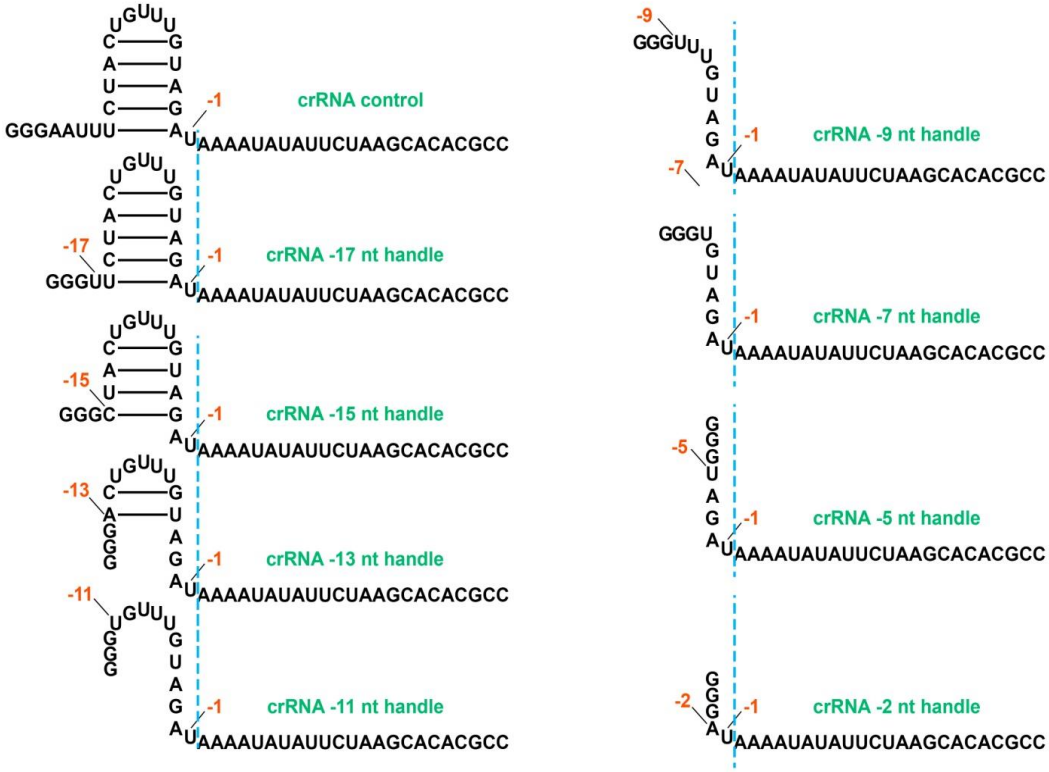


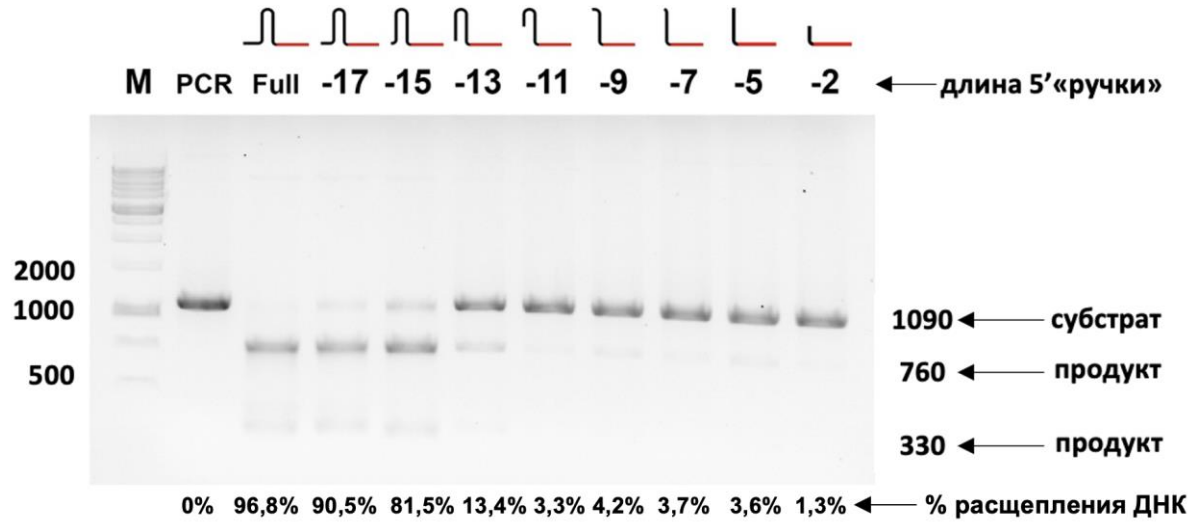
Рисунок 21 – Дизайн crРНК с различными вариантами укорочения со стороны 5' – конца

Таблица 3 – Нуклеотидная последовательность crРНК различной длины со стороны 5' – конца (укорочение «ручки»)

№	Название	Последовательность
1	crRNA – 23 bp target	GGGAAUUUCUACUGUUUGUAGAU**AAAAUAUAUUCUAAGCACACGCC**
2	crRNA – 17 bp handle	GGGUUCUACUGUUUGUAGAU**AAAAUAUAUUCUAAGCACACGCC**
3	crRNA – 15 bp handle	GGGCUACUGUUUGUAGAU**AAAAUAUAUUCUAAGCACACGCC**
4	crRNA – 13 bp handle	GGGACUGUUUGUAGAU**AAAAUAUAUUCUAAGCACACGCC**
5	crRNA – 11 bp handle	GGGUGUUUGUAGAU**AAAAUAUAUUCUAAGCACACGCC**
6	crRNA – 9 bp handle	GGGUUUGUAGAU**AAAAUAUAUUCUAAGCACACGCC**
7	crRNA – 7 bp handle	GGGUGUAGAU**AAAAUAUAUUCUAAGCACACGCC**
8	crRNA – 5 bp handle	GGGUAGAU**AAAAUAUAUUCUAAGCACACGCC**
9	crRNA – 2 bp handle	GGGGAU**AAAAUAUAUUCUAAGCACACGCC**

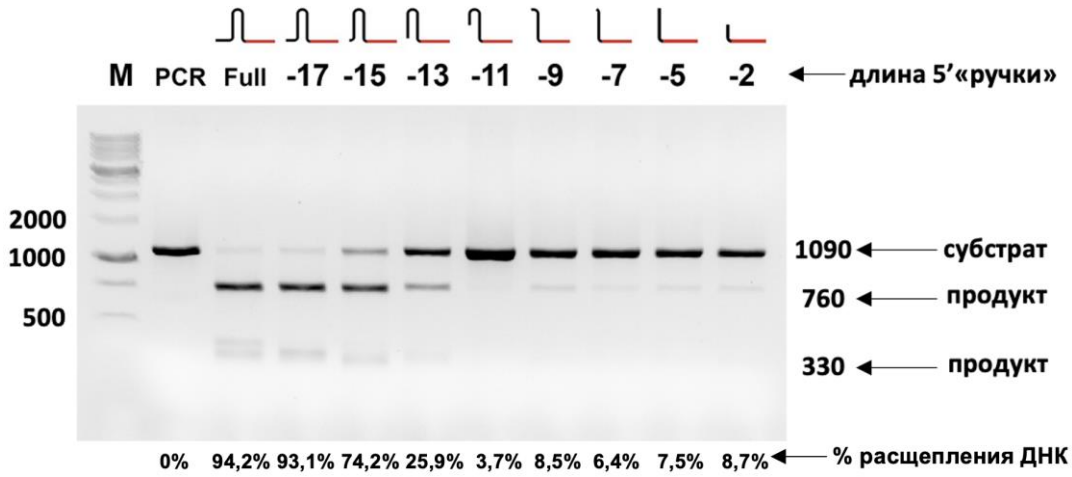
Анализ данных, полученных в ходе экспериментов, позволил количественно оценить влияние укорочения «ручки» crRNA на эффективность формирования функционального комплекса с Cas12a, а также на его способность к специфическому распознаванию и эндонуклеазному расщеплению целевой ДНК.

В ходе экспериментов по изучению влияния укорочения «ручки» crRNA на функциональные свойства CRISPR-Cas систем *Moraxella bovis* и *Moraxella equi,* было установлено, что crRNA с укорочениями на 17, 15 и 13 нуклеотидов сохраняет способность к специфическому распознаванию и эндонуклеазному расщеплению целевой ДНК, хотя и с пониженной эффективностью по сравнению с полноразмерной crRNA. Исследование проводилось с использованием различных вариантов укороченной crRNA, где длина «ручки» последовательно уменьшалась, чтобы определить минимально допустимый размер, обеспечивающий активность комплекса. В то же время crRNA, укороченная на 11 нуклеотидов и менее, то есть на 9, 7, 5 и 2 нуклеотида, не проявляла активности по расщеплению субстрата, как показано на рисунках 22 и 23. Эти результаты свидетельствуют о том, что укорочение «ручки» crRNA ниже порога в 13 нуклеотидов приводит к значительному снижению или полной утрате способности crRNA эффективно взаимодействовать с Cas12a, необходимой для связывания с Cas-белком и последующего распознавания целевой ДНК.



M – название маркера; 2000, 1000, 500 – длина маркера; PCR – очищенный ПЦР-продукт; Full – контроль с полноразмерной crРНК; -17, -15, -13, -11, -9, -7, -5, -2 – длина 5' «ручки»

Рисунок 22 – Репрезентация результатов эндонуклеазной активности MbCas12a в зависимости от укорочения «ручки» (handle splitting) crРНК



M – название маркера; 2000, 1000, 500 – длина маркера; PCR – очищенный ПЦР-продукт; Full – контроль с полноразмерной crРНК; -17, -15, -13, -11, -9, -7, -5, -2 – длина 5' «ручки»

Рисунок 23 – Репрезентация результатов эндонуклеазной активности crРНК в комплексе с MeCas12a в зависимости от укорочения «ручки» (handle splitting) crРНК

Уменьшение длины 5′-ручки crРНК ниже 15 нуклеотидов сопровождалось достоверным снижением активности (ANOVA, $p < 0,05$). Особенно резкое падение активности наблюдалось при длине 13 нуклеотидов и менее, что указывает на важность этой области для эффективного формирования комплекса Cas12a–crРНК–ДНК.

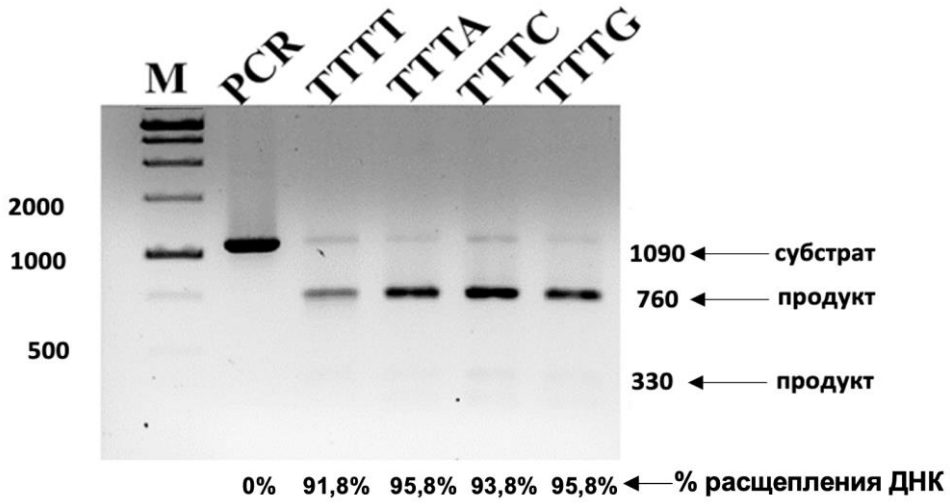
3.3 Подбор оптимальной последовательности протоспейсер-смежных мотивов (PAM) для CRISPR/Cas12a систем

Был проведён подбор протоспейсерных смежных мотивов (PAM) для системы CRISPR-Cas12a. Учитывая специфические требования ферментов MbCas12a и MeCas12a к PAM-последовательностям типа 'TTTN' (где 'N' обозначает любой нуклеотид, кроме T), был проведён скрининг потенциальных PAM-участков вблизи выбранного генетического локуса. Исходная целевая последовательность гена с PAM-участком TTTT имела длину 1090 пар оснований.

Для оценки эффективности и специфичности системы CRISPR-Cas12a по отношению к различным PAM-участкам был использован метод сайт-направленного мутагенеза. В результате были синтезированы варианты целевой последовательности, включающие модифицированные PAM-участки: TTTA, TTTC и TTTG, наряду с исходным TTTT.

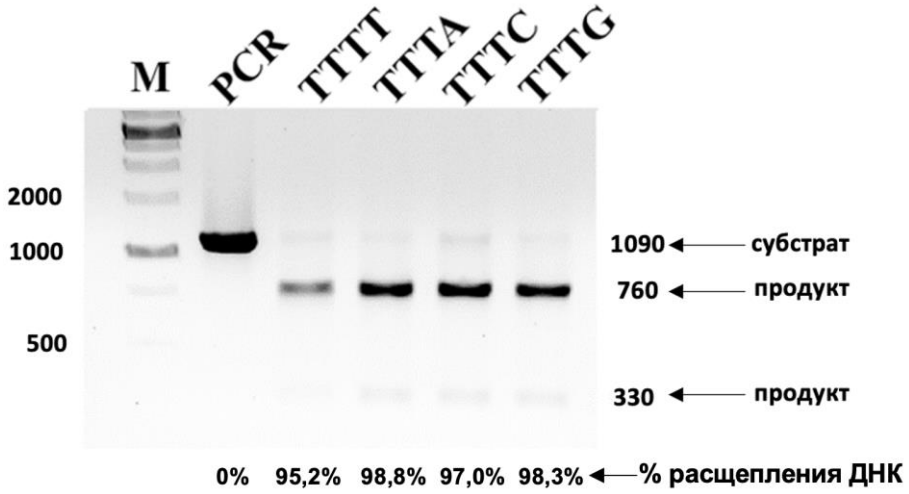
После проведения сайт-направленного мутагенеза и получения соответствующих ПЦР-продуктов, содержащих все четыре варианта PAM-участков, были проведены эксперименты по анализу цис-активности, что показано на рисунках 24 и 25. В ходе этих экспериментов изучалось специфическое расщепление модифицированных последовательностей, после

чего продукты реакции анализировались с помощью гель-электрофореза в агарозе.



M – название маркера; 2000, 1000, 500 – длина маркера; PCR – очищенный ПЦР-продукт; TTTT, TTTA, TTTC, TTTG – последовательность PAM-участка

Рисунок 24 – Репрезентация результатов эндонуклеазной активности MbCas12a в зависимости от PAM-последовательности



M – название маркера; 2000, 1000, 500 – длина маркера; PCR – очищенный ПЦР-продукт; TTTT, TTTA, TTTC, TTTG – последовательность PAM-участка

Рисунок 25 – Репрезентация результатов эндонуклеазной активности MeCas12a в зависимости от PAM-последовательности

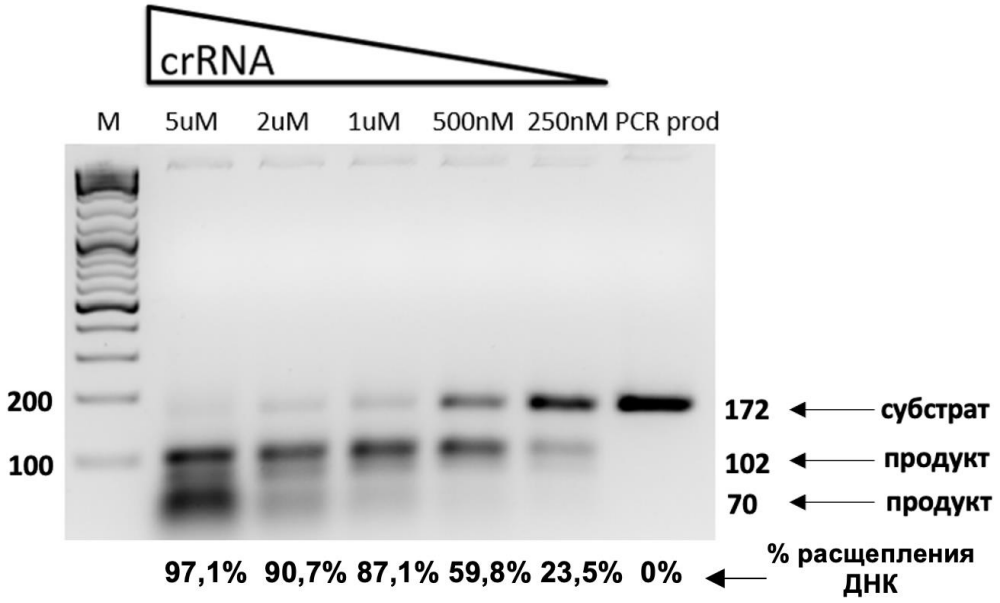
Результаты электрофоретического анализа с последующей денситометрической обработкой показали, что все четыре типа PAM-участков (TTTT, TTTA, TTTC, TTTG) обеспечивали сходную эффективность расщепления ДНК. Между вариантами PAM-последовательностей

статистически значимые различия не выявлены (p = 0,0760; метод: однофакторный дисперсионный анализ, ANOVA), что может свидетельствовать об их сопоставимом влиянии на активность MeCas12a. Статистически значимых различий между вариантами PAM не установлено (p = 0,0744; метод: непараметрический критерий Крускала–Уоллиса), что указывает на отсутствие выраженного предпочтения конкретной PAM-последовательности для MbCas12a в данных условиях. Это указывает на высокую адаптивность системы CRISPR-Cas12a в отношении различных PAM-конфигураций. Полученные данные подтверждают, что последовательность TTTN является оптимальной для эндонуклеазной активности ферментов MbCas12a и MeCas12a.

3.4 Оптимизация условий биохимической реакции CRISPR/Cas12a

Для определения оптимальных условий биохимической реакции, обеспечивающих максимальную эндонуклеазную активность комплекса CRISPR/MbCas12a, был проведен ряд экспериментов. В качестве субстрата использовали ген *uidA* из *E. coli* длиной 172 пар оснований. Оптимизация условий включала подбор температуры, времени реакции, состава реакционного буфера, а также концентраций основных компонентов реакции: crРНК и Cas12a.

Был проведен эксперимент для установления оптимальной концентрации эндонуклеазы crРНК (рисунок 26).



M – название маркера; 2000, 1000, 500 – длина маркера; PCR prod – очищенный ПЦР-продукт; 5мкМ - 250нМ – концентрпция crРНК

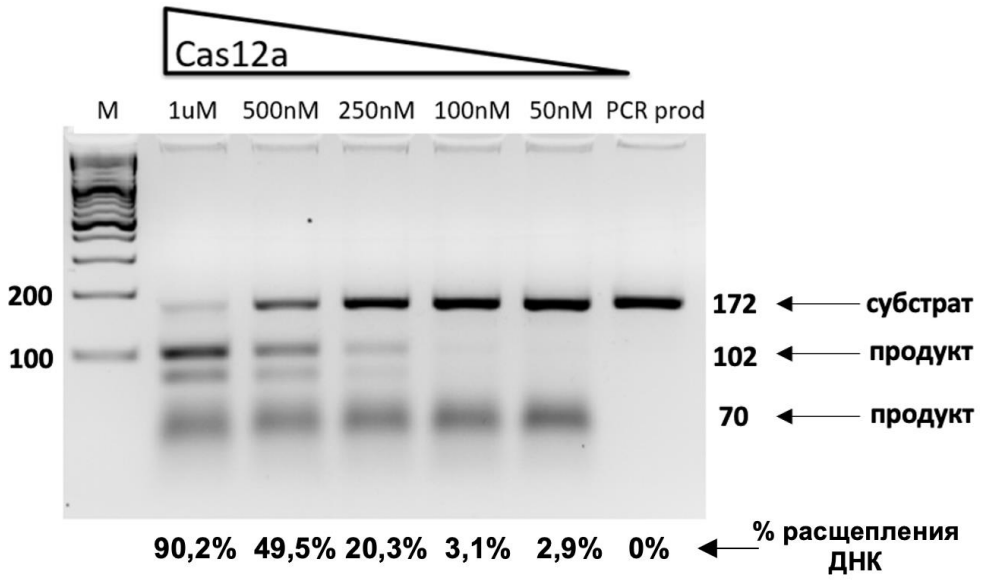
Рисунок 26 – Эффективность расщепления целевой ДНК CRISPR/MbCas12a при различных концентрациях crРНК, от 200 нМ до 5000 нМ

На первом этапе экспериментов была изучена зависимость активности комплекса CRISPR/MbCas12a от концентрации crРНК. Для этого были

протестированы различные концентрации crРНК: 5 мкМ, 2 мкМ, 1 мкМ, 500 нМ и 250 нМ. Реакционная смесь объемом 20 мкл включала фермент Cas12a в концентрации 1 мкМ, crРНК в исследуемой концентрации, буфер Neb2.1 (1×), очищенный ПЦР-продукт гена *uidA* (100 нг/мкл), а также безнуклеазную деионизованную воду, которой доводили смесь до необходимого объема. Преинкубация компонентов системы (MbCas12a, crРНК и буфер Neb2.1) проводилась при комнатной температуре в течение 15 минут для формирования активного комплекса MbCas12a–crRNA. После добавления ПЦР-продукта смесь инкубировали при 37 °C в течение 30 минут. Для остановки реакции добавляли 2 мкл раствора протеиназы К и проводили дополнительную инкубацию при 37°C в течение 10 минут.

Результаты экспериментов показали, что наибольшая эндонуклеазная активность комплекса CRISPR/MbCas12a достигается при концентрации crРНК, равной 2 мкМ. При этой концентрации наблюдался максимальный уровень разрезания ДНК-мишени, что подтверждает эффективность выбранных условий. Концентрации crРНК выше 2 мкМ не обеспечивали значительного увеличения активности, тогда как при более низких концентрациях активность снижалась, что указывает на важность точного подбора соотношения между crРНК и ферментом Cas12a.

Далее в рамках оптимизации условий работы комплекса CRISPR/MbCas12a были проведены эксперименты, направленные на установление оптимальной концентрации фермента Cas12a, дополняющие ранее проведённую оптимизацию концентрации crРНК (рисунок 27).



M – название маркера; 2000, 1000, 500 – длина маркера; PCR prod – очищенный ПЦР-продукт; 1мкМ - 50нМ – концентрпция MbCas12a

Рисунок 27 – Оптимизация концентрации фермента MbCas12a в диапазоне от 1000нМ до 50 нМ и её влияние на эффективность расщепления целевой ДНК

Исследование имело целью определить концентрацию Cas12a, обеспечивающую максимальную эндонуклеазную активность системы. В реакционной смеси объемом 20 мкл использовали crРНК в концентрации 2 мкМ, фермент Cas12a в одной из исследуемых концентраций (1000 nM, 500 nM, 250 nM, 100 нМ или 50 nM), буфер Neb2.1 (1×), очищенный ПЦР-продукт гена *uidA* (100 ng/мкл), а также безнуклеазную деионизованную воду для доведения смеси до полного объема. Для формирования комплекса Cas12a–crRNA проводилась преинкубация фермента, crРНК и буфера Neb2.1 при комнатной температуре в течение 15 минут. После добавления ПЦР-продукта смесь инкубировали при 37 °C в течение 30 минут. Завершение реакции обеспечивалось добавлением 2 мкл раствора протеиназы К с последующей инкубацией при 37 °C в течение 10 минут.

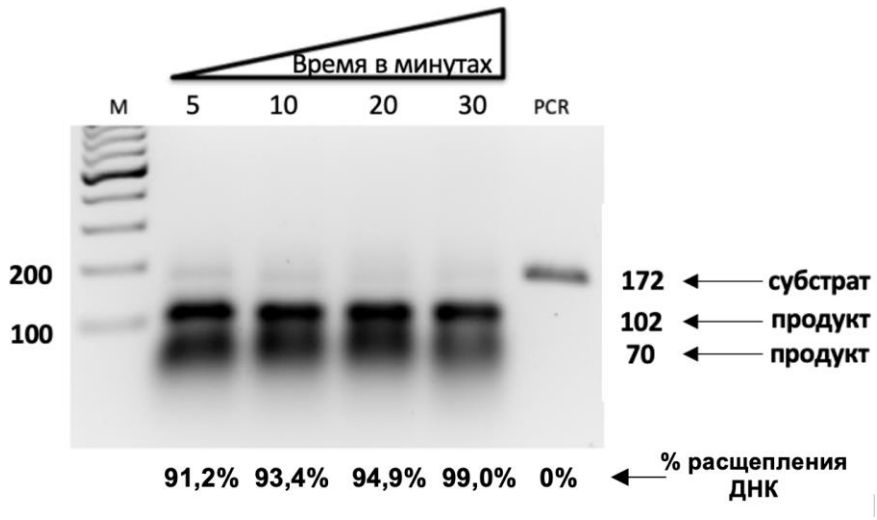
Результаты экспериментов показали, что максимальная активность комплекса CRISPR/MbCas12a наблюдалась при концентрации фермента Cas12a, равной 1 мкМ. При этой концентрации достигалось наиболее эффективное разрезание ДНК-мишени, что указывает на её оптимальность.

При снижении концентрации Cas12a до 500 нМ активность комплекса значительно снижалась, а при концентрациях 250 нМ и ниже наблюдалось резкое падение эффективности разрезания мишени. Таким образом, оптимальной концентрацией фермента Cas12a для биохимической реакции является 1 мкМ. Данная концентрация обеспечивает максимальную эндонуклеазную активность системы, особенно в сочетании с crРНК в концентрации 2 мкМ, что подтверждено предыдущими экспериментами.

В дополнение к ранее проведённым экспериментам по подбору концентраций crРНК и фермента MbCas12a был проведён эксперимент по изучению цис-активности комплекса CRISPR/MbCas12a в зависимости от времени инкубации. Цель эксперимента заключалась в определении времени, необходимого для достижения максимальной эндонуклеазной активности комплекса, с учётом особенностей его кинетики. Для эксперимента реакционная смесь объемом 40 мкл содержала фермент MbCas12a в концентрации 1 мкМ, crРНК в концентрации 2 мкМ, буфер Neb2.1 (1×) и безнуклеазную деионизованную воду.

Смешанные компоненты предварительно инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут для формирования активного комплекса Cas12a–crRNA. После преинкубации в реакционную смесь добавляли очищенный ПЦР-продукт ДНК (*uidA*) в концентрации 100 ng/мкл, после чего смесь инкубировали при 37 °C. Для анализа кинетики цис-активности комплекса на разных временных интервалах отбирались пробы (точки) через 5, 10, 20 и 30 минут. Каждая проба реакционной смеси завершала реакцию добавлением 2 мкл раствора протеиназы К, после чего смесь инкубировали при 37 °C в течение 10 минут для инактивации фермента.

Результаты экспериментов показали, что комплекс CRISPR/MbCas12a демонстрировал высокую цис-активность уже через 5 минут после начала инкубации (рисунок 28).



M – название маркера; 2000, 1000, 500 – длина маркера; PCR – очищенный ПЦР-продукт; 5, 10, 20, 30 – время в минутах

Рисунок 28 – Оптимизация реакции по времени и его влияние на эффективность расщепления целевой ДНК

Однако для дальнейших исследований было решено использовать время инкубации в 30 минут, поскольку именно при этом времени наблюдалась максимальная коллатеральная активность комплекса, необходимая для дальнейших экспериментальных задач.

При варьировании концентрации crРНК, Cas12a и времени инкубации были зафиксированы достоверные изменения активности, установлена статистическая значимость различий ($p<0.05$). Активность возрастала с увеличением концентраций реагентов и времени, достигая плато при 1–5 мкМ crРНК, 1 мкМ фермента и 15–20 мин инкубации.

3.5 Структурный анализ и определение активных центров MbCas12a и MeCas12a

На основе предыдущих исследований было проведено исследование, направленное на понимание механизмов действия эндонуклеаз CRISPR/Cas12a, полученных из различных видов бактерий рода *Moraxella.*

Основное внимание в исследовании было уделено изучению структурных и функциональных характеристик доменов RuvC1, RuvC2, RuvC3 и Nuc, которые играют ключевую роль в каталитической активности ферментов семейства Cas12a. Эти домены обеспечивают специфический разрыв цепи ДНК в целевом участке, что является критически важным для функционирования CRISPR-Cas систем *Moraxella bovis* и *Moraxella equi* при нацеливании на геном SARS-CoV-2.

Структурный анализ показал, что Cas12a обладает двухдольной архитектурой, включающей долю распознавания (REC) и нуклеазную долю (NUC). Доля REC, ответственная за распознавание и связывание с комплексом crРНК-ДНК, состоит из доменов REC1 и REC2, которые обеспечивают

стабилизацию направляющего сегмента crРНК и его комплементарное взаимодействие с целевой ДНК. В свою очередь, нуклеазная доля NUC включает домен RuvC, разделённый на субдомены RuvC1, RuvC2 и RuvC3, а также домен Nuc, которые совместно формируют активный центр фермента, ответственный за эндонуклеазное расщепление целевой ДНК.

Для наглядности ниже представлена доменная организация Cas12a на рисунке 29.

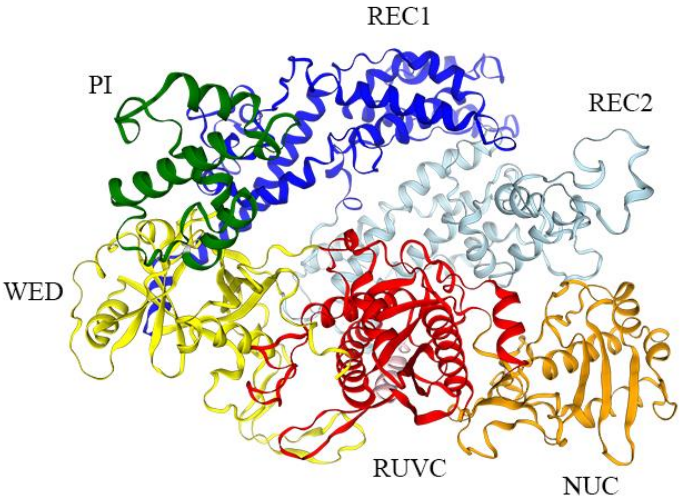
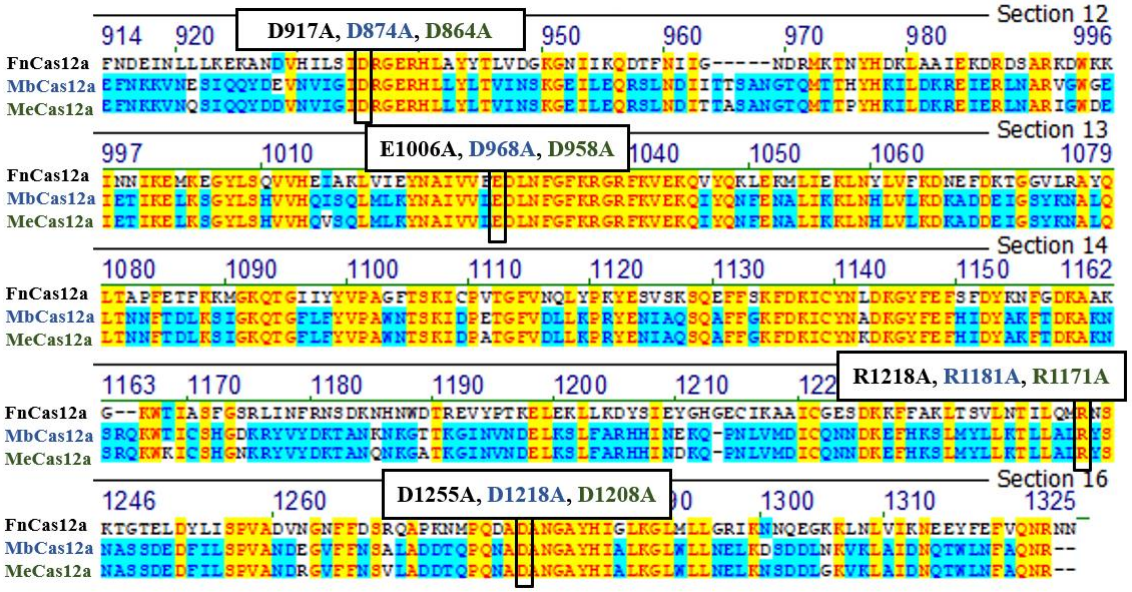


Рисунок 29 – Доменная организация Cas12a

На основе известных сайтов, ответственных за каталитическую активность ферментов, было проведено выравнивание амнокислотных последовательностей Cas12a [39, с.19] (рисунок 30).



Francisella tularensis subsp. novicida (помечено черным), *Moraxella bovis* (помечено синим) и *Moraxella equi* (помечено зеленым)

Рисунок 30 – Выравнивание аминокислотных последовательностей Cas12a

После выравнивания аминокислотных последовательностей двух гомологичных ферментов Cas12a, для надежного определения найденных сайтов, было проведено выравнивание их структур. Для определения критических аминокислот для наших ферментов MbCas12a и MeCas12a использовались данные кристаллической структуры MbCas12a (PDB: 6IV6) [155], доступные в базе данных PDB. Для MeCas12a модель структуры была построена с применением программного обеспечения AlphaFold [156], обеспечивающего высокоточное предсказание на основе глубокого обучения. Сравнительный анализ выявил соответствие всех критических аминокислотных остатков активных центров MbCas12a и MeCas12a известной структуре фермента FnCas12a (рисунок 30), что подтверждает их структурно-функциональную гомологию.

Структурно-функциональный анализ в сочетании с методами гомологичного моделирования позволил идентифицировать и охарактеризовать структуры активных центров доменов белков MbCas12a и MeCas12a. Исследование было направлено на изучение роли специфических аминокислот в активных центрах и их влияния на эндонуклеазную активность. В результате анализа для MbCas12a и MeCas12a определены ключевые аминокислоты, подвергнутые сайт-направленному мутагенезу: в домене RuvC1 — D874A (MbCas12a) и D864A (MeCas12a), в домене RuvC2 — E968A (MbCas12a) и E958A (MeCas12a), в домене Nuc — R1181A (MbCas12a) и R1171A (MeCas12a), а также в домене RuvC3 — D1218A (MbCas12a) и D1208A (MeCas12a) (приложения A, B, E). Указанные мутации проанализированы с использованием структурных данных (рисунки 31 и 32), что обеспечило основу для оценки их функционального значения в каталитической активности эндонуклеаз.

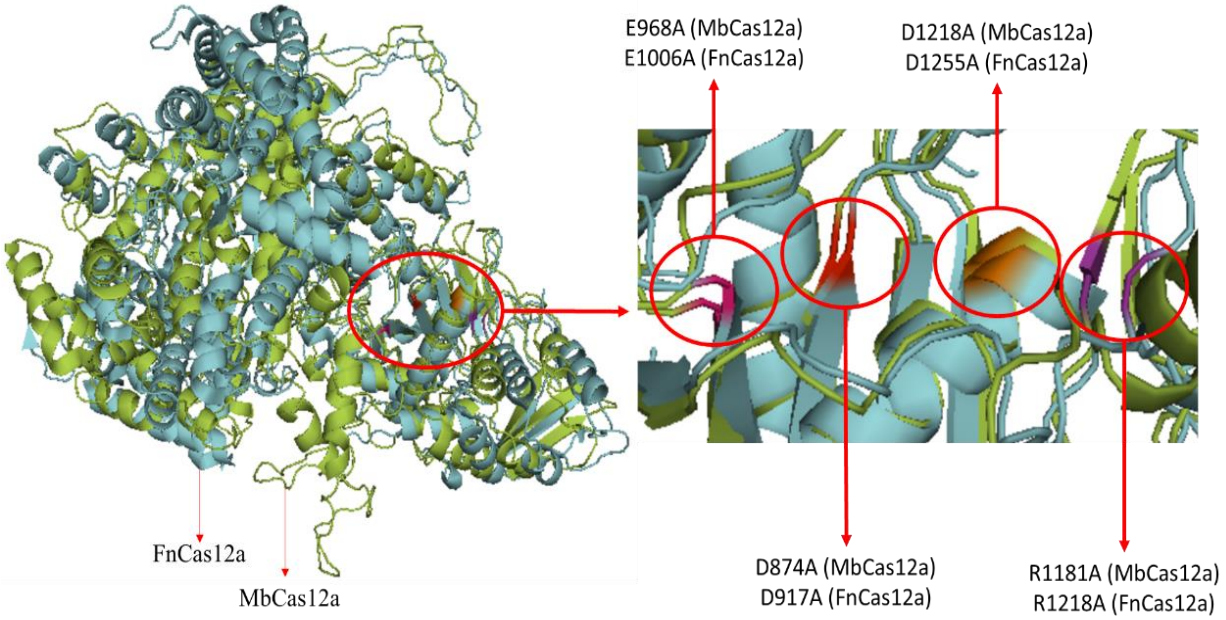


Рисунок 31 – Мутации ключевых аминокислот в белке MbCas12a: D874A в домене RuvC1, E968A в домене RuvC2, R1181A в домене Nuc, D1218A в домене RuvC3

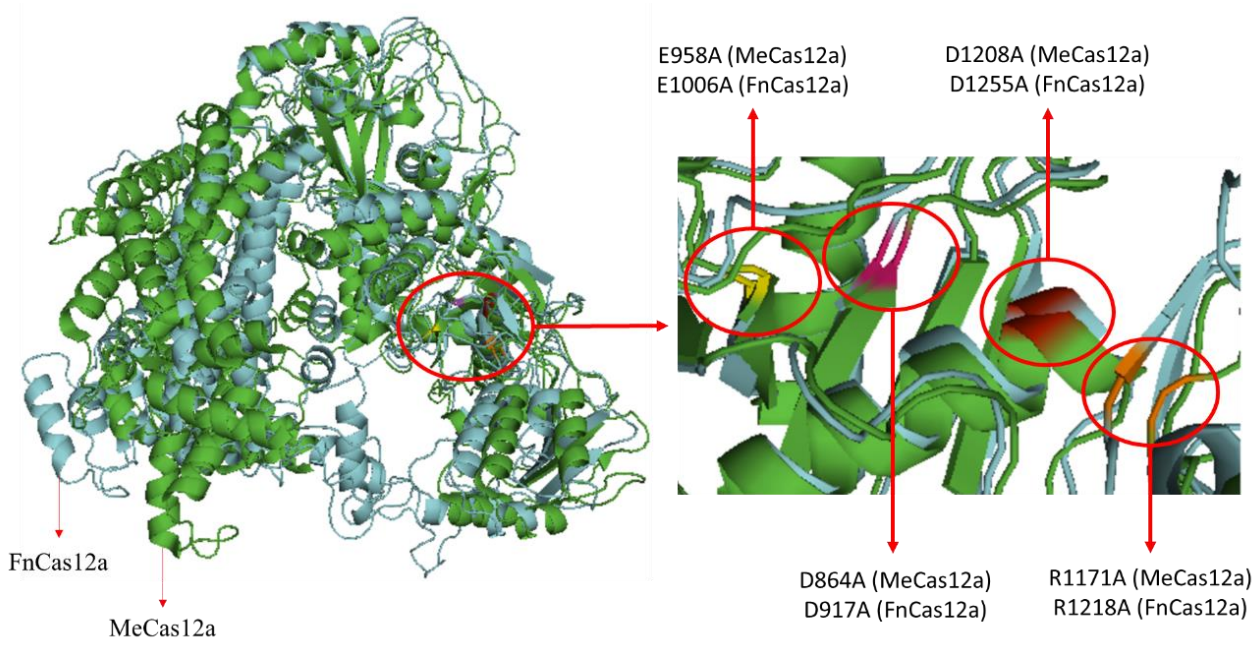


Рисунок 32 – Мутации ключевых аминокислот в белке MeCas12a: D864A в домене RuvC1, E958A в домене RuvC2, R1171A в домене Nuc, D1208A в домене RuvC3

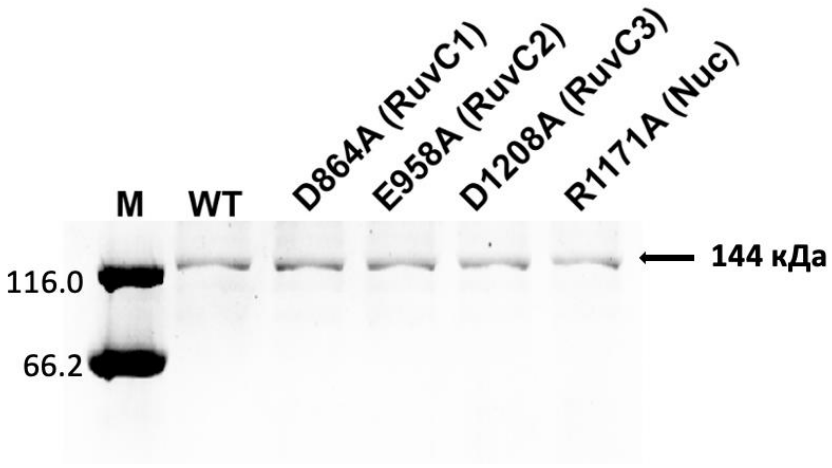
В процессе получения мутантов белка Cas12a сначала осуществлялась проверка ПЦР-продуктов через агарозный гель, затем инкубация ПЦР-смеси с нуклеазой DpnI для удаления материнской ДНК. После этого проводилась трансформация смеси в клетки *E. coli DH5α* и их инкубация на LB-агаре с антибиотиком при 37 °C на ночь. Выбранные колонии культивировали в LB-бульоне, затем из них извлекали плазмиды и проводили секвенирование для подтверждения мутаций.

Хроматографическая очистка рекомбинантных белков дикого типа и их мутантных форм проводилась в два этапа с использованием системы быстрой проточной жидкостной хроматографии (FPLC) ÄKTA Purifier 10 (GE Healthcare), что обеспечило высокую степень разрешения и воспроизводимости процедуры.

На первом этапе использовали металлохелатную хроматографию на колонке HisTrap HP с ионами Ni^{2+}, что обеспечило первичное выделение белков из осветленного лизата.

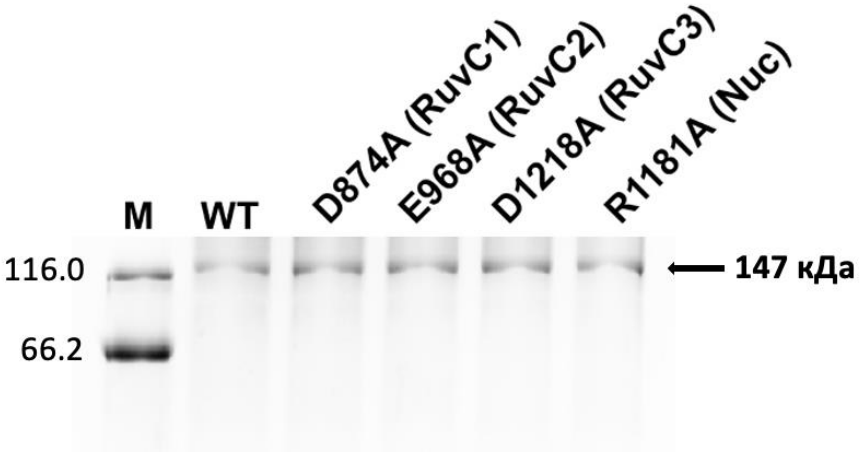
На втором этапе применили аффинную хроматографию на гепариновой колонке, основываясь на способности Cas12a связываться с ДНК-подобными структурами.

Полученные фракции анализировали методом SDS-PAGE в 12% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием, что позволило подтвердить однородность и молекулярную массу очищенных белков (рисунки 33 и 34).



