

## Оптимизация метода выявления единичных копий ДНК вируса гепатита В с помощью систем CRISPR/Cas

М. А. Тюменцева\*, А. И. Тюменцев, А. Н. Преловская, В. Г. Акимкин

ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва

### Резюме

**Актуальность.** Вирус гепатита В (ВГВ) является этиологическим агентом острого и хронического течения гепатита В у людей. ВОЗ рекомендует использовать чувствительные лабораторные анализы на основе методов амплификации нуклеиновых кислот для определения ДНК ВГВ. Для ультрачувствительного определения ДНК ВГВ ранее был разработан метод выявления единичных копий ДНК вируса гепатита В с помощью систем CRISPR/Cas. **Цель.** Оптимизировать метод выявления единичных копий ДНК вируса гепатита В с помощью систем CRISPR/Cas. **Материалы и методы.** Для получения амплифицированных фрагментов генома ВГВ было разработано 22 олигонуклеотида. Этап предварительной амплификации проводили методом рекомбиназной полимеразной амплификации с использованием разработанных олигонуклеотидов. Получение рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas, специфических к фрагментам генома ВГВ, проводили с использованием синтетических направляющих РНК (олигорибонуклеотиды). Этап детекции осуществляли в HOLMES 1. **Результаты.** При проведении работ по оптимизации метода выявления ДНК ВГВ нам удалось сохранить чувствительность оптимизированного метода на уровне исходного (выявление единичных копий ДНК ВГВ). Кроме того, при проведении оптимизации у нас получилось сократить время, необходимое для проведения анализа. Так, для выявления единичных копий (6 копий в реакции) ДНК ВГВ с помощью исходного метода необходимо 83 минуты, тогда как для оптимизированного – 32 минуты. **Заключение.** Описанный в статье оптимизированный метод выявления единичных копий ДНК ВГВ с помощью систем CRISPR/Cas в перспективе может быть использован для разработки новых диагностических наборов для выявления ДНК вируса гепатита В, в том числе применимых у постели больного и/или в полевых условиях.

**Ключевые слова:** вирус гепатита В (ВГВ), ДНК, ПЦР, рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA), CRISPR/Cas, детекция  
Конфликт интересов не заявлен.

**Для цитирования:** Тюменцева М. А., Тюменцев А. И., Преловская А. Н. и др. Оптимизация метода выявления единичных копий ДНК вируса гепатита В с помощью систем CRISPR/Cas. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2024;23(6):114-128. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2024-23-6-114-128>

### Optimization of a Method for Detecting Single copies of Hepatitis B Virus DNA using CRISPR/Cas systems

MA Tyumentseva\*\*, AI Tyumentsev, AN Prelovskaya, VG Akimkin

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

#### Abstract

**Relevance.** Hepatitis B virus (HBV) is the etiologic agent of acute and chronic hepatitis B in humans. WHO recommends the use of sensitive laboratory assays based on nucleic acid amplification methods to detect HBV DNA. A method for detecting single copies of hepatitis B virus DNA using CRISPR/Cas systems was previously developed for ultrasensitive detection of HBV DNA. **Aims.** The aim of present study was to optimize the method for detecting single copies of hepatitis B virus DNA using CRISPR/Cas systems.

**Materials and methods.** To obtain amplified fragments of the hepatitis B virus genome, 22 oligonucleotides were developed. The preliminary amplification stage was performed by the RPA method using the developed oligonucleotides. The assembly of CRISPR/Cas ribonucleoprotein complexes specific for fragments of the hepatitis B virus genome was carried out using synthetic guide RNA (oligoribonucleotides). The detection stage was performed in HOLMES 1. **Results and discussion.** We maintained the sensitivity of the optimized method at the level of the original one (detection of single copies of hepatitis B virus DNA), when optimizing the method for detecting hepatitis B virus DNA. In addition, we reduced the time required for the analysis. Thus, the time required to detect single copies (6 copies per reaction) of hepatitis B virus DNA using the original method is 83 minutes, while for the optimized method it is 32 minutes.

**Conclusions.** The optimized method for detecting single copies of hepatitis B virus DNA using CRISPR/Cas systems described in the article can be used in the future to develop new diagnostic kits, including point-of-care kits and/or kits to use in the field.

\* Для переписки: Тюменцева Марина Алексеевна, к. б. н., заведующая лабораторией геномного редактирования ОМДиЭ, Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт Эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а, стр. 3. +7 (495) 974-96-46 (доб. 2627), [tyumentseva@cmd.su](mailto:tyumentseva@cmd.su). ©Тюменцева М. А. и др.

