

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ КОЛЛАТЕРАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ CRISPR-НУКЛЕАЗ CAS12B, ПОЛУЧЕННЫХ ОДНОСТАДИЙНОЙ ОЧИСТКОЙ МЕТАЛЛ-ХЕЛАТНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ ПОСЛЕ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ

Л.К. Курбатов^{1*}, О.С. Тимошенко¹, С.А. Хмелева¹, К.Г. Птицын¹, Е.В. Супрун², С.П. Радько¹, А.В. Лисица¹¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119435, Москва, Погодинская ул., 10; *e-mail: kurbatovl@mail.ru²Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы 1/3

Термостабильные CRISPR/Cas-нуклеазы рассматриваются как перспективные ферменты для создания ДНК-диагностик нового поколения путем сопряжения петлевой изотермической амплификации нуклеиновых кислот (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) с селективной CRISPR/Cas-детекцией специфичных ампликонов. В настоящей работе представлены результаты тестирования коллатеральной активности CRISPR-нуклеазы AapCas12b и трех вариантов CRISPR-нуклеазы BrCas12b (дикий тип и два мутанта), полученных с использованием упрощенной очистки, в типичном температурном диапазоне проведения LAMP – от 56°C до 72°C. Они показали, что применение одностадийной металл-хелатной хроматографии с исключением этапа энзиматического удаления N-концевых последовательностей, транслируемых вместе с целевым белком, позволяет получать рекомбинантные CRISPR-нуклеазы BrCas12b с достаточно высоким уровнем коллатеральной активности. Температурные зависимости коллатеральной активности различались у исследованных вариантов BrCas12b. Полученные результаты могут быть использованы при выборе термостабильных CRISPR-нуклеаз Cas12b для создания тест-систем на основе комбинирования LAMP и CRISPR/Cas-детекции.

Ключевые слова: рекомбинантная CRISPR-нуклеаза Cas12b; одностадийная очистка; коллатеральная нуклеазная активность; температурная зависимость

DOI: 10.18097/BMCRM00284

ВВЕДЕНИЕ

Стремительное развитие методов молекулярной диагностики патогенных микроорганизмов и вирусов на основе комбинирования методов амплификации нуклеиновых кислот и селективной CRISPR/Cas-детекции специфических ампликонов (CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; Cas, CRISPR associated protein, [1]) сформировало запрос на поиск новых и модификацию известных CRISPR-нуклеаз, используемых в таких системах [2, 3]. Наибольшее развитие получили две технологии детекции, известные как SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter un-LOCKing) на основе активности CRISPR-нуклеазы Cas13a [4] и DETECTR (DNA endonuclease-targeted CRISPR *trans* reporter) с использованием CRISPR-нуклеазы Cas12a [5]. В обоих случаях на первом этапе проводится амплификация нуклеиновых кислот (в случае РНК – с использованием этапа обратной транскрипции) с помощью изотермической рекомбиназной полимеразной амплификации, протекающей при постоянной температуре 37°C-42°C [6]. Это обстоятельство позволяет не только совместить в одной пробирке реакции амплификации и CRISPR-детекции [7], но и осуществлять диагностику во «внелабораторном» формате (*англ.* point-of-care testing или, в более широком контексте, point-of-need testing) [2, 3].

Однако до настоящего времени наиболее широко распространённым методом амплификации нуклеиновых кислот остаётся петлевая изотермическая амплификация (loop-mediated isothermal amplification, LAMP), разработанная в 2000 году Notomi и соавт. [8]. К преимуществам данного метода можно отнести большую доступность реагентов для проведения реакции, использование в процессе только одного фермента – Bst-полимеразы – и совместимость стандартных буферов для проведения LAMP с анализом ампликонов CRISPR-нуклеазами [9]. Однако LAMP наиболее часто проводится в диапазоне температур от 60°C до 65°C, и оптимальная температура амплификации определяется последовательностями используемых праймеров [7]. Таким образом, сопряжение LAMP с CRISPR-детекцией ампликонов возможно либо за счет разделения анализа на два независимых этапа, либо за счет использования термостабильных CRISPR-нуклеаз, сохраняющих активность при высоких температурах, что позволяет выполнять анализ в одной тест-пробирке (*англ.* one-pot assay). Разделение анализа на два этапа нежелательно, поскольку сопряжено с открытием тест-пробирок с продуктами LAMP, что может привести к аэрозольному загрязнению места проведения анализа ампликонами и ложноположительным результатам.



Наибольшее применение в практике создания тест-систем на основе сопряжения LAMP с CRISPR-детекцией ампликонов в формате «one-pot assay» нашли термостабильные CRISPR-нуклеазы AapCas12b, полученная из термоацидофильной бактерии *Alicyclobacillus acidiphilus* [10], и BrCas12b, полученная из бактерий штамма SYP-B805 рода *Brevibacillus*, обнаруженного в горячих источниках [11]. Обе CRISPR-нуклеазы в виде рекомбинантных белков успешно использованы в создании тест-систем для обнаружения генов SARS-CoV-2 [12, 13], однако при температурах выше 60°C коллатеральная активность AapCas12b критически снижалась, в то время как для нуклеазы BrCas12b она сохранялась до порога 63°C [13]. Для повышения термостабильности рекомбинантной CRISPR-нуклеазы BrCas12b, Nguyen и соавт. [14] с помощью направленного мутагенеза получили ряд мутантов, из которых варианты BrCas12b-FNLDTA и BrCas12b-RFND показали наибольшую эффективность в формате совмещения LAMP и CRISPR-детекции в одной тест-пробирке, сохраняя достаточный уровень коллатеральной активности до температуры 67°C.