M – маркер; 116.0, 66.2 – длина маркера; далее фракции белка: WT – дикий тип, мутант D864A (RuvC1), мутант E958A (RuvC2), мутант R1171A(Nuc), мутант D1208A(RuvC3)

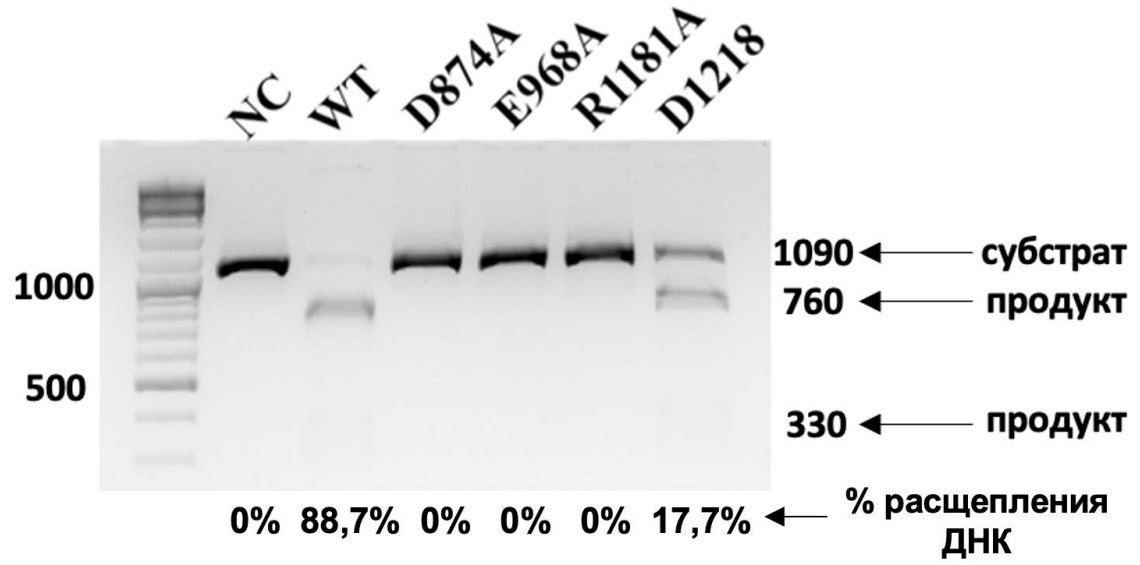
Рисунок 33 – Мутантные варианты рекомбинантного белка MeCas12a - D864A в домене RuvC1, E958A в домене RuvC2, D1208A в домене RuvC3 и R1171A в домене Nuc



M – маркер; 116.0, 66.2 – длина маркера; далее фракции белка: WT – дикий тип, мутант D874A (RuvC1), мутант E968A (RuvC2), мутант R1181A(Nuc), мутант D1218A (RuvC3)

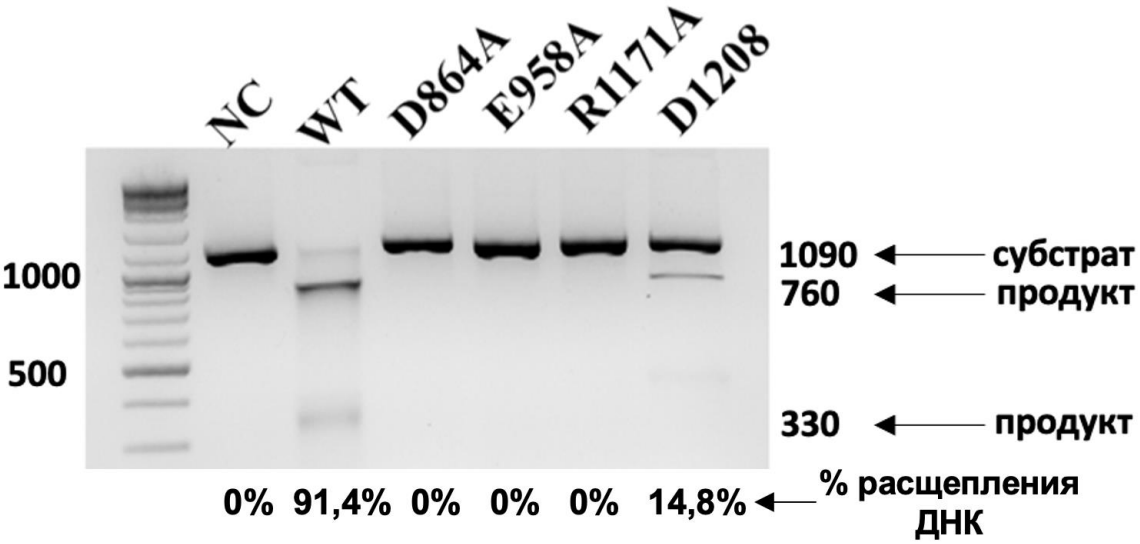
Рисунок 34 – Мутантные варианты рекомбинантного белка MbCas12a - D874A в домене RuvC1, E968A в домене RuvC2, D1218A в домене RuvC3 и R1181A в домене Nuc

Был проведен эксперимент для оценки цис-активности мутантных форм ферментов по сравнению с дикими типами. Мутации в доменах RuvC приводили к полной потере способности ферментов осуществлять расщепление обеих нитей ДНК-мишени, что подчёркивает их роль в механизме двуцепочечного разрыва ДНК. В то же время, мутации в домене Nuc приводили к снижению способности ферментов расщеплять только цепь-мишень, что указывает на специфичность этого домена для одноцепочечного разрыва (рисунок 35 и 36).



M – маркер; 1000, 500 – длина маркера; далее расщепление ДНК комплексом crРНК-Cas12a: NC – отрицательный контроль, WT – дикий тип, мутант D874A (RuvC1), мутант E968A (RuvC2), мутант R1181A(Nuc), мутант D1218A (RuvC3)

Рисунок 35 – Оценка цис-активности мутантных форм ферментов по сравнению с диким типом MbCas12a



M – маркер; 1000, 500 – длина маркера; далее расщепление ДНК комплексом crРНК-Cas12a: NC – отрицательный контроль, WT – дикий тип, мутант D864A (RuvC1), мутант E958A (RuvC2), мутант R1171A(Nuc), мутант D1208A (RuvC3)

Рисунок 36 – Оценка цис-активности мутантных форм ферментов по сравнению с диким типом MeCas12a

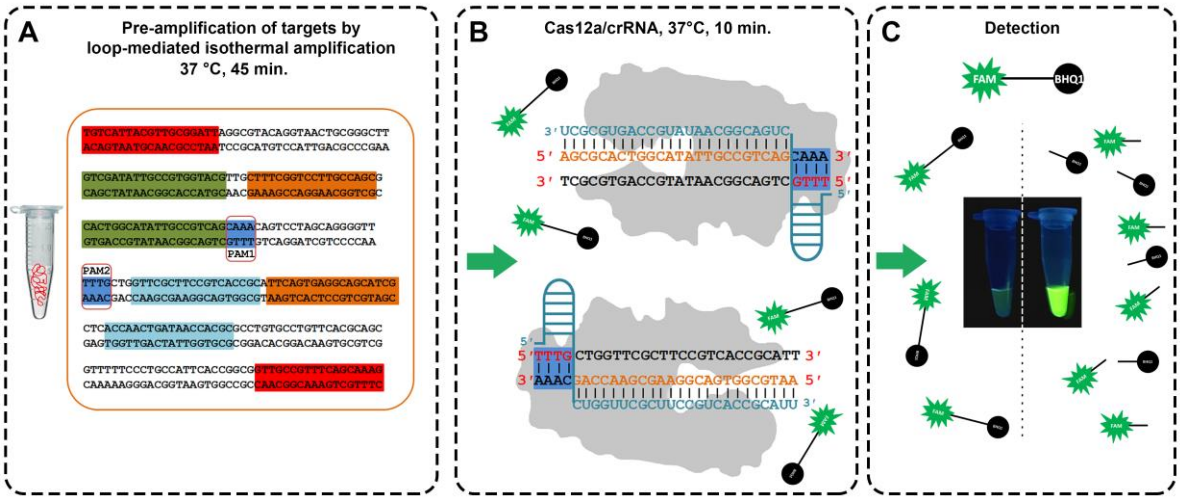
Мутации D864A, E958A и D1208A в MeCas12a демонстрировали полное ингибирование эндонуклеазной активности, тогда как мутация R1171A в области Nuc показала частичную активность, свидетельствуя о важности данной

аминокислоты для механизма действия фермента. Аналогичные результаты были получены и для MbCas12a с мутациями D874A, E968A, и D1218A, где полное ингибирование эндонуклеазной активности указывает на критическую роль этих аминокислот в активности доменов RuvC. Мутант R1181A в области Nuc MbCas12a также показал пониженную активность, подтверждая значимость этой аминокислоты.

Мутации в каталитически значимых остатках фермента (RuvC1, RuvC2, RuvC3 и NUC) приводили к полной потере активности, что подтверждено отсутствием сигнала на денситометрии. Исключением стали мутации D1218A и D1208A, при которых сохранялась остаточная активность (~15–17%), что было статистически достоверно отличимо от полной инактивации (ANOVA, $p < 0,05$).

3.6 Детекция *Escherichia coli* (*E. coli)* методом CRISPR/MbCas12a

В рамках настоящего исследования детекция *E. coli* была выполнена с использованием технологии CRISPR/MbCas12a в сочетании с изотермической петлевой амплификацией (LAMP) [157-159] (приложения Ж и З). Был разработан метод детекции *E. coli*, основанный на сочетании изотермической петлевой амплификации (LAMP) и системы CRISPR/MbCas12a. Этот метод позволяет проводить высокоэффективную и специфичную диагностику патогена в клинических образцах молока. На рисунке 37 представлена схема диагностического процесса, включающая три ключевых этапа: изотермическую амплификацию ДНК, активацию комплекса CRISPR/MbCas12a и визуализацию флуоресцентного сигнала на наличие или отсутствие патогена в образце.



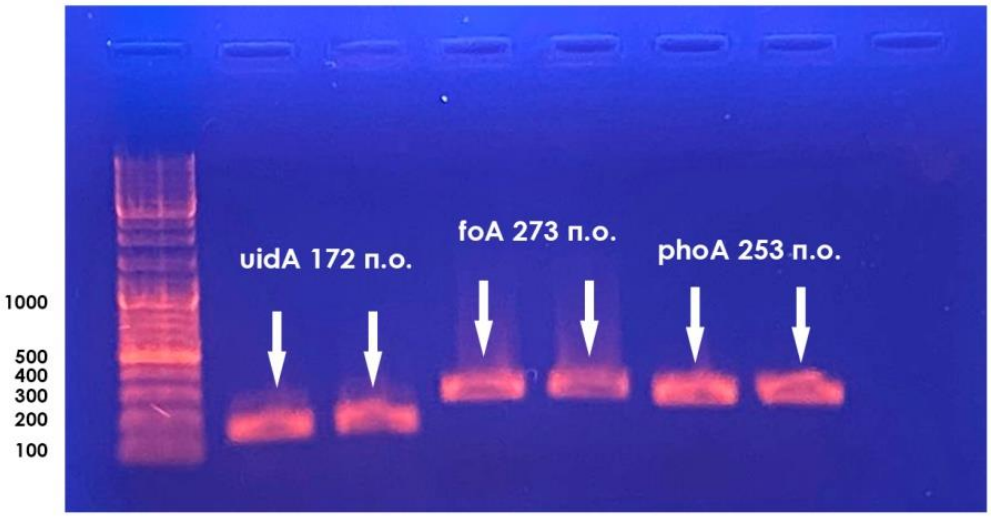
(A) Амплификация ДНК методом LAMP при 62 °C (45 мин). (B) Cas12a с crРНК связывается с мишенью и расщепляет флуоресцентные зонды при 37 °C (10 мин). (C) Сигнал (FAM) регистрируется трансиллюминатором, подтверждая наличие *E. coli.*

Рисунок 37 – Схема процесса диагностики *E. coli* методом CRISPR/MbCas12a с использованием LAMP

3.6.1 Подбор генов и оптимальных условий LAMP

Был выполнен подбор и оптимизация условий изотермической амплификации (LAMP) для детекции целевых генов *E. coli*. В качестве мишеней для амплификации были выбраны гены *uidA, foA* и *phoA*, которые обладают высокой степенью консервативности. Амплификацию генов *uidA, foA* и *phoA E. coli*, проводили с помощью ПЦР с использованием геномной ДНК *E. coli*.

Предварительная амплификация выбранных генов методом ПЦР показала их соответствие расчетным параметрам, подтверждая возможность их использования в дальнейших экспериментах. Длины ПЦР-продуктов составили 172 п.о. для *uidA*, 273 п.о. для *foA* и 253 п.о. для *phoA* соответственно. Идентификация фрагментов проводилась с использованием электрофореза в 1% агарозном геле, что подтверждено представленными данными на рисунке 38.



Электрофорез ПЦР-продуктов амплификации фрагментов генов *uidA* (172 п.о.), *foA* (273 п.о.) и *phoA* (253 п.о.) в 2% агарозном геле. В левой дорожке — маркер молекулярной массы ДНК (100–1000 п.о.). Видны чёткие полосы соответствующей длины, что подтверждает успешную амплификацию целевых фрагментов.

Рисунок 38 – Результат амплификации генов-мишеней *E. coli*

Амплифицированные фрагменты были очищены и клонированы в состав плазмидного вектора pJET1.2/blunt (Thermo Scientific). Векторная система pJET1.2/blunt представляет собой линеаризованную плазмиду, содержащую летальный ген фермента рестрикции (рисунок 39). Этот ген инактивируется при лигировании целевого ДНК-фрагмента в сайт клонирования, что позволяет выживать только тем бактериальным клеткам, которые содержат рекомбинантную плазмиду. Рециркуляризованные векторные молекулы, не содержащие вставки, продолжают экспрессию летального фермента рестрикции, что приводит к гибели клеток-хозяев *E. coli* после трансформации. Такой подход обеспечивает положительный отбор и значительно упрощает процесс скрининга рекомбинантных колоний.

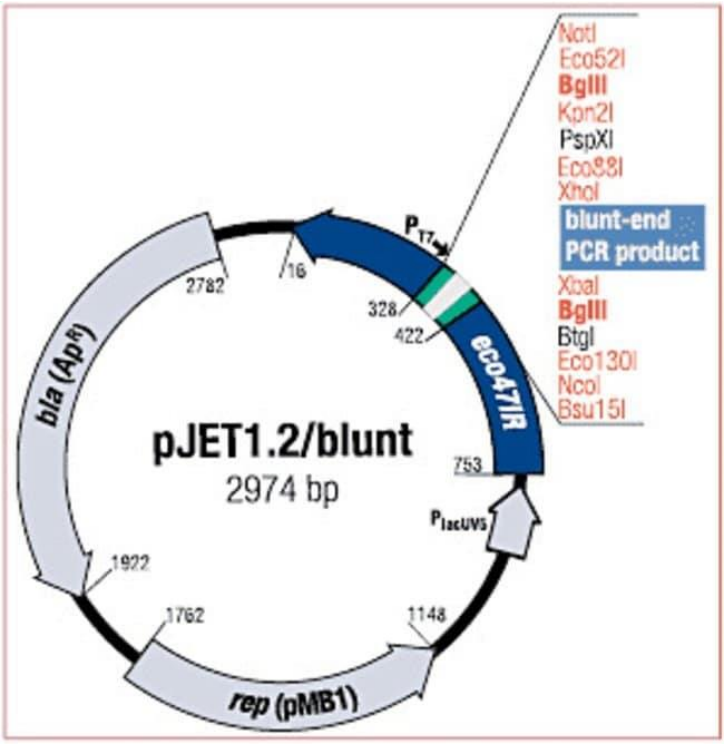
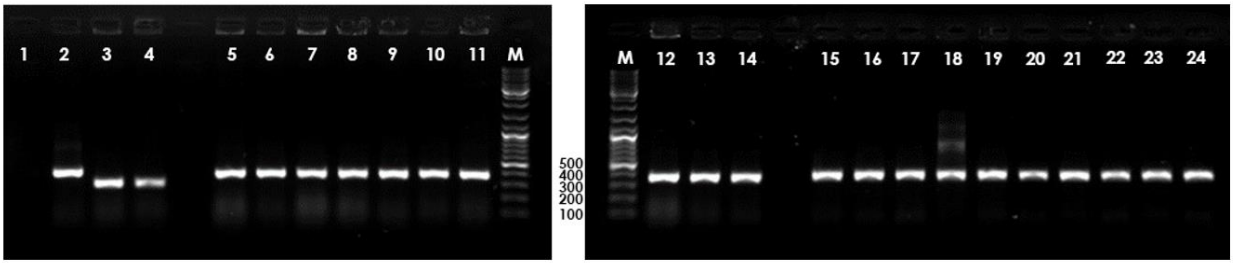


Рисунок 39 – Генетическая карта плазмиды pJET1.2/blunt

Процедура клонирования включала лигирование ПЦР-продуктов с вектором pJET1.2/blunt в соотношении вставки к вектору 3:1. Концентрации ПЦР-продуктов и вектора составляли 50 нг/мкл. Лигазная реакция проводилась с использованием Т4-ДНК-лигазы при температуре +22°С в течение 5 минут. Полученные конструкции трансформировали в химически компетентные клетки *E. coli DH5α* методом температурного шока. После трансформации наблюдалось образование до 100 колоний на чашке. Для проверки эффективности клонирования был проведён ПЦР-скрининг с использованием универсальных праймеров pJET1.2 (рисунок 40).



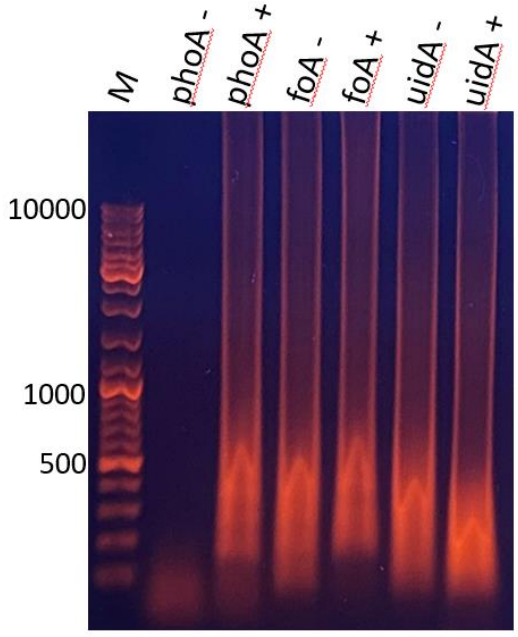
1 – отрицательный контроль, 2 – положительный контроль, 3-4 – ген *uidA* (290 п.о.), 5-14 – ген *phoA* (371 п.о.), 15-24 – ген *foA* (391 п.о.); М – ДНК-маркер

Рисунок 40 – Результат ПЦР-скрининга колоний-трансформантов на предмет содержания колоний высококопийного вектора pJET1.2/blunt

Подтвержденные рекомбинантные колонии были инокулированы в 5 мл ЛБ-среды с добавлением ампициллина (150 мкг/мл) и инкубированы при +37°C в шейкер-инкубаторе в течение 16 часов. Из полученной бактериальной культуры выделяли плазмидную ДНК с использованием набора MiniPrep. Концентрация ДНК составила 50-70 нг/мкл. Секвенирование плазмидных конструкций проводилось с использованием праймеров pJET1.2, а анализ последовательностей выполнялся с помощью программы Vector NTI и BLAST. Секвенированные последовательности подтвердили правильность клонирования целевых фрагментов *uidA, foA* и *phoA*.

После подтверждения структуры клонированных фрагментов проводилась оптимизация условий LAMP. Реакционная смесь включала IAB, MgSO4, dNTP, специфические праймеры (FIP, BIP, B3, F3, LF, LB), фермент *bst*Pol и бетаин. Оптимальные условия для каждого гена: *phoA*: 62°C, 45 минут, 3 пары праймеров; *uidA*: 64°C, 45 минут, 2 пары праймеров; *foA*: 65°C, 45 минут, 3 пары праймеров.

Бетаин добавлялся для предотвращения ложноположительных результатов. Результаты показали, что гены *uidA* и *foA* демонстрировали высокий уровень ложноположительных реакций, что снижало их диагностическую ценность. Ген *phoA*, напротив, показал отсутствие ложноположительных реакций при сохранении высокой чувствительности, что делает его предпочтительным для дальнейших исследований. Подбор праймеров для *phoA* минимизировал вероятность неспецифического связывания, что подтверждается результатами тестов на контрольных образцах (рисунок 41).



M – маркер; 10000, 1000, 500 – длина маркера, линии с «+» показывают положительные реакции амплификации, а с «-» – отрицательные контроли.

Рисунок 41 – Результаты изотермической амплификации (LAMP) для генов *phoA, foA* и *uidA*.

Для анализа функциональности гена *phoA* была сконструирована плазмида pJET1.2/blunt/*phoA* (рисунок 42).

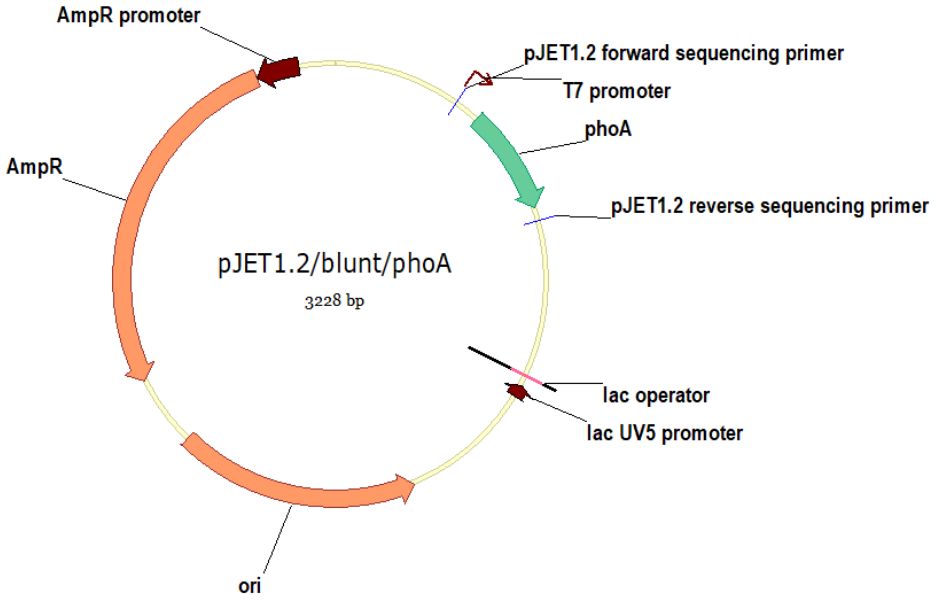


Рисунок 42 – Рекомбинантный вектор с клонированной последовательностью целевой мишени гена *phoA* ДНК *E. coli*

Таким образом, на основании проведённых исследований было установлено, что из трёх исследованных генов-мишеней только *phoA* обеспечивает оптимальные параметры специфичности и чувствительности для использования в LAMP. Это делает его перспективной мишенью для разработки методов молекулярной диагностики *E. coli.*

3.6.2 Подбор PAM-сайтов и дизайн специфической crРНК для детекции гена *phoA* у *E. coli*

Для эффективной детекции гена *phoA* у *E. coli* с использованием технологии CRISPR/MbCas12a были выбраны оптимальные PAM-участки с последовательностью TTTG, расположенные по обе стороны от целевой последовательности (рисунок 43).



Рисунок 43 – Схематическое представление целевой последовательности гена *phoA* с выделенными PAM-сайтами. PAM1 (TTTG) и PAM2 (TTTG)

На основе этих PAM-сайтов был выполнен дизайн crРНК, которые затем синтезировались для дальнейшего использования в диагностических исследованиях.

В результате *in vitro* транскрипции были получены следующие последовательности crРНК: crRNA-PAM1 GGGAAUUUCUACUGUUUGUAGAUCUUGACGGCAAUAUGCCAGUGCGCU ; crRNA-PAM2 GGGAAUUUCUACUGUUUGUAGAUCUUGGUUCGCUUCCGUCACCGCAUU. Эти crРНК были специально разработаны для точного связывания с целевой последовательностью гена *phoA* и обеспечения высокой специфичности в системе CRISPR/MbCas12a.

Выбранные последовательности PAM и спроектированные crРНК обеспечивают высокую чувствительность и минимизацию неспецифичных взаимодействий в процессе детекции, что делает их ключевым элементом диагностического подхода.

3.6.3 Определение чувствительности методом LAMP/CRISPR/MbCas12a и считывание флуоресценции в реальном времени

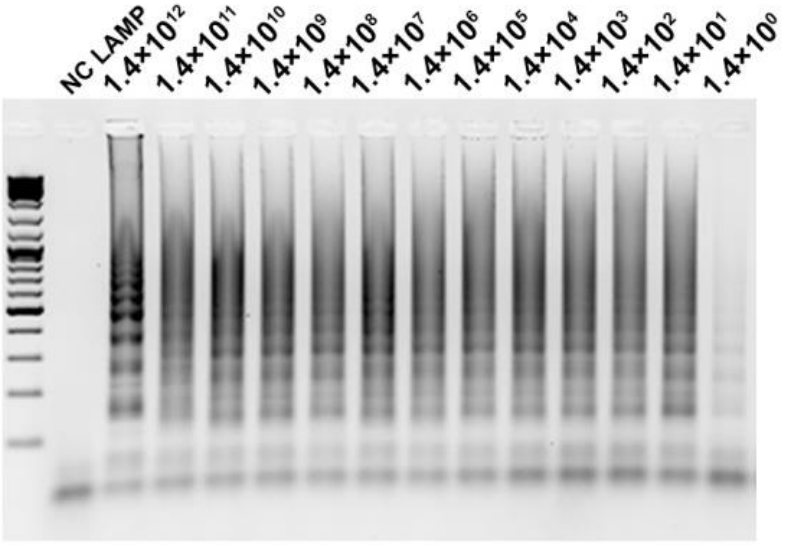
Для оценки чувствительности разработанного метода LAMP/CRISPR/MbCas12a были проведены эксперименты с целью определения предела обнаружения (Limit of Detection, LoD). Данная методика позволяет оценить минимальное количество целевой ДНК, которое может быть детектировано с высокой точностью.

В качестве объекта исследования использовались как плазмидная, так и геномная ДНК *E. coli*. Эксперименты включали этапы изотермической амплификации, визуализации продуктов амплификации и количественного анализа флуоресценции как результата коллатеральной активности комплекса CRISPR/MbCas12a.

На первом этапе эксперимента проводилась изотермическая амплификация с использованием плазмидной ДНК, содержащей ген *phoA* в качестве мишени. Амплификацию осуществляли с последовательным разведением плазмидной ДНК с шагом 10 раз. Продукты амплификации анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле, что позволило визуализировать результат и подтвердить эффективность амплификации. Результаты показали, что предел обнаружения для плазмидной ДНК составляет $1{,}4 \times 10^{0}$ копий на реакцию, что свидетельствует о высокой чувствительности метода при работе с данной матрицей (рисунок 44). На основании этих данных была подтверждена пригодность условий реакции для дальнейших экспериментов с геномной ДНК.

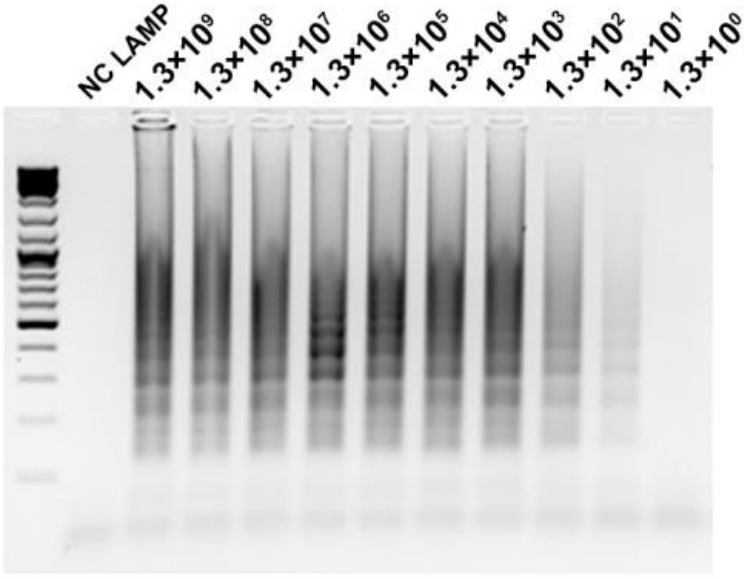
На следующем этапе исследования была проведена амплификация геномной ДНК *E. coli* в аналогичных условиях. Геномную ДНК разводили серийно с шагом 10 раз, обеспечивая диапазон концентраций от $1{,}3 \times 10^{9}$ до $1{,}3 \times 10^{\circ}$ копий. Анализ продуктов реакции методом электрофореза показал, что

минимальная концентрация геномной ДНК, обеспечивающая достоверную амплификацию, составляет 1,3 × 10^1 копий. Эти результаты подтверждают пригодность метода LAMP для работы с более сложными матрицами, такими как геномная ДНК.



NC LAMP – отрицательный контроль; от 1,4 × 10^{12} до 1,4 × 10^0 копии ДНК

Рисунок 44 – Электрофоретический анализ чувствительности метода LAMP для детекции гена *phoA* из *E. coli* на разведениях плазмидной ДНК

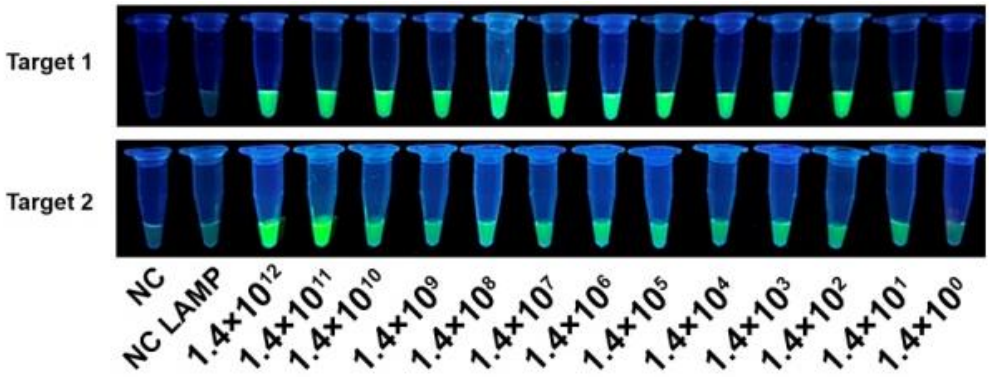


NC LAMP – отрицательный контроль; от 1,3 × 10^9 до 1,3 × 10°копии ДНК

Рисунок 45 – Электрофоретический анализ чувствительности метода LAMP для детекции гена *phoA* из *E. coli* на разведениях геномной ДНК

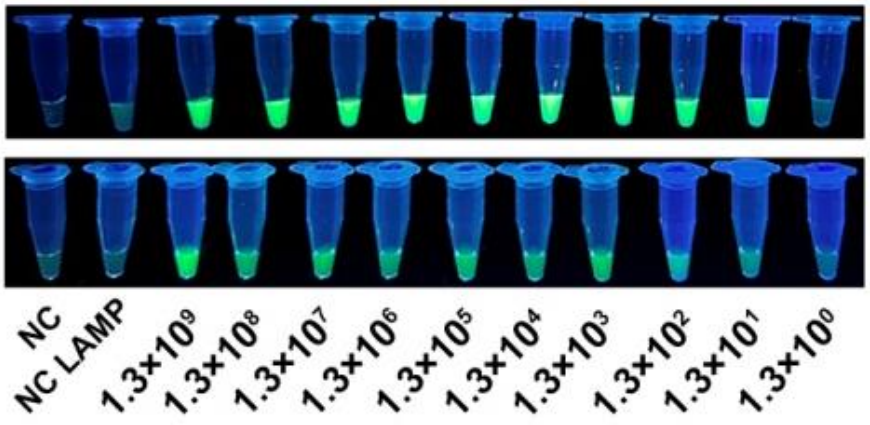
Продукты амплификации, полученные с использованием плазмидной ДНК, были протестированы с использованием системы CRISPR/MbCas12a. Для этого использовали фермент Cas12a и crРНК, направленную на ген *phoA*. Результаты экспериментов показали, что минимальная концентрация плазмидной ДНК, детектируемая системой CRISPR/MbCas12a, составляет 1,4 × 10^0 копий. Эти данные согласуются с результатами амплификации методом LAMP и демонстрируют высокую аналитическую чувствительность метода (рисунок 46).

В этом исследовании использовались две мишени (мишень 1 и мишень 2) для Cas12, чтобы оценить потенциальное влияние использования одной и той же последовательности области PAM.



NC LAMP – отрицательный контроль; от 1,4 × 10^{12} до 1,4 × 10^0 копии ДНК

Рисунок 46 – Флуоресцентная визуализация результатов плазмидной ДНК метода LAMP в сочетании с системой CRISPR/MbCas12a для детекции двух целевых последовательностей

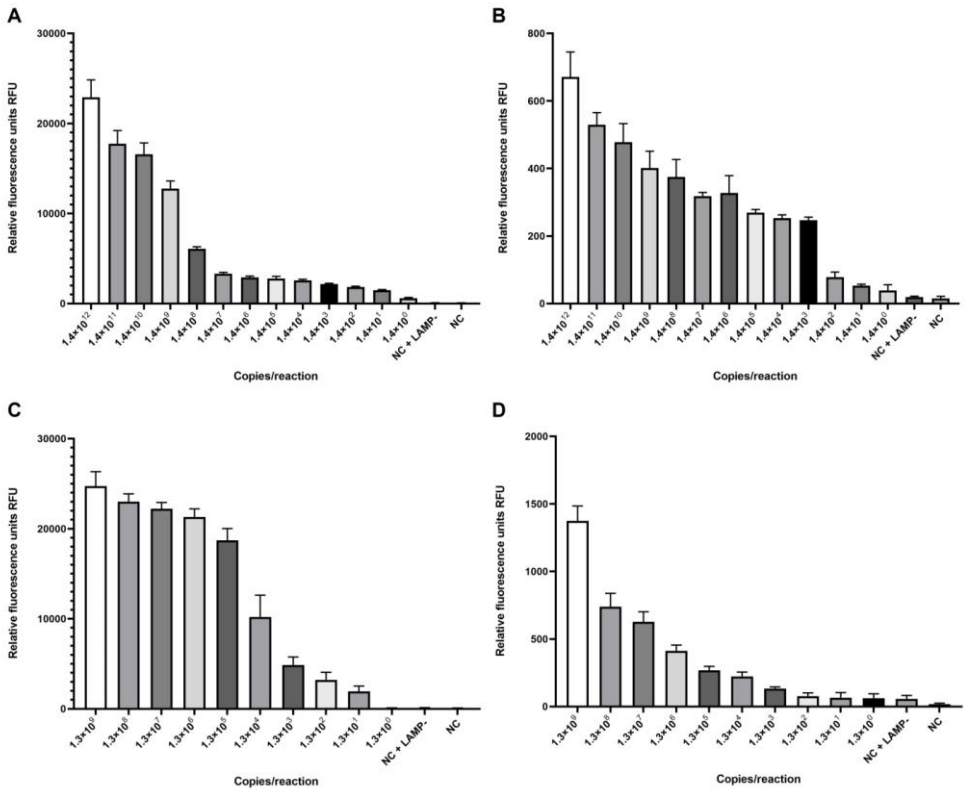


NC LAMP – отрицательный контроль; от 1,3 × 10^9 до 1,3 × 10°копии ДНК

Рисунок 47 – Флуоресцентная визуализация результатов геномной ДНК метода LAMP в сочетании с системой CRISPR/MbCas12a для детекции двух целевых последовательностей.

Продукты амплификации LAMP, полученные с использованием геномной ДНК, также были протестированы системой CRISPR/MbCas12a. Для анализа использовались фермент Cas12a и crРНК, направленные на ту же мишень. Результаты показали, что предел обнаружения для геномной ДНК составляет 1,3 × 10^1 копий, что полностью совпадает с данными, полученными на этапе амплификации (рисунок 47). Таким образом, метод CRISPR/MbCas12a эффективно работает с продуктами амплификации геномной ДНК, подтверждая его универсальность.

Следующим этапом была оценка чувствительности метода CRISPR/MbCas12a, который использовали для анализа продуктов LAMP. Для этого измеряли уровень флуоресценции, генерируемой в процессе транс-расщепления. Было установлено, что предел обнаружения для активности Cas12a совпадает с LoD реакции LAMP и составляет 1,3 × 10^1 копий геномной ДНК (рисунок 48).



(A) Уровень флуоресцентного сигнала тран-активности с использованием продуктов амплификации в градиенте разведений плазмидной ДНК для целевой последовательности 1 (PAM1); (B) Уровень флуоресцентного сигнала тран-активности с использованием продуктов амплификации в градиенте разведений плазмидной ДНК для целевой последовательности 2 (PAM2); (C) Уровень флуоресцентного сигнала тран-активности с использованием продуктов амплификации в градиенте разведений геномной ДНК для целевой последовательности 1 (PAM1); (D) Уровень флуоресцентного сигнала тран-активности с использованием продуктов амплификации в градиенте разведений геномной ДНК для целевой последовательности 2 (PAM2).

Рисунок 48 – Количественная оценка интенсивности флуоресцентного сигнала.

При уменьшении концентрации целевой ДНК наблюдалось пропорциональное снижение интенсивности флуоресцентного сигнала, что объясняется уменьшением количества молекул-мишеней, доступных для взаимодействия с ферментом Cas12a. Эти данные подтверждают, что уровень флуоресценции служит точным индикатором содержания целевой ДНК в образце.

Особое внимание уделялось сравнению эффективности двух типов crРНК (PAM1 и PAM2). Результаты экспериментов продемонстрировали, что crРНК PAM1 обеспечивает более высокую интенсивность флуоресцентного сигнала по сравнению с PAM2 как для продуктов амплификации плазмидной ДНК, так и для продуктов, полученных из геномной ДНК. Это различие может быть связано с особенностями взаимодействия комплекса Cas12a-crРНК с целевой последовательностью. Анализ кривых накопления флуоресцентного сигнала в реальном времени подтвердил, что PAM1 обладает большей эффективностью в создании комплекса с ДНК-мишенью, что делает её предпочтительным выбором для дальнейших исследований.

Для более детальной оценки чувствительности crРНК PAM1 был проведён дополнительный анализ в течение 30 минут с использованием серийно разведённых образцов ДНК. Полученные данные продемонстрировали стабильное детектирование минимальных концентраций целевой ДНК как для плазмидной, так и для геномной матриц. Это подчёркивает универсальность и высокую чувствительность разработанного метода.

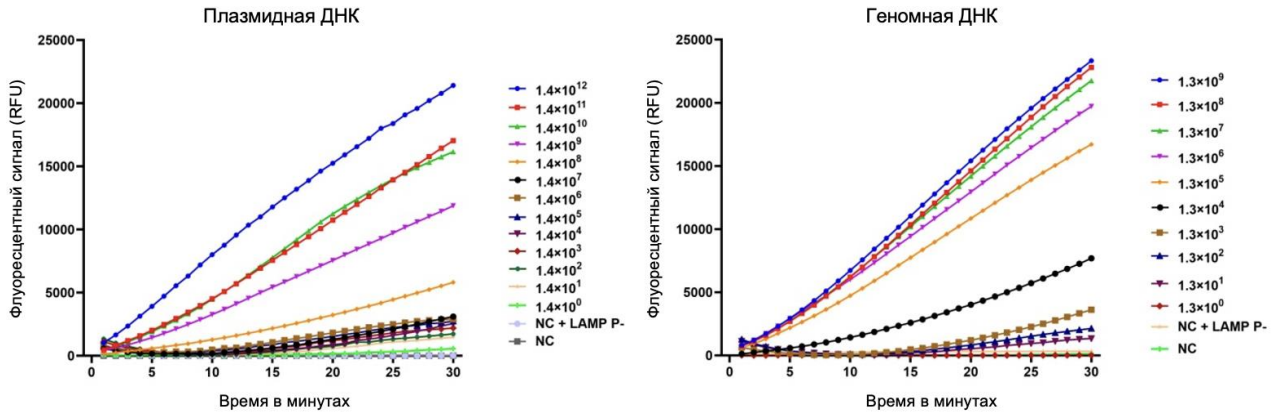


Рисунок 49 – Результаты анализа в реальном времени (RT-флуоресценции) для валидации чувствительности метода LAMP-CRISPR/MbCas12a.

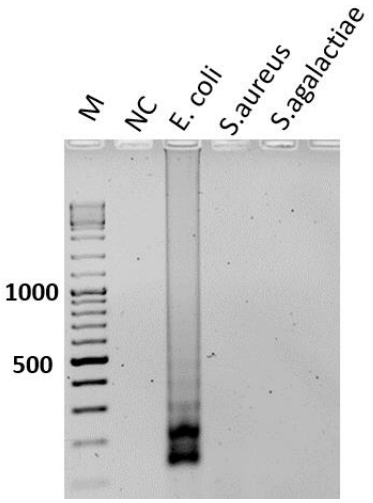
Полученные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности метода LAMP/CRISPR/MbCas12a при детекции как плазмидной, так и геномной ДНК, с пределами обнаружения 1,4 × 10^0 и 1,3 × 10^1 копий соответственно (рисунок 49). Система CRISPR/MbCas12a эффективно распознаёт продукты амплификации, а регистрация флуоресценции в реальном времени подтверждает надёжность работы метода. Для анализа данных применён непараметрический

однофакторный ANOVA (Крускал–Уоллис). Во всех разведениях плазмидной ДНК *E. coli* наблюдались статистически значимые различия ($p < 0,05$); также единичные копии достоверно отличались от отрицательных контролей. Для геномной ДНК *E. coli* различия между исходным и 10^{-1} разведением незначимы, но все последующие разведения статистически различаются ($p < 0,05$). Разведение, соответствующее 10 копиям, также отличалось от отрицательного контроля. Кроме того, метод продемонстрировал высокую специфичность, обеспечивая дифференциацию *E. coli* от других возбудителей мастита, включая *S. aureus* и *S. agalactiae*.

3.6.4 Определение специфичности методом LAMP/CRISPR/MbCas12a

Для определения специфичности анализа была проведена серия экспериментов, включающая BLAST-анализ целевой последовательности и тестирование метода с использованием ДНК других микроорганизмов. На первом этапе был выполнен BLAST-анализ последовательности гена *phoA* против базы данных NCBI. Результаты подтвердили высокую специфичность последовательности для *E. coli*, при этом значительной гомологии с ДНК других видов бактерий не было выявлено.