\*\* For correspondence: Tyumentseva Marina A., Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Genome Editing of the OMD&E Federal Budgetary Institution of Science Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадзор, 3a, building 3, Novogireevskaya st., Moscow, 111123, Russia. +7 (495) 974-96-46 (ext. 2627), [tyumentseva@cmd.su](mailto:tyumentseva@cmd.su). ©Tyumentseva MA, et al.

**Keywords:** hepatitis B virus, DNA, PCR, recombinase polymerase amplification, CRISPR/Cas, detection  
No conflict of interest to declare.

**For citation:** Tyumentseva MA, Tyumentsev AI, Prelovskaya AN et al. Optimization of a method for detecting single copies of hepatitis B virus DNA using CRISPR/Cas systems. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2024;23(6):114-128 (In Russ.). <https://doi:10.31631/2073-3046-2024-23-6-114-128>

## Введение

Вирус гепатита В (ВГВ) является этиологическим агентом острого или хронического гепатита В у людей. В странах, где распространенность ВГВ высока, инфицирование обычно происходит в детском возрасте, что приводит к пожизненной хронической инфекции и носительству вируса, тогда как инфицирование взрослых обычно приводит к острому, саморазрешающемуся заболеванию с последующим выведением вируса или, в редких случаях, к печеночной недостаточности. В основном ВГВ передается через кровь и биологические жидкости. Среди основных путей передачи – перинатальная и ранняя младенческая передача, а также половой и парентеральный пути [1]. По оценкам ВОЗ, в 2022 г. в мире насчитывалось 254 млн человек, живущих с хроническим гепатитом В; при этом ежегодно происходит около 1,2 млн новых случаев инфицирования [2].

Первичная диагностика хронического гепатита В основана на обнаружении поверхностного антигена HBsAg. Однако количественное определение ДНК ВГВ имеет решающее значение для определения соответствия критериям лечения, противовирусной профилактики для предотвращения передачи вируса от матери ребенку и мониторинга лечения [3,4]. ВОЗ рекомендует использовать чувствительные лабораторные исследования на основе методов амплификации нуклеиновых кислот для количественного определения ДНК ВГВ [5,6].

Для решения эпидемиологических задач по расшифровке вспышек инфекционных болезней, выявления и идентификации возбудителя, а также детекции специфических бактериальных и вирусных генов необходимы разработка и внедрение в практику работы надзорных и мониторинговых служб современных технологий молекулярной эпидемиологии. Одной из таких технологий является использование элементов генетического редактирования системы CRISPR/Cas (CRISPR – clustered, regularly interspaced, short palin dromic repeats, Cas – CRISPR-associated system – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами). При углубленных исследованиях применения CRISPR/Cas системы было выяснено, что она может быть использована для тонких диагностических процедур при выявлении возбудителя/ей инфекции у человека, а также их генотипирования.

В 2018 г. было показано, что один из ферментов CRISPR-системы – Cas12 после распознавания своей целевой ДНК-мишени начинает неспецифически гидролизовать одноцепочечную

ДНК. Такое свойство Cas12 можно использовать в качестве индикатора присутствия определенной мишени, например, генома вируса или бактерии. Исследователи использовали это открытие для создания технологической платформы обнаружения нуклеиновых кислот, известной как DETECTR (от англ., DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter – ДНК-нацеленная эндонуклеаза CRISPR трансрепортер). Предложенная платформа объединяет нуклеазу Cas12a, ее направляющую РНК, специфичную к нуклеиновой кислоте, и флуоресцентную репортерную молекулу. Впервые технология DETECTR была использована для выявления и генотипирования вируса папилломы человека. DETECTR в течение 1 часа позволила дифференцировать HPV16 и HPV18 в неочищенных экстрактах ДНК из культивируемых клеток человека и клинических образцов. При этом DETECTR корректно (сопоставимо с результатами ПЦР) идентифицировала HPV16 в 25 и HPV18 – в 23 из 25 клинических образцов [7].