Для получения рекомбинантных CRISPR-нуклеаз Cas12b в вышеприведенных работах использовали стандартный подход с индукцией экспрессии при пониженных температурах (18°C) и последующей очисткой с помощью металл-хелатной хроматографии [11-14]. Целевой белок получали в виде единой полипептидной цепи, содержащей дополнительную N-концевую последовательность (N-tag) для хроматографической очистки, отделённую от последовательности CRISPR-нуклеаз Cas12b сайтом (сайтами) расщепления протеаз. При этом обязательным этапом очистки было энзиматическое удаление N-тага в целевом белке путем его обработки специфическими протеазами [11-14], что удлиняло и усложняло процедуру очистки. В то же время ранее нами была показана возможность получения функционально активных рекомбинантных CRISPR-нуклеаз Cas13a [15] и Cas12a [16] без этапа удаления N-тагов. Использование одностадийной очистки позволяет не только снизить общие затраты времени и ресурсов, но и существенно увеличить выход нуклеаз, предотвращая возможный протеолиз целевого продукта. Применение такого же подхода к очистке CRISPR-нуклеазы Cas12b, при условии сохранения функциональной активности, может существенно упростить её получение для использования в тест-системах на основе технологии LAMP/Cas12b в формате «one-pot assay».

Цель данной работы заключалась в сравнительной оценке коллатеральной активности термостабильных рекомбинантных CRISPR-нуклеаз AapCas12b и BrCas12b («дикий тип» и два мутантных варианта BrCas12b-RFND и BrCas12b-FNLDTA), полученных с использованием одностадийной очистки. Активность оценивали в широком температурном диапазоне, совместимом с проведением LAMP. Полученные температурные зависимости позволяют обосновать рациональный выбор определённого варианта CRISPR-нуклеазы Cas12b для сопряжения с оптимальной

температурой проведения LAMP для использования в тест-системах на основе технологии LAMP/Cas12b.

МЕТОДИКА

Реагенты

В работе использовали ДНК-олигонуклеотиды, синтезированные и очищенные методом ВЭЖХ компаниями «Люмипроб» (Россия) и «Евроген» (Россия). Все реактивы, использованные для приготовления буферных растворов, были приобретены в компании «Merck» (США) и соответствовали степени чистоты «ХЧ» или «ОСЧ». Реактивы без указания источника получения, использованные для гетерологической экспрессии и очистки рекомбинантных белков, были получены из компании «Диа-М» (Россия). Растворы готовили с использованием деионизованной воды качества Milli-Q (18 МΩ·см).

Гетерологическая экспрессия и одностадийная очистка рекомбинантных CRISPR-нуклеаз Cas12b

Для экспрессии рекомбинантных Cas12b-нуклеаз использовали плазмидные векторы 6xHis-MBP-BrCas12b-RFND, 6xHis-MBP-BrCas12b-FNLDTA, 6xHis-MBP-BrCas12b и pAG001 His6-TwinStrep-SUMO-AapCas12b, предоставленные компанией «HonorGene» (Китай). Все плазмиды были трансформированы в штамм Rosetta™ 2(DE3)pLysS Singles™ Competent Cells («Merck», Германия). Для получения рекомбинантных CRISPR-нуклеаз Cas12b трансформированные клетки культивировали, как описано ранее [16], со следующими модификациями. При достижении оптической плотности D600 = 0.6-0.8 при культивировании в среде Terrific Broth, колбы с культурой инкубировали на льду в течение 30 мин, после чего добавляли индуктор экспрессии изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТТ) до конечной концентрации 50 мкМ. Экспрессию целевого белка проводили в течение 16-18 ч при 18°C. Клетки осаждали центрифугированием (4000 g, 15 мин, 4°C), промывали фосфатно-солевым буфером и замораживали при -80°C. Клеточные осадки использовали для получения целевого белка.

Очистку целевого белка осуществляли на колонках Protino Ni-TED 1000 («Macherey-Nagel», Германия) в соответствии с протоколом производителя. Замороженные клеточные осадки ресуспендировали либо в буфере LEW (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 мг/мл лизоцима, pH 8.0) из набора к колонкам Protino Ni-TED 1000 в соотношении 1 г осадка на 2 мл буфера, либо в одном из буферных растворов, использованных в [12] и [14] для получения рекомбинантных CRISPR-нуклеаз AapCas12b и BrCas12b (соответственно 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM DTT, 10% глицерола, 1 mM PMSF, pH 7.5 или 0.5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0.5 mM TCEP, 0.25 мг/мл лизоцима, 10 мг/мл дезоксирибонуклеазы I, 1 mM PMSF, pH 7.5). После инкубации на льду в течение 30 мин, клетки разрушали механическим способом с помощью френч-пресса FA-078AE («Thermo Electron Corporation», США). Поскольку полученный лизат имел повышенную вязкость из-за присутствия ДНК, проводили его дополнительную обработку на ультразвуковом гомогенизаторе Sonopuls HD2070 («Bandelin», Германия) во льду. Лизат осветляли

Таблица 1. Последовательности ДНК-олигонуклеотидов, использованных в работе.

Название	Последовательность (5' → 3')
T7F	TAATACGACTCACTATAGGG
нРНК	CAGCGCTTCAGCGTTCTTCGGTGCTAACCATCTACATTTCCACTA ACTTTGGTTAGTGAA ATATAGATAGCCGTTGTGACTGAGTGACGTGTTAGGTCACCGTAGCATGACACAACCTGCA CTGGTCAGCCTGTAGCTAACCCCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA
SARS-T-F	TGCACAATTTGCCCCAGCGCTTCAGCGTTCTTCGGAATGTTCGCGCATTG
SARS-T-R	CAATGCGCGACATTCCGAAGAACGCTGAAGCGCTGGGGGCAAAATTGTGCA

Примечание. Последовательность, комплементарная последовательности T7-промотора, показана курсивом. Полу жирным шрифтом выделены последовательности протоспейсера синтетической ДНК-мишени и последовательности в ДНК-матрицах, кодирующие последовательности спейсера в направляющей РНК (нРНК).