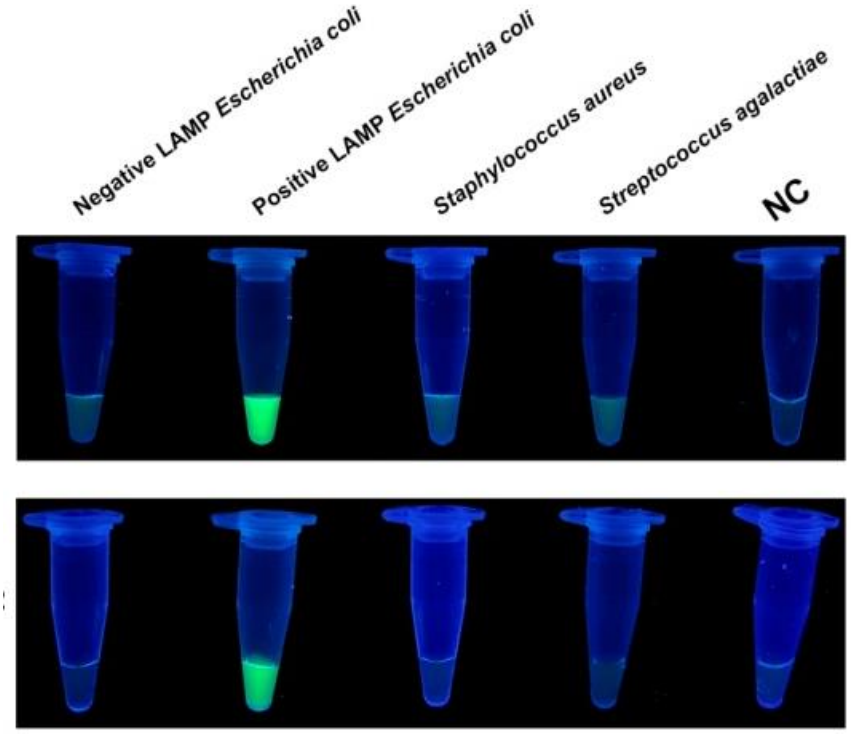
Амплификацию целевой последовательности методом LAMP проводили с использованием ДНК *E. coli, S. aureus* и *Streptococcus agalactiae (S. agalactiae),* которые являются возбудителями мастита (рисунок 50). Продукты амплификации тестировались на платформе CRISPR/MbCas12a с использованием направляющих crРНК, нацеленных на ген *phoA*. Результаты, представленные на рисунке 51, показали, что флуоресцентный сигнал наблюдался только в образцах, содержащих ДНК *E. coli*, тогда как реакции с ДНК *S. aureus* и *S. agalactiae* не давали флуоресцентного отклика. Это демонстрирует высокую специфичность метода для идентификации *E. coli*.



M – маркер; 1000, 500 – длина маркера; NC – отрицательный контроль

Рисунок 50 – Специфичность анализа LAMP с использованием геномной ДНК возбудителей мастита *S. aureus* и *Str. Agalactiae*

Результаты экспериментов подтвердили высокую специфичность метода. Во всех пробирках, содержащих ДНК возбудителей мастита (*S. aureus* и *Str. agalactiae*), флуоресцентный сигнал отсутствовал или находился на уровне фона, что указывает на отсутствие ложноположительных результатов. В то же время реакционные пробирки с геномной ДНК *E. coli* демонстрировали значительно более высокий уровень флуоресцентного сигнала. Флуоресцентный сигнал в реакциях с продуктами LAMP для *E. coli* значительно превышал сигналы, наблюдаемые в отрицательных контрольных пробирках. Это указывает на то, что продукты амплификации LAMP специфически распознаются комплексом Cas12a/crРНК, генерируя интенсивный сигнал. Высокий уровень флуоресценции подтверждает эффективность и специфичность выбранных праймеров и crРНК.



Сверху – мишень 1, снизу – мишень 2.
Отрицательная LAMP *E. coli* - реакция CRISPR/MbCas12a с отрицательным продуктом LAMP с использованием геномной ДНК *E. coli*. Положительный LAMP *E. coli* — реакция CRISPR/MbCas12a с положительным продуктом LAMP с использованием геномной ДНК *E. coli*. *S. aureus* - реакция CRISPR/MbCas12a с отрицательным продуктом LAMP с использованием геномной ДНК *S. aureus*. и *S. agalactiae* — реакция CRISPR/MbCas12a с отрицательным продуктом LAMP с использованием геномной ДНК *Str. agalactiae*. «NC» - реакция CRISPR/MbCas12a без продукта амплификации.

Рисунок 51 – Специфичность анализа LAMP/MbCas12a для мишени 1 и мишени 2 с использованием геномной ДНК возбудителей мастита *S. aureus* и *S. agalactiae*

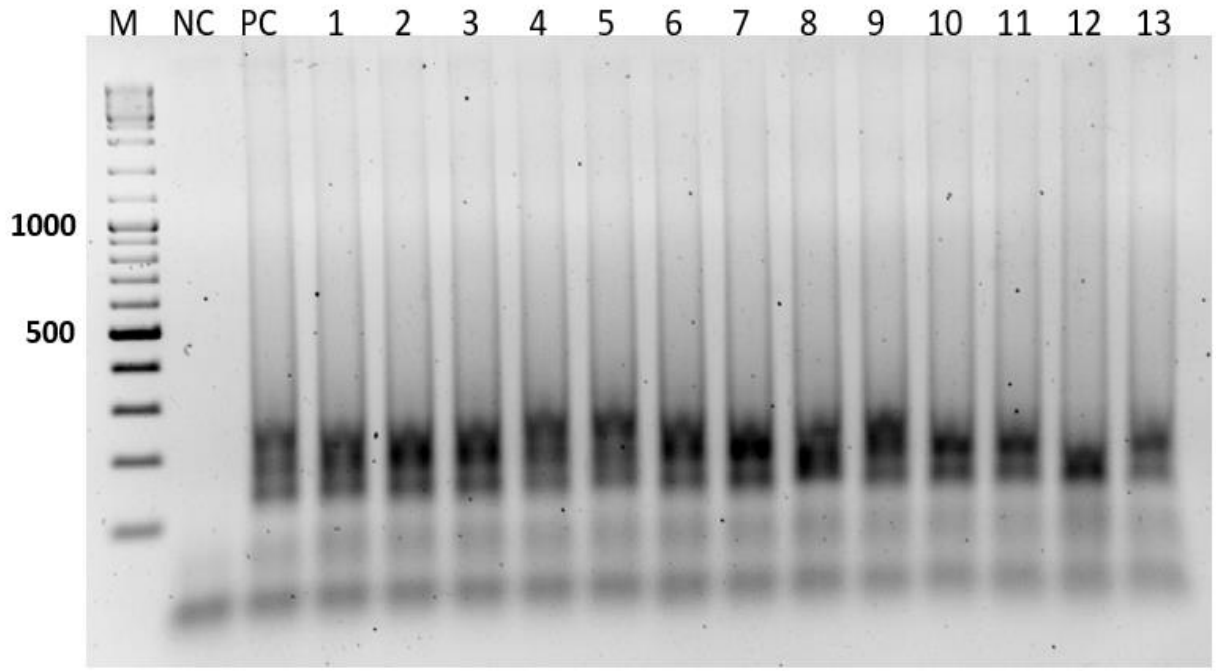
Эксперименты продемонстрировали высокую специфичность метода LAMP/CRISPR/MbCas12a для обнаружения *E. coli*. Отсутствие сигналов при

использовании ДНК других патогенов подтверждает, что метод позволяет эффективно дифференцировать *E. coli* от других микроорганизмов. Это делает его надёжным инструментом для диагностики инфекционных заболеваний, вызванных *E. coli*.

3.6.5 Детекция клинических образцов *E. coli* из маститного молока коров методом LAMP/CRISPR/MbCas12a

Для подтверждения практической применимости метода LAMP/CRISPR/MbCas12a были протестированы клинические изоляты *E. coli*, выделенные из образцов маститного молока коров. Всего в исследовании использовали 13 клинических изолятов. Анализ проводился в два этапа: амплификация целевого гена *phoA* методом LAMP и последующая диагностика продуктов амплификации с использованием системы CRISPR/MbCas12a.

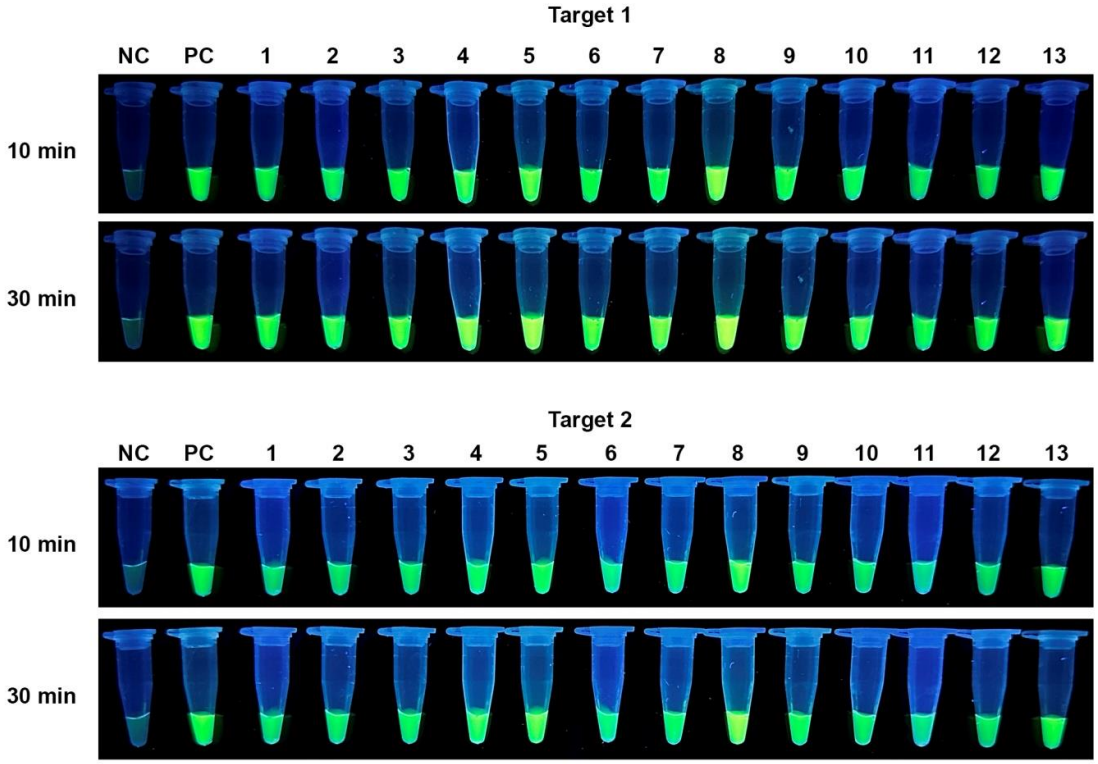
На первом этапе проводилась изотермическая амплификация геномной ДНК из клинических изолятов. Все 13 образцов дали положительный результат в реакции LAMP, что свидетельствует о присутствии целевой последовательности гена *phoA*. Продукты амплификации анализировались методом электрофореза в 1% агарозном геле (рисунок 52).



M – маркер молекулярной массы (размер в парах оснований), NC – отрицательный контроль, PC – положительный контроль, 1–13 – клинические изоляты *E. coli*.

Рисунок 52 – Результаты амплификации методом LAMP для 13 клинических изолятов *E. coli*.

На втором этапе продукты амплификации тестировались с использованием системы CRISPR/MbCas12a. Для анализа применялись crРНК, направленные на две разные мишени гена *phoA* (мишень 1 и мишень 2). Результаты показали, что все 13 клинических изолятов дали отчётливый флуоресцентный сигнал, наблюдаемый уже через 10 минут после начала реакции (рисунок 53).



Реакции CRISPR/MbCas12a на мишени 1 и 2 через 10 и 30 минут. «NC» – отрицательный контроль. «PC» – положительный контроль.

Рисунок 53 – Оценка анализа LAMP-Cas12a на клинических изолятах *E. Coli*

Результаты тестирования клинических изолятов подтвердили, что метод LAMP/CRISPR/MbCas12a способен эффективно идентифицировать ДНК *E. coli* в образцах маститного молока. Флуоресцентный сигнал, генерируемый системой CRISPR/MbCas12a, значительно превышал уровень сигнала в отрицательных контрольных пробах, что свидетельствует о высокой чувствительности и специфичности метода. Наблюдаемая флуоресценция сохранялась как для мишени 1, так и для мишени 2, что указывает на эффективность обеих crРНК. Интенсивность флуоресцентного сигнала для положительных реакций была заметно выше уже через 10 минут после начала реакции, достигая максимума к 30 минутам. Это позволяет использовать данный подход для быстрого скрининга клинических образцов. Полученные данные также показывают, что уровень сигнала не зависит от типа изолята, что подтверждает универсальность метода для идентификации *E. coli* в клинических образцах.

3.6.5. Диагностика *E. coli* с применением иммунохроматографического анализа

Для расширения возможностей обнаружения помимо использования флуоресцентного сигнала в данном исследовании был проведён анализ с применением метода иммунохроматографического анализа. Данный метод основан на колориметрическом обнаружении с использованием наночастиц золота и позволяет осуществлять визуальную идентификацию целевых последовательностей.

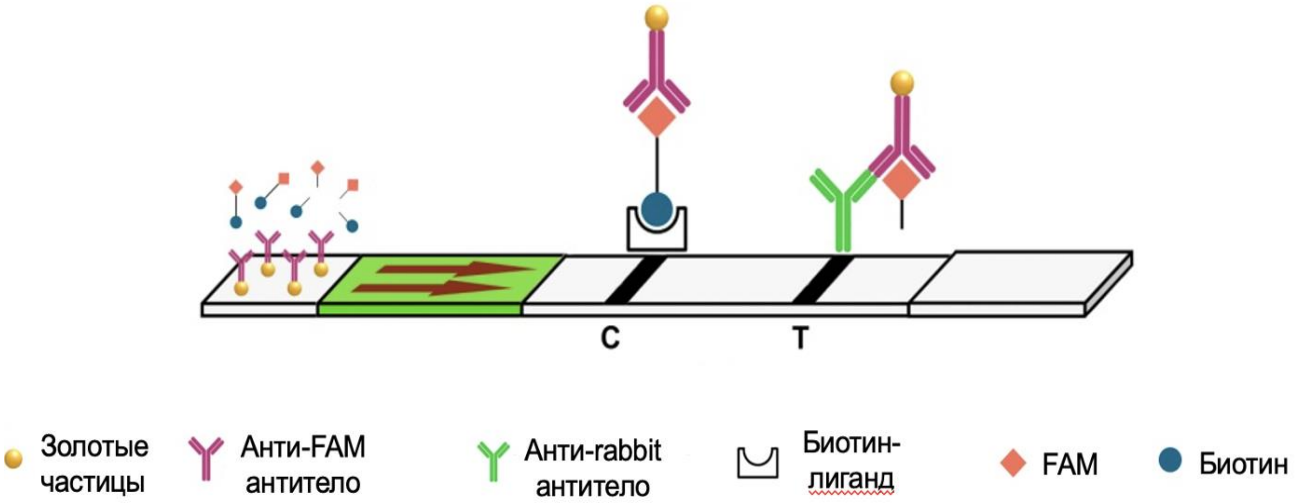


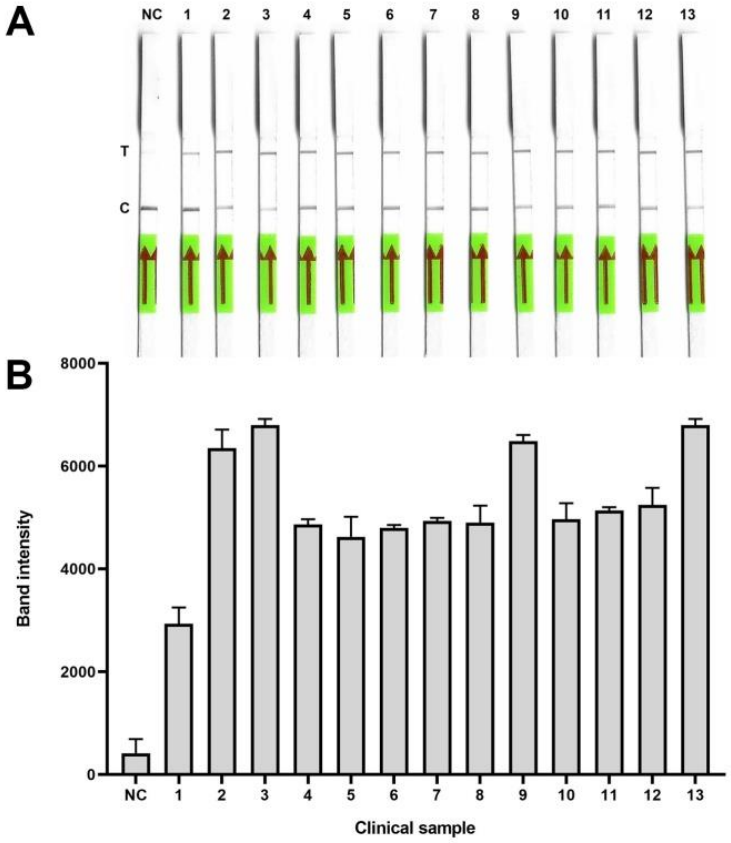
Рисунок 54 – Принцип работы иммунохроматографического анализа.

ИХА реализует механизм латерального потока с использованием репортерной молекулы — зонда одноцепочечной ДНК (оцДНК), который содержит флуоресцентную метку FAM и биотин на 5' и 3' концах соответственно. В процессе анализа оцДНК мигрирует вдоль полоски латерального потока и достигает контрольной линии, на которой иммобилизован стрептавидин. В случае отсутствия расщепления оцДНК на контрольной линии образуется видимая цветная полоса, свидетельствующая об отрицательном результате (рисунок 54).

В ходе исследования была протестирована возможность применения LAMP-CRISPR/MbCas12a в сочетании с ИХА для диагностики *E. coli*. Для анализа использовали продукты реакции LAMP, полученные из 13 клинических изолятов. Следуя протоколу производителя, продукты амплификации наносили на полоски латерального потока.

Положительный результат определялся появлением цветной линии на тестовой линии полоски, что свидетельствовало о наличии целевой последовательности в исследуемом образце. В ходе реакции LAMP ДНК-полимераза амплифицировала последовательность-мишень, образуя большое количество двухцепочечной ДНК (дцДНК). Амплифицированная дцДНК активировала комплекс Cas12a/crРНК, который затем неспецифически расщеплял зонд оцДНК. Накопление расщеплённого зонда приводил к появлению видимой линии на тестовой линии полоски.

Все 13 изолятов дали положительный результат, подтверждая присутствие гена *phoA* в исследуемых образцах (рисунок 55).



(А) Обнаружение 13 клинических изолятов *E. coli* с помощью анализа латерального потока на основе LAMP-CRISPR/MbCas12a. (Б) Графическое представление

Рисунок 55 – Обнаружение с помощью иммунохроматографического анализа.

Результаты экспериментов продемонстрировали эффективность фермента MbCas12a и зонда FAM-TTATTATT-Biotin для расщепления продуктов LAMP и их последующего анализа с использованием полосок латерального потока. Отчётливые цветные линии, наблюдаемые на тестовых полосках, подтверждают возможность применения данного подхода для анализа клинических изолятов.

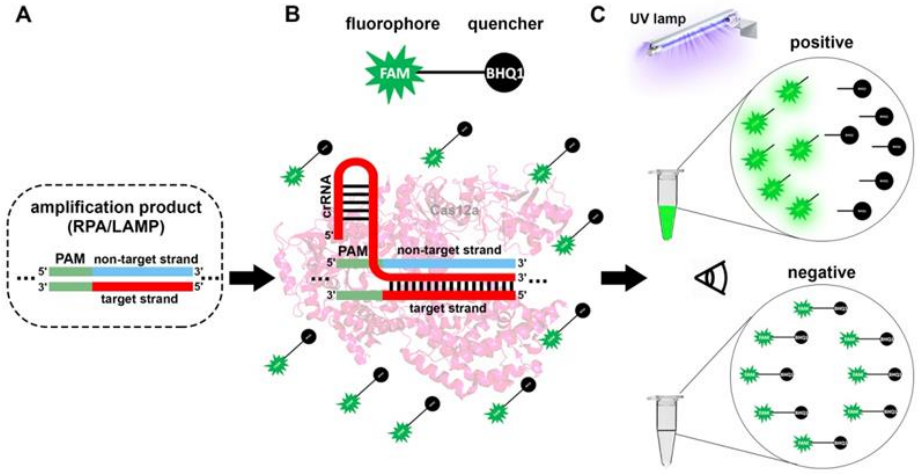
Применение метода иммунохроматографического анализа в сочетании с технологией LAMP-CRISPR/MbCas12a показало высокую эффективность в идентификации *E. coli*. Данный подход позволяет проводить быстрый, визуальный и точный анализ клинических образцов. Также была рассчитана экономическая эффективность молекулярной диагностики, основанной на LAMP-CRISPR/MbCas12a, которая указывает на доступность данного метода (Приложение И). Использование латерального потока в качестве метода детекции делает технологию пригодной для применения в полевых условиях и точечной диагностике, что расширяет возможности диагностики инфекций, вызванных *E. coli*.

3.7 Детекция *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) методом RPA/CRISPR/MbCas12a

В данном исследовании была проведена разработка и внедрение метода диагностики *S. aureus*, основанного на технологии CRISPR/MbCas12a в сочетании с РПА [160, 161].

Предложенный метод основан на комбинированном использовании РПА и CRISPR/MbCas12a, что позволяет повысить чувствительность и специфичность анализа. Диагностический процесс включает два основных этапа. Первый этап — изотермическая амплификация целевого участка генома *S. aureus* методом РПА. Этот метод амплификации позволяет проводить реакцию при постоянной температуре, что упрощает процесс и исключает необходимость использования термоциклеров. На втором этапе амплифицированные продукты служат мишенями для системы CRISPR/MbCas12a. Фермент Cas12a, активируемый присутствием целевой ДНК, проявляет коллатеральную активность, приводящую к расщеплению репортерной молекулы, меченной FAM и BHQ1. Это обеспечивает возможность визуализации результатов с помощью УФ-лампы: положительный результат сопровождается зелёным свечением, тогда как отрицательный остаётся бесцветным.

На рисунке 56 представлена схема работы метода. Продукты РПА с целевой последовательностью распознаются комплексом Cas12a/crРНК, активируются и разрушают репортерную молекулу. Метод демонстрирует высокую точность и чувствительность, что позволяет минимизировать риск ложноположительных результатов. Высокая специфичность системы CRISPR/MbCas12a обусловлена взаимодействием с PAM-последовательностями, что делает данный подход надёжным инструментом для диагностики инфекций, вызванных *S. aureus*.

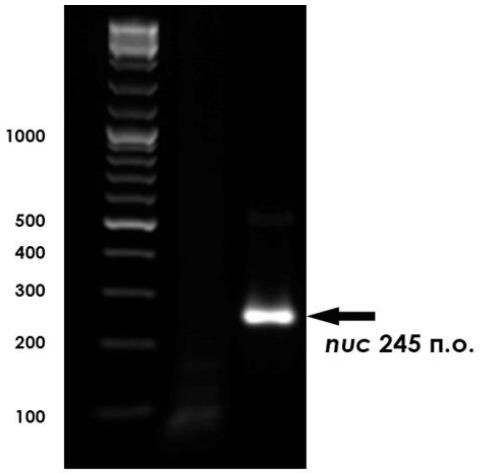


(A) Целевая ДНК амплифицируется методом РПА или LAMP с формированием продукта, содержащего PAM-сайт. (B) Комплекс Cas12a с crРНК связывается с мишенью, активируя транс-разрезание зондов FAM-BHQ1. (C) Результат визуализируется под УФ-лампой: флуоресценция свидетельствует о наличии мишени.

Рисунок 56 – Схема процесса диагностики *S.aureus* методом CRISPR/MbCas12a с использованием LAMP

3.7.1 Подбор генов и оптимальных условий РПА

В рамках работы по разработке метода диагностики *S. aureus* была проведена оптимизация генов-мишеней и условий изотермической амплификации. Амплификация гена *nuc S. aureus* осуществлялась методом ПЦР с использованием геномной ДНК патогена. Идентификацию ПЦР-продукта, с расчётной длиной 253 п.о., проводили методом электрофореза в 1% агарозном геле (рисунок 57).



1000, 500, 400, 300, 200, 100 – маркер молекулярной массы (размер в парах оснований), ген *nuc* размером 245 п.о.

Рисунок 57 – Результат ПЦР-амплификации гена *nuc S. aureus*

Амплифицированные фрагменты ДНК были очищены и клонированы в высококопийный вектор pJET1.2/blunt (Thermo Scientific, США) для дальнейшего использования в исследованиях (рисунок 58).

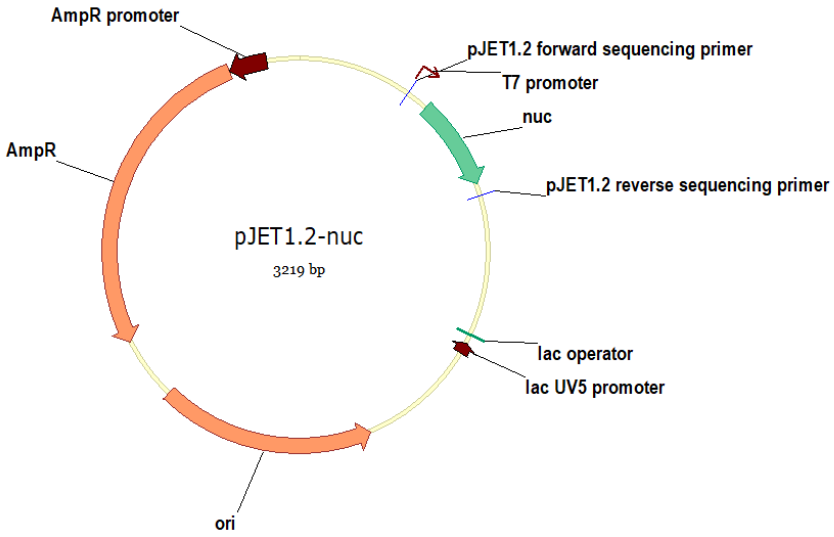
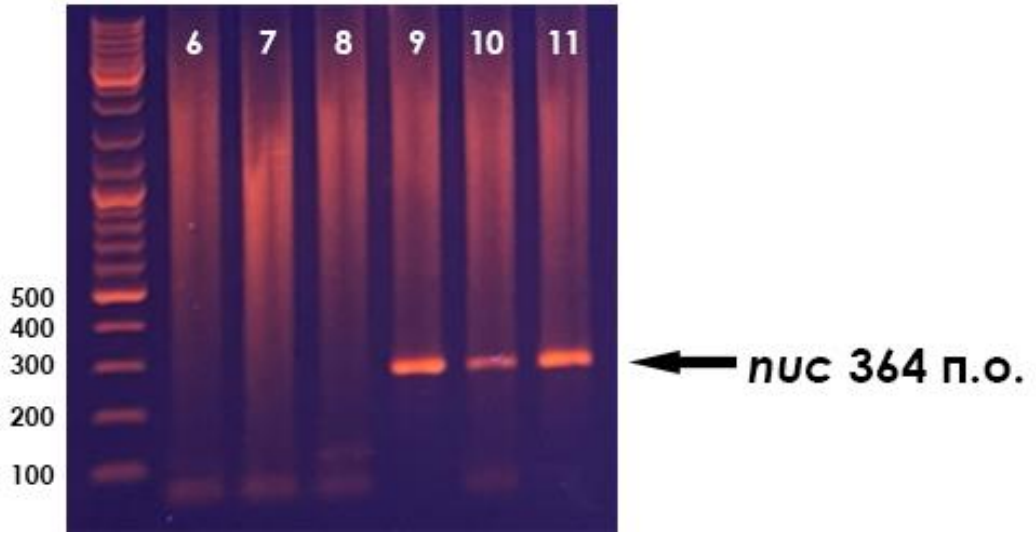


Рисунок 58 – Генетическая конструкция на основе вектора pJET1.2 с клонированной последовательностью гена *nuc*

Для проверки успешности клонирования трансформированные клетки *E. coli* высевались на селективную среду. Колонии, выросшие на питательной среде, тестировались методом ПЦР-скрининга с использованием универсальных праймеров для вектора (pJET1.2 Forward и Reverse). Полученные данные подтвердили наличие вставок целевого гена *nuc* в исследованных колониях (рисунок 59).



500, 400, 300, 200, 100 – маркер молекулярной массы (размер в парах оснований), 6 – 11 ген *nuc* размером 364 п.о.

Рисунок 59 – Результаты ПЦР-скрининга трансформированных клеток, содержащих вектор pJET1.2/blunt с геном *nuc*

Подтверждённые колонии были инокулированы в жидкую ЛБ-среду с добавлением ампициллина (150 мкг/мл) и инкубировались в течение 16 часов при +37°C на шейкере-инкубаторе. После завершения инкубации клетки осаждали центрифугированием при 10,000 g в течение 5 минут. Плазмидная ДНК выделялась с использованием коммерческого набора MiniPrep, достигая концентрации 50-70 нг/мкл. Секвенирование полученных плазмид проводилось с использованием праймеров pJET1.2. Анализ хроматограмм и сравнение последовательностей с референсной базой данных GenBank подтверждали корректность клонирования и идентичность последовательности гена *nuc*. Установленные последовательности использовались для разработки crРНК, направленных на данный ген.

Для изотермической амплификации гена *nuc* был применён набор TwistAmp Basic Kit (TwistDx, Великобритания). Реакционная смесь включала 2,4 мкл 10 мкМ праймеров, 29,5 мкл буфера, не содержащего праймеров, 13,2 мкл матричной ДНК и воду для достижения объёма 47,5 мкл. Лиофилизированный фермент РПА растворяли в 2,5 мкл 280 мМ ацетата магния, после чего смесь инкубировали при 39°C в течение 40 минут.

Проведённая оптимизация условий амплификации гена *nuc* позволила создать надёжные генетические конструкции для использования в диагностических системах на основе технологии CRISPR/MbCas12a. Эти результаты формируют основу для разработки высокочувствительных инструментов диагностики инфекций, вызванных *S. aureus*.

3.7.2 Дизайн crРНК и подбор PAM-участка для точной диагностики гена *nuc* у *S. aureus*

Для точной диагностики гена *nuc* у *S. aureus* был произведен дизайн crРНК, предназначенная для специфического распознавания и образования комплекса с последовательностью-мишенью. Дизайн crРНК включал выбор последовательности PAM (Protospacer Adjacent Motif), необходимой для активации системы CRISPR/MbCas12a. В данном случае использовалась последовательность PAM TTTA, расположенная вблизи целевой области гена *nuc*.

Дизайн и синтез crРНК был направлен на обеспечение высокой специфичности при взаимодействии с целевой последовательностью, что является важным элементом точной и чувствительной диагностики (рисунок 60).

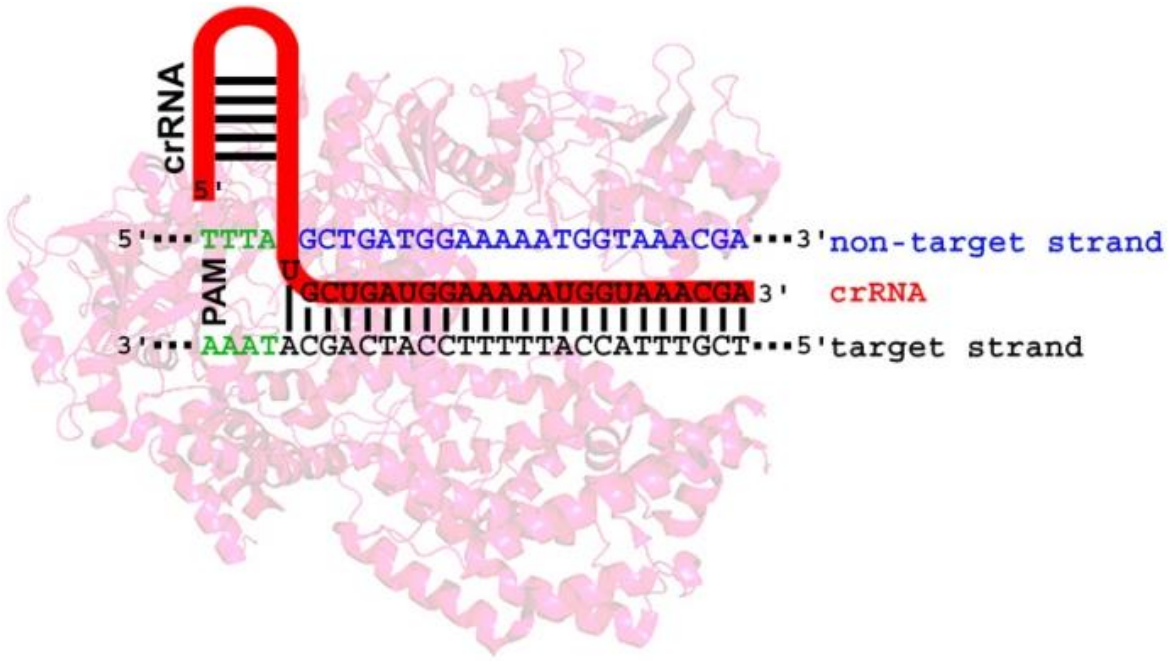


Рисунок 60 – Дизайн crРНК для гена *nuc* с выделением PAM-участка TTTA.

PAM TTTA необходим для активации фермента Cas12a, который способен точно идентифицировать и расщеплять ДНК-мишень. Это свойство позволяет использовать crРНК для эффективного детектирования *S. aureus* в различных образцах.

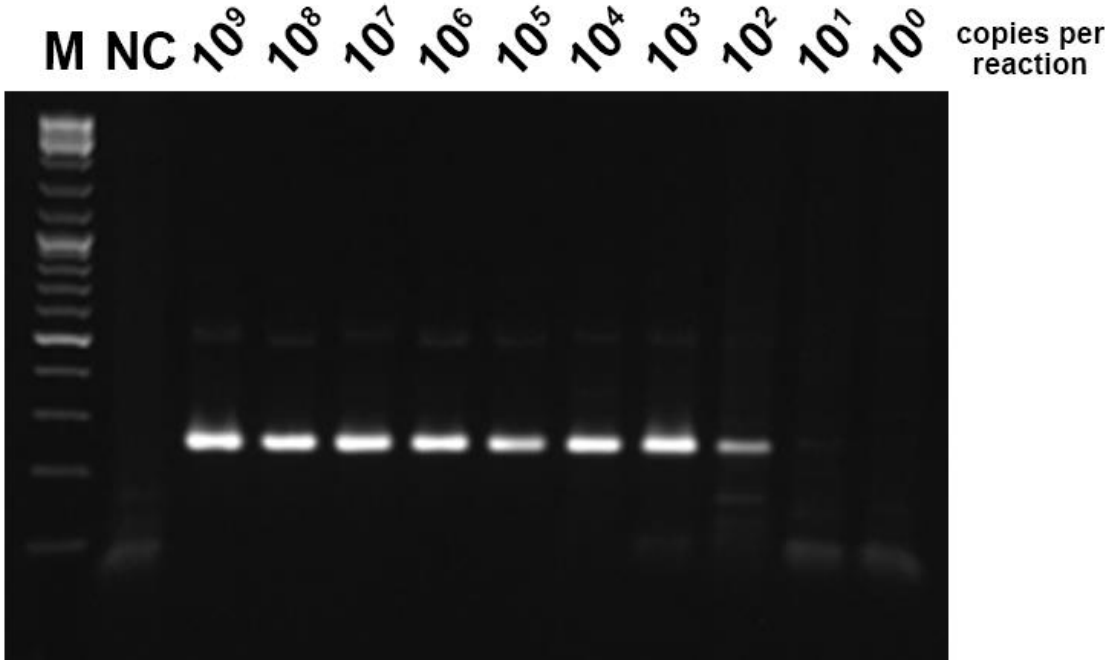
3.7.3 Определение чувствительности *S. aureus* с помощью метода RPA/CRISPR/MbCas12a

Основной целью эксперимента было определение предела обнаружения и чувствительности анализа при использовании оптимизированных условий реакции.

Для амплификации гена *nuc* были использованы специфические праймеры, что позволило определить предел обнаружения и оценить чувствительность метода. Реакции проводились с использованием серийных разведений плазмидной ДНК, содержащей клонированный ген *nuc*, в диапазоне от 10^9 до 10^0 копий на реакцию.

Реакция РПА проводилась с использованием праймеров RPA-NUC-FW (TGGTCCTGAAGCAAGTGCTTTTACGAAAAA) и RPA-NUC-RV (TCTCTTTTTTCGCTTGTGCTTCACTTTTTCTTA) в соответствии с протоколом производителя. В ходе эксперимента гель-электрофорез показал, что продукты амплификации имеют размер 245 п.н., что соответствует ожидаемым значениям для целевой последовательности.

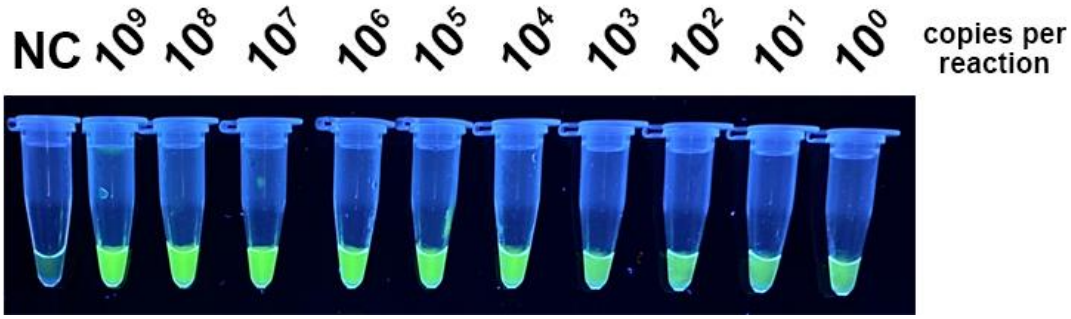
Наблюдение за интенсивностью результатов на геле позволило установить, что уменьшение концентрации исходной ДНК сопровождается снижением интенсивности, что указывает на уменьшение количества амплифицированного продукта (рисунок 61).



M – маркер молекулярной массы, NC – отрицательный контроль. Продукты амплификации гена *nuc* (размер 245 п.н.) видны при различных концентрациях плазмидной ДНК (от 10^9 до 10^0 копий на реакцию).

Рисунок 61 – Результаты гель-электрофореза, демонстрирующие продукты амплификации, полученные методом РПА.

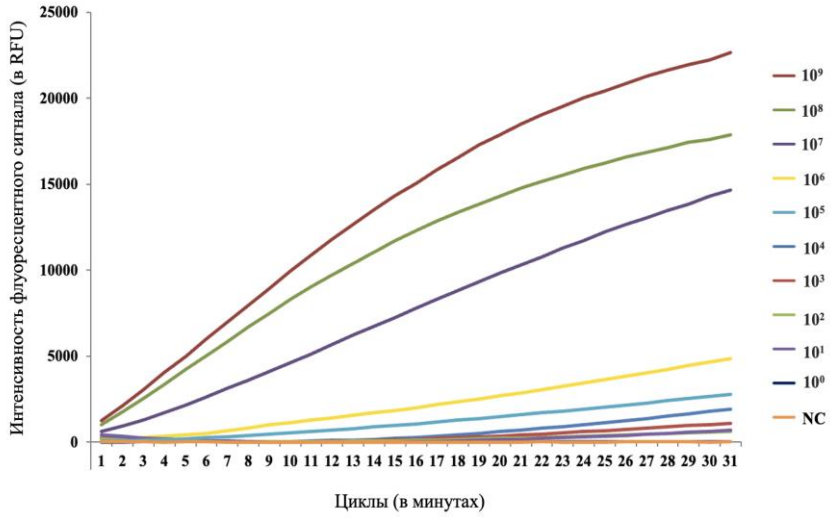
Метод RPA-CRISPR/MbCas12a продемонстрировал способность обнаруживать ген *nuc* при концентрации до 10^2 копий на реакцию (рисунок 62).



На изображении представлены флуоресцентные сигналы, полученные при разных концентрациях плазмидной ДНК с клонированным геном *nuc* (от 10^9 до 10^0 копий на реакцию). NC: отрицательный контроль. Снижение концентрации ДНК сопровождается уменьшением интенсивности сигнала, демонстрируя высокую чувствительность метода и его способность обнаруживать целевой ген при низких концентрациях.

Рисунок 62 – Визуализация результатов анализа RPA-CRISPR/MbCas12a.

Для оценки флуоресцентного сигнала в реальном времени был проведён мониторинг амплификации с использованием RT-флуоресценции (real-time fluorescence detection). Измерение флуоресценции осуществлялось на каждом цикле амплификации, что позволило отслеживать динамику накопления продуктов реакции и подтвердить наличие сигнала даже при низком количестве копий целевой ДНК (рисунок 63).



На изображении представлены флуоресцентные сигналы в реальном времени, полученные при разных концентрациях плазмидной ДНК с клонированным геном *nuc* (от 10^9 до 10^0 копий на реакцию). NC: отрицательный контроль.

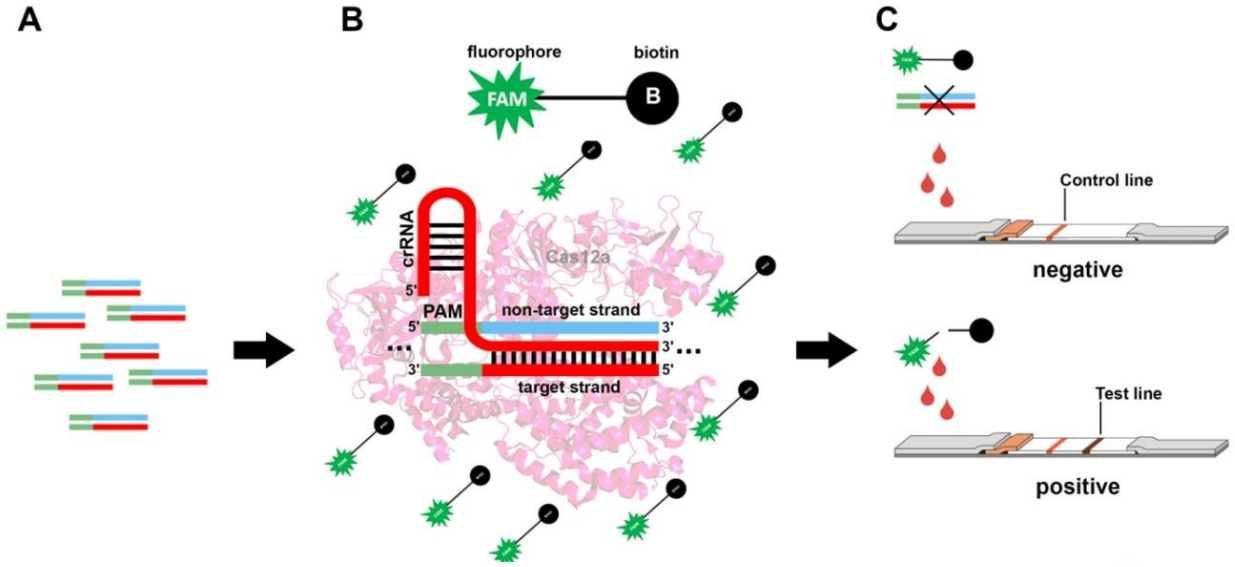
Рисунок 63 – Результаты анализа в реальном времени (RT-флуоресценции) для валидации чувствительности метода.

В отрицательном контроле наблюдалось отсутствие флуоресценции, что подтверждает отсутствие неспецифичной амплификации или детекции. В экспериментальных образцах, напротив, наблюдалось значительное увеличение флуоресцентного сигнала, что подтверждает эффективное распознавание целевого гена.

Для статистической обработки результатов *S. aureus* применён параметрический однофакторный ANOVA. Для *S. aureus* концентрация 100 копий статистически значимо отличалась от отрицательного контроля ($p < 0,05$). Данный результат подчёркивает высокую чувствительность анализа.

3.7.4 Детекция клинических образцов *S. aureus* из маститного молока с использованием метода РПА и CRISPR/MbCas12a-LFA

Для диагностики клинических образцов *S. aureus*, выделенных из маститного молока коров осуществлен с использованием метода РПА и CRISPR/MbCas12a-LFA. Принцип метода RPA-CRISPR/MbCas12a-LFA базируется на последовательности шагов (рисунок 64).