Не менее важным приложением системы CRISPR/Cas является идентификация патогенов и детекция специфических бактериальных генов с помощью платформы SHERLOCK (от англ., Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing – ферментативная специфическая высокочувствительная разблокировка репортера). Предложенная платформа объединяет нуклеазу Cas13a, ее направляющую РНК, специфичную к нуклеиновой кислоте, и флуоресцентную репортерную молекулу. Комплекс Cas13a связывает и расщепляет предварительно амплифицированную нуклеиновую кислоту-мишень с высокой специфичностью. С помощью SHERLOCK удалось корректно дифференцировать близкородственные штаммы вирусов Зика и Денге [8].

Позднее технология SHERLOCK была усовершенствована (SHERLOCKv2) и позволила выявлять в одном анализе до 4 мишеней. Мультиплексирование было достигнуто путем объединения нескольких нуклеаз Cas13 и нуклеазы Cas12 со специфичными флуоресцентными репортерными комплексами, которые обеспечивали детекцию сигнала на разных длинах волн. Количественное обнаружение было достигнуто путем оптимизации концентраций олигонуклеотидов, используемых на этапе предварительной амплификации, чтобы входной сигнал и интенсивность сигнала тесно коррелировали в широком диапазоне концентраций образца. Повышенная чувствительность была достигнута путем добавления белка Csm6 для уве-

личения интенсивности расщепления флуоресцентного репортера. Стоит отметить, что SHERLOCKv2 является портативным анализом за счет того, что обнаружение показаний флуоресценции в предложенной технологии заменено на визуальную детекцию на тест-полосках [9].

На основе SHERLOCK также была разработана технология HUDSON (от англ., Heating Unextracted Diagnostic Samples to Obliterate Nucleases – нагревание неэкстрагированных диагностических образцов для уничтожения нуклеаз), которая устраняет необходимость в экстракции нуклеиновых кислот и позволяет обнаруживать патогены непосредственно в биологических образцах пациента (образец крови, сыворотки или плазмы крови, клеток крови, слюны, мокроты, лимфоидных тканей, тканей кровеносных органов и других биологических материалов). В HUDSON нагревание и химическое восстановление инактивируют нуклеазы, присутствующие в высоких концентрациях в биологических образцах пациента, после чего вирусные частицы лизируются, высвобождая нуклеиновые кислоты в раствор. HUDSON делает возможным в течение двух часов с высокой чувствительностью обнаружить вирус Денге в образцах цельной крови, сыворотки и слюны пациентов. Кроме того, HUDSON позволяет дифференцировать четыре серотипа вируса Денге и выявлять 6 наиболее распространенных мутаций обратной транскриптазы ВИЧ [10].

В 2020 г. Zhou R. и соавт. описали способ выявления ДНК ВГВ с помощью белка Cas12a и технологии плазмонной петлевой изотермической амплификации (LAMP) с ортогональным цветовым выводом. Чувствительность описанного метода составляла 140 копий ДНК вируса гепатита В на реакцию [11].

Cas12a также был использован для выявления ДНК ВГВ методом, основанном на применении LAMP для предварительной амплификации. Визуализация результатов анализа возможна как с помощью флуоресцентного индикатора, так и тест-полосок. Чувствительность описанной платформы составляла 25 копий ДНК ВГВ на реакцию [12].

X. Chen и соавт. в 2021 г. для выявления ДНК ВГВ использовали многократную амплификацию с перекрестным смещением (MCDA) для быстрой предварительной амплификации с последующим детектированием последовательностей-мишеней с помощью Cas12b. Чувствительность описанной платформы составляла 10 копий ДНК ВГВ на реакцию [13].

В связи с этим крайне актуальной является задача разработки новых эффективных методик выявления нуклеиновых кислот возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе ДНК ВГВ, основанных на генетических технологиях, таких как CRISPR/Cas.

**Цель исследования** – оптимизировать метод выявления единичных копий ДНК ВГВ с помощью систем CRISPR/Cas.

## Материалы и методы

### Олигонуклеотиды, рекомбинантные белки и буферы

Все олигонуклеотиды, включая одноцепочечные репортерные молекулы ДНК для флуоресцентного анализа CRISPR/Cas12, олигонуклеотиды для проведения рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA) и направляющие РНК (синтетические олигорибонуклеотиды) были приобретены в АО «ГенТерра» (Москва, Россия). Все использованные нуклеотидные последовательности приведены в таблице 1.