центрифугированием 40 мин при 20000 *g* и 4°C и наносили на колонку Ni-TED. Промывку и элюцию связавшегося материала производили по ранее описанной методике [16], используя буферные растворы LEW и LEW с добавлением 250 мМ имидазола соответственно. Альтернативно, связавшийся материал промывали и элюировали буферными растворами, содержащими 0.5 М NaCl, 50 мМ Tris-HCl, 20 мМ имидазол, 0.5 мМ TCEP, pH 7.5 и 0.5 М NaCl, 50 мМ Tris-HCl, 300 мМ имидазол, 0.5 мМ TCEP, pH 7.5 соответственно, как описано в [14] для BrCas12b. При очистке CRISPR-нуклеазы AarCas12b колонку промывали сначала буфером, содержащим 20 мМ Tris-HCl, 0.5 М NaCl и 10 мМ имидазол (pH 7.5), после чего связавшийся белок элюировали этим же буфером с добавлением 250 мМ имидазола.

Собранные фракции анализировали методом электрофореза по Лэмбли в 9% полиакриламидном геле (ПААГ) с окраской красителем Кумасси G-250 («Bio-Rad», США), как описано ранее [15]. Количество целевого белка определяли методом денситометрии ПААГ, используя для построения калибровочной прямой образцы бычьего сывороточного альбумина (БСА) известной концентрации, как в работе [16].

Содержащие целевой белок фракции объединяли и переводили в буфер для хранения (буфер С: 20 мМ HEPES, 500 мМ NaCl, 0,1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 5% глицерин, pH 7.5) с помощью центрифужных концентраторов Vivaspin 2 («Sartorius Stedim», Германия). Дополнительно, в качестве буферов для хранения целевого белка использовали буферы А и В, соответственно содержащие 10 мМ Tris-HCl, 0.1 М NaCl, 1 мМ DTT, 50% глицерин, pH 7.5 [12] и 150 мМ NaCl, 50 мМ HEPES, 0.5 мМ TCEP, pH 7.0 [14]. Для перевода в буфер А для хранения использовался двухступенчатый диализ через мембрану SnakeSkin Dialysis Tubing 7000 MWCO («Thermo Fisher Scientific», США), как описано в [12].

Синтез направляющей РНК и получение ДНК-мишени

Синтетическую ДНК-мишень SARS-T получали, смешивая эквимоллярные количества олигонуклеотидов SARS-T-F и SARS-T-R (табл.1). Смесь инкубировали 5 мин при 96°C с последующим охлаждением до комнатной температуры.

Для синтеза направляющей РНК (нРНК) готовили ДНК-матрицу, содержащую на 3'-конце участок, комплементарный последовательности промотора ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага T7 (табл. 1). ДНК-матрицу готовили лигированием ДНК-олигонуклеотидов длиной

40-50 нуклеотидов (нт), химически фосфорилированных на 5'-конце, с перекрывающимися комплементарными участками длиной 20-30 нт. Смесь ДНК-олигонуклеотидов в буфере для лигирования (T4 DNA Ligase Reaction Buffer, «New England Biolabs», США) инкубировали 5 мин при 96°C и медленно охлаждали до комнатной температуры. После добавления T4-лигазы («New England Biolabs») до конечной концентрации 120 Ед/мкл, смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Полученные фрагменты ДНК амплифицировали методом ПЦР, используя режим амплификации 5 мин при 95°C, затем 30 циклов по 15 сек при 95°C, 58°C и 72°C, за которыми следовала элонгация – 2 мин при 72°C. ПЦР проводили с праймерами 5'-CAGCGCTTCAGCGTTCTTC-3' и 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGA-3', используя ПЦР-набор «HS Taq ДНК-полимераза» («Евроген», Россия). Ампликоны очищали с использованием набора «Cleanup Standard» («Евроген») в соответствии с протоколом производителя. Соответствие последовательности полученных ампликонов ожидаемой последовательности ДНК-матрицы для синтеза нРНК (gRNA DNA template, табл. 1) контролировали секвенированием. Секвенирование выполнялось компанией «Евроген».

Эквимоллярную смесь ДНК-матрицы и олигонуклеотида T7F с последовательностью T7-промотора (табл. 1) инкубировали 2 мин при 96°C в буфере 10 мМ Tris-HCl (pH 7.0), охлаждали до комнатной температуры и использовали для синтеза нРНК с помощью набора TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit («Thermo Fisher Scientific», США) согласно инструкции производителя. Очистку нРНК проводили смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт 25:24:1 («Acros Organics», Бельгия) с последующим осаждением этанолом. Осадок растворяли в воде, свободной от нуклеаз, и определяли концентрацию на спектрофотометре NanoDrop 1000. Аликвоты раствора нРНК хранили при –80°C.

Определение коллатеральной активности рекомбинантных CRISPR-нуклеаз Cas12b

Для детекции коллатеральной активности препараты целевого белка, полученного с помощью упрощенной одностадийной очистки, смешивали с нРНК в эквимоллярном соотношении в буфере, содержащем 30 мМ Tris-HCl (pH 8.9), 5 мкМ (NH₄)₂SO₄, 0.05 мг/мл БСА, 0.2% Tween 20, 200 мкМ сахарозы, 6 мкМ MgSO₄. Для формирования комплекса Cas12b/нРНК смесь инкубировалась 10 мин при 25°C, после чего к ней добавляли молекулярные репортёры и синтетическую ДНК-мишень SARS-T. Конечная

концентрация CRISPR-нуклеазы Cas12b составляла 30 нМ, репортёров – 5 мкМ, ДНК-мишени – 50 нМ. Объем реакционной смеси составлял 20 мкл. В качестве молекулярных репортёров использовали короткие ДНК-олигонуклеотиды FAM-ТТАТТ-ВНQ1, несущие на концах молекулы флуорофора (FAM) и «гасителя» флуоресценции (ВНQ1). Данные молекулярные репортёры широко используются для мониторинга коллатеральной активности нуклеазы Cas12a [17].