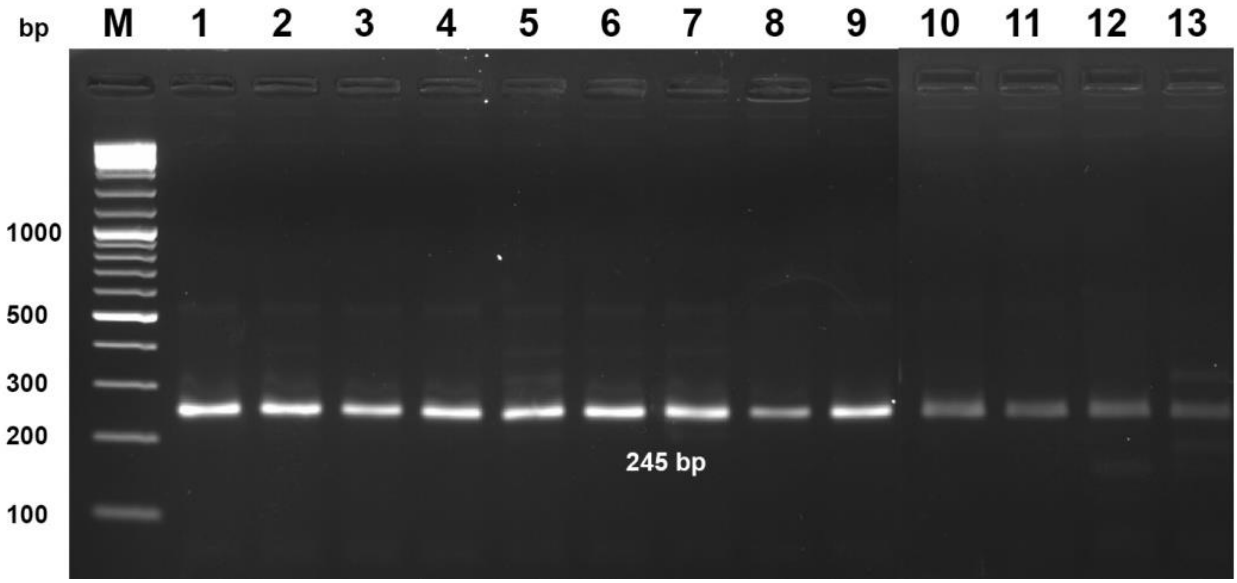
(A) Амплификация мишени методом РПА при 39 °C (40 мин). (B) Активация комплекса Cas12a-crRNA и транс-разрезание репортера. (C) Детекция с помощью ИХА: положительный результат — наличие сигнала на тестовой полосе.

Рисунок 64 – Схема работы метода RPA-CRISPR/MbCas12a-LFA

Сначала в присутствии целевого гена осуществляется амплификация методом РПА, что приводит к образованию продукта амплификации. Затем формируется комплекс, включающий фермент Cas12a, направляющую РНК и продукт амплификации РПА, где репортерная молекула выполняет ключевую функцию. В данном случае одноцепочечный олигонуклеотид, служащий репортером, помечен FAM и биотином на своих 5'- и 3'-концах соответственно. При отрицательном результате отсутствует продукт амплификации, а значит, комплекс Cas12a/crРНК/мишень не формируется. Это предотвращает активацию

транс-активности фермента Cas12a, и репортер остаётся неизменным, что проявляется как видимая линия на контрольной полосе. Положительный результат, напротив, характеризуется расщеплением репортера и образованием линии на тестовой полосе, указывающей на присутствие целевой последовательности.

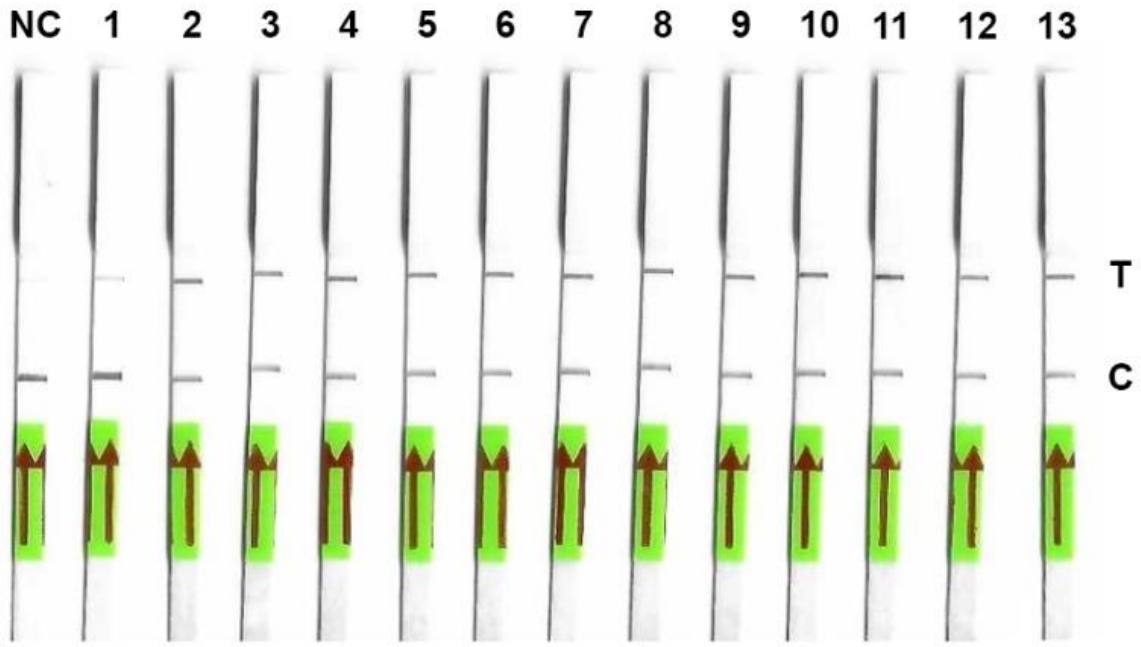
В исследовании использовались 13 образцов, предварительно подтверждённых микробиологическими и масс-спектрометрическими методами. Результаты продемонстрировали эффективность метода, так как во всех образцах был обнаружен специфический продукт амплификации размером 245 п.н. при проведении гель-электрофореза (Рисунок 65). Это подтверждает присутствие гена *nuc* у всех исследованных изолятов *S. aureus*. Продукты реакции РПА из всех 13 изолятов наносились на тест-полоски в соответствии с протоколом производителя. Визуальная оценка сигнала на тестовой полосе подтвердила наличие целевой последовательности во всех исследованных образцах.



М – маркер; 1000, 500, 400, 300, 200, 100 – длина маркера; 1-13 – клинические изоляты

Рисунок 65 – Результаты гель-электрофореза продуктов РПА из клинических образцов *S. aureus*. целевой последовательности во всех образцах

На этапе РПА амплификация целевой последовательности гена *nuc* обеспечила получение продукта размером 245 п.н., который был использован для последующего анализа с использованием ИХА. Продукты реакции РПА из всех 13 изолятов наносились на полоски ИХА в соответствии с протоколом производителя. Визуальная оценка сигнала на тестовой полосе подтвердила наличие целевой последовательности во всех исследованных образцах (рисунок 66).



Тестовые полосы (T) и контрольные полосы (C). Появление полосы на тестовой линии указывает на положительный результат, подтверждающий наличие целевой последовательности гена *nuc* во всех 13 исследованных образцах. Отрицательный контроль (NC) не показывает наличие полосы на тестовой линии, подтверждая отсутствие целевого гена в контрольном образце.

Рисунок 66 – Результаты латерального потокового анализа с использованием продуктов РПА, полученных из клинических изолятов *S. aureus*

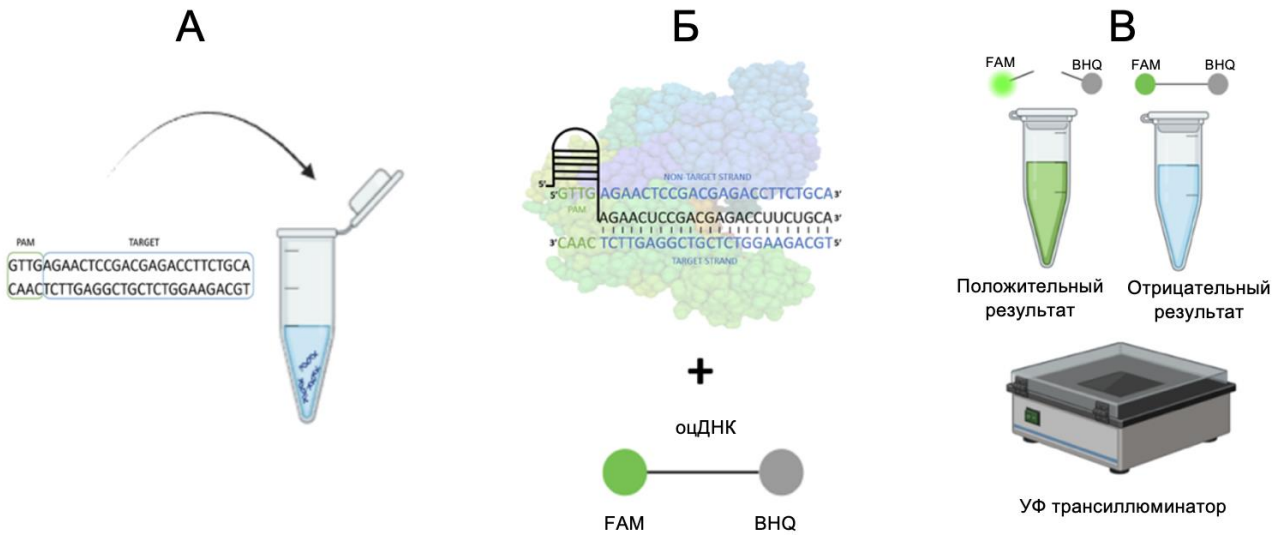
Результаты ИХА анализа для продуктов РПА, дополненные использованием системы CRISPR/MbCas12a, показали высокую надёжность и специфичность метода. Флуоресцентные сигналы, наблюдаемые при положительных результатах, чётко отличались от отрицательных контролей. В условиях эксперимента было установлено, что метод обеспечивает высокую чувствительность даже при низких концентрациях целевого гена. Для визуализации сигнала, связанного с флуоресцентной меткой, использовался источник ультрафиолетового излучения, что подтверждает возможность использования метода как для стандартной лабораторной диагностики, так и для полевых условий.

Таким образом, применение метода RPA/CRISPR/MbCas12a с использованием латерального потокового анализа продемонстрировало высокую эффективность и надёжность в диагностике клинических изолятов *S. aureus* из маститного молока. Возможность выявления целевого гена в реальных клинических образцах подчёркивает значимость данного метода для ветеринарной диагностики. Этот подход открывает перспективы для улучшения диагностики и контроля мастита у коров, обеспечивая доступное, своевременное и точное выявление инфекций (Приложение И).

3.8 Детекция *Alternaria spp.* методом CRISPR/MbCas12a

Цель данного исследования заключалась в разработке метода диагностики *Alternaria spp.*, основанного на технологии CRISPR/MbCas12a, с интеграцией амплификации РПА для специфического выявления грибов, выделенных из образцов зерна пшеницы [162]. Разработанный метод, нацеленный на β-тубулиновый ген, успешно идентифицировал *Alternaria spp.* в течение 20-минутной амплификации РПА, за которой следовала 30-минутная реакция CRISPR/MbCas12a и визуализация результатов.

В настоящем исследовании быда разработана методика диагностики *Alternaria spp.* с использованием технологии CRISPR/MbCas12a в комбинации с РПА. Наш подход основан на высокой специфичности и чувствительности системы RPA/CRISPR/MbCas12a, которая позволяет быстро идентифицировать целевой ген, связанный с патогенностью или видовой принадлежностью. Использование этой технологии обеспечивает точную детекцию фитопатогенов в растениях и зерновых образцах, а также снижает риск их негативного воздействия на здоровье человека и животных. На рисунке 67 представлена поэтапная схема диагностики *Alternaria spp.* методом CRISPR/MbCas12a.



(А) амплификация целевого β-тубулинового гена методом РПА, (Б) активация системы CRISPR/MbCas12a и расщепление целевых продуктов ДНК (В) визуализация результатов диагностики с помощью УФ-трансиллюминатора или тест-полосок методом ИХА.

Рисунок 67 – Схематическое представление этапов диагностики *Alternaria spp.* с использованием метода RPA/CRISPR/MbCas12a.

На первом этапе проводилась амплификация целевого гена β-тубулина с использованием реакции рекомбиназной полимеразной амплификации. Реакция проходила при 37°C в течение 20 минут и позволяла увеличить количество целевых последовательностей экспоненциально. Второй этап включал активацию системы CRISPR/MbCas12a, в которой фермент Cas12a, в присутствии направляющей crРНК, взаимодействовал с продуктом

амплификации. Это приводило к расщеплению репортерных молекул. На завершающем этапе результаты реакции визуализировали с помощью флуоресцентной или колориметрической системы посредством УФ-трансиллюминатора или тест-полосок методом ИХА. Полосы и сигналы указывали на присутствие целевого гена в образце. Данная методология позволяет проводить быструю и высокочувствительную диагностику грибов рода *Alternaria spp.*.

С учётом значительных рисков, связанных с присутствием *Alternaria spp.* в сельскохозяйственных и клинических условиях, своевременная диагностика данных патогенов имеет критическое значение. Разработанный метод RPA/CRISPR/MbCas12a предлагается в качестве эффективного, надёжного и быстрого инструмента для детекции *Alternaria spp.*, пригодного для интеграции в существующие системы мониторинга и диагностики. Данный подход демонстрирует высокий потенциал для повышения эффективности фитосанитарного контроля и минимизации ущерба, вызываемого грибковыми инфекциями.

3.8.1 Выбор штаммов, подбор генов и оптимизация реакции РПА

В рамках настоящего исследования, направленного на разработку высокоспецифичного и воспроизводимого метода молекулярной диагностики грибов рода *Alternaria spp.*, был проведён целенаправленный отбор штаммов фитопатогенных микроорганизмов, обладающих таксономической значимостью и эпидемиологической актуальностью.

В качестве мишени для амплификации и последующей идентификации выбран ген β-tubulin, обладающий высокой степенью консервативности, что делает его надёжным маркёром для межвидовой дифференциации внутри рода *Alternaria*. Благодаря наличию видоспецифичных участков, данный ген широко применяется в молекулярной микологии для разработки высокоспецифичных праймерных систем.

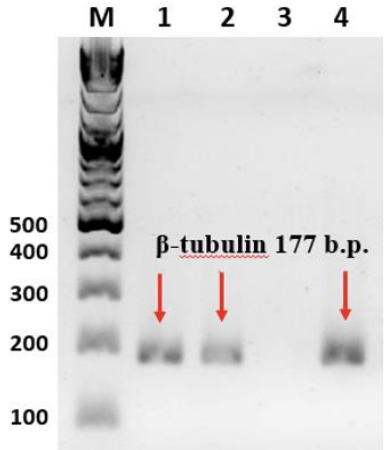
Отбор штаммов осуществлялся с учётом их генетического разнообразия, патогенности и географического происхождения, что обеспечило репрезентативность коллекции и повысило воспроизводимость метода. Для верификации специфичности системы дополнительно были включены штаммы других родов фитопатогенных грибов — *Nigrospora oryzae*, *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium acuminatum*, которые использовались в качестве негативных контрольных образцов. Использование таксономически близких, но неродственных видов критически важно для надёжной оценки специфичности диагностики.

Подробные сведения о применённых штаммах, включая их родовую и видовую принадлежность, а также номера доступа, зарегистрированные в базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI), представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Грибковые штаммы, использованные в данном исследовании

Штаммы	Род/вид	Номер доступа, зарегистрированный в базе данных NCBI.
Разработка и валидация метода		
4/1	*Alternaria* sp.	PQ056909
7/2	*Alternaria* sp.	PQ056910
8/1	*Alternaria* sp.	PQ056911
8/5	*Alternaria* sp.	PQ056912
8/7	*Alternaria* sp.	PQ056913
11/1	*Alternaria* sp.	PQ056914
41/1	*Alternaria* sp.	PQ056915
42/1	*Alternaria* sp.	PQ056916
Тест на чувствительность		
8/1 (гДНК)	*Alternaria* sp.	PQ056911
Тест на специфичность		
22/1	*Nigrospora oryzae*	PQ056917
465	*Bipolaris sorokiniana*	PQ056918
1/3	*Fusarium equiseti*	PQ056919
25/1	*Fusarium acuminatum (Fusarium tricinctum* species complex*)*	PQ056920

Была проведена оптимизация условий амплификации гена β-tubulin. Амплификация гена осуществлялась методом ПЦР с использованием геномной ДНК *A. alternata*. Идентификацию ПЦР-продукта, с расчётной длиной 177 п.н., проводили методом электрофореза в 1% агарозном геле (рисунок 68).



M – маркер; 500, 400, 300, 200, 100 – длина маркера, 1,4 *A. alternata* 2 alternaria infectoria (длина 177 п.н.).

Рисунок 68 – Результат ПЦР-амплификации гена β-tubulin *Alternaria spp*.

Амплификация гена β-tubulin проводилась с использованием метода ПЦР и основе *A. alternata*, выделенного из заражённого образца. Для очистки ПЦР-продуктов использовали ферменты FastAP и ExoI, после чего целевые фрагменты клонировались в вектор pJET1.2/blunt (Thermo Scientific), что обеспечило стабильную конструкцию для последующего использования в диагностических экспериментах (рисунок 69).

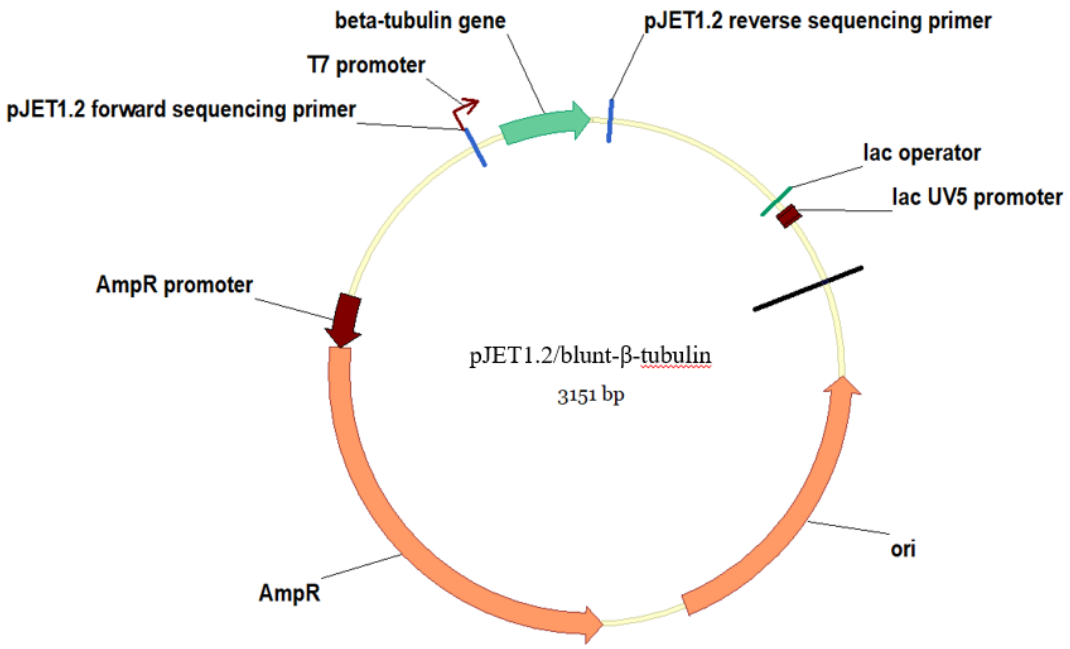


Рисунок 69 – Генетическая конструкция на основе вектора pJET1.2 с клонированной последовательностью β-tubulin

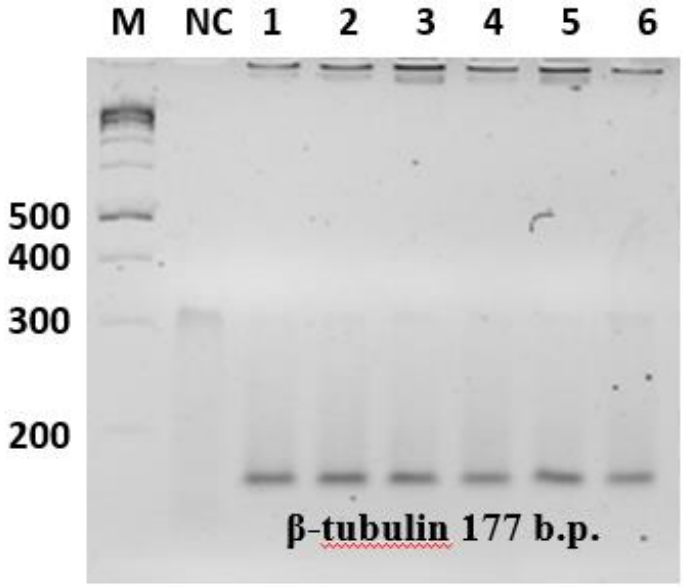
Полученная конструкция была подтверждена методом секвенирования, а последовательность гена сравнивалась с данными NCBI BLAST для подтверждения специфичности.

Полученные ампликоны были подвергнуты секвенированию с использованием универсальных праймеров pJET1.2. Анализ хроматограмм проводился с применением программного обеспечения Vector NTI. Сравнение нуклеотидной последовательности амплифицированного фрагмента с референсной базой данных подтвердило корректность выделения гена β-tubulin.

Для изотермической амплификации гена β-tubulin был использован набор TwistAmp Basic Kit (TwistDx, Великобритания). Реакционная смесь включала следующие компоненты: 2,4 мкл 10 мкМ праймеров Phyto-alt-alt-J-FW (CCTTCCCCCAAGGTCTCCGACACCGTTGTC) и Phyto-alt-alt-J-RV (AACGAGGTGGTTCAGGTCGCCGTAGGAGGG), 29,5 мкл буфера, 13,2 мкл матричной ДНК и воду до общего объёма 47,5 мкл.

Лиофилизированный фермент РПА растворяли в 2,5 мкл 280 мМ ацетата магния. Реакцию проводили при 37°C в течение 20 минут. Продукты

амплификации анализировали методом агарозного гель-электрофореза (рисунок 70).



M – маркер; 500, 400, 300, 200, 100 – длина маркера, 1,3,4,6 *A. alternata* 2,5 *A. infectoria*

Рисунок 70 – Результаты РПА амплификации гена β-tubulin *Alternaria spp*.

Проведённая оптимизация условий амплификации гена β-tubulin позволила создать надежные генетические конструкции для использования в диагностических системах на основе технологии CRISPR/MbCas12a. Эти результаты формируют основу для разработки высокочувствительных инструментов диагностики инфекций, вызванных *A. alternata*.

3.8.2 Дизайн crРНК и выбор PAM-участка для детекции гена *β-tubulin* у *Alternaria spp.*

Для диагностики β-тубулинового гена (TUB2) у *Alternaria spp.* был произведен дизайн crРНК, обеспечивающая высокую специфичность и чувствительность метода CRISPR/MbCas12a.

Процесс дизайна crРНК включал идентификацию протоспейсер-смежного мотива (PAM) и разработку направляющей РНК, которая связывается с целевой последовательностью гена.

Для данной задачи был выбран PAM-сайт с последовательностью GTTG, обнаруженный в области между праймерами, разработанными для реакции рекомбиназной полимеразной амплификации (рисунок 71).

Выбор данного PAM-сайта обусловлен его расположением в оптимальной позиции относительно целевого участка, что обеспечивает эффективную активацию фермента Cas12a и точность распознавания целевой последовательности.

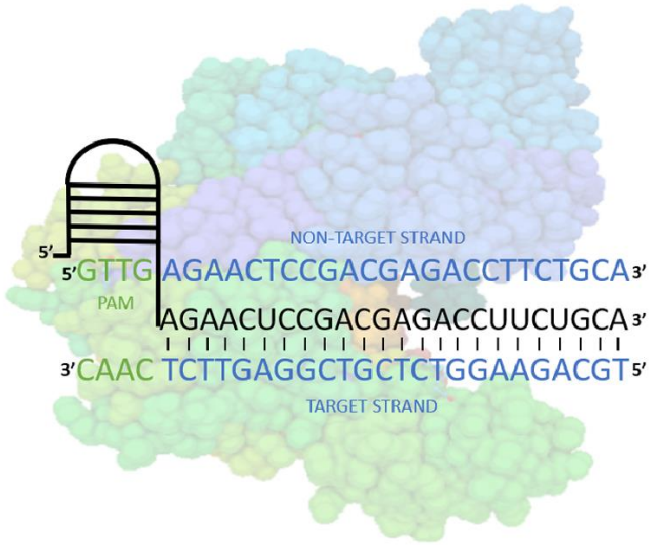


Рисунок 71 – Дизайн crРНК, включающий выбранный PAM-сайт (GTTG), и её взаимодействие с целевой последовательностью β-тубулинового гена (TUB2) у *Alternaria spp.*

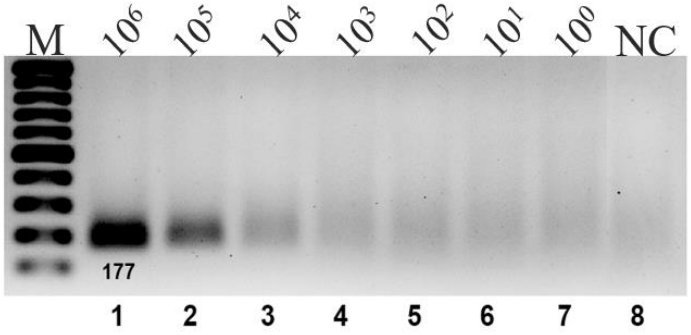
Дизайн crРНК осуществлялся в виде последовательности, строго комплементарной целевому участку следующему за PAM-сайтом, что обеспечивает точность связывания и минимизацию неспецифических взаимодействий. Дизайн направляющей РНК основывался на необходимости минимизации несоответствий и потенциальных неспецифичных взаимодействий. Это позволяет добиться высокой точности работы системы CRISPR/MbCas12a, снижая вероятность ложноположительных результатов.

3.8.3 Определение чувствительности методом RPA/CRISPR/MbCas12a и считывание флуоресценции в реальном времени

Для оценки чувствительности предложенного метода, основанного на технологии РПА и CRISPR/MbCas12a, был проведён анализ гДНК *Alternaria spp*. (штамм 8/1). Эксперимент включал серию разведений гДНК (10-кратные разведения) с начальной концентрацией 42.2 × 10^{-6} нг/мкл, что соответствует диапазону от 1 212 298 до 1,2 копий на мкл, рассчитанных на основе геномного размера *Alternaria spp.* (32,30 Мб). Эксперимент включал этапы изотермической амплификации методом РПА, использование технологии CRISPR/MbCas12a и последующее детектирование флуоресценции.

Изотермическая амплификация осуществлялась с применением набора TwistAmp Basic Kit (TwistDx, Великобритания). Реакционная смесь содержала 2,4 мкл 10 мкМ праймеров Phyto-alt-alt-J-FW (CCTTCCCCCAAGGTCTCCGACACCGTTGTC) и Phyto-alt-alt-J-RV (AACGAGGTGGTTCAGGTCGCCGTAGGAGGG), 29,5 мкл буфера, 13,2 мкл разведённой гДНК, 2,5 мкл 280 мМ ацетата магния и воду для доведения общего объёма до 50 мкл. Реакция проводилась при температуре 37°C в течение 20 минут. Продукты РПА анализировались с использованием 1% агарозного геля, что позволило подтвердить успешность амплификации и соответствие длины

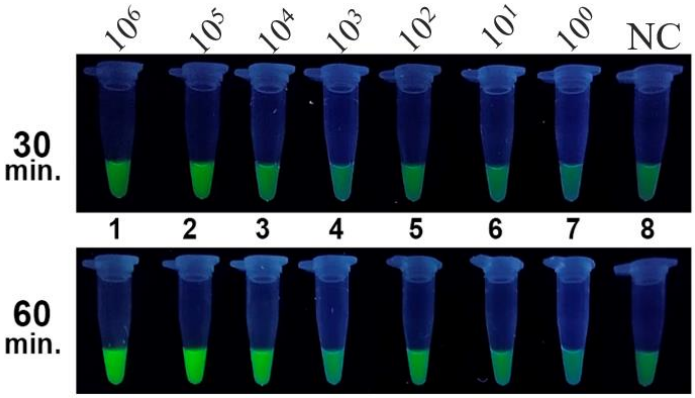
продукта расчётной величине – 177 п.н. На результатах гель-электрофореза чувствительность теста достигала 10^{-4}, что соответствует приблизительно 1212 копиям ДНК (рисунок 72).



M – маркер; NC – отрицательный контроль, 10^6 – 10^0 разведения ДНК гена *β-tubulin Alternaria spp.*

Рисунок 72 – Анализ продуктов РПА-амплификации гена *β-tubulin Alternaria spp.* на различных разведениях от 1 212 298 до 1,2 копий/µl геномной ДНК.

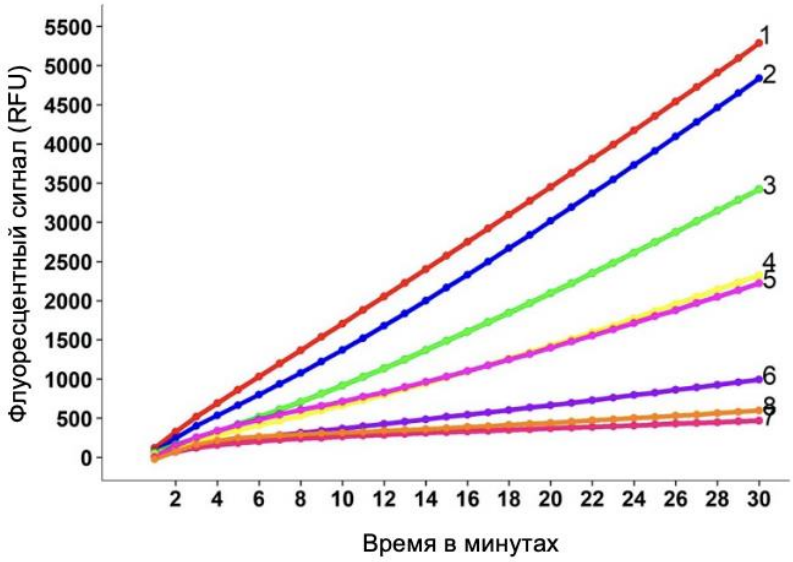
Ампликоны РПА подвергались дальнейшему анализу с использованием системы CRISPR/MbCas12a. Реакционная смесь включала MbCas12a, crРНК, флуоресцентно-меченный репортерный зонд (FAM-reporter-5-BHQ-1, TTATT) и 3 мкл ампликона РПА. Комплекс Cas12a-crRNA предварительно инкубировался при 25°C в течение 15 минут для активации, после чего добавлялся репортерный зонд. Образцы инкубировались при 37°C в течение 60 минут, что позволило получить максимальный флуоресцентный сигнал. Результаты флуоресцентного анализа показали положительный сигнал до разведения 10^{-5}, что соответствует 121 копии ДНК (рисунок 73).



Образцы 1–8 представляют собой 10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} разведения геномной ДНК *Alternaria spp.*, а также отрицательный контроль (вода).

Рисунок 73 – Результаты флуоресцентного анализа продуктов RPA/CRISPR/MbCas12a для гена *β-tubulin Alternaria spp*. с разведениями геномной ДНК от 1 212 298 до 1,2 копий/µl.

Для подтверждения результатов и оценки динамики флуоресцентного сигнала был проведён RT-флуоресцентный анализ в термоциклере C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, Сингапур). Программа RT-флуоресценции состояла из 30 циклов, включающих 50-секундное измерение сигнала и 10-секундный интервал для анализа. В результате было установлено, что метод способен обнаруживать целевой ген до концентрации 121 копии ДНК, подтверждая результаты, полученные с помощью гель-электрофореза и стандартного флуоресцентного анализа (рисунок 74).



Образцы 1–8 представляют собой 10^{0}, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} разведения геномной ДНК *Alternaria spp.,* а также отрицательный контроль (вода). Интенсивность флуоресцентного сигнала, выраженная в относительных единицах флуоресценции (RFU), увеличивается с числом циклов, демонстрируя экспоненциальную амплификацию и детекцию целевого гена *β-tubulin*.

Рисунок 74 – Результаты анализа в реальном времени (RT-флуоресценции) для валидации чувствительности метода.

Анализ чувствительности продемонстрировал, что предложенный метод обладает высоким уровнем точности и чувствительности. Установленный предел обнаружения, составляющий менее 100 копий ДНК, позволяет применять данный подход для ранней диагностики *Alternaria spp.* до появления визуальных симптомов инфекции. Это особенно важно для сельскохозяйственного сектора, так как своевременное выявление патогена может минимизировать экономические потери, связанные с заражением растений.

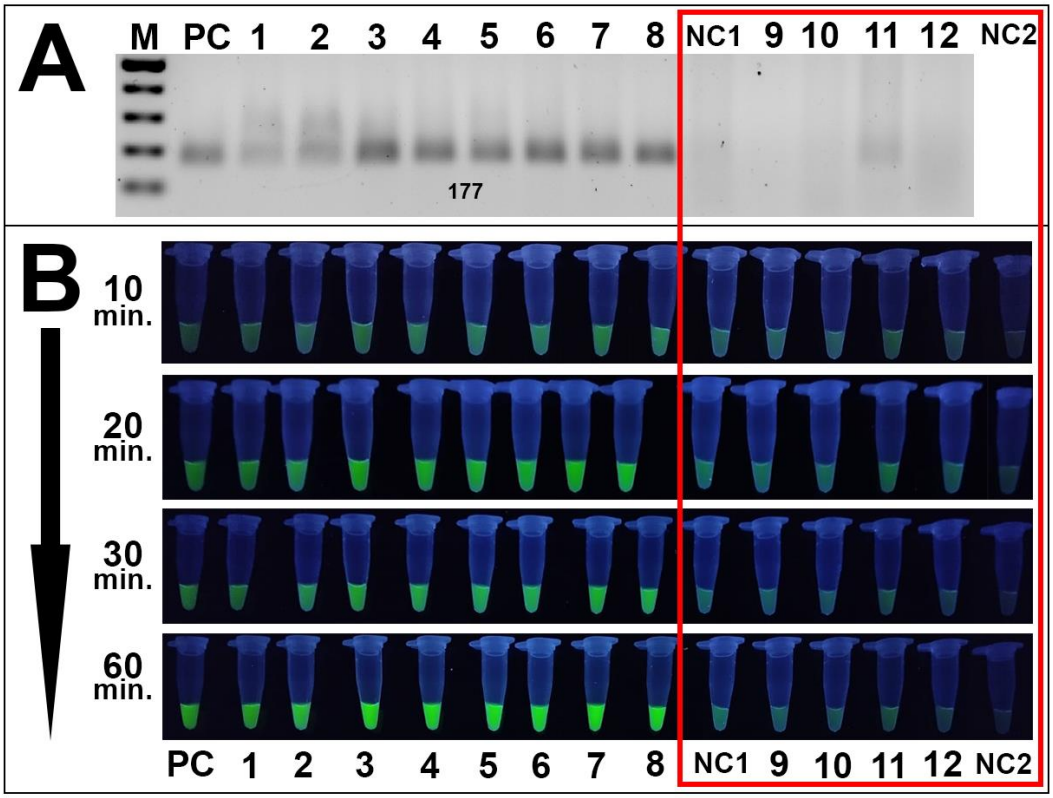
Статистический анализ результатов тридцатого цикла количественного флуоресцентного анализа в реальном времени показал, что образцы с количеством ДНК более 1 миллиона копий (исходные и разведение 10^{-1}) существенно отличаются от остальных разведенных образцов ($p < 0,05$). Кроме того, разведенные образцы с содержанием до 100 копий ДНК также существенно отличаются ($p < 0,05$) от образцов с более низким содержанием ДНК, включая

отрицательный контроль. Таким образом, результаты дисперсионного анализа (ANOVA) дополнительно подтвердили чувствительность нашего метода до 100 копий.

Таким образом, использование метода RPA/CRISPR/MbCas12a с интеграцией RT-флуоресцентного анализа демонстрирует свою эффективность как инновационного инструмента диагностики фитопатогенов. Высокая чувствительность, простота выполнения и возможность применения в условиях полевых исследований делают данный подход перспективным для широкого использования в аграрной и клинической практике.

3.8.4 Определение специфичности методом RPA/CRISPR/MbCas12a

Для оценки специфичности разработанного метода диагностики на основе технологии CRISPR/MbCas12a были проведены эксперименты с применением штаммов грибов рода *Alternaria* и представителей других родов (рисунок 75).



(A) гель-электрофорез продуктов амплификации РПА (репликационно-зависимой амплификации) грибных штаммов, выделенных из зерна. Обозначения: PC – положительный контроль (плазмидная ДНК); 1–8 – ДНК штаммов *Alternaria* 4/1, 7/2, 8/1, 8/5, 8/7, 11/1, 41/1 и 42/1 соответственно; NC1 – отрицательный контроль (DEPC-H_2O для амплификации РПА); 9–12 – ДНК штаммов *Bipolaris sorokiniana* 465, *Nigrospora oryzae* 22/1, *Fusarium equiseti* 1/3 и *Fusarium acuminatum* 25/1. (B) Визуализация результатов с использованием флуоресцентного анализа, NC2 – дополнительный отрицательный контроль (DEPC-H_2O для флуоресцентного анализа). Отрицательные контроли и виды, не относящиеся к *Alternaria*, выделены красным. Инкубация проводилась в течение 10, 20, 30 и 60 минут.

Рисунок 75 – Результаты оценки специфичности метода CRISPR/MbCas12a

Анализу подверглись шесть новых изолятов *Alternaria* (4/1, 7/2, 8/7, 11/1, 41/1 и 42/1), а также два ранее исследованных штамма (8/1 и 8/5), что позволило определить способность метода к точному распознаванию целевых последовательностей гена β-тубулина.

Эксперименты включали амплификацию ДНК всех изолятов методом рекомбинантной полимеразной амплификации. Ампликоны анализировались с помощью гель-электрофореза и флуоресцентного анализа для подтверждения успешного выделения целевых последовательностей. Дополнительно в эксперименты включены штаммы *Bipolaris sorokiniana* 465, *Fusarium acuminatum* (комплекс *Fusarium tricinctum*) 25/1, *Fusarium equiseti* 1/3 и *Nigrospora oryzae* 22/1. Амплификация их ДНК также проводилась методом РПА с последующим анализом полученных ампликонов.

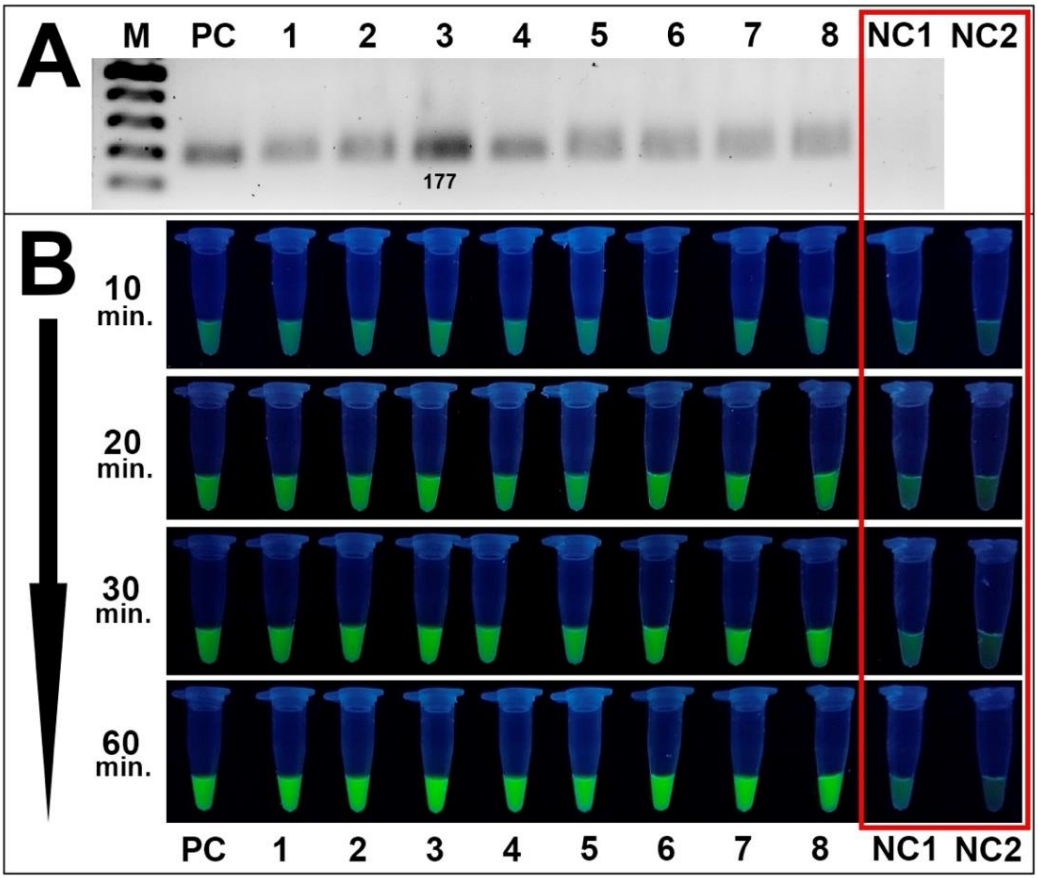
Результаты гель-электрофореза выявили наличие ампликонов ожидаемого размера (177 пар оснований) исключительно в образцах, содержащих ДНК *Alternaria spp.*, что подтверждает специфичность амплификации (рисунок 74А). В образцах, содержащих ДНК других родов грибов, ампликоны отсутствовали. Флуоресцентный анализ продемонстрировал сигналы только в реакциях с ДНК *Alternaria spp.*, что дополнительно подтверждает высокую специфичность метода (рисунок 74В).

Проведенные исследования продемонстрировали надежность метода RPA/CRISPR/MbCas12a в идентификации *Alternaria spp*. и его высокую специфичность по отношению к целевым последовательностям β-тубулинового гена. Это делает предложенный подход перспективным инструментом для использования в сельском хозяйстве, фитопатологии и биотехнологиях для точной и быстрой диагностики фитопатогенных грибов, вызывающих заражение зерновых культур.

3.8.5 Детекция образцов *Alternaria spp.* из зараженной пшеницы методом RPA/CRISPR/MbCas12a

Для анализа изолятов *Alternaria spp.* из зараженной пшеницы было выделено 12 грибных штаммов с различной морфологией из образцов зерна пшеницы и ячменя, собранных на территории Северного Казахстана. Предварительная идентификация проводилась методом визуального осмотра морфологических характеристик и микроскопического анализа выделенных штаммов.

Морфология грибов рода *Alternaria* характеризуется наличием типичных признаков, включая принадлежность к гифомицетам, образование темноокрашенных многоклеточных конидий. Из 12 выделенных штаммов для дальнейшего анализа были отобраны восемь изолятов, морфологические характеристики которых соответствовали типичным признакам грибов рода *Alternaria* (рисунок 76).



(A) гель-электрофорез продуктов амплификации РПА
(B) Визуализация результатов с использованием флуоресцентного анализа, NC2 – дополнительный отрицательный контроль (DEPC-H_2O для флуоресцентного анализа). Отрицательные контроли и виды, не относящиеся к *Alternaria*, выделены красным. Инкубация проводилась в течение 10, 20, 30 и 60 минут.

Рисунок 76 – Валидация метода CRISPR/MbCas12a для детекции штаммов Alternaria, выделенных из зерновых образцов пшеницы.