Cas12a из *Lachnospiraceae bacterium* (LbCpf1) и все рекомбинантные белки, необходимые для проведения RPA были получены в ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва, Россия); 10× Cas12 реакционный буфер (100 mM TrisHCl, 1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0 при 25 °C) и 10×HOLMES 1 буфер с незначительными модификациями (400 mM TrisHCl, 60 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 mM Glycine, 20 mM Spermidine, 10 mM DTT, 0.01% Triton® X-100, 4% PEG-8000, pH 8,5 при 25 °C) [14] готовили из химических реагентов производства Merck (Дармштадт, Германия) и Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd. (Махараштра, Индия).

### Выбор целевых последовательностей в геноме вируса гепатита В для разработки направляющих РНК

Выбор целевых высококонсервативных последовательностей генома вируса гепатита В, а также разработка направляющих РНК системы CRISPR/Cas12a описаны ранее [15]. В работе использованы направляющие РНК crRNA ВГВ №648, crRNA ВГВ №1690 и crRNA ВГВ №3098. Целевые последовательности, узнаваемые направляющими РНК, приведены в таблице 2.

### Конструирование модельной ДНК-матрицы, содержащей фрагменты генома ВГВ вируса гепатита В

Конструирование модельных матриц (контрольных образцов) pGEM-T-ВГВ-НВsAg, pGEM-T-ВГВ-1674-1900 и pGEM-T-ВГВ-2890-3176 описано ранее [15]. Модельная матрица pGEM-T-ВГВ-НВsAg содержала в своем составе участок генома ВГВ, к которому специфична направляющая РНК crRNA ВГВ №648; pGEM-T-ВГВ-1674-1900 – участок генома ВГВ, к которому специфична направляющая РНК crRNA ВГВ №1690; pGEM-T-ВГВ-2890-3176 – участок генома ВГВ, к которому специфична направляющая РНК crRNA ВГВ №3098.

### Предварительная амплификация фрагмента генома вируса гепатита В

Для получения амплифицированных фрагментов генома ВГВ проводили RPA, как описано Piepenburg O., et al. [16]. В качестве праймеров использовали олигонуклеотиды, приведенные в таблице 1.

**Таблица 1. Перечень олигонуклеотидов, используемых в работе**  
**Table 1. List of oligonucleotides used in the work**

Наименование Name	Назначение Purpose	Последовательность, 5'-3' Sequence, 5'-3'	Ссылка Reference
crRNA ВГВ\HBV № 648	направляющая РНК guide RNA	AAUUUCUACUAAGUGUAGAUAGCAAAAUACCUAU GGGAGUG	[15]
crRNA ВГВ\HBV № 1690	направляющая РНК guide RNA	AAUUUCUACUAAGUGUAGAUAGUAGGCCUCA GGUCGGU	[15]
crRNA ВГВ\HBV № 3098	направляющая РНК guide RNA	AAUUUCUACUAAGUGUAGAUAGGGUGGAGCCCU CAGGCUCA	[15]
648_for_1	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	AATCCAGGATCAACAACAACCAGTACGGGAC	настоящая работа present study
648_for_2	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	TCAACAACAACCAGTACGGGACCATGCAAAAC	настоящая работа present study
648_for_3	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	ACTCCTGCTCAAGGCAACTCTATGTTCCCTC	настоящая работа present study
648_for_4	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	TCTATGTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACC	настоящая работа present study
648_for_5	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	GAAATGCACCTGTATTCCCATCCCATCGTCC	настоящая работа present study
648_rev_1	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	CCCCAATACCACATCATCCATATAGCTGAAAGCC	настоящая работа present study
648_rev_2	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	CCAATACCACATCATCCATATAGCTGAAAGCC	настоящая работа present study
648_rev_3	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	GAAAGCCCTACGAACCACTGAACAATGGCAC	настоящая работа present study
1690_for_1	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	GTCTTACATAAGAGGACTCTTGACTCCCAGC	настоящая работа present study
1690_for_2	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	TACATAAGAGGACTCTTGACTCCCAGCAATG	настоящая работа present study
1690_for_3	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	ATAAGAGGACTCTTGACTCCCAGCAATGTCAAC	настоящая работа present study
1690_rev_1	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	GTACAAGAGATGATTAGGCAGAGGTGAAAAG	настоящая работа present study
1690_rev_2	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	CGCAGACCAATTTATGCCTACAGCCTCCTAATAC	настоящая работа present study
1690_rev_3	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	GCAGACCAATTTATGCCTACAGCCTCCTAATAC	настоящая работа present study
1690_rev_4	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	CAGACCAATTTATGCCTACAGCCTCCTAATAC	настоящая работа present study
1690_rev_5	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	CAATTTATGCCTACAGCCTCCTAATACAAAGACC	настоящая работа present study
3098_for_1	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	TCGGAGCCAACCAACAATCCAGATTGGGAC	настоящая работа present study
3098_for_2	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	GCCAACTCAACAATCCAGATTGGGACTTCAAC	настоящая работа present study
3098_for_3	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	ATCCAGATTGGGACTTCAACCCCATCAAGGAC	настоящая работа present study
3098_rev_1	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	TCTCTTAGAGGTGGAGAGATGGGAGTAGGCTG	настоящая работа present study
3098_rev_2	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	GTTGACTGTGGTCAATATGCCCTGAGCCTG	настоящая работа present study
3098_rev_3	олигонуклеотид для проведения RPA oligonucleotide for RPA	TTGACTGTGGTCAATATGCCCTGAGCCTGAG	настоящая работа present study
оцДНК репортерная молекула ssDNA reporter molecule	флуоресцентная репортерная молекула fluorescent reporter molecule	FAM-TTATT-BHQ 1	[7]