При проведении всех операций пробирки с реакционными смесями находились во льду. Для инициации реакции пробы помещали в термоблок амплификатора DTrprime5 («ДНК-Технология», Россия) сразу после внесения ДНК-мишени. Контрольные образцы не содержали ДНК-мишень. Амплификатор использовали в режиме «температурный градиент». Температуру лунок термоблока варьировали от 56°C до 72°C. Измерения флуоресценции проводили каждые 30 с. Флуоресценцию измеряли в условных единицах (у.е.), установленных производителем амплификатора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование упрощенной одностадийной очистки целевого белка методом металл-хелатной хроматографии позволяет сократить затраты времени и ресурсов на получение функционально активных рекомбинантных CRISPR/Cas-нуклеаз. Такой подход был нами ранее успешно реализован при получении рекомбинантных CRISPR-нуклеаз Cas12a и Cas13a с сохранением их коллатеральной активности [15, 16]. В обоих случаях очищенный целевой белок фактически представлял белок слияния (fusion protein). В случае Cas12a-нуклеазы, белок слияния имел N-концевой мотив, состоящий из 6 остатков гистидина, за которым следовали последовательность мальтозосвязывающего белка (молекулярная масса около 42 кДа), последовательность сайта узнавания для TEV-протеазы из 7 аминокислотных остатков (а.о.) и последовательность самой нуклеазы (около 150 кДа). В случае Cas13a-нуклеазы белок слияния также включал N-концевой мотив из 6 остатков гистидина и заканчивался последовательностью нуклеазы (молекулярный размер – около 144 кДа), но между ними располагались аминокислотные последовательности стрептавидинового тага (Twin-Strep-tag, молекулярная масса «вставки» около 3 кДа) и сайта узнавания SUMO-протеазы (размер «вставки» около 11 кДа). В данной работе рекомбинантная нуклеаза AapCas12b была получена как белок слияния, аналогичный ранее полученному для Cas13a-нуклеазы [15], а нуклеазы BrCas12b, BrCas12b-FNLDTA и BrCas12b-RFND – как белки слияния, аналогичные белку слияния для Cas12a-нуклеазы [16]. Для удобства дальнейшего изложения, рекомбинантные CRISPR/Cas-нуклеазы, получаемые в виде белка слияния (fusion protein), будут обозначаться как «fr-название нуклеазы».

Для сравнительной оценки коллатеральной нуклеазной активности рекомбинантных белков fr-AapCas12b, fr-BrCas12b, fr-BrCas12b-FNLDTA и fr-BrCas12b-RFND был проведен экспериментальный анализ скорости расщепления молекулярного репортёра, FAM-ТТАТТ-ВНQ1, в одинаковых условиях при трёх температурах – 56°C, 64°C и 72°C. Выбор температур был обусловлен тем, что температура 64°C находится в диапазоне, наиболее часто используемом

для проведения LAMP (60°C–65°C), а температуры 56°C и 72°C близки к нижнему и верхнему пределам температур, совместимых с LAMP [18]. Следует отметить, что амплификация при 72°C требует использования определённой полимеразы, а именно Bst 3.0 («New England Biolabs»). В качестве мишени служил химически синтезированный участок гена N, кодирующего белок нуклеокапсида вируса SARS-CoV-2, ранее использованный как мишень для комплексов nРНК с нуклеазой BrCas12b и её мутантными вариантами в работе [14], а композиция буферного раствора для выполнения кинетического анализа была совместима с проведением реакции LAMP.

На рисунке 1 представлены репрезентативные кинетические кривые расщепления репортёров. Как можно видеть, все четыре рекомбинантные нуклеазы, полученные в виде белков слияния и имеющие в своем составе последовательности N-тагов, не утратили способность проявлять коллатеральную активность в температурном диапазоне 56°C–72°C. При этом коллатеральная активность fr-AapCas12b была значительно ниже активности, наблюдаемой для белков слияния, полученных для трех вариантов нуклеазы BrCas12b.

В целом полученный результат согласуется с данными работы [14], где было продемонстрировано многократное превышение уровня коллатеральной активности у мутантов BrCas12b по сравнению с AapCas12b в температурном диапазоне проведения LAMP. Однако в нашем случае не было выявлено резкого падения коллатеральной активности с ростом температуры выше 60°C, наблюдаемого в работе [13]. Следует отметить, что в работах [11-14] для получения рекомбинантных нуклеаз AapCas12b и BrCas12b (а также её мутантных вариантов) при лизисе клеток использовали буферные растворы разной композиции, в то время как в нашем случае разрушение клеток проходило в одинаковом буферном растворе (композиции буферных растворов приведены в разделе «Методика»). Однако использование таких же буферных растворов для лизиса клеток, как в работах [11-14], при получении рекомбинантных нуклеаз по упрощенной методике с одностадийной хроматографической очисткой не привело к сколь-либо существенному изменению кинетики расщепления репортёров по сравнению с представленной на рисунке 1 (данные не показаны). Следует отметить, что в этом случае получаемые белковые продукты переводились для хранения в буферные растворы А и В (раздел «Методика») соответственно [11-14]. Таким образом, различия в температурной зависимости коллатеральной активности между AapCas12b [13] и fr-AapCas12b скорее всего связаны с влиянием N-тагов. Кроме того, рекомбинантный белок fr-BrCas12b, который включает аминокислотную последовательность нуклеазы BrCas12b «дикого типа», практически не уступал по уровню коллатеральной активности белкам fr-BrCas12b-FNLDTA и fr-BrCas12b-RFND, содержащим последовательность мутантов BrCas12b, при температурах 56°C и 64°C, но заметно превосходил их при температуре 72°C (рис. 1). Такое поведение существенно отличалось от поведения рекомбинантных нуклеаз BrCas12b, BrCas12b-FNLDTA и BrCas12b-RFND, наблюдаемого в работе [14], где мутанты значительно превосходили «дикий тип» по уровню коллатеральной активности при повышении температуры.