На рисунке 75A представлены результаты амплификации восьми штаммов *Alternaria* методом рекомбинантной полимеразной амплификации, проанализированные с использованием гель-электрофореза. Обозначения: PC — положительный контроль (плазмидная ДНК); образцы 1–8 соответствуют штаммам *Alternaria* 4/1, 7/2, 8/1, 8/5, 8/7, 11/1, 41/1 и 42/1, соответственно; NC1 — отрицательный контроль, содержащий DEPC-H_2O, добавленный в реакцию амплификации РПА. Лестница молекулярных маркеров представлена маркером SM033 (Thermo Fisher Scientific), что позволило подтвердить соответствие полученных продуктов ожидаемым размерам. На рисунке 75B продемонстрированы результаты флуоресцентного анализа, адаптированного для использования в полевых условиях (on-site detection). Порядок расположения образцов соответствует изображенному на рисунке 1A. Образец NC2 использовался в качестве дополнительного отрицательного контроля (DEPC-

H_2O, добавленное в флуоресцентную реакцию). Отрицательные контроли выделены красным прямоугольником для наглядности.

Флуоресцентный анализ проводился в условиях инкубации при временных интервалах 10, 20, 30 и 60 минут, что позволило отследить динамику накопления флуоресцентного сигнала. Наблюдалось последовательное увеличение интенсивности сигнала во времени, что подтверждает возможность использования данного метода для быстрой и чувствительной детекции целевых последовательностей в клинических и полевых условиях.

Эти восемь штаммов использовались для детекции методом RPA/CRISPR/MbCas12a, что позволило подтвердить их принадлежность к роду *Alternaria* на основе анализа целевых последовательностей гена β-тубулина. Данный подход позволил обеспечить надежную идентификацию изолятов *Alternaria spp.* с использованием как морфологических методов, так и молекулярных подходов.

3.9 Портативное устройство CRISPR-Kaz для флуоресцентной визуализации и детекции патогенов

CRISPR-Kaz представляет собой портативное устройство, разработанное для детекции патогенов с использованием флуоресцентной визуализации на основе технологии CRISPR/MbCas12a (рисунок 77). CRISPR-Kaz ориентирован на использование в условиях ограниченной инфраструктуры, включая полевые исследования и лаборатории с минимальным оборудованием.

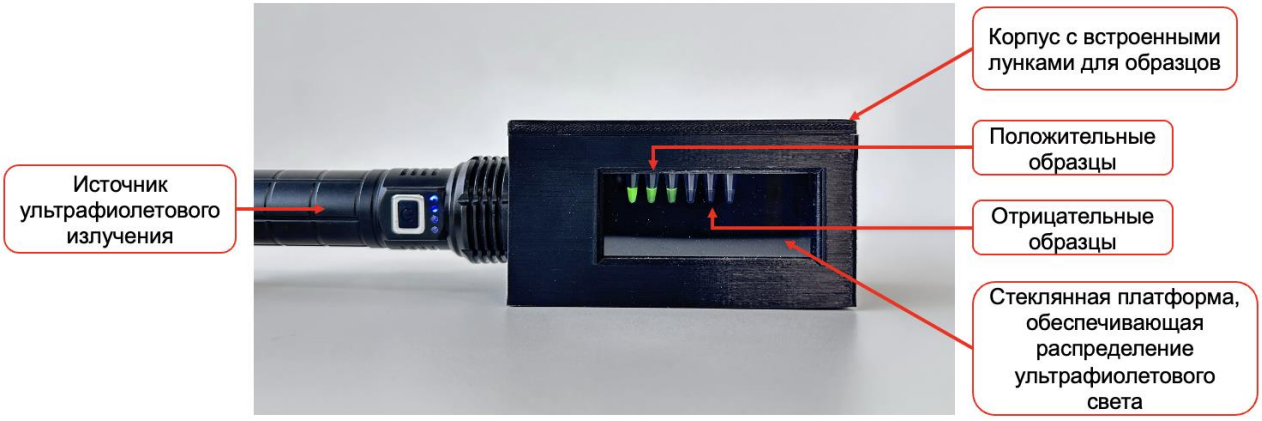


Рисунок 77 – Портативное устройство CRISPR-Kaz для флуоресцентной визуализации.

Устройство состоит из корпуса, изготовленного методом 3D-печати из пластика, который включает лунки, адаптированные для стандартных пробирок. Стеклянная платформа обеспечивает равномерное распределение ультрафиолетового света, который поступает от встроенного УФ-фонарика. Такой дизайн делает CRISPR-Kaz лёгким, компактным и удобным в эксплуатации.

3.10 Результаты статистического анализа

Для оценки чувствительности методов RPA/CRISPR-Cas12a и LAMP/CRISPR-Cas12a был проведён статистический анализ с использованием одностороннего дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Анализ выполнялся в программной среде R (версия 4.3.1) с использованием интерфейса RStudio. Перед применением ANOVA проверялись статистические допущения, включая нормальность распределения остатков и гомогенность дисперсий. В случаях, когда данные не удовлетворяли требованиям параметрического анализа, применялся непараметрический критерий Крускала–Уоллиса. При наличии статистически значимых различий ($p < 0.05$) проводились пост-хок попарные сравнения с использованием теста Тьюки (Tukey's HSD).

Результаты статистического анализа чувствительности разведений плазмдной ДНК *E. Coli* выполнены с использованием языка программирования R (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты статистического анализа чувствительности разведений плазмдной ДНК E. Coli

Группа	Среднее значение	Стат. группа
origin	44.00	a
V101	40.67	b
V102	38.33	b
V103	35.00	c
V104	32.00	d
V105	28.67	e
V106	26.00	f
V107	23.00	g
V108	20.33	h
V109	17.00	i
V110	14.00	j
V111	11.00	k
V112	8.00	l
W-NC-LAMP	4.00	m
W-NC	3.00	m

Для данных, относящихся к определению плазмидной ДНК *E. coli*, был применён непараметрический дисперсионный анализ Крускала–Уоллиса, поскольку распределение данных не соответствовало нормальному. Результаты показали, что все разведения статистически значимо различаются между собой ($p < 0,05$). Кроме того, разведения, соответствующие единичным копиям, достоверно отличаются от отрицательных контролей ($p < 0,05$) (рисунок 78).

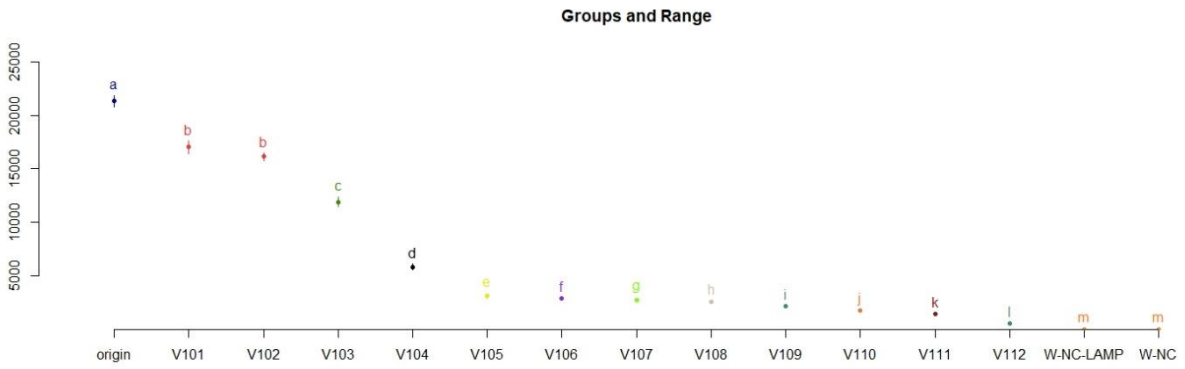


Рисунок 78 – Результаты статистического анализа чувствительности разведений плазмидной ДНК E. coli

Результаты статистического анализа чувствительности разведений геномной ДНК *E. Coli* выполнены с использованием языка программирования R (таблица 6).

Таблица 6 – Результаты статистического анализа чувствительности разведений геномной ДНК *E. coli*

Группа	Среднее значение	Стат. группа
origin	34.00	a
V101	32.67	a
V102	29.33	b
V103	26.00	c
V104	23.00	d
V105	20.00	e
V106	17.00	f
V107	14.00	g
V108	11.00	h
V109	8.00	i
W-NC	5.00	j
W-NC-LAMP	2.00	k

В случае определения геномной ДНК *E. coli* также был использован критерий Крускала–Уоллиса. Анализ показал, что между образцами origin и разведением 10^{-1} статистически значимых различий не наблюдается. Однако все остальные разведения достоверно отличаются друг от друга ($p < 0,05$). Также разведение, соответствующее 10 копиям, статистически значимо отличается от отрицательных контролей ($p < 0,05$) (рисунок 79).

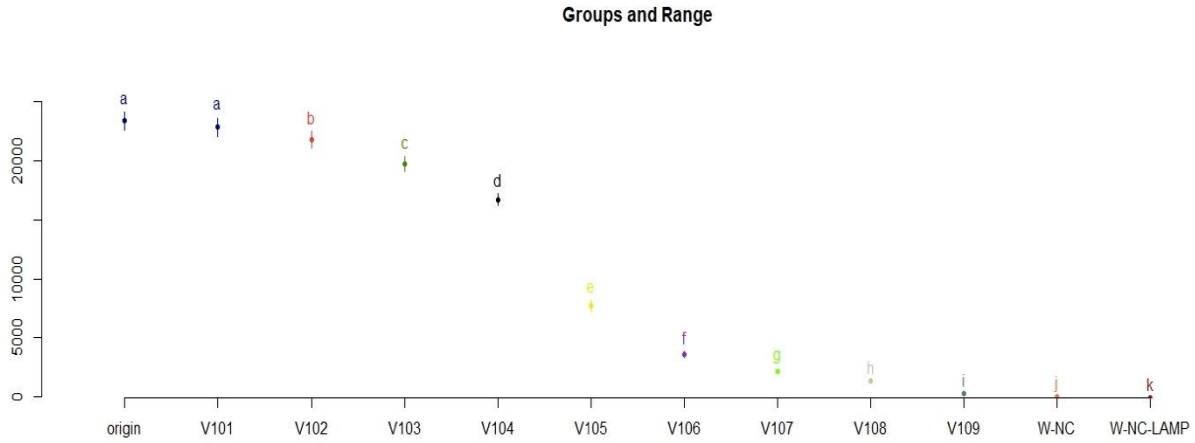


Рисунок 79 – Результаты статистического анализа чувствительности разведений геномной ДНК *E. coli*

Результаты статистического анализа чувствительности разведений плазмидной ДНК *S. aureus* выполнены с использованием языка программирования R (таблица 7).

Таблица 7 – Результаты статистического анализа чувствительности разведений плазмидной ДНК *S. aureus*

Группа	Среднее значение	Стат. группа
origin	22280.91	a
V101	17629.48	b
V102	14262.76	c
V103	4647.86	d
V104	2640.49	e
V105	2640.49	e
V106	1776.02	f
V107	1015.92	g
V109	617.62	g
V108	582.53	gh
W-NC	1.52	h

Для анализа плазмидной ДНК *S. aureus* использовался параметрический дисперсионный анализ (однофакторный ANOVA). Выявлены достоверные различия между всеми основными группами. Также установлено, что образцы, содержащие 100 копий ДНК, статистически значимо отличаются от отрицательного контроля ($p < 0,05$) (рисунок 80).

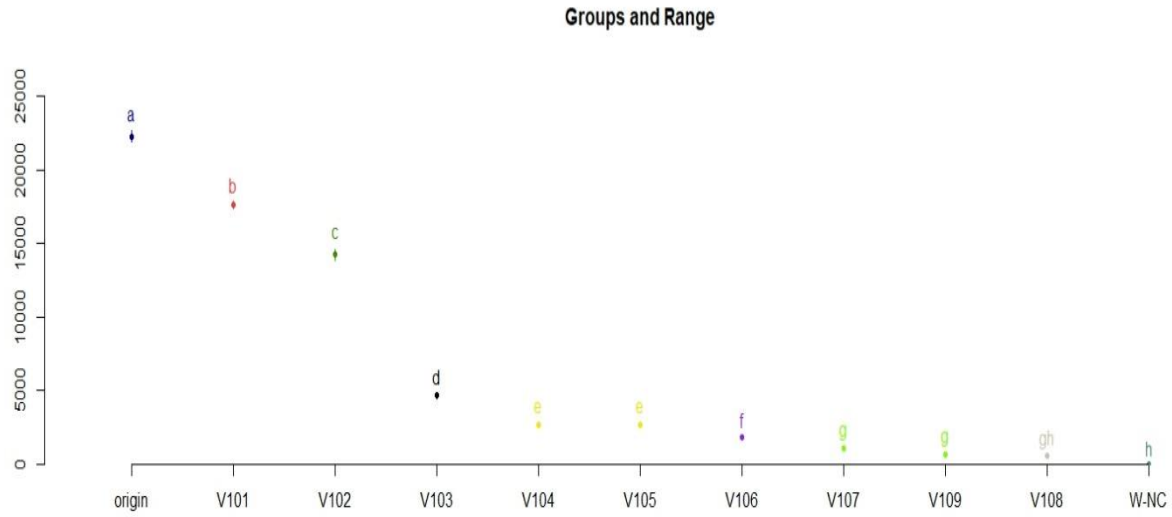


Рисунок 80 – Результаты статистического анализа чувствительности разведений плазмидной ДНК *S. aureus*

Результаты статистического анализа чувствительности разведений геномной ДНК *Alternaria spp.* выполнены с использованием языка программирования R (таблица 8).

Таблица 8 – Результаты статистического анализа чувствительности разведений геномной ДНК *Alternaria spp.*

Группа	Среднее значение	Стат. группа
Origin	5287.93	a
V101	4838.61	a
V102	3419.90	b
V104	2374.69	c
V103	2178.91	c
V105	993.19	d
RPA	598.66	d
V106	468.97	d

Параметрический однофакторный дисперсионный анализ показал, что образцы с количеством ДНК более 1 миллиона копий (исходные и разведение 10^{-1}) статистически значимо отличаются от всех последующих разведений ($p<0,05$). Также образцы с содержанием до 100 копий ДНК достоверно различаются между собой и от образцов с более низким содержанием ДНК, включая отрицательный контроль ($p<0,05$) (рисунок 81). Это подтверждает чувствительность метода вплоть до 100 копий.

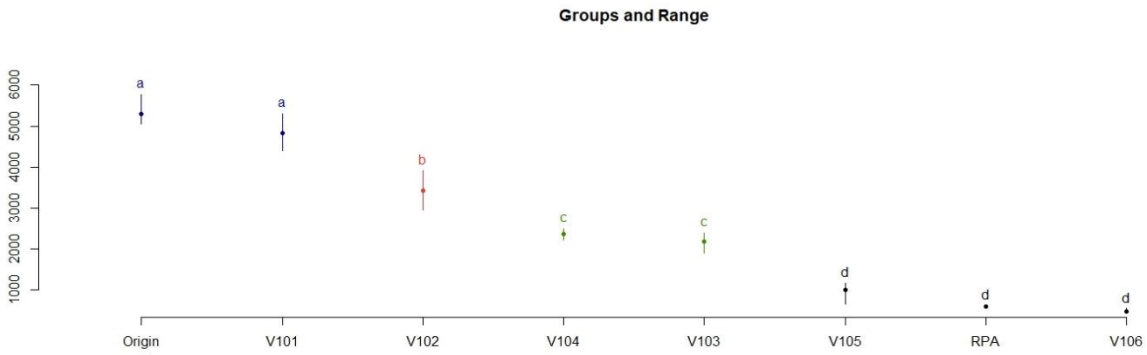


Рисунок 81 – Результаты статистического анализа чувствительности разведений геномной ДНК *Alternaria spp.*

Статистическая обработка денситометрических данных, полученных при идентификации активных центров ферментов MbCas12a и MeCas12a, а также при оптимизации условий биохимических реакций (включая подбор длины таргетной области, ручки crРНК и PAM-последовательностей), проводилась с использованием программы Microsoft Excel. При необходимости, для сравнения экспериментальных групп применялись односторонний дисперсионный анализ (one-way ANOVA) или непараметрический критерий Крускала–Уоллиса, в зависимости от соответствия данных критериям нормальности распределения и гомогенности дисперсий.

Статистические данные денситометрического анализа, проведённого для оценки активности мутантных форм MbCas12a и MeCas12a с заменами в предполагаемых активных центрах, представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Результаты статистического анализа идентификации активных центров MbCas12a и MeCas12a

MbCas12a		
Вариант	Среднее значение	Стандартное отклонение
MbCas12aD1218A	17.70	1.23
MbCas12aD874A	0.00	0.00
MbCas12aE968A	0.00	0.00
MbCas12aR1181A	0.00	0.00
MbCas12aWT	88.70	1.08
MeCas12a		
Вариант	Среднее значение	Стандартное отклонение
MeCas12aD1218A	14.80	0.79
MeCas12aD874A	0.00	0.00
MeCas12aE968A	0.00	0.00
MeCas12aR1181A	0.00	0.00
MeCas12aWT	91.40	1.15

Результаты анализа выявили статистически значимые различия между исследуемыми вариантами ($p<0,05$; метод: однофакторный дисперсионный анализ, ANOVA), что указывает на достоверное влияние мутаций в каталитических центрах на активность MbCas12a. По результатам дисперсионного анализа ($p<0,05$; метод: однофакторный ANOVA) установлены статистически значимые различия между вариантами, что подтверждает влияние модификаций активных центров на функциональную активность MeCas12a (рисунок 82).

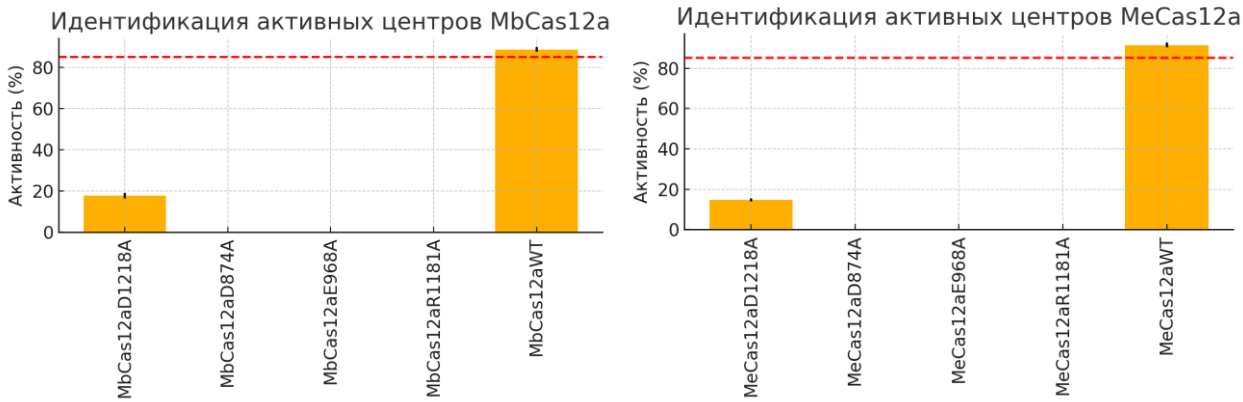


Рисунок 82 – Результаты статистического анализа идентификации активных центров MbCas12a и MeCas12a

Статистические данные денситометрического анализа, проведённого для оптимизации биохимической реакции по концентрации crРНК для MbCas12a, представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты статистического анализа оптимизации биохимической реакции по концентрации crРНК для MbCas12a

Вариант	Среднее значение	Стандартное отклонение
crRNA_1uM	87.10	1.95
crRNA_250nM	23.50	1.95
crRNA_2uM	90.70	1.95
crRNA_500nM	59.80	1.95
crRNA_5uM	97.10	1.95
crRNA_Control	0.00	0.00

Анализ показал достоверные различия между вариантами crРНК ($p<0,05$; метод: однофакторный ANOVA), что свидетельствует о значимом влиянии концентрации crРНК на эффективность ферментативной активности Cas12a (рисунок 83).

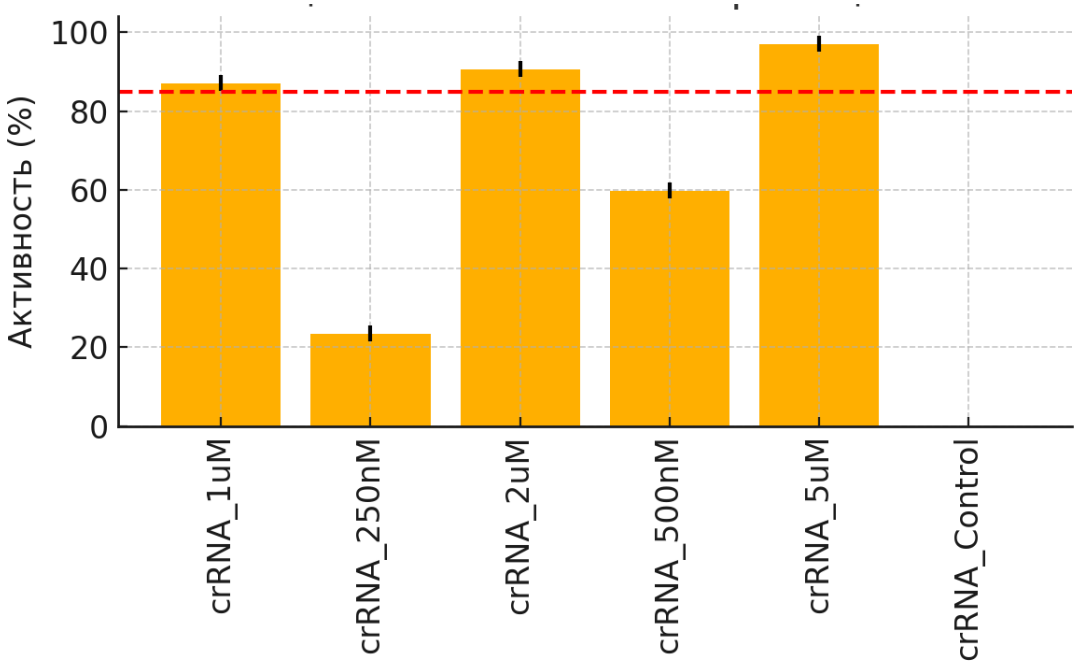


Рисунок 83 – Результаты статистического анализа оптимизации биохимической реакции по концентрации crРНК для MbCas12a

Статистические данные денситометрического анализа, проведённого для оптимизации биохимической реакции по концентрации MbCas12a, представлены в таблице 11.

Таблица 11 - Результаты статистического анализа оптимизации биохимической реакции по концентрации MbCas12a

Вариант	Среднее значение	Стандартное отклонение
MbCas12a_100nM	3.10	1.95
MbCas12a_1uM	90.20	1.95
MbCas12a_250nM	20.30	1.95
MbCas12a_500nM	49.50	1.95
MbCas12a_50nM	2.90	0.20
MbCas12a_Control	0.00	0.00

Результаты однофакторного дисперсионного анализа ($p<0,05$) подтверждают наличие статистически значимых различий между концентрациями белка MbCas12a, влияющих на уровень его активности (рисунок 84).

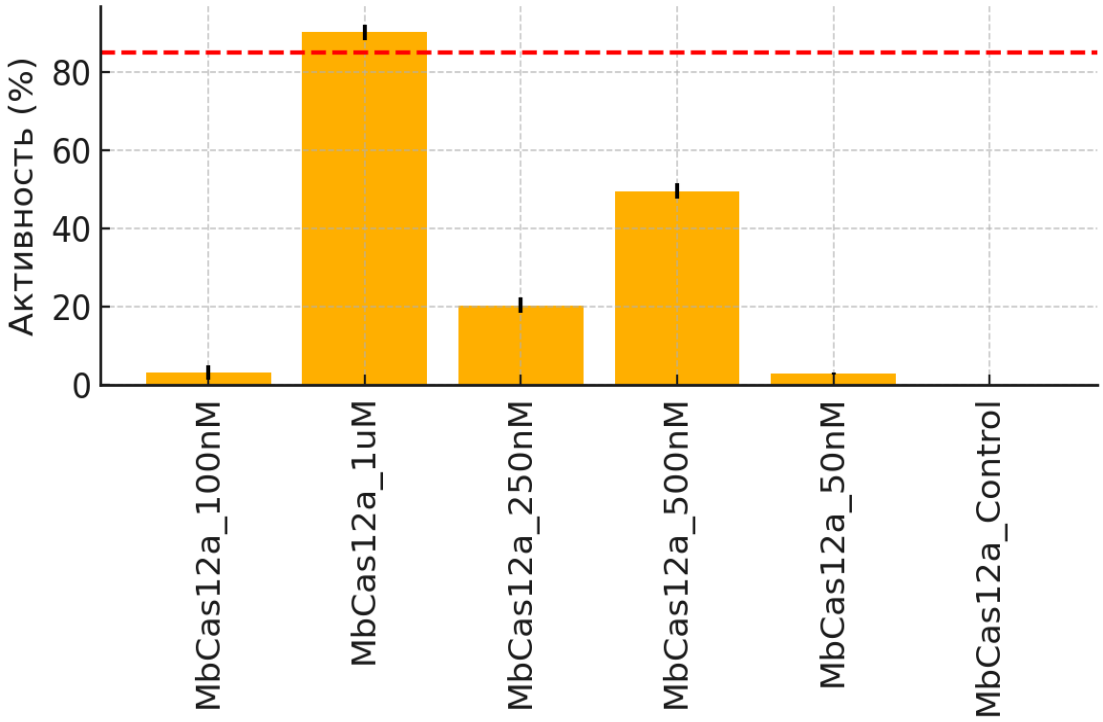


Рисунок 84 – Результаты статистического анализа оптимизации биохимической реакции по концентрации MbCas12a

Статистические данные денситометрического анализа, проведённого для оптимизации биохимической реакции по времени для MbCas12a, представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Результаты статистического анализа оптимизации времени для MbCas12a

Вариант	Среднее значение	Стандартное отклонение
MbCas12a_10min	93.40	1.95
MbCas12a_20min	94.90	1.95
MbCas12a_30min	99.00	0.20
MbCas12a_5min	91.20	1.95
MbCas12a_control	0.00	0.00

По данным ANOVA ($p<0,05$), временные параметры реакции оказывают статистически значимое влияние на активность MbCas12a, что позволяет определить оптимальную продолжительность инкубации (рисунок 85).

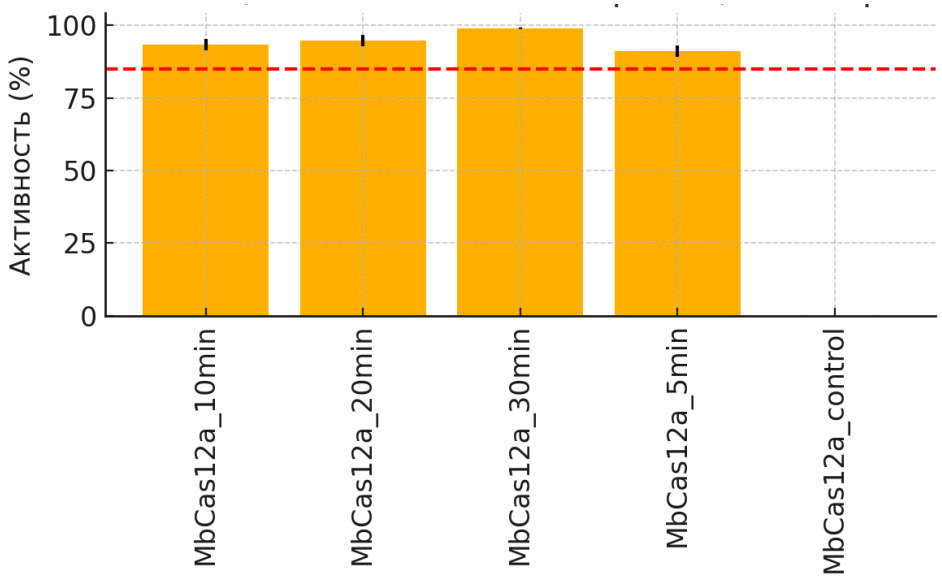


Рисунок 85 – Результаты статистического анализа оптимизации времени для MbCas12a

Статистические данные денситометрического анализа, проведённого для оптимизации длины crРНК со стороны таргета для MeCas12a и MbCas12a, представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Результаты статистического анализа оптимизации длины crРНК со стороны таргета для MeCas12a и MbCas12a

MeCas12a		
Вариант	Среднее значение	Стандартное отклонение
MecrRNA_15	7.70	0.95
MecrRNA_17	57.30	0.95
MecrRNA_19	72.70	0.95
MecrRNA_21	86.80	0.95
MecrRNA_23	92.60	0.95
MecrRNA_control	0.00	0.00
MbCas12a		
Вариант	Среднее значение	Стандартное отклонение
MbcrRNA_15	15.30	1.95
MbcrRNA_17	59.50	1.95
MbcrRNA_19	71.25	1.48
MbcrRNA_21	87.60	1.95
MbcrRNA_23	90.20	1.95
MbcrRNA_control	0.00	0.00

Выявлены статистически значимые различия между вариантами crРНК ($p<0,05$; метод: однофакторный ANOVA), направленными на разные участки таргетной последовательности, что указывает на критичность выбора таргета для активности MeCas12a. Применение непараметрического критерия Крускала–Уоллиса показало наличие статистически значимых различий между вариантами ($p<0,05$), что свидетельствует о влиянии положения таргетной области crРНК на активность MbCas12a (рисунок 86).

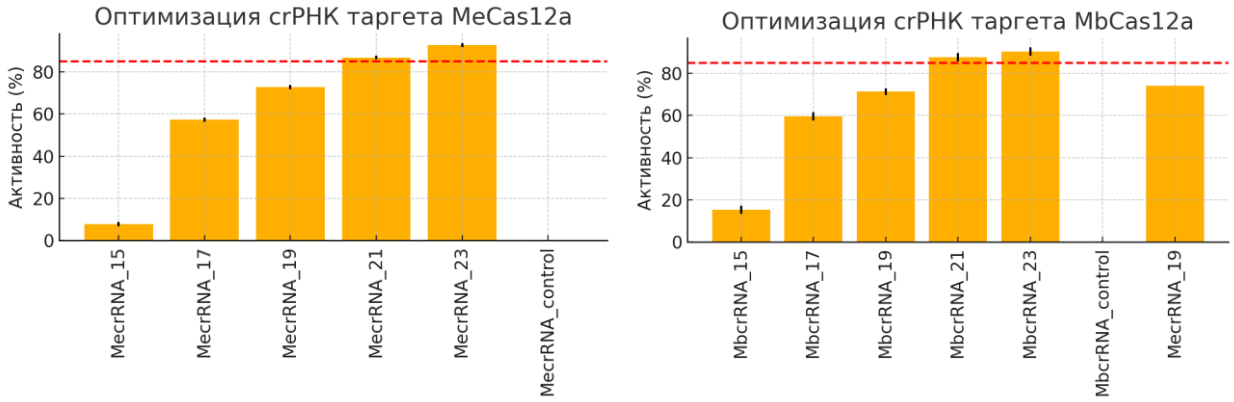


Рисунок 86 - Результаты статистического анализа оптимизации длины crРНК со стороны таргета для MeCas12a и MbCas12a

Статистические данные денситометрического анализа, проведённого для оптимизации длины crРНК со стороны ручки для MeCas12a и MbCas12a, представлены в таблице 14 и 15.

Таблица 14 – Результаты статистического анализа оптимизации длины crРНК со стороны ручки для MeCas12a

MeCas12a		
Вариант	Среднее значение	Стандартное отклонение
MecrRNA_-11_	4.30	2.25
MecrRNA_-13_	25.90	1.95
MecrRNA_-15_	74.20	1.95
MecrRNA_-17_	93.10	1.95
MecrRNA_-2_	8.70	1.95
MecrRNA_-5_	7.50	1.95
MecrRNA_-7_	6.40	1.95
MecrRNA_-9_	8.50	1.95
MecrRNA_1control	0.00	0.00
MecrRNA_control	94.20	1.95

Таблица 15 – Результаты статистического анализа оптимизации длины crРНК со стороны ручки для MbCas12a

MbCas12a		
Вариант	Среднее значение	Стандартное отклонение
MbcrRNA_-11_	3.30	1.95
MbcrRNA_-13_	13.40	1.95
MbcrRNA_-15_	81.50	1.95
MbcrRNA_-17_	90.50	1.95
MbcrRNA_-2_	1.30	0.30
MbcrRNA_-5_	3.60	1.95
MbcrRNA_-7_	3.10	1.21
MbcrRNA_-9_	4.20	1.95
MbcrRNA_1control	0.00	0.00
MbcrRNA_control	96.80	1.95

Результаты анализа ($p<0,05$; метод: однофакторный ANOVA) демонстрируют значимое влияние модификаций ручки (handle) crРНК на активность MeCas12a. Анализ по методу однофакторного ANOVA выявил статистически значимые различия ($p<0,05$), что указывает на зависимость активности MbCas12a от структурных особенностей ручки crРНК (рисунок 87).

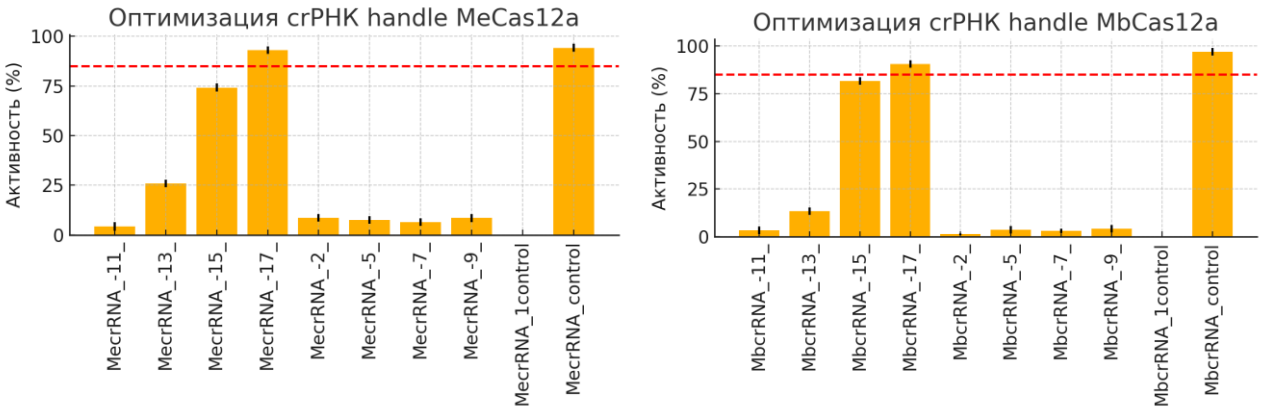


Рисунок 87 - Результаты статистического анализа оптимизации длины crРНК со стороны ручки для MeCas12a и MbCas12a

Статистические данные денситометрического анализа, полученные в ходе экспериментов по оптимизации PAM-последовательностей для ферментов MbCas12a и MeCas12a, представлены в таблице 16. Представленные результаты позволяют количественно оценить влияние различных PAM-мотивов на уровень ферментативной активности и выбрать наиболее эффективные последовательности.

Таблица 16 – Результаты статистического анализа оптимизации PAM для MbCas12a и MeCas12a

MbCas12a		
Вариант	Среднее значение	Стандартное отклонение
TTTA	95.80	0.95
TTTC	92.80	0.20
TTTG	96.70	1.95
TTTT	91.80	0.95
MeCas12a		
Вариант	Среднее значение	Стандартное отклонение
TTTA	98.60	0.20
TTTC	97.00	1.95
TTTG	98.30	0.95
TTTT	95.20	1.95

Между вариантами PAM-последовательностей статистически значимые различия не выявлены (p = 0,0760; метод: однофакторный дисперсионный анализ, ANOVA), что может свидетельствовать об их сопоставимом влиянии на активность MeCas12a.

Статистически значимых различий между вариантами PAM не установлено (p = 0,0744; метод: непараметрический критерий Крускала–Уоллиса), что указывает на отсутствие выраженного предпочтения конкретной PAM-последовательности для MbCas12a в данных условиях (рисунок 88).

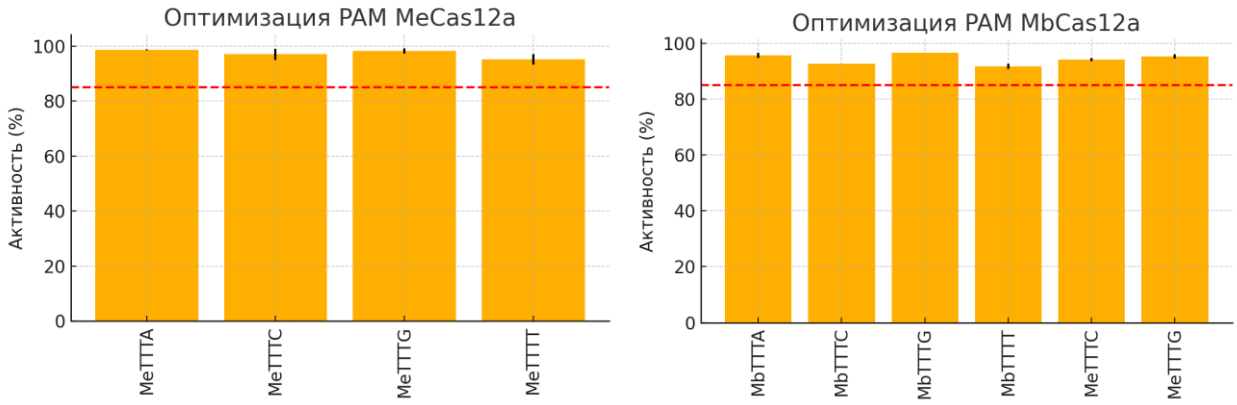


Рисунок 88 – Результаты статистического анализа оптимизации PAM для MeCas12a и MbCas12a

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной диссертационной работы были получены и охарактеризованы новые программируемые РНК-направляемые эндонуклеазы CRISPR/Cas12a, а также разработана молекулярная диагностика патогенов на основе метода CRISPR/MbCas12a.

На основании полученных результатов в ходе выполнения диссертационной работы были сделаны следующие выводы:

1) Получены гены эндонуклеаз Cas12a (*Moraxella bovis*) и Cas12a (*Moraxella equi*). Ген Cas12a (*Moraxella bovis*) клонирован в промежуточный вектор для сиквенсного анализа, наработки и хранения. Ген Cas12a (*Moraxella equi*) синтезирован с кодон-оптимизированной последовательностью. Оба белка, MbCas12a и MeCas12a, экспрессированы в клетках *E. coli*, оптимизированы условия их очистки, подтверждена их чистота и идентичность методами SDS-PAGE и хроматографии. Экспериментальные исследования показали, что обе эндонуклеазы проявляют специфичную активность по расщеплению ДНК в присутствии crРНК, что подтверждает их функциональность в условиях *in vitro*.

2) Определена оптимальная последовательность PAM участка для ферментов MbCas12a и MeCas12a, при которой наблюдается наивысшая активность в расщеплении ДНК. Исследования показали, что последовательность TTTN, где «N» обозначает любой нуклеотид, является предпочтительной для максимальной специфичности и эффективности действия данных эндонуклеаз. Проведённый скрининг показал, что вариации PAM-мотива (TTTT, TTTA, TTTC, TTTG) демонстрируют сопоставимый уровень активности, что подтверждено денситометрическим анализом. Это свидетельствует о высокой толерантности и адаптивности CRISPR/Cas12a-систем к различным PAM-конфигурациям без значительной потери эффективности.

3) Произведены дизайн, синтез и очистка направляющих РНК (crРНК). Дизайн crРНК был проведен при помощи поиска прямых повторов в геномных последовательностях *Moraxella bovis* и *Moraxella equi*, а также поиска таргетной области в последовательностях целевых ДНК патогенов. Далее проводился синтез и очистка crРНК. Тестирование эффективности синтезированных crРНК проводилось в условиях их взаимодействия с эндонуклеазами MbCas12a и MeCas12a для оценки способности расщепления ДНК. В ходе экспериментов было подтверждено, что эти crРНК эффективно направляют эндонуклеазы на целевые участки ДНК, обеспечивая точное и специфичное расщепление. Также были синтезированы crРНК с использованием специфических праймеров, проведены эксперименты для определения оптимальной длины crРНК и укорочения «ручки» crРНК. Проведённый анализ показал, что как длина таргетной области, так и длина 5′-ручки crРНК существенно влияют на эндонуклеазную активность Cas12a. Сокращение таргетной части направляющей РНК с 23 до 15 нуклеотидов вызывало статистически значимое снижение активности фермента; при этом денситометрический анализ показал сохранение остаточной активности на уровне 3–8%, что соответствует

практически полной, но не абсолютной утрате функциональности. Оптимальная длина таргетной области составила 23–24 нуклеотида. Аналогично, укорочение 5′-ручки crРНК ниже 15 нуклеотидов также приводило к значимому снижению активности, при этом наиболее резкое падение наблюдалось при длине ручки 13 нуклеотидов и менее.

4) В ходе работы были изучены активность и специфичность эндонуклеаз Cas12a по отношению к различным субстратам. Оптимизированы условия для проведения биохимических реакций, включая температуру, время реакции, концентрацию компонентов и состав буфера. Оптимальные концентрации crРНК и Cas12a в реакции цис-активности – 2 мкМ и 1 мкМ соответственно. В ходе исследования было установлено, что расщепление ДНК эндонуклеазами Cas12a начинается уже через 5 минут инкубации при оптимальных условиях реакции. Однако для достижения достоверности и максимальной воспроизводимости результатов инкубацию проводили в течение 30 минут. Для обеспечения условий транс-активности использовали концентрации компонентов: 100 нМ crРНК, 100 нМ Cas12a, и буферную систему 1× NEBuffer 2.1. Эти параметры были выбраны на основе предварительных оптимизационных экспериментов, обеспечивающих высокую активность и специфичность системы CRISPR/Cas12a. Результаты флуоресцентного анализа, основанного на методе CRISPR/Cas12a, показали, что инкубация комплекса MbCas12a с crРНК при 25°C в течение 15 минут, а затем реакция транс-расщепления при 37°C в течение 30 минут с продуктами амплификации, позволяет визуализировать результаты с помощью трансиллюминатора под ультрафиолетовым излучением.

5) Проведённое гомологичное моделирование ферментов MbCas12a и MeCas12a позволило идентифицировать каталитически значимые аминокислоты, расположенные в доменах RuvC и NUC. Сайт-направленный мутагенез и последующее тестирование активности мутантных форм подтвердили функциональную значимость этих остатков. Мутации в доменах RuvC1 (D874A/D864A), RuvC2 (E968A/E958A), RuvC3 (D1218A/D1208A) и NUC (R1181A/R1171A) приводили к полному или частичному ингибированию ферментативной активности. Достоверные различия между активными и инактивированными формами были подтверждены денситометрическим анализом и статистически значимыми результатами. Полная потеря активности наблюдалась при мутациях D874A, E968A, D1218A (MbCas12a) и D864A, E958A, D1208A (MeCas12a). При этом мутации R1181A и R1171A приводили к частичному снижению активности, что свидетельствует о дифференцированной роли этих остатков в каталитической функции. Кроме того, данные подтверждают, что домены RuvC ответственны преимущественно за расщепление обеих цепей ДНК, тогда как остатки домена Nuc вносят вклад в расщепление одной цепи, указывая на их специфическую функциональную нагрузку.

6) Была проведена оптимизация условий петлевой изотермической амплификации LAMP и рекомбиназной полимеразной амплификации РПА. Для

реакции РПА были оптимизированы условия температуры (37-39°C) и времени (20-30 минут), а также были сконструированы специфические праймеры для детекции таргетных ДНК. Для амплификации ДНК методом LAMP были также подобраны температура - 62°C, время - 45 минут, а также применялись специальные наборы праймеров (3 пары праймеров).