**Таблица 2. Перечень участков генома вируса гепатита В с теоретически рассчитанной вероятностью их расщепления LbCpf1 из *Lachnospiraceae bacterium***

**Table 2. List of regions of the hepatitis B virus genome with the theoretically calculated probability of their cleavage by LbCpf1 from *Lachnospiraceae bacterium***

Участок Region	Участок генома вируса гепатита В, к которому специфична направляющая РНК The region of the hepatitis B virus genome to which the guide RNA is specific	Последовательность, 5'-3' Sequence, 5'-3'	Оценка специфичности, % Specificity score, %	Ссылка Reference
648	поверхностный антиген гепатита В hepatitis B surface antigen	GCAAAATACCTATGGGAGTG (кодирующая цепь) (coding strand)	91,5	[15]
1690	Х-белок HBx	AAGTAGGCCTCAAGGTCGGT (некодирующая цепь) (non-coding strand)	96	
3098	ДНК-полимераза DNA polymerase	GGGTGGAGCCCTCAGGCTCA (кодирующая цепь) (coding strand)	95,4	

**Создание готовых рибонуклеопротеиновых комплексов для выявления единичных копий ДНК вируса гепатита В и проведение анализа флуоресценции CRISPR/Cas12a**

Рибонуклеопротеиновые комплексы (РНПК), специфические к фрагментам генома ВГВ, были получены путем объединения 300 нг рекомбинантного белка CRISPR/Cas12a LbCpf1 из *Lachnospiraceae bacterium* и 2 пмоль направляющих РНК-олигонуклеотидов (crRNA), перечисленных в таблице 1, в соответствии со стандартным протоколом с небольшими модификациями [17]. LbCpf1 и crRNA перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут для образования комплекса. Полученный таким образом РНПК был готов для выявления ДНК ВГВ:

**Обработка данных**

Использовался двухфакторный дисперсионный анализ с множественными сравнениями для выявления значимых различий между сигналами флуоресценции, полученными при гидролизе репортерных молекул, и средними отношениями «сигнал»/«шум» (S/N), полученными при различных условиях реакции.

Графики были построены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 9.5.1.

**Результаты**

**Оптимизация этапа предварительной амплификации**

Для оптимизации метода выявления единичных копий ДНК ВГВ с помощью систем CRISPR/Cas было принято решение на этапе предварительной амплификации целевых фрагментов генома ВГВ вместо метода ПЦР применить технологию изотермической амплификации – рекомбиназную полимеразную амплификацию (RPA).

В ходе работы были проведены исследования по подбору оптимальных пар олигонуклеотидов для проведения предварительной амплификации мето-

дом RPA. Использованные комбинации приведены в таблице 3, количество модельной матрицы, добавленной в реакцию амплификации, составляло 5850 копий ДНК. Все полученные амплифицированные фрагменты были протестированы в реакции детекции с применением системы CRISPR/Cas (рис. 1–3). Проведенный анализ показал, что наилучший результат получен при использовании для предварительной амплификации методом RPA олигонуклеотидов 1690\_for\_2 и 1690\_rev\_4 и направляющей РНК crRNA ВГВ №1690 (рис. 2).