Для более детального изучения температурной зависимости коллатеральной активности рекомбинантных

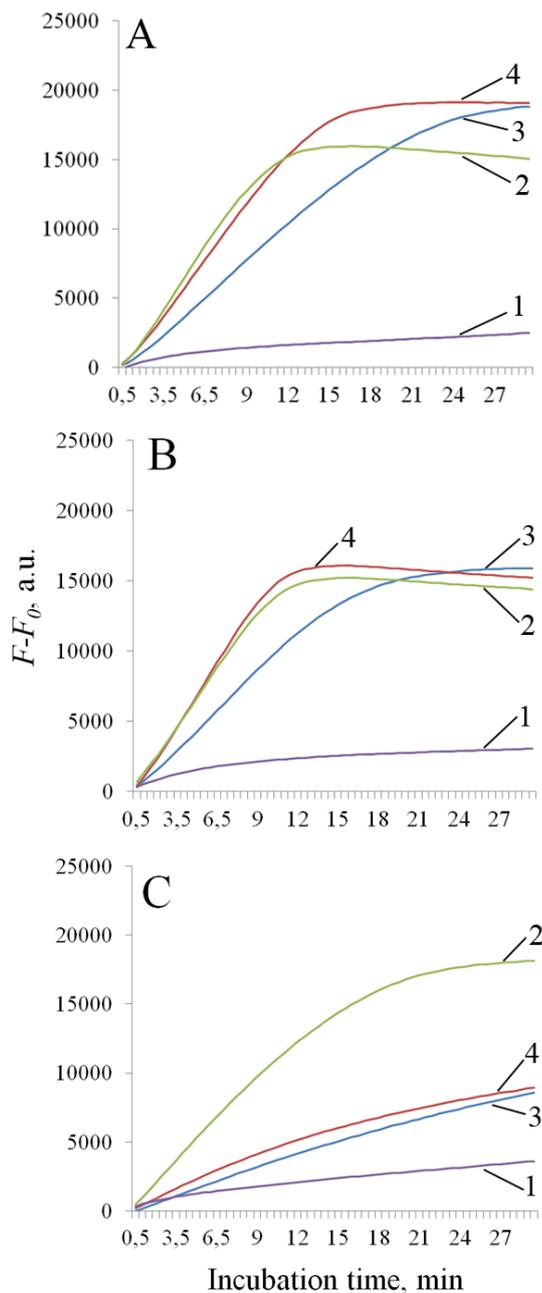


Рисунок 1. Репрезентативные зависимости изменения флуоресценции от времени реакции при расщеплении ДНК-репортёров рекомбинантными нуклеазами fp-AapCas12b, fp-BrCas12b, fp-BrCas12b-FNLDTA и fp-BrCas12b-RFND. Температура проведения реакции: 56°C(A), 64°C (B), 72°C (C). Кривые 1, 2, 3 и 4 - fp-AapCas12b, fp-BrCas12b, fp-BrCas12b-FNLDTA и fp-BrCas12b-RFND соответственно. Флуоресценция в пробах без добавления ДНК-мишени (F_0) вычиталась из флуоресценции, измеренной в пробах, где мишень присутствовала (F).

Cas12b-нуклеаз, получаемых в виде белков слияния, было проведено тестирование с меньшим температурным инкрементом, а именно с шагом в два градуса, в том же температурном диапазоне 56°C–72°C. Поскольку уровень коллатеральной активности у fp-AapCas12b был существенно ниже, чем у fp-BrCas12b, fp-BrCas12b-FNLDTA и fp-BrCas12b-RFND при всех трех ранее тестированных температурах (рис. 1), данный рекомбинантный белок был исключен нами из дальнейшего анализа. На рисунке 2 результаты проведенного анализа представлены как гистограммы, показывающие средние значения начальной

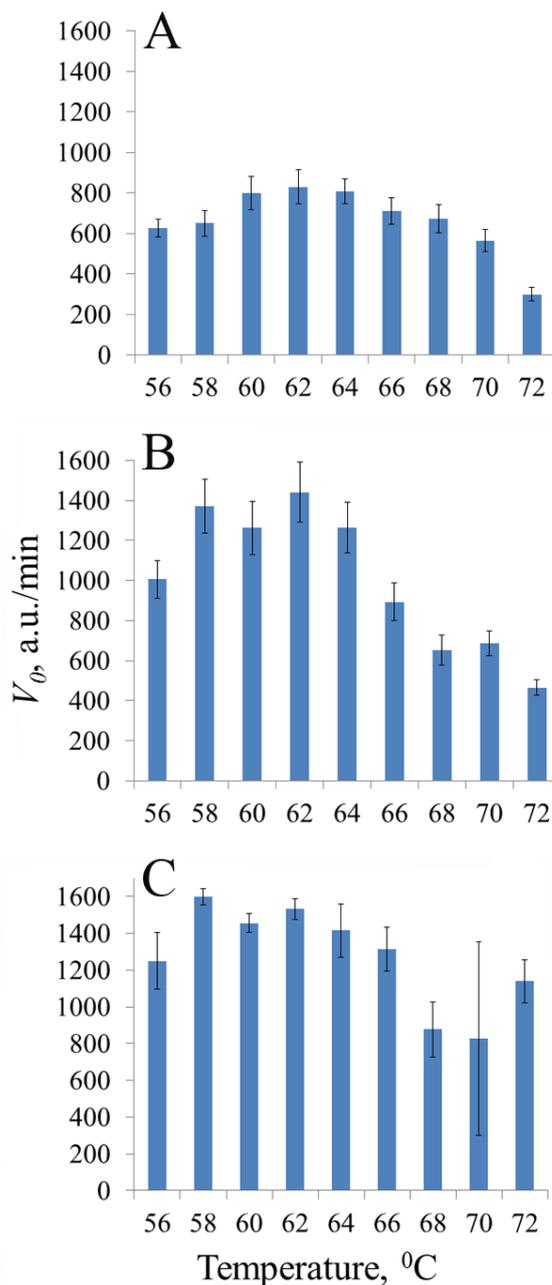


Рисунок 2. Начальная скорость V_0 расщепления ДНК-репортёров рекомбинантными нуклеазами fp-BrCas12b-FNLDTA (A), BrCas12b-RFND (B) и fp-BrCas12b (C) при разных температурах проведения реакции. Показаны средние арифметические значения и среднеквадратичные отклонения для трех независимых измерений.