7) Разработан иммунохроматографический латеральный потоковый анализ на основе метода CRISPR/Cas12a, использующий золотые наночастицы и одноцепочечные ДНК-зонды, меченные флуоресцеином и биотином. Реакция проводилась при 37°C в течение 30 минут с последующей визуализацией результатов на полоске ИХА, что позволяет оперативно и эффективно выявлять целевые ДНК-последовательности.

8) Разработан и предложен метод молекулярной диагностики *Escherichia coli*, основанный на сочетании изотермической амплификации LAMP и технологии CRISPR/MbCas12a. Метод обеспечивает чувствительность до 1 копии плазмидной ДНК и 10 копий геномной ДНК на реакцию. Обеспечена специфичность за счёт использования таргетных crРНК и фермента MbCas12a с коллатеральной активностью, что позволило достоверно отличать *E. coli* от других патогенов мастита, включая *S. aureus* и *S. agalactiae*. Метод апробирован на образцах маститного молока и показал воспроизводимую детекцию *E. coli* в реальных клинических условиях, что подтверждает его применимость для экспресс-диагностики в ветеринарной практике.

9) Был разработан молекулярный диагностический метод для выявления *Staphylococcus aureus*, основанный на комбинации рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA) и CRISPR/MbCas12a с использованием crРНК, нацеленной на ген *nuc*. Метод позволяет обнаруживать до 100 копий ДНК и обеспечивает селективную идентификацию *S. aureus* без перекрёстных реакций с другими патогенами. Проведена валидация метода на 13 клинических изолятах, включая пробы маститного молока, где система продемонстрировала стабильность, точность и оперативность (время анализа — около 60 минут), что делает её пригодной для первичного экспресс-тестирования в полевых условиях.

10) Разработан метод детекции *Alternaria spp.* с использованием CRISPR/MbCas12a и предварительной амплификации методом RPA. Метод позволяет выявлять до 100 копий ДНК в образцах зерна пшеницы. Проведена оценка видовой специфичности: метод не давал сигнала при наличии ДНК *Bipolaris sorokiniana, Nigrospora oryzae, Fusarium equiseti* и *Fusarium acuminatum*. Анализ инфицированных фитопатологическим материалом образцов подтвердил применимость метода для экспресс-скрининга *Alternaria spp.* в задачах фитосанитарного контроля и агробиотехнологии.

11) Статистический анализ данных чувствительности разработанных молекулярных диагностических методов, а также проведённая статистическая обработка результатов, полученных методом денситометрического анализа электрофореграмм, показала, что активность эндонуклеазы Cas12a достоверно зависит от условий тестирования, включая структуру направляющей РНК, мутации в каталитических доменах, а также концентрации компонентов реакции.

Значимые различия были установлены при использовании однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA, $p < 0,05$) и непараметрического критерия Крускала–Уоллиса.

12) Разработано портативное устройство CRISPR-Kaz для флуоресцентной визуализации и детекции патогенов на основе технологии CRISPR/Cas12a. Устройство предназначено для использования в условиях ограниченной инфраструктуры, включая полевые исследования. Конструкция включает корпус, напечатанный на 3D-принтере, с лунками для стандартных пробирок, стеклянную платформу для равномерного распределения УФ-света и встроенный УФ-источник. Дизайн обеспечивает компактность, удобство эксплуатации и возможность быстрой детекции патогенов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Wang, J. Y. CRISPR technology: A decade of genome editing is only the beginning / J. Y. Wang, J. A. Doudna // Science. — 2023. — Т. 379, № 6629. — С. eadd8643. — DOI: 10.1126/science.add8643.

2. Koonin, E. V. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems / E. V. Koonin, K. S. Makarova // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. — 2019. — Т. 374, № 1772. — С. 20180087. — DOI: 10.1098/rstb.2018.0087.

3. Ishino, Y. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product / Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino [и др.] // Journal of Bacteriology. — 1987. — Т. 169, № 12. — С. 5429–5433. — DOI: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.

4. Mojica, F. J. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements / F. J. Mojica, C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez [и др.] // Journal of Molecular Evolution. — 2005. — Т. 60, № 2. — С. 174–182. — DOI: 10.1007/s00239-004-0046-3.

5. Brouns, S. J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes / S. J. Brouns, M. M. Jore, M. Lundgren [и др.] // Science. — 2008. — Т. 321, № 5891. — С. 960–964. — DOI: 10.1126/science.1159689.

6. Barrangou, R. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes / R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau [и др.] // Science. — 2007. — Т. 315, № 5819. — С. 1709–1712. — DOI: 10.1126/science.1138140.

7. Jinek, M. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity / M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara [и др.] // Science. — 2012. — Т. 337, № 6096. — С. 816–821. — DOI: 10.1126/science.1225829.

8. Knott, G. J. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering / G. J. Knott, J. A. Doudna // Science. — 2018. — Т. 361, № 6405. — С. 866–869. — DOI: 10.1126/science.aat5011.

9. Gasiunas, G. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria / G. Gasiunas, R. Barrangou, P. Horvath [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2012. — Т. 109, № 39. — С. E2579–E2586. — DOI: 10.1073/pnas.1208507109.

10. Nishida, K. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems / K. Nishida, T. Arazoe, N. Yachie [и др.] // Science. — 2016. — Т. 353, № 6305. — С. aaf8729. — DOI: 10.1126/science.aaf8729.

11. Komor, A. C. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage / A. C. Komor, Y. B. Kim, M. S. Packer [и др.] // Nature. — 2016. — Т. 533, № 7603. — С. 420–424. — DOI: 10.1038/nature17946.

12. Anzalone, A. V. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA / A. V. Anzalone, P. B. Randolph, J. R. Davis [и др.] // Nature. — 2019. — Т. 576, № 7785. — С. 149–157. — DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4.

13. Gilbert, L. A. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes / L. A. Gilbert, M. H. Larson, L. Morsut [и др.] // Cell. — 2013. — Т. 154, № 2. — С. 442–451. — DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.044.

14. Wang, J. Y. Structural biology of CRISPR-Cas immunity and genome editing enzymes / J. Y. Wang, P. Pausch, J. A. Doudna // Nature Reviews Microbiology. — 2022. — Т. 20, № 11. — С. 641–656. — DOI: 10.1038/s41579-022-00739-4.

15. Kaminski, M. M. CRISPR-based diagnostics / M. M. Kaminski, O. O. Abudayyeh, J. S. Gootenberg [и др.] // Nature Biomedical Engineering. — 2021. — Т. 5, № 7. — С. 643–656. — DOI: 10.1038/s41551-021-00760-7.

16. Bhardwaj, P. Next-Generation Diagnostic with CRISPR/Cas: Beyond Nucleic Acid Detection / P. Bhardwaj, P. S. Pang, S. K. Jha [и др.] // International Journal of Molecular Sciences. — 2022. — Т. 23, № 11. — С. 6057. — DOI: 10.3390/ijms23116057.

17. Broughton, J. P. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2 / J. P. Broughton, X. Deng, G. Yu [и др.] // Nature Biotechnology. — 2020. — Т. 38, № 7. — С. 870–874. — DOI: 10.1038/s41587-020-0513-4.

18. Bolotin, A. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin / A. Bolotin, B. Quinquis, A. Sorokin [и др.] // Microbiology. — 2005. — Т. 151, № 8. — С. 2551–2561. — DOI: 10.1099/mic.0.28048-0.

19. Makarova, K. S. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action / K. S. Makarova, N. V. Grishin, S. A. Shabalina [и др.] // Biology Direct. — 2006. — Т. 1. — С. 7. — DOI: 10.1186/1745-6150-1-7.

20. Garneau, J. E. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA / J. E. Garneau, M. E. Dupuis, M. Villion [и др.] // Nature. — 2010. — Т. 468, № 7320. — С. 67–71. — DOI: 10.1038/nature09523.

21. Deltcheva, E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III / E. Deltcheva, K. Chylinski, C. M. Sharma [и др.] // Nature. — 2011. — Т. 471, № 7340. — С. 602–607. — DOI: 10.1038/nature09886.

22. Sapranauskas, R. The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli / R. Sapranauskas, G. Gasiunas, C. Fremaux [и др.] // Nucleic Acids Research. — 2011. — Т. 39, № 21. — С. 9275–9282. — DOI: 10.1093/nar/gkr606.

23. Cong, L. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems / L. Cong, F. A. Ran, D. Cox [и др.] // Science. — 2013. — Т. 339, № 6121. — С. 819–823. — DOI: 10.1126/science.1231143.

24. Retraction for Mustafa and Makhawi, “SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-Cas Systems as Potential Rapid Diagnostic Tools for Emerging Infectious Diseases” / H. Mustafa, A. M. Makhawi // Journal of Clinical Microbiology. — 2024. — Т. 62, № 1. — С. e0152123. — DOI: 10.1128/jcm.01521-23.

25. Doudna, J. A. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 / J. A. Doudna, E. Charpentier // Science. — 2014. — Т. 346, № 6213. — С. 1258096. — DOI: 10.1126/science.1258096.

26. Cheng, X. CRISPR/Cas9 for cancer treatment: technology, clinical applications and challenges / X. Cheng, Y. Wang, X. Liu [и др.] // Briefings in Functional Genomics. — 2020. — Т. 19, № 3. — С. 209–214. — DOI: 10.1093/bfgp/elaa003.

27. Makarova, K. S. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems / K. S. Makarova, E. V. Koonin // Methods in Molecular Biology. — 2015. — Т. 1311. — С. 47–75. — DOI: 10.1007/978-1-4939-2687-9_4.

28. Chylinski, K. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems / K. Chylinski, K. S. Makarova, E. Charpentier [и др.] // Nucleic Acids Research. — 2014. — Т. 42, № 10. — С. 6091–6105. — DOI: 10.1093/nar/gku241.

29. Makarova, K. S. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems / K. S. Makarova, Y. I. Wolf, O. S. Alkhnbashi [и др.] // Nature Reviews Microbiology. — 2015. — Т. 13, № 11. — С. 722–736. — DOI: 10.1038/nrmicro3569.

30. Makarova, K. S. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants / K. S. Makarova, Y. I. Wolf, J. Iranzo [и др.] // Nature Reviews Microbiology. — 2020. — Т. 18, № 2. — С. 67–83. — DOI: 10.1038/s41579-019-0299-x.

31. Koonin, E. V. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems / E. V. Koonin, K. S. Makarova, F. Zhang // Current Opinion in Microbiology. — 2017. — Т. 37. — С. 67–78. — DOI: 10.1016/j.mib.2017.05.008.

32. Burstein, D. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes / D. Burstein, C. L. Sun, C. T. Brown [и др.] // Nature. — 2017. — Т. 542, № 7640. — С. 237–241. — DOI: 10.1038/nature21059.

33. Shmakov, S. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems / S. Shmakov, O. Abudayyeh, K. S. Makarova [и др.] // Molecular Cell. — 2015. — Т. 60, № 3. — С. 385–397. — DOI: 10.1016/j.molcel.2015.10.008.

34. Zetsche, B. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system / B. Zetsche, J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh [и др.] // Cell. — 2015. — Т. 163, № 3. — С. 759–771. — DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038.

35. Yamano, T. Crystal Structure of Cpf1 in Complex with Guide RNA and Target DNA / T. Yamano, H. Nishimasu, B. Zetsche [и др.] // Cell. — 2016. — Т. 165, № 4. — С. 949–962. — DOI: 10.1016/j.cell.2016.04.003.

36. Mali, P. RNA-guided human genome engineering via Cas9 / P. Mali, L. Yang, K. M. Esvelt [и др.] // Science. — 2013. — Т. 339, № 6121. — С. 823–826. — DOI: 10.1126/science.1232033.

37. Anders, C. In vitro enzymology of Cas9 / C. Anders, M. Jinek // Methods in Enzymology. — 2014. — Т. 546. — С. 1–20. — DOI: 10.1016/B978-0-12-801185-0.00001-5.

38. Paul, B. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications / B. Paul, G. Montoya // Biomedical Journal. — 2020. — Т. 43, № 1. — С. 8–17. — DOI: 10.1016/j.bj.2019.10.005.

39. Swarts, D. C. Structural Basis for Guide RNA Processing and Seed-Dependent DNA Targeting by CRISPR-Cas12a / D. C. Swarts, J. van der Oost, M. Jinek // Molecular Cell. — 2017. — Т. 66, № 2. — С. 221–233.e4. — DOI: 10.1016/j.molcel.2017.03.016.

40. Stella, S. Structure of the Cpf1 endonuclease R-loop complex after target DNA cleavage / S. Stella, P. Alcón, G. Montoya // Nature. — 2017. — Т. 546, № 7659. — С. 559–563. — DOI: 10.1038/nature22398.

41. Li, S. Y. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection / S. Y. Li, Q. X. Cheng, J. K. Li [и др.] // Cell Discovery. — 2018. — Т. 4. — С. 20. — DOI: 10.1038/s41421-018-0028-z.

42. Yin, L. CRISPR-Cas based virus detection: Recent advances and perspectives / L. Yin, Z. Zhao, Q. Liu [и др.] // Biosensors and Bioelectronics. — 2021. — Т. 193. — С. 113541. — DOI: 10.1016/j.bios.2021.113541.

43. Zhang, K. RPA-CRISPR/Cas12a-Based Detection of Haemophilus parasuis / K. Zhang, X. Zhang, H. Liu [и др.] // Animals. — 2023. — Т. 13, № 21. — С. 3357. — DOI: 10.3390/ani13213357.

44. Hu, M. Light-Start CRISPR-Cas12a Reaction with Caged crRNA Enables Rapid and Sensitive Nucleic Acid Detection / M. Hu, Z. Zhou, J. Zhou [и др.] // Angewandte Chemie International Edition. — 2023. — Т. 62, № 23. — С. e202300663. — DOI: 10.1002/anie.202300663.

45. Nishimasu, H. Structures and mechanisms of CRISPR RNA-guided effector nucleases / H. Nishimasu, O. Nureki // Current Opinion in Structural Biology. — 2017. — Т. 43. — С. 68–78. — DOI: 10.1016/j.sbi.2016.11.013.

46. Hille, F. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance / F. Hille, E. Charpentier // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. — 2016. — Т. 371, № 1707. — С. 20150496. — DOI: 10.1098/rstb.2015.0496.

47. Jore, M. M. Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade / M. M. Jore, M. Lundgren, E. van Duijn [и др.] // Nature Structural & Molecular Biology. — 2011. — Т. 18, № 5. — С. 529–536. — DOI: 10.1038/nsmb.2019.

48. Barrangou, R. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity / R. Barrangou, L. A. Marraffini // Molecular Cell. — 2014. — Т. 54, № 2. — С. 234–244. — DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.011.

49. East-Seletsky, A. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection / A. East-Seletsky, M. R. O'Connell, S. C. Knight [и др.] // Nature. — 2016. — Т. 538, № 7624. — С. 270–273. — DOI: 10.1038/nature19802.

50. Swarts, D. C. Mechanistic Insights into the cis- and trans-Acting DNase Activities of Cas12a / D. C. Swarts, M. Jinek // Molecular Cell. — 2019. — Т. 73, № 3. — С. 589–600.e4. — DOI: 10.1016/j.molcel.2018.11.021.

51. Adli, M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond / M. Adli // Nature Communications. — 2018. — Т. 9, № 1. — С. 1911. — DOI: 10.1038/s41467-018-04252-2.

52. Maeder, M. L. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy / M. L. Maeder, C. A. Gersbach // Molecular Therapy. — 2016. — Т. 24, № 3. — С. 430–446. — DOI: 10.1038/mt.2016.10.

53. Hsu, P. D. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering / P. D. Hsu, E. S. Lander, F. Zhang // Cell. — 2014. — Т. 157, № 6. — С. 1262–1278. — DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.010.

54. Kumaran, A. Advancements in CRISPR-Based Biosensing for Next-Gen Point of Care Diagnostic Application / A. Kumaran, N. S. Sirisha, S. V. Nair [и др.] // Biosensors. — 2023. — Т. 13, № 2. — С. 202. — DOI: 10.3390/bios13020202.

55. Chen, J. S. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity / J. S. Chen, E. Ma, L. B. Harrington [и др.] // Science. — 2018. — Т. 360, № 6387. — С. 436–439. — DOI: 10.1126/science.aar6245.

56. Gootenberg, J. S. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 / J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh, J. W. Lee [и др.] // Science. — 2017. — Т. 356, № 6336. — С. 438–442. — DOI: 10.1126/science.aam9321.

57. Kellner, M. J. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases / M. J. Kellner, J. G. Koob, J. S. Gootenberg [и др.] // Nature Protocols. — 2019. — Т. 14, № 10. — С. 2986–3012. — DOI: 10.1038/s41596-019-0210-2.

58. Liu, Q. Advances in the application of molecular diagnostic techniques for the detection of infectious disease pathogens (Review) / Q. Liu, L. Jin, X. Zhu [и др.] // Molecular Medicine Reports. — 2023. — Т. 27, № 5. — С. 104. — DOI: 10.3892/mmr.2023.12991.

59. Joung, J. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing / J. Joung, A. Ladha, M. Saito [и др.] // New England Journal of Medicine. — 2020. — Т. 383, № 15. — С. 1492–1494. — DOI: 10.1056/NEJMc2026172.

60. Myhrvold, C. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13 / C. Myhrvold, C. A. Freije, J. S. Gootenberg [и др.] // Science. — 2018. — Т. 360, № 6387. — С. 444–448. — DOI: 10.1126/science.aas8836.

61. Ruegg, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention / P. L. Ruegg // Journal of Dairy Science. — 2017. — Т. 100, № 12. — С. 10381–10397. — DOI: 10.3168/jds.2017-13023.

62. Mărginean, C. O. Traditional and Modern Diagnostic Approaches in Diagnosing Pediatric Helicobacter pylori Infection / C. O. Mărginean, L. E. Meliț, M. O. Săsăran // Children. — 2022. — Т. 9, № 7. — С. 994. — DOI: 10.3390/children9070994.

63. Momčilović, S. Rapid diagnosis of parasitic diseases: current scenario and future needs / S. Momčilović, S. Cantacessi, A. Arsić [и др.] // Clinical Microbiology and Infection. — 2019. — Т. 25, № 3. — С. 290–309. — DOI: 10.1016/j.cmi.2018.04.028.

64. Austin, B. The value of cultures to modern microbiology / B. Austin // Antonie van Leeuwenhoek. — 2017. — Т. 110, № 10. — С. 1247–1256. — DOI: 10.1007/s10482-017-0840-8.

65. Wang, C. Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices / C. Wang, M. Liu, Z. Wang [и др.] // Nano Today. — 2021. — Т. 37. — С. 101092. — DOI: 10.1016/j.nantod.2021.101092.

66. Zhang, N. Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans / N. Zhang, L. Wang, X. Deng [и др.] // Journal of Medical Virology. — 2020. — Т. 92, № 4. — С. 408–417. — DOI: 10.1002/jmv.25674.

67. Barer, M. R. Bacterial viability and culturability / M. R. Barer, C. R. Harwood // Advances in Microbial Physiology. — 1999. — Т. 41. — С. 93–137. — DOI: 10.1016/S0065-2911(08)60166-6.

68. Vasala, A. Modern Tools for Rapid Diagnostics of Antimicrobial Resistance / A. Vasala, V. P. Hytönen, O. H. Laitinen // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. — 2020. — Т. 10. — С. 308. — DOI: 10.3389/fcimb.2020.00308.

69. Tarr, C. L. Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic Escherichia coli / C. L. Tarr, T. S. Whittam // Journal of Bacteriology. — 2002. — Т. 184, № 2. — С. 479–487. — DOI: 10.1128/JB.184.2.479-487.2002.

70. Paton, A. W. Detection and characterization of Shiga toxigenic Escherichia coli by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic E. coli hlyA, rfbO111, and rfbO157 / A. W. Paton, J. C. Paton // Journal of Clinical Microbiology. — 1998. — Т. 36, № 2. — С. 598–602. — DOI: 10.1128/JCM.36.2.598-602.1998.

71. Mackay, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory / I. M. Mackay // Clinical Microbiology and Infection. — 2004. — Т. 10, № 3. — С. 190–212. — DOI: 10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x.

72. Saiki, R. K. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase / R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel [и др.] // Science. — 1988. — Т. 239, № 4839. — С. 487–491. — DOI: 10.1126/science.2448875.

73. Crowther, J. R. The ELISA guidebook / J. R. Crowther // Methods in Molecular Biology. — 2000. — Т. 149. — С. III–IV, 1–413. — DOI: 10.1385/1592590497.

74. Atiya-Nasagi, Y. Development of an immunofluorescence assay for detection of SARS-CoV-2 / Y. Atiya-Nasagi, E. Banai, I. Margalit [и др.] // Archives of Virology. — 2022. — Т. 167, № 4. — С. 1041–1049. — DOI: 10.1007/s00705-022-05394-3.

75. Lau, H. Y. Advanced DNA-Based Point-of-Care Diagnostic Methods for Plant Diseases Detection / H. Y. Lau, J. R. Botella // Frontiers in Plant Science. — 2017. — Т. 8. — С. 2016. — DOI: 10.3389/fpls.2017.02016.

76. Wang, H. Y. Rapid classification of group B Streptococcus serotypes based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and machine learning techniques / H. Y. Wang, Y. C. Chung, H. Y. Chung [и др.] // BMC

Bioinformatics. — 2019. — Т. 20, № 19. — С. 703. — DOI: 10.1186/s12859-019-3238-9.

77. Nectoux, J. Current, Emerging, and Future Applications of Digital PCR in Non-Invasive Prenatal Diagnosis / J. Nectoux // Molecular Diagnosis & Therapy. — 2018. — Т. 22, № 2. — С. 139–148. — DOI: 10.1007/s40291-018-0318-3.

78. Pomari, E. Digital PCR: a new technology for diagnosis of parasitic infections / E. Pomari, C. Piubelli, F. Perandin [и др.] // Clinical Microbiology and Infection. — 2019. — Т. 25, № 12. — С. 1510–1516. — DOI: 10.1016/j.cmi.2019.06.009.

79. Artika, I. M. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis / I. M. Artika, A. Dewantari, Y. Wiyatno [и др.] // Genes. — 2022. — Т. 13, № 12. — С. 2387. — DOI: 10.3390/genes13122387.

80. Templeton, N. S. The polymerase chain reaction. History, methods, and applications / N. S. Templeton // Diagnostic Molecular Pathology. — 1992. — Т. 1, № 1. — С. 58–72.

81. Zhang, L. Emerging digital PCR technology in precision medicine / L. Zhang, Y. Peng, X. Yang [и др.] // Biosensors and Bioelectronics. — 2022. — Т. 211. — С. 114344. — DOI: 10.1016/j.bios.2022.114344.

82. Tsai, C. T. Ultrasensitive Antibody Detection by Agglutination-PCR (ADAP) / C. T. Tsai, C. W. Robinson, C. F. Barbaro [и др.] // ACS Central Science. — 2016. — Т. 2, № 3. — С. 139–147. — DOI: 10.1021/acscentsci.6b00040.

83. Dybkov, M. V. RAPID LOW-COST DETECTION OF TYPE 2CALR MUTATION BY ALLELE-SPECIFIC RT-PCR FOR DIAGNOSIS OF MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS / M. V. Dybkov, O. V. Kokhan, V. P. Shubin [и др.] // Experimental Oncology. — 2022. — Т. 44, № 1. — С. 83–86. — DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-1.17422.

84. Shakir, S. M. Clinical Laboratory Perspective on Streptococcus halichoeri, an Unusual Nonhemolytic, Lancefield Group B Streptococcus Causing Human Infections / S. M. Shakir, B. J. Salgado, M. A. Ansari [и др.] // Emerging Infectious Diseases. — 2021. — Т. 27, № 5. — С. 1309–1316. — DOI: 10.3201/eid2705.203353.

85. Kubista, M. The real-time polymerase chain reaction / M. Kubista, J. M. Andrade, M. Bengtsson [и др.] // Molecular Aspects of Medicine. — 2006. — Т. 27, № 2–3. — С. 95–125. — DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007.

86. Khan, A. H. Application of immuno-PCR for the detection of early stage cancer / A. H. Khan, E. Sadroddiny // Molecular and Cellular Probes. — 2016. — Т. 30, № 2. — С. 106–112. — DOI: 10.1016/j.mcp.2016.01.010.

87. Ruiz-Ruiz, S. A Real-Time PCR Assay for Detection of Low Pneumocystis jirovecii Levels / S. Ruiz-Ruiz, A. L. Calderon, J. A. Pineda [и др.] // Frontiers in Microbiology. — 2021. — Т. 12. — С. 787554. — DOI: 10.3389/fmicb.2021.787554.

88. Thomas, W. J. A Quantitative PCR Assay for Detection and Quantification of Fusarium sambucinum / W. J. Thomas, K. M. McNamara, D. A. Johnson // Plant Disease. — 2022. — Т. 106, № 10. — С. 2601–2606. — DOI: 10.1094/PDIS-03-22-0617-RE.

89. Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA / T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi [и др.] // Nucleic Acids Research. — 2000. — Т. 28, № 12. — С. E63. — DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.

90. Silva, S. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus: A Review / S. Silva, K. Pardee, L. Pena // Viruses. — 2019. — Т. 12, № 1. — С. 19. — DOI: 10.3390/v12010019.

91. Chaouch, M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An effective molecular point-of-care technique for the rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2 / M. Chaouch // Reviews in Medical Virology. — 2021. — Т. 31, № 6. — С. e2215. — DOI: 10.1002/rmv.2215.

92. Lenkowski, M. The Loop-Mediated Isothermal Amplification Technique in Periodontal Diagnostics: A Systematic Review / M. Lenkowski, M. Nijakowski, T. Kaczmarek [и др.] // Journal of Clinical Medicine. — 2021. — Т. 10, № 6. — С. 1189. — DOI: 10.3390/jcm10061189.

93. Owoicho, O. Loop-mediated isothermal amplification for Candida species surveillance in under-resourced setting: a review of evidence / O. Owoicho, I. B. Otu, B. O. Musa [и др.] // Expert Review of Molecular Diagnostics. — 2022. — Т. 22, № 6. — С. 643–653. — DOI: 10.1080/14737159.2022.2095373.

94. Soroka, M. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? / M. Soroka, B. Wasowicz, A. Rymaszewska // Cells. — 2021. — Т. 10, № 8. — С. 1931. — DOI: 10.3390/cells10081931.

95. Padzil, F. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) as a Promising Point-of-Care Diagnostic Strategy in Avian Virus Research / F. Padzil, A. S. Mariatulqabtiah, M. N. Abu-Bakar [и др.] // Animals. — 2021. — Т. 12, № 1. — С. 76. — DOI: 10.3390/ani12010076.

96. Gomez-Gutierrez, S. V. Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of Plant Pathogens in Wheat (Triticum aestivum) / S. V. Gomez-Gutierrez, S. B. Goodwin // Frontiers in Plant Science. — 2022. — Т. 13. — С. 857673. — DOI: 10.3389/fpls.2022.857673.

97. Panno, S. Loop Mediated Isothermal Amplification: Principles and Applications in Plant Virology / S. Panno, A. G. Matić, G. Tiberini [и др.] // Plants. — 2020. — Т. 9, № 4. — С. 461. — DOI: 10.3390/plants9040461.

98. Park, J. W. Principles and Applications of Loop-Mediated Isothermal Amplification to Point-of-Care Tests / J. W. Park // Biosensors. — 2022. — Т. 12, № 10. — С. 857. — DOI: 10.3390/bios12100857.

99. Shang, Y. Loop-mediated isothermal amplification-based microfluidic chip for pathogen detection / Y. Shang, J. Xing, Z. Guo [и др.] // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. — 2020. — Т. 60, № 2. — С. 201–224. — DOI: 10.1080/10408398.2018.1518897.

100. Nagamine, K. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers / K. Nagamine, T. Hase, T. Notomi // Molecular and Cellular Probes. — 2002. — Т. 16, № 3. — С. 223–229. — DOI: 10.1006/mcpr.2002.0415.

101. Kim, S. H. Diverse methods of reducing and confirming false-positive results of loop-mediated isothermal amplification assays: A review / S. H. Kim, H. J. Kim, S. J. Kim [и др.] // Analytica Chimica Acta. — 2023. — Т. 1280. — С. 341693. — DOI: 10.1016/j.aca.2023.341693.

102. Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects / T. Notomi, Y. Mori, N. Tomita [и др.] // Journal of Microbiology. — 2015. — Т. 53, № 1. — С. 1–5. — DOI: 10.1007/s12275-015-4656-9.

103. Zhou, W. LAMP, PCR, and real-time PCR detection of Acetobacter aceti in yogurt / W. Zhou, Y. Zhang, S. Wang [и др.] // Food Science and Biotechnology. — 2017. — Т. 26, № 1. — С. 153–158. — DOI: 10.1007/s10068-017-0020-0.

104. Molina-Gonzalez, S. J. Application of a recombinase polymerase amplification (RPA) assay and pilot field testing for Giardia duodenalis at Lake Albert, Uganda / S. J. Molina-Gonzalez, T. Bhattacharyya, R. A. Alsheikh [и др.] // Parasites & Vectors. — 2020. — Т. 13, № 1. — С. 289. — DOI: 10.1186/s13071-020-04154-1.

105. Feng, X. Recombinase Polymerase Amplification-Based Biosensors for Rapid Zoonoses Screening / X. Feng, X. Liu, X. Yang [и др.] // International Journal of Nanomedicine. — 2023. — Т. 18. — С. 6311–6331. — DOI: 10.2147/IJN.S426642.

106. Kumar, R. Development of Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification (RT-RPA): A Methodology for Quick Diagnosis of Potato Leafroll Viral Disease in Potato / R. Kumar, P. Kaundal, S. K. Sharma [и др.] // International Journal of Molecular Sciences. — 2023. — Т. 24, № 3. — С. 2513. — DOI: 10.3390/ijms24032513.

107. Amer, H. M. A new approach for diagnosis of bovine coronavirus using a reverse transcription recombinase polymerase amplification assay / H. M. Amer, F. Abd El Wahed, M. Shalaby [и др.] // Journal of Virological Methods. — 2013. — Т. 193, № 2. — С. 337–340. — DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.06.027.

108. Gumaa, M. M. Establishment of a recombinase polymerase amplification (RPA) assay for the detection of Brucella spp. Infection / M. M. Gumaa, Y. Cao, Z. Zhang [и др.] // Molecular and Cellular Probes. — 2019. — Т. 47. — С. 101434. — DOI: 10.1016/j.mcp.2019.101434.

109. Munawar, M. A. Critical insight into recombinase polymerase amplification technology / M. A. Munawar // Expert Review of Molecular Diagnostics. — 2022. — Т. 22, № 7. — С. 725–737. — DOI: 10.1080/14737159.2022.2104237.

110. Tan, M. Recent advances in recombinase polymerase amplification: Principle, advantages, disadvantages and applications / M. Tan, X. Liao, L. Wei [и др.] // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. — 2022. — Т. 12. — С. 1019071. — DOI: 10.3389/fcimb.2022.1019071.

111. Li, J. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification / J. Li, J. Macdonald, F. von Stetten // Analyst. — 2018. — Т. 144, № 1. — С. 31–67. — DOI: 10.1039/C8AN01621F.

112. Euler, M. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus / M. Euler, Y. Wang, P. Otto [и др.] // Journal of Clinical Virology. — 2012. — Т. 54, № 4. — С. 308–312. — DOI: 10.1016/j.jcv.2012.05.006.

113. Tan, M. Recent advances in recombinase polymerase amplification: Principle, advantages, disadvantages and applications / M. Tan, X. Liao, L. Wei [и др.] // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. — 2022. — Т. 12. — С. 1019071. — DOI: 10.3389/fcimb.2022.1019071.

114. Omidfar, K. Lateral Flow Assay: A Summary of Recent Progress for Improving Assay Performance / K. Omidfar, F. Riahi, S. Kashanian // Biosensors. — 2023. — Т. 13, № 9. — С. 837. — DOI: 10.3390/bios13090837.

115. Wang, Z. An Overview for the Nanoparticles-Based Quantitative Lateral Flow Assay / Z. Wang, J. Zhao, X. Xu [и др.] // Small Methods. — 2022. — Т. 6, № 1. — С. e2101143. — DOI: 10.1002/smtd.202101143.

116. Panferov, V. G. Post-Assay Chemical Enhancement for Highly Sensitive Lateral Flow Immunoassays: A Critical Review / V. G. Panferov, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev // Biosensors. — 2023. — Т. 13, № 9. — С. 863. — DOI: 10.3390/bios13090863.

117. Su, G. Multiplexed lateral flow assay integrated with orthogonal CRISPR-Cas system for SARS-CoV-2 detection / G. Su, Y. Zhu, Z. Xu [и др.] // Sensors and Actuators B: Chemical. — 2022. — Т. 371. — С. 132537. — DOI: 10.1016/j.snb.2022.132537.

118. Li, Y. CRISPR/Cas and Argonaute-powered lateral flow assay for pathogens detection / Y. Li, Y. Wang, X. Liu [и др.] // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. — 2024. — С. 1–23. — DOI: 10.1080/10408398.2024.2310788.

119. Caliendo, A. M. Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases / A. M. Caliendo, D. N. Gilbert, C. C. Ginocchio [и др.] // Clinical Infectious Diseases. — 2013. — Т. 57, № S3. — С. S139–S170. — DOI: 10.1093/cid/cit578.

120. Schmitz, J. E. Forty Years of Molecular Diagnostics for Infectious Diseases / J. E. Schmitz, Y. W. Tang, P. H. Gilligan // Journal of Clinical Microbiology. — 2022. — Т. 60, № 10. — С. e0244621. — DOI: 10.1128/jcm.02446-21.

121. McAdams, D. Resistance diagnostics as a public health tool to combat antibiotic resistance: A model-based evaluation / D. McAdams, K. Wollein Waldetoft, C. Tedijanto [и др.] // PLoS Biology. — 2019. — Т. 17, № 5. — С. e3000250. — DOI: 10.1371/journal.pbio.3000250.

122. Croxen, M. A. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli / M. A. Croxen, R. J. Law, R. Scholz [и др.] // Clinical Microbiology Reviews. — 2013. — Т. 26, № 4. — С. 822–880. — DOI: 10.1128/CMR.00022-13.

123. Kaper, J. B. Pathogenic Escherichia coli / J. B. Kaper // International Journal of Medical Microbiology. — 2005. — Т. 295, № 6–7. — С. 355–356. — DOI: 10.1016/j.ijmm.2005.06.008.

124. Nataro, J. P. Diarrheagenic Escherichia coli / J. P. Nataro, J. B. Kaper // Clinical Microbiology Reviews. — 1998. — Т. 11, № 1. — С. 142–201. — DOI: 10.1128/CMR.11.1.142.

125. Wirth, T. Sex and virulence in Escherichia coli: an evolutionary perspective / T. Wirth, D. Falush, R. Lan [и др.] // Molecular Microbiology. — 2006. — Т. 60, № 5. — С. 1136–1151. — DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x.

126. Jang, J. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review / J. Jang, H. G. Hur, M. J. Sadowsky [и др.] // Journal of Applied Microbiology. — 2017. — Т. 123, № 3. — С. 570–581. — DOI: 10.1111/jam.13468.

127. Lee, H. B. Alternaria in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology / H. B. Lee, A. Patriarca, N. Magan // Mycobiology. — 2015. — Т. 43, № 2. — С. 93–106. — DOI: 10.5941/MYCO.2015.43.2.93.

128. Da Silva, G. J. Association between antimicrobial resistance and virulence in Escherichia coli / G. J. Da Silva, N. Mendonça // Virulence. — 2012. — Т. 3, № 1. — С. 18–28. — DOI: 10.4161/viru.3.1.18382.

129. Tenaillon, O. The population genetics of commensal Escherichia coli / O. Tenaillon, D. Skurnik, B. Picard [и др.] // Nature Reviews Microbiology. — 2010. — Т. 8, № 3. — С. 207–217. — DOI: 10.1038/nrmicro2298.

130. Nagasawa, Y. Exfoliation rate of mammary epithelial cells in milk on bovine mastitis caused by Staphylococcus aureus is associated with bacterial load / Y. Nagasawa, Y. Kiku, K. Sugawara [и др.] // Animal Science Journal. — 2018. — Т. 89, № 1. — С. 259–266. — DOI: 10.1111/asj.12927.

131. Kaper, J. B. Pathogenic Escherichia coli / J. B. Kaper, J. P. Nataro, H. L. Mobley // Nature Reviews Microbiology. — 2004. — Т. 2, № 2. — С. 123–140. — DOI: 10.1038/nrmicro818.

132. Lee, A. S. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus / A. S. Lee, H. de Lencastre, J. Garau [и др.] // Nature Reviews Disease Primers. — 2018. — Т. 4. — С. 18033. — DOI: 10.1038/nrdp.2018.33.

133. Ahmad-Mansour, N. Staphylococcus aureus Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments / N. Ahmad-Mansour, S. Loubet, R. Y. Clone [и др.] // Toxins. — 2021. — Т. 13, № 10. — С. 677. — DOI: 10.3390/toxins13100677.

134. Oliveira, D. Staphylococcus aureus Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases / D. Oliveira, A. Borges, M. Simões // Toxins. — 2018. — Т. 10, № 6. — С. 252. — DOI: 10.3390/toxins10060252.

135. Lowy, F. D. Staphylococcus aureus infections / F. D. Lowy // New England Journal of Medicine. — 1998. — Т. 339, № 8. — С. 520–532. — DOI: 10.1056/NEJM199808203390806.

136. Cheung, G. Y. C. Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus / G. Y. C. Cheung, J. S. Bae, M. Otto // Virulence. — 2021. — Т. 12, № 1. — С. 547–569. — DOI: 10.1080/21505594.2021.1878680.

137. Zhou, K. A review on nanosystems as an effective approach against infections of Staphylococcus aureus / K. Zhou, Y. Li, Y. Zhang [и др.] // International Journal of Nanomedicine. — 2018. — Т. 13. — С. 7333–7347. — DOI: 10.2147/IJN.S169935.

138. Löffler, B. Staphylococcus aureus Toxins: Promoter or Handicap during Infection? / B. Löffler, L. Tuchscherr // Toxins. — 2021. — Т. 13, № 4. — С. 287. — DOI: 10.3390/toxins13040287.

139. Hirvonen, J. J. The use of molecular methods for the detection and identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus / J. J. Hirvonen // Biomarkers in Medicine. — 2014. — Т. 8, № 9. — С. 1115–1125. — DOI: 10.2217/bmm.14.60.

140. Lister, J. L. Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal / J. L. Lister, A. R. Horswill // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. — 2014. — Т. 4. — С. 178. — DOI: 10.3389/fcimb.2014.00178.

141. Dettman, J. R. Species diversity and molecular characterization of Alternaria section Alternaria isolates collected mainly from cereal crops in Canada / J. R. Dettman, Q. A. Eggertson, N. E. Kim // Frontiers in Microbiology. — 2023. — Т. 14. — С. 1194911. — DOI: 10.3389/fmicb.2023.1194911.

142. Fernandes, C. Mechanisms of Alternaria pathogenesis in animals and plants / C. Fernandes, A. Casadevall, T. Gonçalves // FEMS Microbiology Reviews. — 2023. — Т. 47, № 6. — С. fuad051. — DOI: 10.1093/femsre/fuad051.

143. Rivas, L. M. [Alternaria spp] / L. M. Rivas, M. Mühlhauser // Revista Chilena de Infectología. — 2014. — Т. 31, № 5. — С. 605–606. — DOI: 10.4067/S0716-10182014000500015.

144. Andersen, B. Differentiation of Alternaria infectoria and Alternaria alternata based on morphology, metabolites, and cultural characteristics / B. Andersen, U. Thrane // Canadian Journal of Microbiology. — 1996. — Т. 42, № 7. — С. 685–689. — DOI: 10.1139/m96-092.

145. Schmey, T. Small-spored Alternaria spp. (section Alternaria) are common pathogens on wild tomato species / T. Schmey, V. J. Febres, J. A. Rollins [и др.] // Environmental Microbiology. — 2023. — Т. 25, № 10. — С. 1830–1846. — DOI: 10.1111/1462-2920.16405.

146. Xu, X. Alternaria spp. Associated with Leaf Blight of Maize in Heilongjiang Province, China / X. Xu, Z. Zhang, Y. Liu [и др.] // Plant Disease. — 2022. — Т. 106, № 2. — С. 572–584. — DOI: 10.1094/PDIS-06-21-1256-RE.

147. Lawrence, D. P. The sections of Alternaria: formalizing species-group concepts / D. P. Lawrence, S. M. Gannibal, B. M. Pryor [и др.] // Mycologia. — 2013. — Т. 105, № 3. — С. 530–546. — DOI: 10.3852/12-249.

148. Thomma, B. P. Alternaria spp.: from general saprophyte to specific parasite / B. P. Thomma // Molecular Plant Pathology. — 2003. — Т. 4, № 4. — С. 225–236. — DOI: 10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x.

149. Turzhanova, A. Genetic diversity of Alternaria species associated with black point in wheat grains / A. Turzhanova, A. K. Sapakhova, G. Yernazarova [и др.] // PeerJ. — 2020. — Т. 8. — С. e9097. — DOI: 10.7717/peerj.9097.

150. Liu, G. T. Etiological role of Alternaria alternata in human esophageal cancer / G. T. Liu, S. Q. Qian, J. Z. Zhang [и др.] // Chinese Medical Journal. — 1992. — Т. 105, № 5. — С. 394–400.

151. Meena, M. Alternaria Toxins: Potential Virulence Factors and Genes Related to Pathogenesis / M. Meena, S. K. Gupta, P. Swapnil [и др.] // Frontiers in Microbiology. — 2017. — Т. 8. — С. 1451. — DOI: 10.3389/fmicb.2017.01451.

152. Mari, A. Sensitization to fungi: epidemiology, comparative skin tests, and IgE reactivity of fungal extracts / A. Mari, P. Schneider, V. Wally [и др.] // Clinical and Experimental Allergy. — 2003. — Т. 33, № 10. — С. 1429–1438. — DOI: 10.1046/j.1365-2222.2003.01787.x.

153. Woudenberg, J. H. Alternaria section Alternaria: Species, formae speciales or pathotypes? / J. H. Woudenberg, M. F. Seidl, J. Z. Groenewald [и др.] // Studies in Mycology. — 2015. — Т. 82. — С. 1–21. — DOI: 10.1016/j.simyco.2015.07.001.

154. Аманжолова, М. Ж. Экспрессия и очистка рекомбинатной эндонуклеазы CRISPR/Cas системы / М. Ж. Аманжолова, Ш. А. Манабайева, С. К. Абельденов // Вестник Карагандинского университета. Серия «Биология, медицина, география». — 2022. — № 4 (108). — С. 7–13.

155. Dong, L. An anti-CRISPR protein disables type V Cas12a by acetylation / L. Dong, X. Guan, N. Li [и др.] // Nature Structural & Molecular Biology. — 2019. — Т. 26, № 4. — С. 308–314. — DOI: 10.1038/s41594-019-0206-1.

156. Jumper, J. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel [и др.] // Nature. — 2021. — Т. 596, № 7873. — С. 583–589. — DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2.

157. Shaizadinova, A. Rapid and highly sensitive LAMP-CRISPR/Cas12a-based identification of bovine mastitis milk samples contaminated by Escherichia coli / A. Shaizadinova, M. Amanzholova, S. Abeldenov [и др.] // Journal of Agriculture and Food Research. — 2023. — Т. 14. — С. 100721. — DOI: 10.1016/j.jafr.2023.100721.