Для предварительной амплификации модельную матрицу рGEM-T-ВГВ-1674-1900 титровали путем приготовления серийных разведений (табл. 4). Для оценки эффективности предварительной амплификации методами ПЦР и RPA полученные продукты, соответствующие фрагменту генома ВГВ, визуализировали при помощи электрофореза в агарозном геле (рис. 4). Важно отметить, что фрагменты, полученные методом RPA, визуализировались вплоть до 7 разведения (6 копий/реакция), тогда как в ПЦР – до 5 разведения (585 копий/реакция).

Подготовленный описанным способом материал без предварительной очистки был использован для экспериментов по выявлению ДНК ВГВ с помощью рибонуклеопротеиновых комплексов LbCpf1 из *Lachnospiraceae bacterium*, содержащих направляющую РНК crRNA ВГВ №1690.

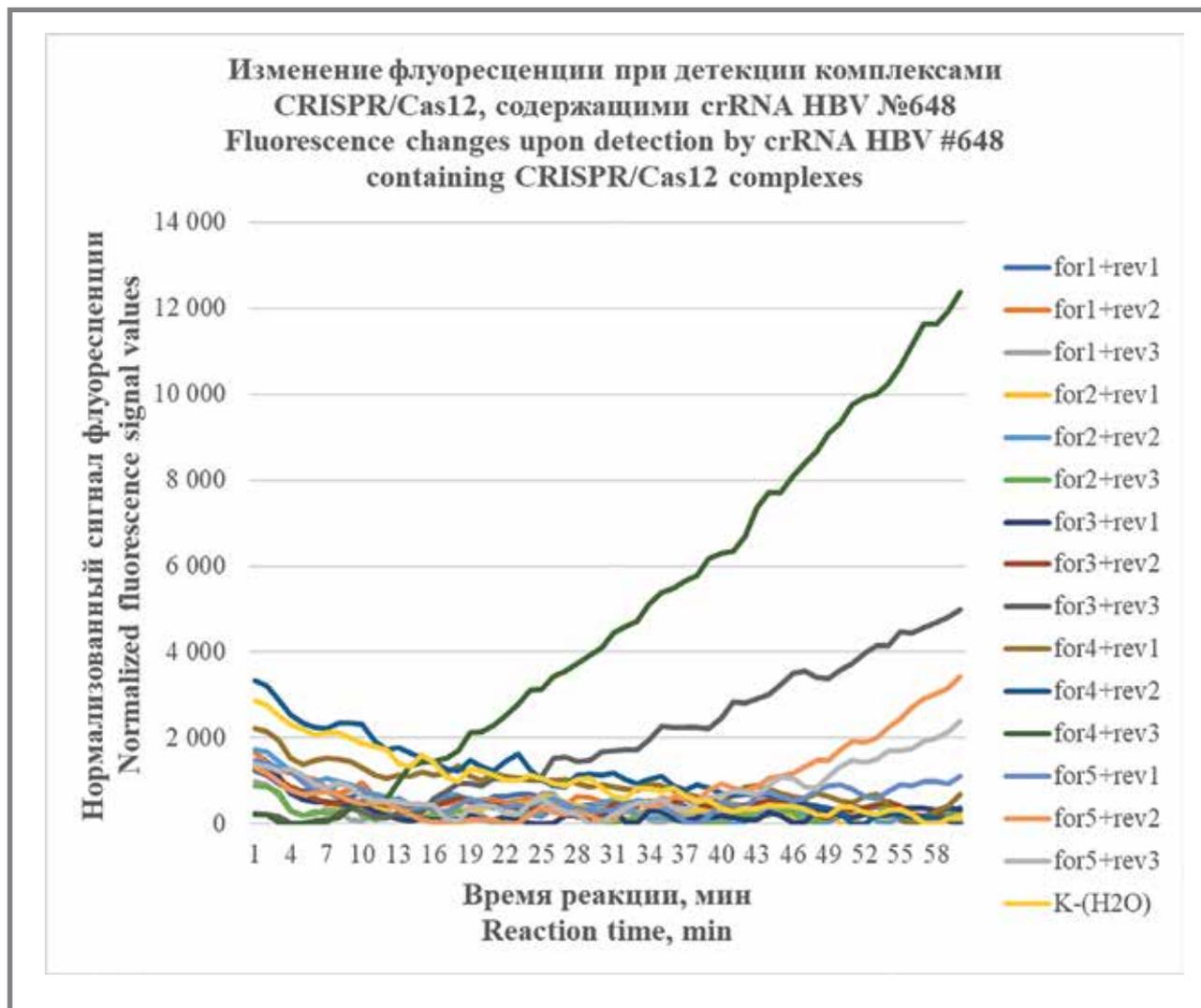
**Оптимизация этапа детекции при работе с образцами с высокой нагрузкой ДНК**

Для оптимизации метода по выявлению ДНК ВГВ на этапе детекции нуклеиновых кислот с помощью системы CRISPR/Cas было принято решение использовать буфер HOLMES 1 с модификациями [14], а не стандартный реакционный [18–20].