скорости V_0 расщепления репортёров активированными fp-BrCas12b, fp-BrCas12b-FNLDTA и fp-BrCas12b-RFND при тестированных температурах реакции. Начальную скорость V_0 рассчитывали, как описано в статье [19]. Она представляет собой тангенс угла наклона начального прямолинейного участка кинетических зависимостей (зависимостей флуоресценции от времени, аналогичным представленным на рисунке 1).

Как можно видеть из рисунка 2, рекомбинантные белки fp-BrCas12b, fp-BrCas12b-FNLDTA и fp-BrCas12b-RFND различаются между собой как по температурному профилю уровня коллатеральной активности, так и по его абсолютному значению. Так, для fp-BrCas12b-FNLDTA оптимальными были значения температуры в диапазоне от 60°C до 64°C, а максимальная величина начальной скорости составила всего

800 у.е./мин (рис. 2А). При этом активность нуклеазы плавно снижалась с повышением и понижением температуры от уровня оптимальных температур. В случае с *fp-BrCas12b-RFND* максимальные показатели V_0 достигались в диапазоне от 58°C до 64°C и составляли 1300-1400 у.е./мин (рис. 2В), при этом при всех температурах средние значения V_0 были выше, чем для *fp-BrCas12b-FNLDTA*. Наиболее интересным было поведение рекомбинантного белка *fp-BrCas12b*, содержащего последовательность нуклеазы «дикого типа». Он показал более высокие уровни коллатеральной активности, чем *fp-BrCas12b-FNLDTA* и *fp-BrCas12b-RFND*, во всем температурном диапазоне, при этом значения V_0 уменьшались не более чем в два раза при повышении температуры реакции от 58°C-62°C до 68°C-72°C (рис. 2С). Это контрастирует с поведением рекомбинантной CRISPR-нуклеазы *BrCas12b*, которая практически полностью теряла способность к неспецифическому расщеплению молекул-репортеров в присутствии ДНК-мишени при температуре 68°C и выше [14]. Однако следует отметить, что при температуре 70°C наблюдалась высокая вариабельность значений V_0 для *fp-BrCas12b*, причины которой остались неясны. Тем не менее, такая высокая вариабельность при данной температуре может негативно сказываться при использовании рекомбинантного белка *fp-BrCas12b* в тестах, требующих проведения LAMP при повышенной температуре.

Ещё одной методической особенностью нашего протокола является отличие буферных растворов для промывки и элюции целевого белка, связавшегося на сорбенте Ni-TED, от использованных в работе [14] для получения рекомбинантной нуклеазы *BrCas12b* и её мутантных вариантов. Однако использование таких же буферных растворов, как в работе [14] (раздел «Методика»), не привело в нашем случае к улучшению функциональных характеристик *fp-BrCas12b*, *fp-BrCas12b-RFND* и *fp-BrCas12b-FNLDTA* (рис. 3). В то время как температурные профили коллатеральной активности практически не изменились, значения V_0 были во всех случаях заметно ниже – от 30% до 60% (рис. 2, 3). Следует отметить, что мы использовали для промывки и элюции буферные растворы, состав которых оптимизирован производителем колонок Protino Ni-TED 1000 для проведения данных процедур. Возможно, использование оптимизированных для данных колонок буферных растворов позволяет увеличить долю функционально активного целевого белка в элюате. При этом стоит отметить, что для любых из использованных буферных растворов степень очистки, контролируемая с помощью ПААГ, была практически одинаковой.

Известно, что термостабильность ферментов, включая CRISPR/Cas-нуклеазы, определяется особенностями формирования их вторичной и третичной структуры [20, 21]. В настоящее время нам сложно представить механистическое объяснение того, как наличие дополнительных доменов в белке слияния, содержащем домены CRISPR-нуклеазы, может влиять на термостабильность последних. Тем не менее, наличие дополнительных доменов не только не привело к утере способности *BrCas12b*-нуклеазы как части белка слияния проявлять коллатеральную нуклеазную активность, но даже улучшило её термостабильность по сравнению со специально отобранными термостабильными мутантными вариантами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