158. Аманжолова, М. Ж. Enhancing Pathogen Detection Methods through a Novel Molecular Diagnostic Approach with CRISPR/Cas Technology / М. Ж. Аманжолова, А. М. Шайзадинова, С. К. Абельденов // Вестник Карагандинского университета. Серия «Биология, медицина, география». — 2023. — № 4 (112). — С. 1–7.

159. Шайзадинова, А. М. Способ in vitro диагностики Escherichia coli на основе технологии LAMP-CRISPR/MBCAS12A : патент РК на полезную модель № 10420 / А. М. Шайзадинова, М. Ж. Аманжолова, С. О. Кириллов, С. К. Абельденов. — 2025.

160. Amanzholova, M. Genetic identification of Staphylococcus aureus isolates from cultured milk samples of bovine mastitis using isothermal amplification with CRISPR/Cas12a-based molecular assay / M. Amanzholova, A. Shaizadinova, S. Kirillov [и др.] // Veterinary Research Communications. — 2024. — Т. 48, № 1. — С. 291–300. — DOI: 10.1007/s11259-023-10194-0.

161. Зейнуллин, М. К. Advancement in Staphylococcus aureus Detection Using a RPA-CRISPR-Cas12a Fluorescent Assay Technology / М. К. Зейнуллин, М. Ж. Аманжолова, А. М. Шайзадинова [и др.] // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. — 2023. — № 3. — С. 23–28. — DOI: 10.11134/btp.3.2023.3.

162. Shaizadinova, A. CRISPR/Cas12a-based method coupled with isothermal amplification to identify Alternaria spp. isolated from wheat grain samples / A. Shaizadinova, M. Amanzholova, S. Kirillov [и др.] // Frontiers in Microbiology. — 2025. — Т. 15. — С. 1398584. — DOI: 10.3389/fmicb.2025.1398584.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
Нуклеотидная последовательность Cas12a

Нуклеотидная последовательность Cas12a Moraxella bovis:

5’CATATGTTATTTCAAGAGTTTACCCATTTATATCCCCTATCAAAAACCGT
GCGTTTTGAATTAAAGCCCATTGGCAAGACATTAGAGCATATCCATGCCA
AAAACTTTTTGAGCCAAGATGAGACCATGGCGGACATGTACCAAAAGGT
GAAGGCGATGTTGGACGATTATCATCGTGATTTTATCGCTGATATGATGG
GCGAAGTTAAGCTAACTAAGCTGGCAGAATTTTATGATGTGTATTTAAAA
TTTAGAAAAAATCCCAAAGACGATGGATTGCAAAAACAGCTAAAGGACT
TGCAAGCAGTTTTAAGAAAAGAGATTGTGAAGCCCATCGGTAATGGCGG
AAAATACAAGGCGGGTTATGACCGCTTGTTTGGGGCAAAGCTCTTTAAGG
ACGGCAAGAAGCTTGGTGATTTGGCGAAATTTGTCATCGCCCAAGAGGGC
GACTCATCACCCAAGCTTGCTCACCTTGCCCATTTTGAGAAGTTTAGCACT
TACTTTACTGGCTTTCATGACAACCGCAAAAACATGTACAGCGATGAGGA
TAAACACACCTCCATTGCCTATCGTCTGATTCATGAAAACTTACCACGCTT
TATTGACAACCTACAAATACTGACAACCATCAAACAAAAGCACTCGGCGT
TGTATGACCAGATTATAAATGAGCTGACTGCGAGTGGCTTGGATGTGTCG
CTGGCAAGTCATCTGGACGGCTATCACAAGCTTTTAACCCAAGAGGGTAT
CACGGCTTATAATACCCTGCTTGGCGGTATCAGTGGCGAGGCAGGTTCTC
GCAAGATAAAAGGTATCAATGAGCTTATCAATAGTCATCACAACCAACAT
TGCCACAAATCCGAACGTATCGCCAAATTACGCCCCCTGCACAAACAAAT
CCTAAGCGACGGCATGGGTGTGTCATTTTTGCCAAGCAAATTTGCTGATG
ACAGCGAAGTTTGTCAAGCGGTCAATGAATTTTACCGCCATTATGCTGAT
GTTTTTGCCAAGGTGCAAAGCTTATTTGATGGGTTTGATGACTATCAAAA
GGACGGCATTTATGTTGAGCATAAAAATTTAAATGAACTATCCAAGCAGG
CATTTGGTGATTTTGCCTTGTTGGGTCGGGTGTTAGACGGCTATTATGTGG
ATGTGGTGAGTCCAGAGTTTAATGAGAGATTTGCCAAAGCCAAAACCGAC
AATGCCAAAGAAAAACTAACAAAAGAAAAAGACAAATTCATCAAAGGCG
TGCATTCCTTGGCAAGCCTTGAGCAGGCGATAGAGCATTATACTGCTAGG
CATGATGATGAGTCTGTGCAGGCGGGCAAACTTGGACAGTATTTCAAACA
CGGTCTGGCAGGCGTGGACAATCCAATCCAAAAAATACACAACAACCAC
AGCACCATTAAGGGTTTTTTGGAGCGTGAACGTCCAGCAGGCGAGCGAGC
ATTGCCCAAAATTCAGTTAGGCAAAAACCCTGAAATCAGGCAACTAAAA
GAGCTGCTAGACAACACCCTAAACGTGGTGCATTTTGCCAAGTTATTAAC
GACCAAAACCACGCTAGACAACCAAGACGGCAATTTTTATGGTGAGTTTG
GGGCGTTGTATGATGAGCTTGCCAAGATTCCCACGCTTTATAACAAAGTG
CGTGATTATCTGTCGCAAAAGCCATTTAGCACCGAAAAATATAAATTAAA
CTTTGGCAATCCGACATTATTAAACGGGTGGGATTTGAATAAAGAAAAAG
ATAATTTTGGGGTTATCTTACAAAAAGACGGTTGTTATTATTTGGCGTTAT
TAGATAAAGCTCATAAAAAAGTATTTGATAATGCTCCAAATACAGGCAAA
AATATTTATCAAAAAATGATTTATAAATTATTGCCCGGACCTAATAAAAT
GCTACCCAAAGTATTTTTTGCCAAGAGTAATTTGGATTATTATAACCCTTC
TGCTGAACTACTGGATAAATATGCAAAAGGCACGCACAAAAAAGGCGAT

AATTTTAATCTAAAAGACTGCCATGCGTTGATTGATTTTTTTAAGGCGGGT
ATTAATAAACATCCAGAATGGCAACATTTTGGTTTTAAATTTTCGCCAACC
AGTAGCTATCAGGATTTGAGTGATTTTTATAGAGAAGTCGAACCACAAGG
TTATCAAGTAAAATTTGTGGATATCAACGCCGATTATATTGACGAGTTGG
TTGAACAAGGTCAGTTGTATTTATTCCAGATTTATAATAAAGATTTCTCGC
CCAAGGCTCACGGTAAGCCCAATTTGCATACTCTGTATTTTAAGGCGTTGT
TTAGCGAAGATAACCTTGCCGATCCAATTTATAAATTAAATGGCGAGGCA
CAGATATTTTATCGTCAGGCATCTTTGGATATGAATGAAACCACCATTCAT
CGTGCAGGCGAGGTATTAGAAAATAAAAATCCTGATAATCCAAAAAAGC
GTCAATTTGTCTATGACATCATCAAAGATAAACGCTATACCCAAGATAAG
TTTATGCTACATGTACCTATTACCATGAATTTTGGTGTGCAGGGCATGACG
ATTAAAGAATTTAATAAAAAAGTTAATGAAAGCATACAGCAATATGATG
AGGTGAATGTCATAGGCATAGACCGTGGAGAGCGACATTTGCTATATCTG
ACCGTGATTAATAGCAAAGGCGAAATCTTAGAACAGCGTAGTCTCAATGA
CATCATCACCACATCGGCAAATGGTACACAAATGACCACGCATTATCATA
AAATACTAGACAAGAGAGAAATAGAACGCCTAAATGCTCGTGTCGGTTG
GGGTGAGATTGAGACCATAAAAGAGCTAAAATCGGGCTATCTAAGCCAT
GTGGTACATCAAATCAGCCAGCTTATGCTTAAATATAATGCCATTGTGGT
GTTAGAGGATTTAAATTTTGGGTTTAAACGTGGTCGCTTTAAGGTGGAAA
AACAAATTTACCAAAACTTTGAAAACGCCTTAATCAAAAAGCTAAACCAT
TTGGTATTAAAAGATAAGGCAGATGATGAGATTGGCTCATACAAAAATGC
CCTGCAACTGACCAATAATTTTACTGATCTAAAAAGCATTGGCAAACAAA
CAGGCTTTTTATTCTATGTGCCTGCATGGAATACCAGTAAAATAGACCCT
GAAACGGGCTTTGTGGATTTGTTAAAACCACGTTATGAAAATATCGCTCA
GTCGCAAGCGTTTTTTGGTAAATTTGATAAGATTTGTTATAACGCAGATA
AGGGTTATTTTGAATTTCATATTGATTATGCCAAATTTACTGACAAAGCCA
AAAACTCTCGCCAAAAATGGACGATTTGCTCGCATGGCGATAAACGTTAT
GTGTATGACAAAACCGCCAATAAAAATAAAGGAACGACAAAGGGTATTA
ATGTCAATGATGAATTAAAATCGCTATTTGCTCGTCATCACATCAATGAA
AAACAGCCAAATCTGGTCATGGATATTTGCCAAAATAACGATAAAGAATT
TCATAAATCGCTGATGTATCTATTAAAGACATTGCTTGCATTAAGATATA
GTAACGCCAGTAGCGATGAAGATTTTATTTTATCGCCTGTGGCAAATGAT
GAGGGTGTGTTTTTTAATTCGGCATTGGCGGATGATACACAGCCACAAAA
TGCGGACGCCAATGGGGCGTATCATATCGCATTAAAGGGCTTATGGCTAT
TAAATGAACTAAAAGACAGCGATGATTTGAATAAAGTCAAACTTGCCATT
GACAATCAAACATGGCTAAACTTCGCTCAAAACCGCTAAGGATCC 3’

Кодон-оптимизированная последовательность Cas12a *Moraxella equi*

5’CTGTTTCAAGATTTTACCCACCTGTATCCGCTGAGCAAGACCGTTCGTTT
CGAGCTGAAGCCGATTGGCAAGACCCTGGAGCACATTCACGCGAAGAAC
TTTCTGAGCCAGGACAAAACGATGGCGGATATGTACCAAAAAGTGGGTG
CGATCCTGGACGATTATCACCGTGACTTCATTGCGGATATGATGGGCGAG
GTGAAACTGACCAAGCTGGCGGAATTTTACGATGTTTACCTGAAGTTCCG
TAAGAACCCGAAAGACGATGGTCTGCAGAAGCAACTGAAAGACCTGCAG

GCGGTGCTGCGTAAAGAGATCGTTAAGCCGATTGGCAGCGGTGGCAAGT
ACAAAGCGGGTTATGAGCGTCTGTTTGGCGCGAAGCTGTTCAAAGACGGC
AAGGAACTGGGCGATCTGGCGAAGTTTGTTATTACCCAGGAAGGTGAAA
GCAGCCCGAAGCTGCCGCAAATCGCGCACTTTGAAAAATTCAGCACCTAC
TTTACCGGCTTCCACGACAACCGTAAGAACATGTACAGCGACGAGGATAA
ACACACCGCGATCGCGTATCGTCTGATTCACGAAAACCTGCCGCGTTTCA
TCGATAACCTGCAGATCCTGGCGACCATTAAGCAAAAACACAGCGTGCTG
TACGACCGTATCATTAACGAGCTGACCGCGAGCGGTCTGGATGTTAGCCT
GGCGAGCCACCTGGACGGTTATCACAAACTGCTGACCCAGGAAGGTATC
ACCGCGTACAACCGTATCATTGGTGAAGTGAACGGCTATACCAACAAGCA
CAACCAGCACTGCCACAAAAGCGAACGTATCGCGAAGCTGCGTCCGCTG
CACAAACAAATTCTGAGCGATGGTATGGGCGTGAGCTTTCTGCCGAGCAA
ATTCGCGGACGATAACGAGATGTGCCAGGCGGTTAACGAATTTTGCCGTC
ACTACGCGCACGTGTTCGCGAAGGTTCAGAGCCTGTTTGATGGTTTCGAC
GATCACCAAAAAGACGGCATCTATGTGGAGCACAAGAACCTGAACGAAC
TGAGCAAACAGGCGTTTGGTGACTTCGCGCTGCTGGGTCGTGTGCTGGAC
GGCTACTATGTTGATGTGGTTAACCCGGAGTTTAGCGAACGTTTCGCGAA
GGCGAAAACCGATAACGCGAAGGAGAAACTGACCAAGGAAAAAGACAA
GTTCATTAAAGGTGTTCACAGCCTGGCGAGCCTGGAGCAGGCGATCGAAC
ACTACACCACCAAGCACGACGATGAGAGCGTGCAGGCGGGCAAGCTGGG
CCAATATTTTAAACACGGTCTGGCGGGCGTTGACAACCCGATCCAAAAGA
TTCACAACAGCCACAGCACCATCAAAGGTTTCCTGGAGCGTGAACGTCCG
GCGGGTGAACGTACCCTGCCGAAAATTAAGAGCGATAAGAGCCCGGAGA
TGACCCAGCTGCGTCAACTGAAAGAACTGCTGGACAACGCGCTGAACGT
GGTTCACTTCGCGAAACTGCTGACCACCAAGACCACCCTGGACAACCAGG
ATGGTAACTTTTACGGCGAGTTCGGCGTGCTGTATGATGAACTGGCGAAG
ATCGCGACCCTGTACAACAAAGTTCGTGACTATCTGAGCCAAAAACCGTT
TAGCACCGAGAAATACAAGCTGAACTTCGGTAACCCGACCCTGCTGAACG
GCTGGGACCTGAACAAAGAAAAGGATAACTTTGGTGTGATTCTGCAGAA
GGACGGCTGCTACTATCTGGCGCTGCTGGATAAAGCGCACAAGAAAGTTT
TCGACAACGCGCCGAACGCGGGCAAGAGCGTGTACCAAAAAATGGTTTA
TAAGCTGCTGCCGGGCCCGAACAAAATGCTGCCGAAGGTGTTCTTTGCGA
AGAGCAACCTGGATTACTATAACCCGAGCGCGGAGCTGCTGGACAAATA
CGCGCAGGGCACCCACAAGAAAGGCGACAACTTCAACCTGAAGGATTGC
CACGCGCTGATCGACTTCTTTAAAGCGAGCATTAACAAGCACCCGGAGTG
GCAGCACTTCGGTTTTGAGTTCAGCCCGACCAGCAGCTACCAAGACCTGA
GCGATTTCTATCGTGAGGTGGAACCGCAGGGCTACCAAGTGAAATTTGTT
GACATCGATACCGAGTATATTGATGAGCTGGTTGAACAGGGTCAACTGTA
CCTGTTTCAGATTTACAACAAAGACTTCAGCACCAAAGCGCACGGCAAGC
CGAACCTGCACACCCTGTACTTTAAGGCGCTGTTCAGCGAGGATAACCTG
GCGAACCCGATCTACAAGCTGAACGGTGAAGCGCAGATTTTCTACCGTAA
AGCGAGCCTGGATATGAACGAAATCACCATTCACCGTGCGGGCGAGGTG
CTGGAAAACAAGAACCCGGACAACCCGAAACAGCGTCAATTCGTTTACG
ACATCATCAAGGATAAGCGTTACACCCAGGACAAATTTATGCTGCACGTG

CCGATCACCATGAACTTCGGTGTTCAGGGCATGACCATTAAGGAGTTTAA
CAAGAAAGTGAACCAAAGCATCCAGCAATACGACGATGTGAACGTTATC
GGTATTGATCGTGGCGAACGTCACCTGCTGTATCTGACCGTTATCAACAG
CAAGGGCGAGATTCTGGAACAGCGTAGCCTGAACGACATCACCACCGCG
AGCGCGAACGGCACCCAAATGACCACCCCGTACCACAAAATCCTGGATA
AGCGTGAGATTGAACGTCTGAACGCGCGTATTGGTTGGGACGAGATCGA
AACCATTAAAGAGCTGAAGAGCGGCTACCTGAGCCACGTGGTTCACCAG
GTTAGCCAACTGATGCTGAAATATAACGCGATCGTGGTTCTGGAAGACCT
GAACTTTGGTTTCAAGCGTGGCCGTTTCAAAGTGGAGAAGCAGATTTACC
AAAACTTTGAAAACGCGCTGATTAAGAAACTGAACCACCTGGTTCTGAAA
GATAAGGCGGACGATGAGATCGGTAGCTATAAAAACGCGCTGCAGCTGA
CCAACAACTTCACCGACCTGAAAAGCATCGGCAAGCAAACCGGCTTTCTG
TTCTACGTGCCGGCGTGGAACACCAGCAAGATTGATCCGGCGACCGGCTT
CGTTGACCTGCTGAAACCGCGTTATGAGAACATTGCGCAGAGCCAAGCGT
TCTTTGGCAAGTTCGATAAAATCTGCTACAACAAGGACAAGGGCTATTTT
GAGTTCCACATTGATTACGCGAAGTTCACCGACAAAGCGAAGAACAGCC
GTCAGAAATGGAAAATCTGCAGCCACGGTAACAAGCGTTACGTGTATGA
CAAAACCGCGAACCAAAACAAAGGTGCGACCAAGGGCATTAACGTTAAC
GATGAGCTGAAGAGCCTGTTTGCGCGTCACCACATTAACGACAAACAGCC
GAACCTGGTGATGGACATCTGCCAAAACAACGACAAAGAGTTCCACAAG
AGCCTGATGTACCTGCTGAAGACCCTGCTGGCGCTGCGTTATAGCAACGC
GAGCAGCGACGAAGATTTCATCCTGAGCCCGGTTGCGAACGATCGTGGTG
TGTTCTTTAACAGCGTTCTGGCGGACGATACCCAGCCGCAAAACGCGGAC
GCGAACGGTGCGTACCACATTGCGCTGAAGGGCCTGTGGCTGCTGAACGA
ACTGAAAAACAGCGACGATCTGGGCAAAGTGAAACTGGCGATTGATAAC
CAAACCTGGCTGAACTTCGCGCAAAACCGCTAA 3’

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Отчет GenScript о кодон-оптимизации MeCas12a с выравниванием аминокислотных последовательностей



GenScript
Make Research Easy



Quotation #:
Gene name: **MeCas12a**
Customer:
Optimized for expression in: ***E. coli***
Gene length: **3753**
Optimization region: **1-3753**
Analysis conducted by: **Jason Zhou, Ph.D**
Analysis created: **11/04/2021 04:00:22**

QA: *James*

ACCORDING TO ISO 9001 CERTIFIED

OptimumGene™ GenScript Codon Optimization

OptimumGene™ Codon Optimization Analysis

Optimization Parameters

OptimumGene™ algorithm optimizes a variety of parameters that are critical to the efficiency of gene expression, including but not limited to:

- Codon usage bias
- GC content
- CpG dinucleotides content
- mRNA secondary structure
- Cryptic splicing sites
- Premature PolyA sites
- Internal chi sites and ribosomal binding sites
- Negative CpG islands
- RNA instability motif (ARE)
- Repeat sequences (direct repeat, reverse repeat, and Dyad repeat)
- Restriction sites that may interfere with cloning

Additional sequences we propose to improve translational performance:

(1) To increase the efficiency of translational initiation
- Kozak sequence
- Shine-Dalgarno Sequence

(2) To increase the efficiency of translational termination
- Stop codon (TAA)

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA
Tel: 1-732-885-9188 Fax: 1-732-210-0262 Email: gene@genscript.com Web: www.genscript.com

3. Restriction Enzymes and CIS-Acting Elements

Restriction Enzymes	Optimized	Original
* Green: filtered sites; Blue: checked sites (not filtered); Red: kept sites.		
EcoRI(GAATTC)	0	0
NdeI(CATATG)	0	0
XbaI(TCTAGA)	0	0
BamHI(GGATCC)	0	0
NcoI(CCATGG)	0	1(119)
BglII(AGATCT)	0	0
HindIII(AAGCTT)	0	4(454,721,972,1282)
KpnI(GGTACC)	0	0
EcoRV(GATATC)	0	0
XhoI(CTCGAG)	0	0
NotI(GCGGCCGC)	0	0
NheI(GCTAGC)	0	0
SacI(GAGCTC)	0	0
SalI(GTCGAC)	0	0
Polymerase slippage site 1	0	0
Polymerase slippage site 2	0	0
Frameshift element	0	3(1777,1951,2533)
Ribosome binding site	0	0

CIS-Acting Elements	Optimized	Original
E.coli_RBS(AGGAGG)	0	0
PolyT(TTTTTT)	0	4
PolyA(AAAAAAA)	0	0
Chi_sites(GCTGGTGG)	0	0
T7Cis(ATCTGTT)	0	0
SD_like(GGRGGT)	0	0

4. Remove Repeat Sequences

After Optimization

Max Direct Repeat: Size:13 Distance:2631 Frequency:2
Max Inverted Repeat: None
Max Dyad Repeat: None

Before Optimization

Max Direct Repeat: Size:14 Distance:1006 Frequency:2
Max Inverted Repeat: Size: 14 Tm: 36.2 Start Positions: 2917, 3177
Max Dyad Repeat: None

5. Optimized Sequence(Optimized Sequence Length:3753, GC%:51.42)

```
CTGTTTCAAGATTTTACCCACCTGTATCCGCTGAGCAAGACCGTTCGTTTCGAGCTGAAGCCGATTGGCAAGACC
CTGGAGCACATTCACGCGAAGAACTTTCTGAGCCAGGACAAAACGATGGCGGATATGTACCAAAAAGTGGGTGCG
ATCCTGGACGATTATCACCGTGACTTCATTGCGGATATGATGGGCGAGGTGAAACTGACCAAGCTGGCGGAATTT
TACGATGTTTACCTGAAGTTCCGTAAGAACCCGAAAGACGATGGTCTGCAGAAGCAACTGAAAGACCTGCAGGCG
GTGCTGCGTAAAGAGATCGTTAAGCCGATTGGCAGCGGTGGCAAGTACAAAGCGGGTTATGAGCGTCTGTTTGGC
GCGAAGCTGTTCAAAGACGGCAAGGAACTGGGCGATCTGGCGAAGTTTGTTATTACCCAGGAAGGTGAAAGCAGC
CCGAAGCTGCCGCAAATCGCGCACTTTGAAAAATTCAGCACCTACTTTACCGGCTTCCACGACAACCGTAAGAAC
ATGTACAGCGACGAGGATAAACACACCGCGATCGCGTATCGTCTGATTCACGAAAACCTGCCGCGTTTCATCGAT
AACCTGCAGATCCTGGCGACCATTAAGCAAAAACACAGCGTGCTGTACGACCGTATCATTAACGAGCTGACCGCG
AGCGGTCTGGATGTTAGCCTGGCGAGCCACCTGGACGGTTATCACAAACTGCTGACCCAGGAAGGTATCACCGCG
TACAACCGTATCATTGGTGAAGTGAACGGCTATACCAACAAGCACAACCAGCACTGCCACAAAAGCGAACGTATC
GCGAAGCTGCGTCCGCTGCACAAACAAATTCTGAGCGATGGTATGGGCGTGAGCTTTCTGCCGAGCAAATTCGCG
GACGATAACGAGATGTGCCAGGCGGTTAACGAATTTTGCCGTCACTACGCGCACGTGTTCGCGAAGGTTCAGAGC
CTGTTTGATGGTTTCGACGATCACCAAAAAGACGGCATCTATGTGGAGCACAAGAACCTGAACGAACTGAGCAAA
CAGGCGTTTGGTGACTTCGCGCTGCTGGGTCGTGTGCTGGACGGCTACTATGTTGATGTGGTTAACCCGGAGTTT
AGCGAACGTTTCGCGAAGGCGAAAACCGATAACGCGAAGGAGAAACTGACCAAGGAAAAAGACAAGTTCATTAAA
GGTGTTCACAGCCTGGCGAGCCTGGAGCAGGCGATCGAACACTACACCACCAAGCACGACGATGAGAGCGTGCAG
GCGGGCAAGCTGGGCCAATATTTTAAACACGGTCTGGCGGGCGTTGACAACCCGATCCAAAAGATTCACAACAGC
CACAGCACCATCAAAGGTTTCCTGGAGCGTGAACGTCCGGCGGGTGAACGTACCCTGCCGAAAATTAAGAGCGAT
AAGAGCCCGGAGATGACCCAGCTGCGTCAACTGAAAGAACTGCTGGACAACGCGCTGAACGTGGTTCACTTCGCG
AAACTGCTGACCACCAAGACCACCCTGGACAACCAGGATGGTAACTTTTACGGCGAGTTCGGCGTGCTGTATGAT
GAACTGGCGAAGATCGCGACCCTGTACAACAAAGTTCGTGACTATCTGAGCCAAAAACCGTTTAGCACCGAGAAA
TACAAGCTGAACTTCGGTAACCCGACCCTGCTGAACGGCTGGGACCTGAACAAAGAAAAGGATAACTTTGGTGTG
ATTCTGCAGAAGGACGGCTGCTACTATCTGGCGCTGCTGGATAAAGCGCACAAGAAAGTTTTCGACAACGCGCCG
AACGCGGGCAAGAGCGTGTACCAAAAAATGGTTTATAAGCTGCTGCCGGGCCCGAACAAAATGCTGCCGAAGGTG
TTCTTTGCGAAGAGCAACCTGGATTACTATAACCCGAGCGCGGAGCTGCTGGACAAATACGCGCAGGGCACCCAC
AAGAAAGGCGACAACTTCAACCTGAAGGATTGCCACGCGCTGATCGACTTCTTTAAAGCGAGCATTAACAAGCAC
CCGGAGTGGCAGCACTTCGGTTTTGAGTTCAGCCCGACCAGCAGCTACCAAGACCTGAGCGATTTCTATCGTGAG
GTGGAACCGCAGGGCTACCAAGTGAAATTTGTTGACATCGATACCGAGTATATTGATGAGCTGGTTGAACAGGGT
CAACTGTACCTGTTTCAGATTTACAACAAAGACTTCAGCACCAAAGCGCACGGCAAGCCGAACCTGCACACCCTG
TACTTTAAGGCGCTGTTCAGCGAGGATAACCTGGCGAACCCGATCTACAAGCTGAACGGTGAAGCGCAGATTTTC
TACCGTAAAGCGAGCCTGGATATGAACGAAATCACCATTCACCGTGCGGGCGAGGTGCTGGAAAACAAGAACCCG
GACAACCCGAAACAGCGTCAATTCGTTTACGACATCATCAAGGATAAGCGTTACACCCAGGACAAATTTATGCTG
CACGTGCCGATCACCATGAACTTCGGTGTTCAGGGCATGACCATTAAGGAGTTTAACAAGAAAGTGAACCAAAGC
ATCCAGCAATACGACGATGTGAACGTTATCGGTATTGATCGTGGCGAACGTCACCTGCTGTATCTGACCGTTATC
AACAGCAAGGGCGAGATTCTGGAACAGCGTAGCCTGAACGACATCACCACCGCGAGCGCGAACGGCACCCAAATG
ACCACCCCGTACCACAAAATCCTGGATAAGCGTGAGATTGAACGTCTGAACGCGCGTATTGGTTGGGACGAGATC
GAAACCATTAAAGAGCTGAAGAGCGGCTACCTGAGCCACGTGGTTCACCAGGTTAGCCAACTGATGCTGAAATAT
AACGCGATCGTGGTTCTGGAAGACCTGAACTTTGGTTTCAAGCGTGGCCGTTTCAAAGTGGAGAAGCAGATTTAC
```

CAAAACTTTGAAAACGCGCTGATTAAGAAACTGAACCACCTGGTTCTGAAAGATAAGGCGGACGATGAGATCGGT
AGCTATAAAAACGCGCTGCAGCTGACCAACAACTTCACCGACCTGAAAAGCATCGGCAAGCAAACCGGCTTTCTG
TTCTACGTGCCGGCGTGGAACACCAGCAAGATTGATCCGGCGACCGGCTTCGTTGACCTGCTGAAACCGCGTTAT
GAGAACATTGCGCAGAGCCAAGCGTTCTTTGGCAAGTTCGATAAAATCTGCTACAACAAGGACAAGGGCTATTTT
GAGTTCCACATTGATTACGCGAAGTTCACCGACAAAGCGAAGAACAGCCGTCAGAAATGGAAAATCTGCAGCCAC
GGTAACAAGCGTTACGTGTATGACAAAACCGCGAACCAAAACAAAGGTGCGACCAAGGGCATTAACGTTAACGAT
GAGCTGAAGAGCCTGTTTGCGCGTCACCACATTAACGACAAACAGCCGAACCTGGTGATGGACATCTGCCAAAAC
AACGACAAAGAGTTCCACAAGAGCCTGATGTACCTGCTGAAGACCCTGCTGGCGCTGCGTTATAGCAACGCGAGC
AGCGACGAAGATTTCATCCTGAGCCCGGTTGCGAACGATCGTGGTGTGTTCTTTAACAGCGTTCTGGCGGACGAT
ACCCAGCCGCAAAACGCGGACGCGAACGGTGCGTACCACATTGCGCTGAAGGGCCTGTGGCTGCTGAACGAACTG
AAAAACAGCGACGATCTGGGCAAAGTGAAACTGGCGATTGATAACCAAACCTGGCTGAACTTCGCGCAAAACCGC
TAA

6. DNA Alignment (Optimized Region)

```
Optimized     1   CTGTTTCAAGATTTTACCCACCTGTATCCGCTGAGCAAGACCGTTCGTTTCGAGCTGAAG
Original      1   TTATTTCAAGACTTTACTCATCTATACCCCTTATCAAAAACCGTGCGTTTTGAATTAAAG

Optimized    61   CCGATTGGCAAGACCCTGGAGCACATTCACGCGAAGAACTTTCTGAGCCAGGACAAAACG
Original     61   CCCATTGGCAAGACATTAGAGCATATCCATGCCAAAAACTTTCTGAGCCAAGATAAGACC

Optimized   121   ATGGCGGATATGTACCAAAAAGTGGGTGCGATCCTGGACGATTATCACCGTGACTTCATT
Original    121   ATGGCGGACATGTACCAAAAGGTAGGGGCGATACTGGACGATTATCATCGTGATTTTATC

Optimized   181   GCGGATATGATGGGCGAGGTGAAACTGACCAAGCTGGCGGAATTTTACGATGTTTACCTG
Original    181   GCTGATATGATGGGCGAAGTTAAGCTAACTAAGCTGGCAGAATTTTATGATGTGTATTTA

Optimized   241   AAGTTCCGTAAGAACCCGAAAGACGATGGTCTGCAGAAGCAACTGAAAGACCTGCAGGCG
Original    241   AAATTTAGAAAAAATCCCAAAGACGATGGATTGCAAAAACAGCTAAAGGACTTGCAAGCA

Optimized   301   GTGCTGCGTAAAGAGATCGTTAAGCCGATTGGCAGCGGTGGCAAGTACAAAGCGGGTTAT
Original    301   GTTTTAAGAAAAGAGATTGTCAAGCCGATAGGCAGTGGTGGCAAATACAAGGCTGGCTAT

Optimized   361   GAGCGTCTGTTTGGCGCGAAGCTGTTCAAAGACGGCAAGGAACTGGGCGATCTGGCGAAG
Original    361   GAACGCTTATTTGGGGCAAAGCTCTTTAAAGACGGCAAAGAGCTTGGTGATTTGGCAAAA

Optimized   421   TTTGTTATTACCCAGGAAGGTGAAAGCAGCCCGAAGCTGCCGCAAATCGCGCACTTTGAA
Original    421   TTTGTCATCACCCAAGAAGGCGAATCATCGCCAAAGCTTCCTCAAATTGCCCATTTTGAG

Optimized   481   AAATTCAGCACCTACTTTACCGGCTTCCACGACAACCGTAAGAACATGTACAGCGACGAG
Original    481   AAGTTTAGCACCTACTTTACTGGCTTTCATGACAACCGCAAAAACATGTACAGCGATGAG
```

```
Optimized  1321   GACAACCCGATCCAAAAGATTCACAACAGCCACAGCACCATCAAAGGTTTCCTGGAGCGT
Original   1321   GATAATCCAATCCAAAAAATACACAACAGCCACAGCACTATTAAAGGCTTTTTGGAGCGT

Optimized  1381   GAACGTCCGGCGGGTGAACGTACCCTGCCGAAAATTAAGAGCGATAAGAGCCCGGAGATG
Original   1381   GAACGCCCAGCAGGCGAGCGAACACTGCCCAAAATCAAATCAGATAAAAGTCCTGAAATG

Optimized  1441   ACCCAGCTGCGTCAACTGAAAGAACTGCTGGACAACGCGCTGAACGTGGTTCACTTCGCG
Original   1441   ACACAGTTAAGACAACTAAAAGAGCTACTAGACAACGCCCTAAACGTGGTGCATTTTGCT

Optimized  1501   AAACTGCTGACCACCAAGACCACCCTGGACAACCAGGATGGTAACTTTTACGGCGAGTTC
Original   1501   AAGTTATTAACGACCAAAACCACGCTGGATAACCAAGACGGTAATTTTTATGGTGAGTTT

Optimized  1561   GGCGTGCTGTATGATGAACTGGCGAAGATCGCGACCCTGTACAACAAAGTTCGTGACTAT
Original   1561   GGGGTGTTGTATGATGAGCTTGCCAAGATTGCCACGCTTTATAACAAAGTGCGTGATTAT

Optimized  1621   CTGAGCCAAAAACCGTTTAGCACCGAGAAATACAAGCTGAACTTCGGTAACCCGACCCTG
Original   1621   CTGTCCCAAAAGCCATTTAGTACCGAAAAATACAAATTAAACTTTGGCAATCCGACATTA

Optimized  1681   CTGAACGGCTGGGACCTGAACAAAGAAAAGGATAACTTTGGTGTGATTCTGCAGAAGGAC
Original   1681   TTAAACGGTTGGGATTTGAATAAAGAAAAAGATAATTTTGGGGTTATCTTACAAAAAGAC

Optimized  1741   GGCTGCTACTATCTGGCGCTGCTGGATAAAGCGCACAAGAAAGTTTTCGACAACGCGCCG
Original   1741   GGCTGTTATTATTTGGCATTATTGGATAAAGCTCATAAAAAAGTATTTGATAATGCTCCA

Optimized  1801   AACGCGGGCAAGAGCGTGTACCAAAAAATGGTTTATAAGCTGCTGCCGGGCCCGAACAAA
Original   1801   AATGCAGGTAAAAGCGTTTATCAAAAAATGGTTTATAAATTATTGCCCGGCCCTAATAAA

Optimized  1861   ATGCTGCCGAAGGTGTTCTTTGCGAAGAGCAACCTGGATTACTATAACCCGAGCGCGGAG
Original   1861   ATGCTACCAAAAGTATTTTTTGCCAAGAGTAATTTGGATTATTATAACCCTTCTGCCGAA

Optimized  1921   CTGCTGGACAAATACGCGCAGGGCACCCACAAGAAAGGCGACAACTTCAACCTGAAGGAT
Original   1921   CTACTGGATAAATATGCACAAGGCACGCACAAAAAAGGCGATAATTTTAATCTAAAAGAC

Optimized  1981   TGCCACGCGCTGATCGACTTCTTTAAAGCGAGCATTAACAAGCACCCGGAGTGGCAGCAC
Original   1981   TGCCATGCGTTGATTGATTTTTTTAAGGCGAGTATTAACAAACATCCAGAATGGCAACAT

Optimized  2041   TTCGGTTTTGAGTTCAGCCCGACCAGCAGCTACCAAGACCTGAGCGATTTCTATCGTGAG
Original   2041   TTTGGTTTTGAATTTTCGCCAACCAGTAGCTATCAGGATTTAAGCGATTTTTATAGAGAA

Optimized  2101   GTGGAACCGCAGGGCTACCAAGTGAAATTTGTTGACATCGATACCGAGTATATTGATGAG
```

```
Original    2101    GTTGAACCACAAGGTTATCAAGTAAAATTTGTGGATATTGACACCGAGTATATTGATGAG

Optimized   2161    CTGGTTGAACAGGGTCAACTGTACCTGTTTCAGATTTACAACAAAGACTTCAGCACCAAA
Original    2161    TTGGTTGAACAGGGTCAGTTATATTTATTCCAGATTTATAATAAAGATTTCTCGACCAAG

Optimized   2221    GCGCACGGCAAGCCGAACCTGCACACCCTGTACTTTAAGGCGCTGTTCAGCGAGGATAAC
Original    2221    GCTCATGGTAAACCCAATTTACATACTTTGTATTTTAAGGCGTTATTTAGTGAAGATAAT

Optimized   2281    CTGGCGAACCCGATCTACAAGCTGAACGGTGAAGCGCAGATTTTCTACCGTAAAGCGAGC
Original    2281    CTTGCCAATCCAATTTATAAATTAAATGGCGAGGCACAGATATTTTATCGCAAGGCGTCT

Optimized   2341    CTGGATATGAACGAAATCACCATTCACCGTGCGGGCGAGGTGCTGGAAAACAAGAACCCG
Original    2341    TTGGATATGAATGAAATCACCATTCATCGTGCAGGCGAGGTATTAGAAAATAAAAATCCC

Optimized   2401    GACAACCCGAAACAGCGTCAATTCGTTTACGACATCATCAAGGATAAGCGTTACACCCAG
Original    2401    GATAATCCCAAACAGCGTCAATTTGTCTATGACATCATCAAAGACAAACGTTATACCCAA

Optimized   2461    GACAAATTTATGCTGCACGTGCCGATCACCATGAACTTCGGTGTTCAGGGCATGACCATT
Original    2461    GATAAGTTTATGCTACATGTGCCTATTACCATGAATTTTGGCGTGCAGGGTATGACGATT

Optimized   2521    AAGGAGTTTAACAAGAAAGTGAACCAAAGCATCCAGCAATACGACGATGTGAACGTTATC
Original    2521    AAAGAATTTAATAAAAAAGTCAATCAAAGCATACAGCAATATGATGATGTCAATGTCATA

Optimized   2581    GGTATTGATCGTGGCGAACGTCACCTGCTGTATCTGACCGTTATCAACAGCAAGGGCGAG
Original    2581    GGCATAGACCGTGGCGAGCGACATCTATTGTATCTGACCGTGATTAATAGCAAAGGCGAA

Optimized   2641    ATTCTGGAACAGCGTAGCCTGAACGACATCACCACCGCGAGCGCGAACGGCACCCAAATG
Original    2641    ATCTTAGAACAGCGTAGTCTCAATGACATCACTACCGCATCGGCAAATGGCACACAAATG

Optimized   2701    ACCACCCCGTACCACAAAATCCTGGATAAGCGTGAGATTGAACGTCTGAACGCGCGTATT
Original    2701    ACCACGCCTTATCATAAGATACTGGACAAGAGAGAAATAGAACGCCTAAATGCTCGTATC

Optimized   2761    GGTTGGGACGAGATCGAAACCATTAAAGAGCTGAAGAGCGGCTACCTGAGCCACGTGGTT
Original    2761    GGTTGGGATGAGATTGAGACCATAAAAGAGCTAAAATCGGGCTATCTAAGCCATGTGGTA

Optimized   2821    CACCAGGTTAGCCAACTGATGCTGAAATATAACGCGATCGTGGTTCTGGAAGACCTGAAC
Original    2821    CATCAAGTCAGCCAGCTTATGCTTAAATATAATGCCATTGTGGTGTTAGAGGATTTAAAT

Optimized   2881    TTTGGTTTCAAGCGTGGCCGTTTCAAAGTGGAGAAGCAGATTTACCAAAACTTTGAAAAC
Original    2881    TTTGGGTTTAAGCGTGGTCGCTTTAAGGTGGAAAAACAAATTTACCAAAATTTTGAAAAC
```

```
Optimized  2941   GCGCTGATTAAGAAACTGAACCACCTGGTTCTGAAAGATAAGGCGGACGATGAGATCGGT
Original   2941   GCCTTAATCAAAAAGCTAAACCACTTGGTATTAAAAGATAAGGCAGATGATGAGATTGGT

Optimized  3001   AGCTATAAAAACGCGCTGCAGCTGACCAACAACTTCACCGACCTGAAAAGCATCGGCAAG
Original   3001   TCATATAAAAATGCCCTGCAATTGACCAATAATTTTACTGATCTAAAAAGCATTGGCAAA

Optimized  3061   CAAACCGGCTTTCTGTTCTACGTGCCGGCGTGGAACACCAGCAAGATTGATCCGGCGACC
Original   3061   CAAACGGGCTTTTTATTCTATGTGCCTGCATGGAATACCAGTAAAATAGACCCTGCAACG

Optimized  3121   GGCTTCGTTGACCTGCTGAAACCGCGTTATGAGAACATTGCGCAGAGCCAAGCGTTCTTT
Original   3121   GGCTTTGTGGATTTGTTAAAACCACGTTATGAAAATATCGCTCAGTCGCAAGCGTTTTTT

Optimized  3181   GGCAAGTTCGATAAAATCTGCTACAACAAGGACAAGGGCTATTTTGAGTTCCACATTGAT
Original   3181   GGTAAATTTGATAAGATTTGTTATAACAAAGACAAGGGTTATTTTGAATTTCATATTGAT

Optimized  3241   TACGCGAAGTTCACCGACAAAGCGAAGAACAGCCGTCAGAAATGGAAAATCTGCAGCCAC
Original   3241   TATGCCAAATTCACTGACAAGGCCAAAAATTCTCGCCAAAAATGGAAGATTTGCTCGCAT

Optimized  3301   GGTAACAAGCGTTACGTGTATGACAAAACCGCGAACCAAAACAAAGGTGCGACCAAGGGC
Original   3301   GGCAATAAACGCTATGTGTATGACAAAACCGCCAATCAAAATAAAGGGGCGACCAAGGGT

Optimized  3361   ATTAACGTTAACGATGAGCTGAAGAGCCTGTTTGCGCGTCACCACATTAACGACAAACAG
Original   3361   ATTAATGTCAATGATGAATTAAAATCGCTATTTGCTCGTCATCACATCAATGACAAACAG

Optimized  3421   CCGAACCTGGTGATGGACATCTGCCAAAACAACGACAAAGAGTTCCACAAGAGCCTGATG
Original   3421   CCAAATCTGGTTATGGATATTTGCCAAAATAACGATAAAGAATTTCATAAATCGCTAATG

Optimized  3481   TACCTGCTGAAGACCCTGCTGGCGCTGCGTTATAGCAACGCGAGCAGCGACGAAGATTTC
Original   3481   TATCTATTAAAGACATTGCTTGCATTGCGATATAGTAACGCCAGTAGCGATGAAGATTTT

Optimized  3541   ATCCTGAGCCCGGTTGCGAACGATCGTGGTGTGTTCTTTAACAGCGTTCTGGCGGACGAT
Original   3541   ATTTTATCGCCTGTGGCAAATGATAGGGGTGTGTTTTTTAATTCGGTATTAGCAGATGAC

Optimized  3601   ACCCAGCCGCAAAACGCGGACGCGAACGGTGCGTACCACATTGCGCTGAAGGGCCTGTGG
Original   3601   ACACAGCCACAAAATGCGGACGCCAATGGGGCGTATCATATCGCATTAAAGGGCTTATGG

Optimized  3661   CTGCTGAACGAACTGAAAAACAGCGACGATCTGGGCAAAGTGAAACTGGCGATTGATAAC
Original   3661   CTATTAAATGAACTAAAAAACAGCGATGATTTGGGTAAAGTCAAACTTGCCATTGATAAT
```

```
Optimized   3721    CAAACCTGGCTGAACTTCGCGCAAAACCGCTAA
Original    3721    CAAACATGGCTAAACTTCGCTCAAAACCGCTAA
```

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA
Toll-Free: 1-877-436-7274 Tel: 1-732-885-9188 Fax: 1-732-210-0262 Email: gene@genscript.com Web: www.genscript.com

Conclusion

A wide variety of factors regulate and influence gene expression levels, and our OptimumGene™ algorithm takes into consideration as many of them as possible, producing the single gene that can reach the highest possible level of expression.