При использовании ПЦР и стандартного буфера Cas12 для детекции уровень флуоресценции в образцах, содержащих 5 850 000 копий ДНК в реакции, в среднем достигал 3 342,80 относительных единиц флуоресценции на 5-й минуте анализа,

**Рисунок 1. Профиль флуоресценции в реальном времени для предварительно амплифицированных фрагментов генома ВГВ, обработанных рибонуклеопротеиновым комплексом, содержащим направляющую РНК crRNA ВГВ №648 и белок LbCpf1**

**Figure 1. Real-time fluorescence profile of pre-amplified fragments of HBV genome treated with a ribonucleoprotein complex containing the HBV crRNA № 648 and the LbCpf1 protein**



9 809,96 – на 10-й минуте, 17 172,09 – на 15-й минуте и 42 217,70 – на 30-й минуте анализа. При этом значение «сигнала» (специфической флуоресценции образца, содержащего мишень) превышало значение «шума» (неспецифической флуоресценции контрольного образца, не содержащего мишени) в 24, 70, 124 и 305 раз соответственно.

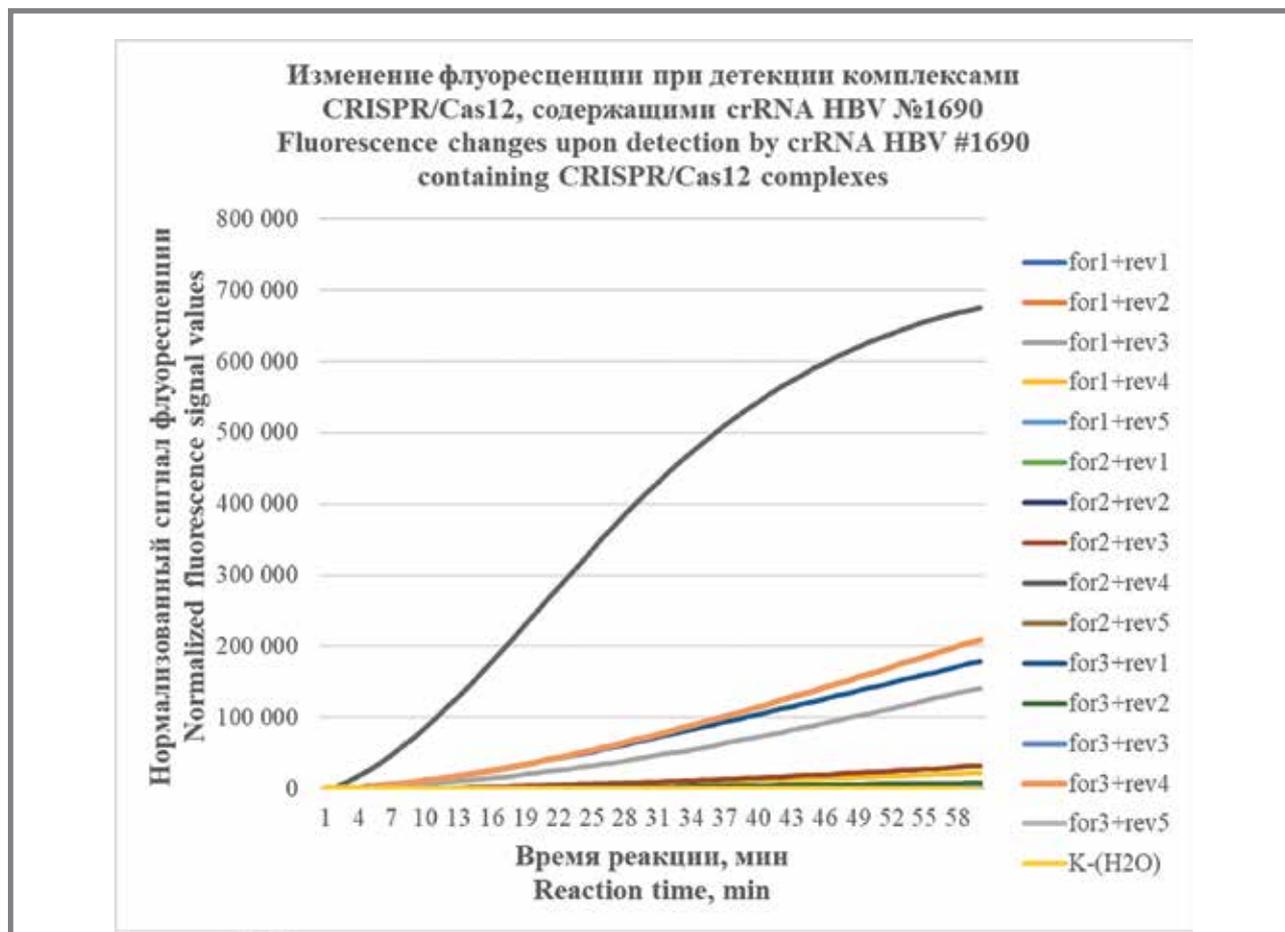
При использовании метода RPA и буфера HOLMES 1 с модификациями для детекции уровень флуоресценции в образцах, содержащих 5 850 000 копий ДНК в реакции, в среднем достигал 102 004,04 относительных единиц флуоресценции на 5-й минуте анализа, 273 096,01 – на 10-й минуте, 408 148,98 – на 15-й минуте и 537 606,36 – на 30-й минуте анализа. При этом значение «сигнала» (специфической флуоресценции образца, содержащего мишень) превышало значение «шума» (неспецифической флуоресценции контрольного образца, не содержащего мишени) в 157,99, 566,16, 730,64 и 884,66 раз соответственно.