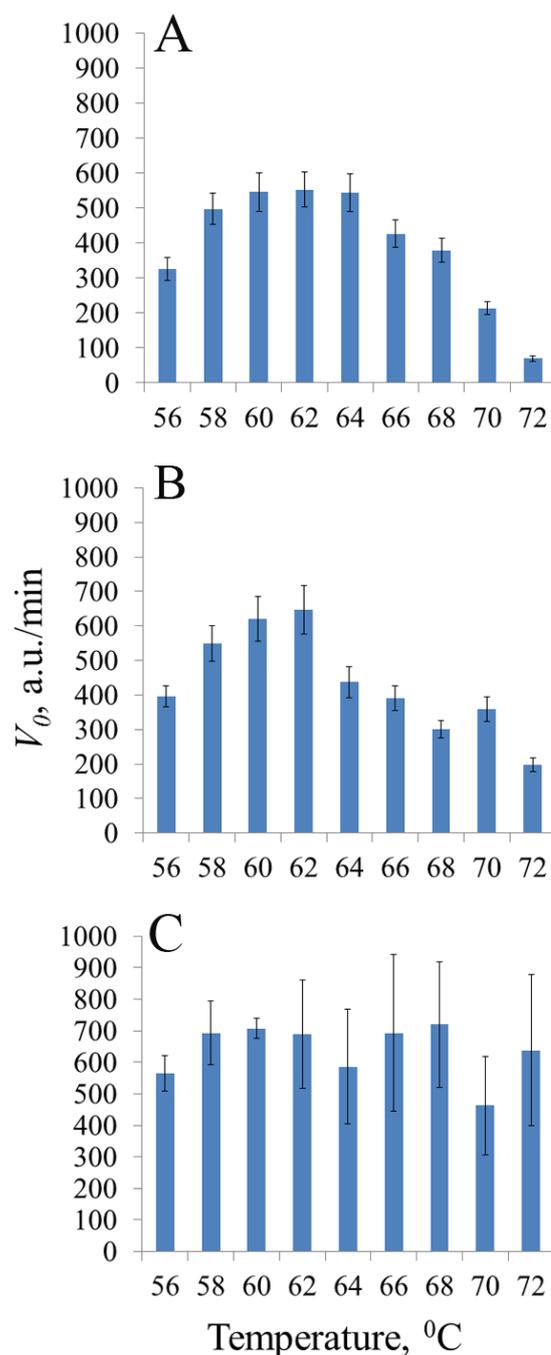


Рисунок 3. Начальная скорость V_0 расщепления ДНК-репортёров рекомбинантными нуклеазами *fp-BrCas12b-FNLDTA* (А), *BrCas12b-RFND* (В) и *fp-BrCas12b* (С) при разных температурах проведения реакции. Очистку целевых белков проводили с использованием буферных растворов из работы [15]. Показаны средние арифметические значения и среднеквадратичные отклонения для трех измерений.

Термостабильные рекомбинантные CRISPR-нуклеазы *Cas12b* могут быть получены с использованием упрощенной одностадийной процедуры очистки на основе метода металл-хелатной хроматографии в виде белков слияния. Несмотря на наличие аминокислотных последовательностей N-тагов, такие белки слияния сохраняют способность доменов *Cas12b*-нуклеаз к формированию комплексов с нРНК, активации и проявлению коллатеральной нуклеазной активности в отношении однонитевой ДНК в температурном диапазоне 56°C–72°C. Это делает их пригодными для сопряжения с LAMP и использования в тест-системах, нацеленных