In this case, the native gene employs tandem rare codons that can reduce the efficiency of translation or even disengage the translational machinery. We changed the codon usage bias in E. coli by upgrading the CAI from 0.47 to 0.96 . GC content and unfavorable peaks have been optimized to prolong the half-life of the mRNA. The Stem-Loop structures, which impact ribosomal binding and stability of mRNA, were broken. In addition, our optimization process has screened and successfully modified those negative cis-acting sites as listed in the introduction.

We are honored to deliver the analysis that you requested. We hope that you are pleased with your GenScript OptimumGene™ results.

GenScript Recombinant Protein Expression Service (Bacteria, Mammalian, Insect, Yeast)

High quality recombinant protein for your research!

Supplementary

1. Protein Alignment (Optimized Region)

```
Optimized     1    LFQDFTHLYPLSKTVRFELKPIGKTLEHIHAKNFLSQDKTMADMYQKVGAILDDYHRDFI
Original      1    LFQDFTHLYPLSKTVRFELKPIGKTLEHIHAKNFLSQDKTMADMYQKVGAILDDYHRDFI

Optimized    61    ADMMGEVKLTKLAEFYDVYLKFRKNPKDDGLQKQLKDLQAVLRKEIVKPIGSGGKYKAGY
Original     61    ADMMGEVKLTKLAEFYDVYLKFRKNPKDDGLQKQLKDLQAVLRKEIVKPIGSGGKYKAGY

Optimized   121    ERLFGAKLFKDGKELGDLAKFVITQEGESSPKLPQIAHFEKFSTYFTGFHDNRKNMYSDE
Original    121    ERLFGAKLFKDGKELGDLAKFVITQEGESSPKLPQIAHFEKFSTYFTGFHDNRKNMYSDE

Optimized   181    DKHTAIAYRLIHENLPRFIDNLQILATIKQKHSVLYDRIINELTASGLDVSLASHLDGYH
Original    181    DKHTAIAYRLIHENLPRFIDNLQILATIKQKHSVLYDRIINELTASGLDVSLASHLDGYH

Optimized   241    KLLTQEGITAYNRIIGEVNGYTNKHNQHCHKSERIAKLRPLHKQILSDGMGVSFLPSKFA
Original    241    KLLTQEGITAYNRIIGEVNGYTNKHNQHCHKSERIAKLRPLHKQILSDGMGVSFLPSKFA

Optimized   301    DDNEMCQAVNEFCRHYAHVFAKVQSLFDGFDDHQKDGIYVEHKNLNELSKQAFGDFALLG
Original    301    DDNEMCQAVNEFCRHYAHVFAKVQSLFDGFDDHQKDGIYVEHKNLNELSKQAFGDFALLG

Optimized   361    RVLDGYYVDVVNPEFSERFAKAKTDNAKEKLTKEKDKFIKGVHSLASLEQAIEHYTTKHD
Original    361    RVLDGYYVDVVNPEFSERFAKAKTDNAKEKLTKEKDKFIKGVHSLASLEQAIEHYTTKHD

Optimized   421    DESVQAGKLGQYFKHGLAGVDNPIQKIHNSHSTIKGFLERERPAGERTLPKIKSDKSPEM
Original    421    DESVQAGKLGQYFKHGLAGVDNPIQKIHNSHSTIKGFLERERPAGERTLPKIKSDKSPEM

Optimized   481    TQLRQLKELLDNALNVVHFAKLLTTKTTLDNQDGNFYGEFGVLYDELAKIATLYNKVRDY
Original    481    TQLRQLKELLDNALNVVHFAKLLTTKTTLDNQDGNFYGEFGVLYDELAKIATLYNKVRDY

Optimized   541    LSQKPFSTEKYKLNFGNPTLLNGWDLNKEKDNFGVILQKDGCYYLALLDKAHKKVFDNAP
Original    541    LSQKPFSTEKYKLNFGNPTLLNGWDLNKEKDNFGVILQKDGCYYLALLDKAHKKVFDNAP

Optimized   601    NAGKSVYQKMVYKLLPGPNKMLPKVFFAKSNLDYYNPSAELLDKYAQGTHKKGDNFNLKD
Original    601    NAGKSVYQKMVYKLLPGPNKMLPKVFFAKSNLDYYNPSAELLDKYAQGTHKKGDNFNLKD

Optimized   661    CHALIDFFKASINKHPEWQHFGFEFSPTSSYQDLSDFYREVEPQGYQVKFVDIDTEYIDE
Original    661    CHALIDFFKASINKHPEWQHFGFEFSPTSSYQDLSDFYREVEPQGYQVKFVDIDTEYIDE

Optimized   721    LVEQGQLYLFQIYNKDFSTKAHGKPNLHTLYFKALFSEDNLANPIYKLNGEAQIFYRKAS
```

```
Original    721     LVEQGQLYLFQIYNKDFSTKAHGKPNLHTLYFKALFSEDNLANPIYKLNGEAQIFYRKAS

Optimized   781     LDMNEITIHRAGEVLENKNPDNPKQRQFVYDIIKDKRYTQDKFMLHVPITMNFGVQGMTI
Original    781     LDMNEITIHRAGEVLENKNPDNPKQRQFVYDIIKDKRYTQDKFMLHVPITMNFGVQGMTI

Optimized   841     KEFNKKVNQSIQQYDDVNVIGIDRGERHLLYLTVINSKGEILEQRSLNDITTASANGTQM
Original    841     KEFNKKVNQSIQQYDDVNVIGIDRGERHLLYLTVINSKGEILEQRSLNDITTASANGTQM

Optimized   901     TTPYHKILDKREIERLNARIGWDEIETIKELKSGYLSHVVHQVSQLMLKYNAIVVLEDLN
Original    901     TTPYHKILDKREIERLNARIGWDEIETIKELKSGYLSHVVHQVSQLMLKYNAIVVLEDLN

Optimized   961     FGFKRGRFKVEKQIYQNFENALIKKLNHLVLKDKADDEIGSYKNALQLTNNFTDLKSIGK
Original    961     FGFKRGRFKVEKQIYQNFENALIKKLNHLVLKDKADDEIGSYKNALQLTNNFTDLKSIGK

Optimized  1021     QTGFLFYVPAWNTSKIDPATGFVDLLKPRYENIAQSQAFFGKFDKICYNKDKGYFEFHID
Original   1021     QTGFLFYVPAWNTSKIDPATGFVDLLKPRYENIAQSQAFFGKFDKICYNKDKGYFEFHID

Optimized  1081     YAKFTDKAKNSRQKWKICSHGNKRYVYDKTANQNKGATKGINVNDELKSLFARHHINDKQ
Original   1081     YAKFTDKAKNSRQKWKICSHGNKRYVYDKTANQNKGATKGINVNDELKSLFARHHINDKQ

Optimized  1141     PNLVMDICQNNDKEFHKSLMYLLKTLLALRYSNASSDEDFILSPVANDRGVFFNSVLADD
Original   1141     PNLVMDICQNNDKEFHKSLMYLLKTLLALRYSNASSDEDFILSPVANDRGVFFNSVLADD

Optimized  1201     TQPQNADANGAYHIALKGLWLLNELKNSDDLGKVKLAIDNQTWLNFAQNR*
Original   1201     TQPQNADANGAYHIALKGLWLLNELKNSDDLGKVKLAIDNQTWLNFAQNR*
```

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Аминокислотные последовательности MeCas12a

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMLFQDFTHLYPLSKTVRFELKPIGKTLEHI
HAKNFLSQDKTMADMYQKVGAILDDYHRDFIADMMGEVKLTKLAEFYDVY
LKFRKNPKDDGLQKQLKDLQAVLRKEIVKPIGSGGKYKAGYERLFGAKLFK
DGKELGDLAKFVITQEGESSPKLPQIAHFEKFSTYFTGFHDNRKNMYSDEDK
HTAIAYRLIHENLPRFIDNLQILATIKQKHSVLYDRIINELTASGLDVSLASHLD
GYHKLLTQEGITAYNRIIGEVNGYTNKHNQHCHKSERIAKLRPLHKQILSDG
MGVSFLPSKFADDNEMCQAVNEFCRHYAHVFAKVQSLFDGFDDHQKDGIY
VEHKNLNELSKQAFGDFALLGRVLDGYYVDVVNPEFSERFAKAKTDNAKEK
LTKEKDKFIKGVHSLASLEQAIEHYTTKHDDESVQAGKLGQYFKHGLAGVD
NPIQKIHNSHSTIKGFLERERPAGERTLPKIKSDKSPEMTQLRQLKELLDNALN
VVHFAKLLTTKTTLDNQDGNFYGEFGVLYDELAKIATLYNKVRDYLSQKPFS
TEKYKLNFGNPTLLNGWDLNKEKDNFGVILQKDGCYYLALLDKAHKKVFD
NAPNAGKSVYQKMVYKLLPGPNKMLPKVFFAKSNLDYYNPSAELLDKYAQ
GTHKKGDNFNLKDCHALIDFFKASINKHPEWQHFGFEFSPTSSYQDLSDFYRE
VEPQGYQVKFVDIDTEYIDELVEQGQLYLFQIYNKDFSTKAHGKPNLHTLYF
KALFSEDNLANPIYKLNGEAQIFYRKASLDMNEITIHRAGEVLENKNPDNPKQ
RQFVYDIIKDKRYTQDKFMLHVPITMNFGVQGMTIKEFNKKVNQSIQQYDD
VNVIGIDRGERHLLYLTVINSKGEILEQRSLNDITTASANGTQMTTPYHKILDK
REIERLNARIGWDEIETIKELKSGYLSHVVHQVSQLMLKYNAIVVLEDLNFGF
KRGRFKVEKQIYQNFENALIKKLNHLVLKDKADDEIGSYKNALQLTNNFTDL
KSIGKQTGFLFYVPAWNTSKIDPATGFVDLLKPRYENIAQSQAFFGKFDKICY
NKDKGYFEFHIDYAKFTDKAKNSRQKWKICSHGNKRYVYDKTANQNKGAT
KGINVNDELKSLFARHHINDKQPNLVMDICQNNDKEFHKSLMYLLKTLLALR
YSNASSDEDFILSPVANDRGVFFNSVLADDTQPQNADANGAYHIALKGLWLL
NELKNSDDLGKVKLAIDNQTWLNFAQNR

Аминокислотные последовательности MbCas12a

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMLFQEFTHLYPLSKTVRFELKPIGKTLEHI
HAKNFLSQDETMADMYQKVKAMLDDYHRDFIADMMGEVKLTKLAEFYDV
YLKFRKNPKDDGLQKQLKDLQAVLRKEIVKPIGNGGKYKAGYDRLFGAKLF
KDGKKLGDLAKFVIAQEGDSSPKLAHLAHFEKFSTYFTGFHDNRKNMYSDE
DKHTSIAYRLIHENLPRFIDNLQILTTIKQKHSALYDQIINELTASGLDVSLASH
LDGYHKLLTQEGITAYNTLLGGISGEAGSRKIKGINELINSHHNQHCHKSERIA
KLRPLHKQILSDGMGVSFLPSKFADDSEVCQAVNEFYRHYADVFAKVQSLFD
GFDDYQKDGIYVEHKNLNELSKQAFGDFALLGRVLDGYYVDVVSPEFNERF
AKAKTDNAKEKLTKEKDKFIKGVHSLASLEQAIEHYTARHDDESVQAGKLG
QYFKHGLAGVDNPIQKIHNNHSTIKGFLERERPAGERALPKIQLGKNPEIRQL
KELLDNTLNVVHFAKLLTTKTTLDNQDGNFYGEFGALYDELAKIPTLYNKV
RDYLSQKPFSTEKYKLNFGNPTLLNGWDLNKEKDNFGVILQKDGCYYLALL
DKAHKKVFDNAPNTGKNIYQKMIYKLLPGPNKMLPKVFFAKSNLDYYNPSA
ELLDKYAKGTHKKGDNFNLKDCHALIDFFKAGINKHPEWQHFGFKFSPTSSY
QDLSDFYREVEPQGYQVKFVDINADYIDELVEQGQLYLFQIYNKDFSPKAHG

KPNLHTLYFKALFSEDNLADPIYKLNGEAQIFYRQASLDMNETTIHRAGEVLE
NKNPDNPKKRQFVYDIIKDKRYTQDKFMLHVPITMNFGVQGMTIKEFNKKV
NESIQQYDEVNVIGIDRGERHLLYLTVINSKGEILEQRSLNDIITTSANGTQMT
THYHKILDKREIERLNARVGWGEIETIKELKSGYLSHVVHQISQLMLKYNAIV
VLEDLNFGFKRGRFKVEKQIYQNFENALIKKLNHLVLKDKADDEIGSYKNAL
QLTNNFTDLKSIGKQTGFLFYVPAWNTSKIDPETGFVDLLKPRYENIAQSQAF
FGKFDKICYNADKGYFEFHIDYAKFTDKAKNSRQKWTICSHGDKRYVYDKT
ANKNKGTTKGINVNDELKSLFARHHINEKQPNLVMDICQNNDKEFHKSLMY
LLKTLLALRYSNASSDEDFILSPVANDEGVFFNSALADDTQPQNADANGAYH
IALKGLWLLNELKDSDDLNKVKLAIDNQTWLNFAQNR

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Нуклеотидные последовательности ДНК-мишеней.

Нуклеотидная последовательность фрагмента S-гена коронавируса (1090 п.н.):

5’CTAACATAATAAGAGGCTGGATTTTTGGTACTACTTTAGATTCGAA
GACCCAGTCCCTACTTATTGTTAATAACGCTACTAATGTTGTTATTAAAGT
CTGTGAATTTCAATTTTGTAATGATCCATTTTTGGGTGTTTATTACCACAA
AAACAACAAAAGTTGGATGGAAAGTGAGTTCAGAGTTTATTCTAGTGCGA
ATAATTGCACTTTTGAATATGTCTCTCAGCCTTTTCTTATGGACCTTGAAG
GAAAACAGGGTAATTTCAAAAATCTTAGGGAATTTGTGTTTAAGAATATT
GATGGTTATTTTAAAATATATTCTAAGCACACGCCTATTAATTTAGTGCGT
GATCTCCCTCAGGGTTTTTCGGCTTTAGAACCATTGGTAGATTTGCCAATA
GGTATTAACATCACTAGGTTTCAAACTTTACTTGCTTTACATAGAAGTTAT
TTGACTCCTGGTGATTCTTCTTCAGGTTGGACAGCTGGTGCTGCAGCTTAT
TATGTGGGTTATCTTCAACCTAGGACTTTTCTATTAAAATATAATGAAAAT
GGAACCATTACAGATGCTGTAGACTGTGCACTTGACCCTCTCTCAGAAAC
AAAGTGTACGTTGAAATCCTTCACTGTAGAAAAAGGAATCTATCAAACTT
CTAACTTTAGAGTCCAACCAACAGAATCTATTGTTAGATTTCCTAATATTA
CAAACTTGTGCCCTTTTGGTGAAGTTTTTAACGCCACCAGATTTGCATCTG
TTTATGCTTGGAACAGGAAGAGAATCAGCAACTGTGTTGCTGATTATTCT
GTCCTATATAATTCCGCATCATTTTCCACTTTTAAGTGTTATGGAGTGTCT
CCTACTAAATTAAATGATCTCTGCTTTACTAATGTCTATGCAGATTCATTT
GTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGGCAAACTGGAA
AGATTGCTGATTATAATTATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTA
TAGCTTGGAATTCTAACAATCTTGATTCTAAGGTTGGTGGTAATTATAATT
ACCTGTATAGATTGTTTAGGAAGTCTAATCT 3’

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена *uidA E. coli* (172п.н.):

5’CCAGAGGTGCGGATTCACCACTTGCAAAGTCCCGCTGGTGCCTTGT
CCAGTTGCAACCACCTGTTGATCCGCATCACGCAGTTCAACGCTGACATC
ACCATTGGCCACCACCTGCCAGTCAACAGACGCGTGGTTACAGGCTTGCG
CGACATGCGTCACCACGGTGATATCG 3’

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена *phoA E. coli* (253 п.н.)*:*

5’CTTTGCTGAAACGGCAACCGCCGGTGAATGGCAGGGAAAAACGCT
GCGTGAACAGGCACAGGCGCGTGGTTATCAGTTGGTGAGCGATGCTGCCT
CACTGAATGCGGTGACGGAAGCGAACCAGCAAAAACCCCTGCTAGGACT
GTTTGCTGACGGCAATATGCCAGTGCGCTGGCAAGGACCGAAAGCAACG
TACCACGGCAATATCGACAAGCCCGCAGTTACCTGTACGCCTAATCCGCA
ACGTAATGAC 3’

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена *nuc S. aureus* (245 п.н.):

5’TGGTCCTGAAGCAAGTGCATTTACGAAAAAAATGGTAGAAAATGC
AAAGAAAATTGAAGTCGAGTTTGACAAAGGTCAAAGAACTGATAAATAT

GGACGTGGCTTAGCGTATATTTATGCTGATGGAAAAATGGTAAACAAAGC
TTTAGTTCGTCAAGGCTTGGCTAAAGTTGCTTATGTTTATAAACCTAACAA
TACACATGAACAACTTTTAAGAAAAAGTGAAGCACAAGCGAAAAAAGAG
A 3’

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена *β-tubulin A. alternata* (177 п.н.):

5’CCTTCCCCCAAGGTCTCCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCA
CACTCTCCATCCACCAGCTGGTTGAGAACTCAGACGAGACCTTCTGCATT
GACAACGAGGCTCTCTACGACATCTGCATGAGGACTCTCAAGCTGAACAA
CCCCTCCTACGGCGACCTGAACCACCTCGTT 3’

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Олигонуклеотиды.

Праймер	Последовательность (5'→3')
MbovisCas12aFW	GGCAGCCATATGTTATTTCAAGAGTTTACCC
MbovisCas12aRV	CAAGGATCCTTAGCGGTTTTGAGCGAAG
Cas12CoronaFW	CTAACATAATAAGAGGCTGGAC
Cas12CoronaRV	AGATTAGACTTCCTAAACAATCTAT
MbCas12a-crRNA-SHORT	AATTCTAATACGACTCACTATAGGG
crRNA Sgene compl	GGCGTGTGCTTAGAATATATTTTATCTACAAACAG TAGAAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATT
ssDNA Reporter	FAM-TTATT-BHQ-1
ssDNA LFA Reporter	FAM-TTATTATT-Biotin
pET-28c-MeCas12a-D864A-Fw	GGTATTGCACGTGGCGAACGTCACCTG
pET-28c-MeCas12a-D864A-Rv	TCGCCACGTGCAATACCGATAACGTTC
pET-28c-MeCas12a-E958A-Fw	GTTCTGGCAGACCTGAACTTTGGTTTC
pET-28c-MeCas12a-E958A-Rv	GTTCAGGTCTGCCAGAACCACGATCGC
pET-28c-MeCas12a-R1171A-Fw	GCGCTGGCTTATAGCAACGCGAGC
pET-28c-MeCas12a-R1171A-Rv	GCTATAAGCCAGCGCCAGCAGGGTCTT
pET-28c-MeCas12a-D1208A-Fw	AACGCGGCCGCGAACGGTGCGTAC
pET-28c-MeCas12a-D1208A-Rv	ACCGTTCGCGGCCGCGTTTTGCGGCTG
pET-28c-MbCas12a-D874A-Fw	GGCATAGCCCGTGGAGAGCGACATTTG
pET-28c-MbCas12a-D874A-Rv	TCTCCACGGGCTATGCCTATGACATTC

pET-28c-MbCas12a-E968A-Fw	GTGTTAGCGGATTTAAATTTTGGGTTT
pET-28c-MbCas12a-E968A-Rv	ATTTAAATCCGCTAACACCACAATGGC
pET-28c-MbCas12a-R1181A-Fw	GCATTAGCATATAGTAACGCCAGTAGC
pET-28c-MbCas12a-R1181A-Rv	ACTATATGCTAATGCAAGCAATGTCTT
pET-28c-MeCas12a-D1218A-Fw	AATGCGGCCGCCAATGGGGCGTAT
pET-28c-MeCas12a-D1218A-Rv	CCCATTGGCGGCCGCATTTTGTGGCTG
FW PAM TTTG Sgene	GTTATTTGAAAATATATTCTAAGCACA
RV PAM TTTG Sgene	ATATATTTTCAAATAACCATCAATATT
FW PAM TTTA Sgene	GTTATTTAAAAATATATTCTAAGCACA
RV PAM TTTA Sgene	ATATATTTTTAAATAACCATCAATATT
FW PAM TTTC Sgene	GTTATTTCAAAATATATTCTAAGCACA
RV PAM TTTC Sgene	ATATATTTTGAAATAACCATCAATATT
crRNA -17 handle split Sgene	GGCGTGTGCTTAGAATATATTTTATCTACAAACAG TAGAACCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATT
crRNA -15 handle split Sgene	GGCGTGTGCTTAGAATATATTTTATCTACAAACAG TAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATT
crRNA -13 handle split Sgene	GGCGTGTGCTTAGAATATATTTTATCTACAAACAG TCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATT
crRNA -11 handle split Sgene	GGCGTGTGCTTAGAATATATTTTATCTACAAACAC CCTATAGTGAGTCGTATTAGAATT
crRNA -9 handle split Sgene	GGCGTGTGCTTAGAATATATTTTATCTACAAACCC TATAGTGAGTCGTATTAGAATT
crRNA -7 handle split Sgene	GGCGTGTGCTTAGAATATATTTTATCTACACCCTA TAGTGAGTCGTATTAGAATT
crRNA -5 handle split Sgene	GGCGTGTGCTTAGAATATATTTTATCTACCCTATA GTGAGTCGTATTAGAATT
crRNA -2 handle split Sgene	GGCGTGTGCTTAGAATATATTTTATCCCTATAGTG AGTCGTATTAGAATT

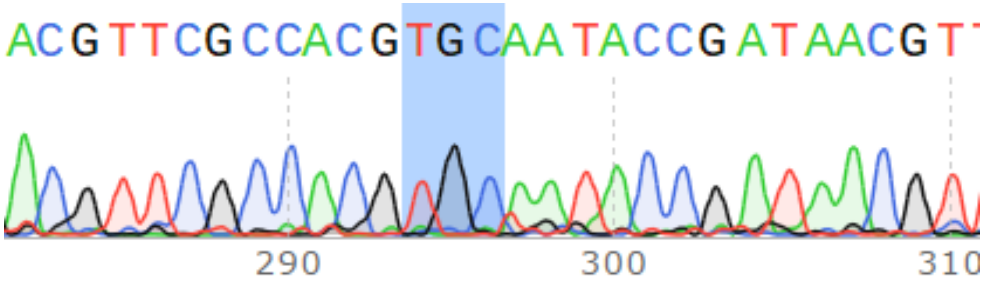
crRNA - 21bp target split compl Sgene	CGTGTGCTTAGAATATATTTTATCTACAAACAGTAGAAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATT
crRNA - 19bp target split compl Sgene	TGTGCTTAGAATATATTTTATCTACAAACAGTAGAAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATT
crRNA - 17bp target split compl Sgene	TGCTTAGAATATATTTTATCTACAAACAGTAGAAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATT
crRNA - 15bp target split compl Sgene	CTTAGAATATATTTTATCTACAAACAGTAGAAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATT
crRNA-PAM1-compl	AGCGCACTGGCATATTGCCGTCAGATCTACAAACAGTAGAAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATT
crRNA-PAM2-compl	AATGCGGTGACGGAAGCGAACCAGATCTACAAACAGTAGAAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATT
crRNA-SHORT	AATTCTAATACGACTCACTATAGGG
F3-phoA	TGTCATTACGTTGCGGATT
B3-phoA	CTTTGCTGAAACGGCAAC
FIP-phoA	CTGACGGCAATATGCCAGTGGTCGATATTGCCGTGGTACG
BIP-phoA	GTTCGCTTCCGTCACCGCGCGTGGTTATCAGTTGGT
LF-phoA	GCTGGCAAGGACCGAAAG
LB-phoA	TTCAGTGAGGCAGCATCG
RPA-NUC-FW	TGGTCCTGAAGCAAGTGCTTTTACGAAAAA
RPA-NUC-RV	TCTCTTTTTTCGCTTGTGCTTCACTTTTTCTTA
crRNA-NUC	TCGTTTACCATTTTTCCATCAGCAATCTACAAACAGTAGAAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATT
crRNA- NUC_SHORT	AATTCTAATACGACTCACTATAGGG
F3-FoA-E.coli	AAGTTGAAGGTGCATCAAT
B3-FoA-E.coli	CTTGTGAATCCTCTTCGGAG
LF-FoA-E.coli	AGCGTGTTGCCATCCTTT
LB-FoA-E.coli	CAGGCGCTAAATACCAAAGATG

FIP-uidA-E.coli	ACTGCGTGATGCGGATCAACAGTTTTCACTTGCAAAGTCCCGCTGG
BIP-uidA-E.coli	CTGACATCACCATTGGCCACCATTTTGTCGCGCAAGCCTGTAACC
F3-uidA-E.coli	CCAGAGGTGCGGATTCAC
B3-uidA-E.coli	CGATATCACCGTGGTGACG
MbCas12a-crRNA-COLI-uidA-PAM1-SHORT	AATTCTAATACGACTCACTATAGGG
MbCas12a-crRNA-COLI-uidA- PAM1-compl	CACCATTGGCCACCACCTGCCAGTATCTACAAACAGTAGAAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATT
Aalt-For	GTGCCTTCCCCCAAGGTCTCCG
Aalt-Rev	CGGAAACGAGGTGGTTCAGGTC
RPA-Phyto-alt-alt-J-FW	CCTTCCCCCAAGGTCTCCGACACCGTTGTC
RPA-Phyto-alt-alt-J-RV	AACGAGGTGGTTCAGGTCGCCGTAGGAGGG
MbCas12a-crRNA-Phyto-Alt-alt-J	TGCAGAAGGTCTCGTCTGAGTTCTATCTACAAACAGTAGAAATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAATT
RPA-Phyto-alt-alt-J-FW	CCTTCCCCCAAGGTCTCCGACACCGTTGTC

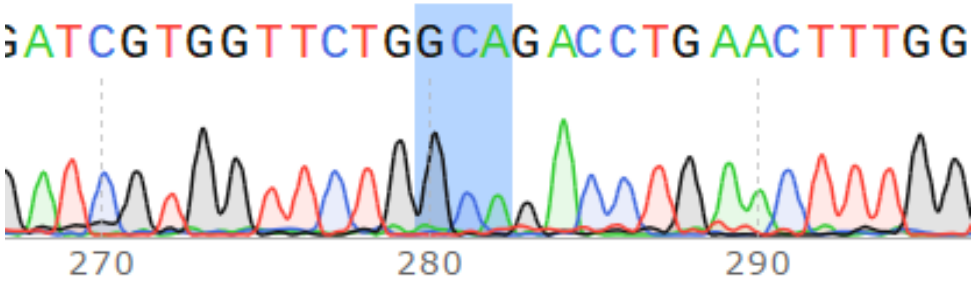
ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Хроматограммы секвенирования для подтверждения мутаций, влияющих на функциональную активность Cas12a

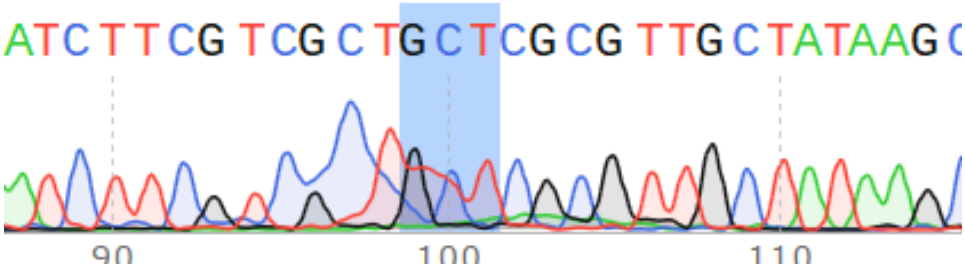
MeCas12a D864A



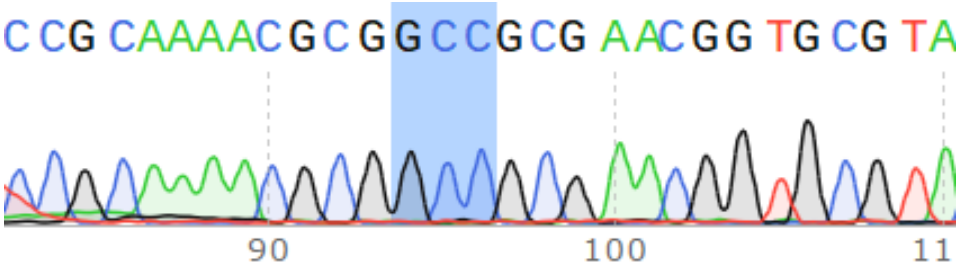
MeCas12a E958A



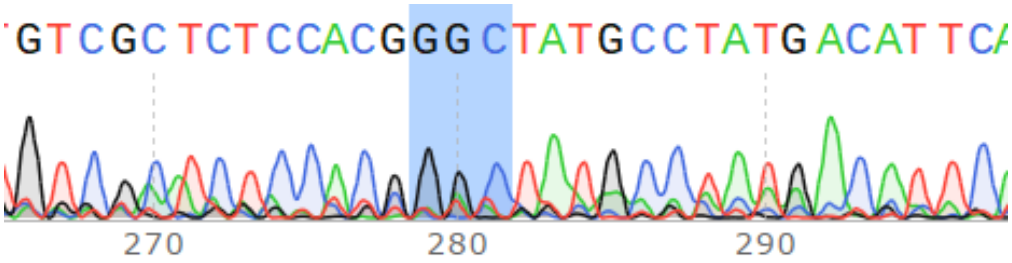
MeCas12a R1171A



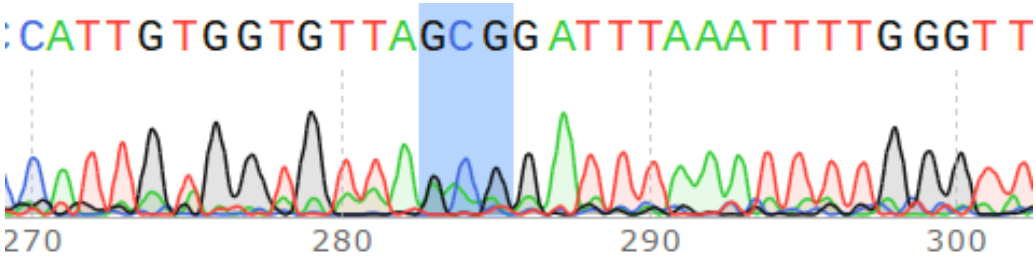
MeCas12a D1208A



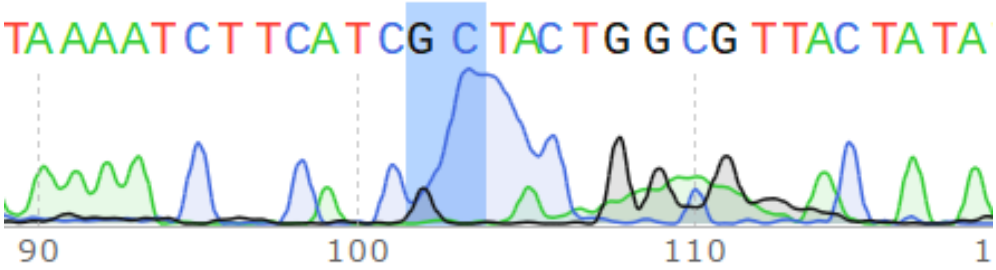
MbCas12a D874A



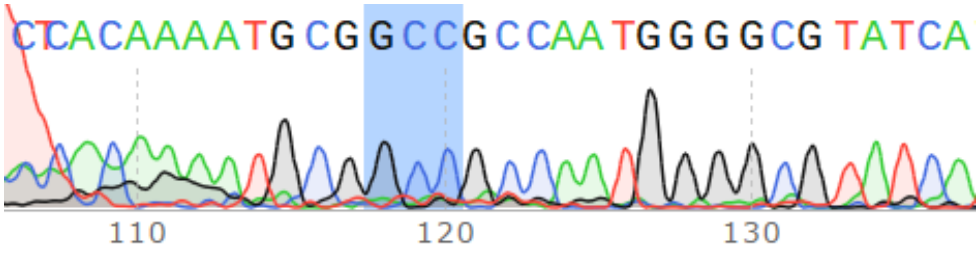
MbCas12a E968A



MbCas12a R1181A



MbCas12a D1218A



ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Нормативно-техническая документация на «Набор для исследования молока коров при бактериальных инфекциях»

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ

Товарищество с ограниченной ответственностью «Национальный центр биотехнологии» АО «Национальный холдинг «QazBioPharm» Министерства здравоохранения Республики Казахстан.

КП ВЭД 72.11.13 **МКС 11.220**

УТВЕРЖДАЮ
И.о. генерального директора ТОО «Национальный центр биотехнологии»
_____ Искакова А.Н.
«__» _____2023 г.

НАБОР ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛОКА КОРОВ ПРИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ
СТ ТОО _____
(Вводится впервые)

Держатель подлинника:
ТОО «Национальный центр биотехнологии» АО «Национальный холдинг «QazBioPharm» Министерства здравоохранения Республики Казахстан.
Республика Казахстан, 010000, г. Астана, район Нура, Коргалжинское шоссе 13/5.

РАЗРАБОТАНО
Заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии
_____ Абельденов С.К.
«21» 02 2023

Астана, 2023

1

Товарищество с ограниченной ответственностью «Национальный центр биотехнологии» АО «Национальный холдинг «QazBioPharm» Министерства здравоохранения Республики Казахстан.

СОГЛАСОВАНО	**УТВЕРЖДАЮ**
Комитет Ветеринарного контроля и надзора МСХ РК	И.о. генерального директора ТОО «Национальный центр биотехнологии» Искакова А.Н.
_____	_____
«_____»_____2023 г.	«__»_____2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ИЗГОТОВЛЕНИЮ И КОНТРОЛЮ НАБОРА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛОКА КОРОВ ПРИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Держатель подлинника:	**РАЗРАБОТАНО**
ТОО «Национальный центр биотехнологии» АО «Национальный холдинг «QazBioPharm» Министерства здравоохранения Республики Казахстан. Республика Казахстан, 010000, г. Астана, район Нура, Коргалжинское шоссе 13/5.	Заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии _____ Абельденов С.К. «21» 07 2023 г.

ВЫПИСКА

из протокола № 6 заседания Ученого совета
ТОО «Национальный центр биотехнологии»

г. Астана 21 июля 2023 г.

Присутствовали: (по списку) Всего членов Ученого совета: 19
Присутствовали: 17

Присутствовали: Искакова А.Н., Унышева Г.Б., Абельденов С.К., Ескендирова С.З., Жабагин М.К., Жолдыбаева Е.В., Манабаева Ш.А., Мукантаев К.Н., Киян В.С., Тарлыков П.В., Хапилина О.Н., Хасенов Б.Б., Шевцов А.Б., Шустов А.В., Сарсенова М.А., Скиба Ю.А., Шульгау З.Т.

СЛУШАЛИ:

1. И.о. генерального директора Искакову А.Н. которая вынесла на рассмотрение вопрос о необходимости утверждения научно – технической документации «Набор для исследования молока коров при бактериальных инфекциях», автор Абельденов С.К.

ПОСТАНОВИЛИ:

1. Утвердить и рекомендовать в печать НТД «Набор для исследования молока коров при бактериальных инфекциях».

Председатель Ученого совета **А. Искакова**

Секретарь Ученого совета **Г. Унышева**

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Патент на полезную модель «Способ *in vitro* диагностики *Escherichia coli* на основе технологии LAMPCRISPR/MBCAS12A»

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ 10420

ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL

(21) 2024/1655.2

(22) 08.08.2023

(45) 18.04.2025

(54) LAMP-CRISPR/MBCAS12A технологиясының негізінде Escherichia coli in vitro диагностикалық тәсілі
Способ in vitro диагностики Escherichia coli на основе технологии LAMP-CRISPR/MBCAS12A
Method of in vitro diagnostics of Escherichia coli based on LAMP-CRISPR/MBCAS12A technology

(73) «Ұлттық биотехнология орталығы» жауапкершілігі шектеулі серіктестігі (KZ)
Товарищество с ограниченной ответственностью «Национальный центр биотехнологии» (KZ)
«National Center for Biotechnology» Limited Liability Partnership (KZ)

(72)

Шайзадинова Айша Маратовна (KZ)	Shaizadinova Aisha Maratovna (KZ)
Аманжолова Меруерт Жаксылыковна (KZ)	Amanzholova Meruyert Zhaksylykovna (KZ)
Кириллов Савелий Олегович (KZ)	Kirillov Saveliy Olegovich (KZ)
Абельденов Сайлау Касенович (KZ)	Abeldenov Sailau Kasenovich (KZ)

ҚР Ұлттық зияткерлік меншік институты РМК РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности» РФК РК

ЭЦҚ қол қойылды — С. Ахметов
Подписано ЭЦП — С. Ахметов
Signed with EDS — S. Akhmetov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE

ПРИЛОЖЕНИЕ И

Экономическая эффективность и рассчет разработаных методов диагностики

Таблица И1 – Расчет цены за MbCas12a

Получение и очистка MbCas12a					
Наименование	**Производитель**	**Каталожный номер**	**Измерение**	**Цена за упаковку**	**Цена за едичную реакцию**
LB broth	Леннокс	1083	500 гр	35,112 ₸	1.40 ₸
Лизоцим	Thermo Fisher Scientific	89833	5 г.	120,393 ₸	0.07 ₸
Канамицин	Roth Carl	T832.4	100 г	247,950 ₸	123.98 ₸
HisTrap 1 ml	Cityva	17524701	5*1 мл	169,484 ₸	338.97 ₸
Heparin 1 ml	Cityva	17040601	5*1 мл	229,957 ₸	459.91 ₸
Коктейль ингибиторов протеазы и фосфатазы Halt™, без ЭДТА (100X)	Thermo Fisher Scientific	78447	10 мл	1,075,590 ₸	107,559.00 ₸
Глицерол	ThermoScientific	A16205.AP	500 мл	32,647 ₸	32.65 ₸
IPTG	Apollo Scientific	BIMB1008-25G	25G	124,236 ₸	1,182.73 ₸
Набор для заливки акриламидных гелей TGX Stain-Free™ FastCast™, 12%	Bio-Rad	1610185	65 гелей	127,403 ₸	1,960.05 ₸
10x буфер Трис/Глицин для вестерн-блоттинга и нативных гелей	Bio-Rad	1610734	1 л, 10x	418,375 ₸	20,918.75 ₸
Белковый маркер Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards	Bio-Rad	1610393	250 применений	418,375.00 ₸	1,673.50 ₸
Итого			**20000 реакций**	**134,251 ₸**	**6.71 ₸**

Таблица И2 – Расчет цены за crРНК

Дизайн и синтез crРНК					
Наименование	**Производитель**	**Каталожный номер**	**Измерение**	**Цена за упаковку**	**Цена за едичную реакцию**
Набор для синтеза РНК HiScribe ® T7 Quick High Yield	Neb	E2050L	250 реакций	1,131,840 ₸	4,527.36 ₸
RNA CleanUP Kit	Neb	T2030L	100 реакций	284,240 ₸	2,842.40 ₸
Oligonucleotide	ТОО "НЦБ"	94 Буквы	1000 реакций	56,400 ₸	56.40 ₸
Реагент DEPC BioChemica	PanReac AppliChem	A0881.0020	20 мл	81,142 ₸	2.03 ₸
Итого			**40000 реакций**	**7,428.19 ₸**	**0.19 ₸**

Таблица И3 – Расчет цены за РПА

РПА					
Наименование	**Производитель**	**Каталожный номер**	**Измерение**	**Цена за упаковку**	**Цена за едичную реакцию**
TWISTAMP BASIC KIT	TwistDx	TABAS03KIT	96 реакций	332,902 ₸	3467.73 ₸
Итого			**480 реакций**		**693.55 ₸**

Таблица И4 – Расчет цены за LAMP

LAMP					
Наименование	**Производитель**	**Каталожный номер**	**Измерение**	**Цена за упаковку**	**Цена за едичную реакцию**
Bst polymerase	NEB	M0537S	160 мкл / 8000 U	80000 ₸	500 ₸
dNTP mix	NEB	N0447S	500 мкл	25000 ₸	70 ₸
FIP primer	ТОО "НЦБ"		25 нмоль	5000 ₸	32 ₸
BIP primer	ТОО "НЦБ"		25 нмоль	5000 ₸	32 ₸
F3 primer	ТОО "НЦБ"		25 нмоль	5000 ₸	1 ₸
B3 primer	ТОО "НЦБ"		25 нмоль	5000 ₸	1 ₸
LF primer	ТОО "НЦБ"		25 нмоль	5000 ₸	4 ₸
LB primer	ТОО "НЦБ"		25 нмоль	5000 ₸	4 ₸
Betaine	Sigma	B0300	10 мл	500 ₸	5 ₸
Buffer with $MgSO_4$	NEB	M1800	1 мл	2000 ₸	10 ₸
Реагент DEPC BioChemica	PanReac AppliChem	A0881.0020	20 мл	81,142 ₸	2.03 ₸
Итого			210 реакций	137, 581 ₸	**656.03 ₸**

Таблица И5 – Расчет цены за единичную реакцию RPA/CRISPR-Cas12a

RPA/CRISPR-Cas12a					
Наименование	**Производитель**	**Каталожный номер**	**Измерение**	**Цена за упаковку**	**Цена за едичную реакцию**
Cas12a			20000 реакций	134,251 ₸	6.71 ₸
РНК			40000 реакций	7,428.19 ₸	0.19 ₸
Реагент DEPC BioChemica	PanReac AppliChem	A0881.0020	20 мл	81,142 ₸	2.03 ₸
RPA	TwistDx	TABAS03KIT	96 реакций	332,902 ₸	693.55 ₸
NEBuffer™ r2.1	Neb	B6002S	5 мл	31,900 ₸	19.14 ₸
Reporter	Lumiprob		1000 реакций	108,685 ₸	108.69 ₸
Олигонуклеотиды	ТОО "НЦБ"	70 букв	1000 реакций	42,000 ₸	42.00 ₸
Итого					**872.30 ₸**

Таблица И6 – Расчет цены за единичную реакцию LAMP/CRISPR-Cas12a

LAMP/CRISPR-Cas12a					
Наименование	**Производитель**	**Каталожный номер**	**Измерение**	**Цена за упаковку**	**Цена за едичную реакцию**
Cas12a			20000 реакций	134,251 ₸	6.71 ₸
РНК			40000 реакций	7,428.19 ₸	0.19 ₸
Реагент DEPC BioChemica	PanReac AppliChem	A0881.0020	20 мл	81,142 ₸	2.03 ₸
LAMP			210 реакций	137, 581 ₸	656.03 ₸
NEBuffer™ r2.1	Neb	B6002S	5 мл	31,900 ₸	19.14 ₸
Reporter	Lumiprob		1000 реакций	108,685 ₸	108.69 ₸
Олигонуклеотиды	ТОО "НЦБ"	70 букв	1000 реакций	42,000 ₸	42.00 ₸
Итого					**834.79 ₸**