на проведение ДНК-диагностики во внелабораторном формате. Среди тестированных Cas12b-нуклеаз, Brcas12b в виде белка слияния показала наибольшую коллатеральную активность во всем исследованном температурном диапазоне (56°C–72°C), однако характеризовалась нестабильностью в уровне активности при температуре 70°C. Белок слияния, содержащий мутантный вариант нуклеазы, Brcas12bRFND, имеет выраженный температурный оптимум в интервале от 58°C до 64°C и характеризуется высоким значением и стабильностью уровня коллатеральной активности.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная работа не связана с исследованиями, в которых в качестве объекта выступают люди или животные.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- van der Oost, J., Westra, E.R., Jackson, R.N., Wiedenheft, B. (2014) Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nature Review Microbiology*, **12**(7), 479-492. DOI: 10.1038/nrmicro3279
- Kaminski, M.M., Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Zhang, F., Collins, J.J. (2021) CRISPR-based diagnostics. *Nature Biomedical Engineering*, **5**(7), 643-656. DOI: 10.1038/s41551-021-00760-7
- Fapohunda, F.O., Qiao, S., Pan, Y., Wang, H., Liu, Y., Chen, Q., Lu, P. (2022) CRISPR Cas system: A strategic approach in detection of nucleic acids. *Microbiological Research*, **259**, 127000. DOI: 10.1016/j.micres.2022.127000
- Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Lee, J.W., Essletzbichler, P., Dy, A.J., Joung, J., Verdine, V., Donghia, N., Daringer, N.M., Freije, C.A., Myhrvold, C., Bhattacharyya, R.P., Livny, J., Regev, A., Koonin, E.V., Hung, D.T., Sabeti, P.C., Collins, J.J., Zhang, F. (2017) Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, **356**(6336), 438-442. DOI: 10.1126/science.aam9321
- Chen, J.S., Ma, E., Harrington, L.B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J.M., Doudna, J.A. (2018) CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, **360**(6387), 436-439. DOI: 10.1126/science.aar6245
- Piepenburg, O., Williams, C.H., Stemple, D.L., Armes, N.A. (2006) DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biology*, **4**(7), e204. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040204
- Khmeleva, S. A., Ptitsyn, K. G., Kurbatov, L. K., Timoshenko, O. S., Suprun, E. V., Radko, S. P., Lisitsa, A. V. (2024) Biosensing platforms for DNA diagnostics based on CRISPR/Cas nucleases: towards the detection of nucleic acids at the level of single molecules in non-laboratory settings. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **70**(5), 287-303. DOI: 10.18097/PBMC20247005287
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, **28**(12), e63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
- Joung, J., Ladha, A., Saito, M., Kim, N.G., Woolley, A.E., Segel, M., Barretto, R.P.J., Ranu, A., Macrae, R.K., Faure, G., Ioannidi, E.I., Krajcski, R.N., Bruneau, R., Huang, M.W., Yu, X.G., Li, J.Z., Walker, B.D., Hung, D.T., Greninger, A.L., Jerome, K.R., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Zhang, F. (2020) Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing. *The New England Journal of Medicine*, **383**(15), 1492-1494.
- Teng, F., Cui, T., Feng, G., Guo, L., Xu, K., Gao, Q., Li, T., Li, J., Zhou, Q., Li, W. (2018) Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. *Cell Discovery*, **27**(4), 63. DOI: 10.1038/s41421-018-0069-3
- Tian, Y., Liu, R.R., Xian, W.D., Xiong, M., Xiao, M., Li, W.J. (2020) A novel thermal Cas12b from a hot spring bacterium with high target mismatch tolerance and robust DNA cleavage efficiency. *International Journal of Biological Macromolecules*, **147**, 376-384. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.079
- Nan, X., Hardinge, P., Hoehn, S., Dighe, S.N., Ukeri, J., Pease, D.F., Griffin, J., Warrington, J.I., Saud, Z., Hottinger, E., Webster, G., Jones, D., Kille, P., Weightman, A., Stanton, R., Castell, O.K., Murray, J.A.H., Jurkowski, T.P. (2023) VarLOCK: sequencing-independent, rapid detection of SARS-CoV-2 variants of concern for point-of-care testing, qPCR pipelines and national wastewater surveillance. *Scientific Reports*, **13**(1), 20832. DOI: 10.1038/s41598-023-47289-0
- Nguyen, L.T., Macaluso, N.C., Pizzano, B.L.M., Cash, M.N., Spacek, J., Karasek, J., Miller, M.R., Lednický, J.A., Dinglasan, R.R., Salemi, M., Jain, P.K. (2022) A thermostable Cas12b from *Brevibacillus* leverages one-pot discrimination of SARS-CoV-2 variants of concern. *EBioMedicine*, **77**, 103926. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.103926
- Nguyen, L.T., Rananaware, S.R., Yang, L.G., Macaluso, N.C., Ocana-Ortiz, J.E., Meister, K.S., Pizzano, B.L.M., Sandoval, L.S.W., Hautamaki, R.C., Fang, Z.R., Joseph, S.M., Shoemaker, G.M., Carman, D.R., Chang, L., Rakestraw, N.R., Zachary, J.F., Guerra, S., Perez, A., Jain, P.K. (2023) Engineering highly thermostable Cas12b via de novo structural analyses for one-pot detection of nucleic acids. *Cell Reports Medicine*, **4**(5), 101037. DOI: 10.1016/j.xcrm.2023.101037
- Kurbatov, L.K., Radko, S.P., Kravchenko, S.V., Kiseleva, O. I., Durmanov, N. D., Lisitsa, A. V. (2020) Single Stage Purification of CRISPR/Cas13a Nuclease via Metal-Chelating Chromatography Following Heterologous Expression with the Preservation of Collateral Ribonuclease Activity. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **56**(6), 671–677. DOI: 10.1134/S0003683820060071
- Kurbatov, L. K., Radko, S. P., Khmeleva, S. A., Ptitsyn, K. G., Timoshenko, O. S., Lisitsa, A. V. (2024) Application of DETECTR for Selective Detection of Bacterial Pathogen *Dickeya solani* Using Recombinant CRISPR-Nuclease Cas12a Obtained by Single-Stage Chromatographic Purification. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **60**(1), 17-25. DOI: 10.1134/S0003683824010095
- Habimana, J.D., Mukama, O., Chen, G., Chen, M., Amisah, O.B., Wang, L., Liu, Y., Sun, Y., Li, A.L., Deng, S., Huang, J., Yan, X.X., Rutaganda, T., Mutangana, D., Wu, L.P., Huang, R., Li, Z. (2023) Harnessing enhanced CRISPR/Cas12a trans-cleavage activity with extended reporters and reductants for early diagnosis of *Helicobacter pylori*, the causative agent of peptic ulcers and stomach cancer. *Biosensors and Bioelectronics*, **222**, 114939. DOI: 10.1016/j.bios.2022.114939
- Ptitsyn, K. G., Khmeleva, S. A., Kurbatov, L. K., Timoshenko, O. S., Suprun, E. A., Radko, S. P., Lisitsa, A. V. (2024) Lamp Primer Designing Software: The Overview. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **7**(4), e00226. DOI: 10.18097/BMCRM00226
- Kurbatov, L. K., Radko, S. P., Khmeleva, S. A., Timoshenko, O. S., Lisitsa, A. V. (2022) Standardization of Recombinant CRISPR/Cas13a-nuclease Preparations by Using RNase A of Known Activity. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **5**(4), e00177. DOI: 10.18097/BMCRM00177
- Hand, T.H., Das, A., Li, H. (2019). Directed evolution studies of a thermophilic Type II-C Cas9. *Methods in Enzymology*, **616**, 265–288. DOI: 10.1016/bs.mie.2018.10.029
- Kumar, S., Tsai, C.J., Nussinov, R. (2000) Factors enhancing protein thermostability. *Protein Engineering*, **13**(3), 179–191. DOI: 10.1093/protein/13.3.179

Поступила: 29.07.2025
 После доработки: 01.09.2025
 Принята к публикации: 09.09.2025

TEMPERATURE DEPENDENCE OF COLLATERAL ACTIVITY OF THERMOSTABLE RECOMBINANT CRISPR NUCLEASES Cas12b OBTAINED BY ONE-STEP PURIFICATION WITH METAL-CHELATE CHROMATOGRAPHY AFTER HETEROLOGOUS EXPRESSION

L.K. Kurbatov^{1}, O.S. Timoshenko¹, S.A. Khmeleva¹, K.G. Ptitsyn¹, E.V. Suprun², S.P. Radko¹, A.V. Lisitsa¹*

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

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

Thermostable CRISPR/Cas nucleases are considered as promising enzymes for development of next-generation DNA diagnostics by coupling loop-mediated isothermal amplification of nucleic acids (LAMP) with selective CRISPR/Cas detection of specific amplicons. In this paper, we present the results of testing the collateral activity of CRISPR nuclease AapCas12b and three variants of CRISPR nuclease BrCas12b (wild type and two mutants) obtained using simplified purification in the typical temperature range of LAMP - from 56°C to 72°C. It was shown that the use of one-step metal-chelate chromatography by excluding a stage of enzymatic removal of N-terminal sequences translated together with the target protein allows for obtaining recombinant CRISPR nucleases BrCas12b with a sufficiently high level of collateral activity. Temperature dependences of collateral activity differed among the studied BrCas12b variants. The obtained results can be useful in selecting thermostable CRISPR nucleases Cas12b for development of test systems based on a combination of LAMP and CRISPR/Cas detection.

Key words: recombinant CRISPR nuclease Cas12b; single-stage purification; collateral nuclease activity; temperature dependence

FUNDING

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

Received: 29.07.2025, revised: 01.09.2025, accepted: 09.09.2025