Таким образом, применение метода RPA на этапе предварительной амплификации и использование буфера HOLMES 1 с модификациями (оптимизированного метода) на этапе детекции позволяет существенно увеличить уровень флуоресценции в высоконагруженных образцах, содержащих 5 850 000 копий ДНК в реакции (статистически значимое увеличение уровня флуоресценции отмечено, начиная с 10-й минуты реакции, рис. 5).

Также оптимизированный метод выявления ДНК ВГВ с помощью систем CRISPR/Cas характеризуется более высоким значением соотношения «сигнал»/«шум» при работе с образцами с высокой нагрузкой ДНК. Статистически значимое увеличение соотношения «сигнал»/«шум» отмечено, начиная с 10-й минуты реакции (рис. 6), при этом в исходной системе соотношение «сигнал»/«шум» превышает пороговое значение (равное 5) на третьей минуте анализа, а в оптимизированной системе – на второй.

**Рисунок 2. Профиль флуоресценции в реальном времени для предварительно амплифицированных фрагментов генома ВГВ, обработанных рибонуклеопротеиновым комплексом, содержащим направляющую РНК crRNA ВГВ №1690 и белок LbCpf1**

**Figure 2. Real-time fluorescence profile of pre-amplified HBV genome fragments treated with ribonucleoprotein complex containing HBV crRNA #1690 and LbCpf1 protein**



**Оптимизация этапа детекции при работе с образцами со средней нагрузкой ДНК**

Отметим, что в случае применения исходного метода (ПЦР на этапе предварительной амплификации и стандартный Cas12 буфер для проведения детекции) уровень флуоресценции в образцах со средней нагрузкой ДНК, содержащих 5 850 копий ДНК в реакции, в среднем достигал 1 784,60 относительных единиц флуоресценции на 5-й минуте анализа, 5903,18 – на 10-й минуте, 10 065,10 – на 15-й минуте и 24 183,67 – на 30-й минуте анализа. При этом соотношение «сигнал»/«шум» составляло 13, 43, 73 и 175 соответственно.

При использовании оптимизированного метода (RPA на этапе предварительной амплификации и буфер HOLMES 1 с модификациями для проведения детекции), уровень флуоресценции в образцах со средней нагрузкой ДНК в среднем достигал 217 519,59 относительных единиц флуоресценции на 5-й минуте анализа, 519 761,09 – на 10-й минуте, 682 134,47 – на 15-й минуте и 821 860,59 – на 30-й минуте анализа. При этом соотношение «сигнал»/«шум» было равно 337, 1078, 1221 и 1352 соответственно.

Таким образом, применение оптимизированного метода позволяет существенно увеличить

уровень флуоресценции в образцах со средней нагрузкой ДНК, содержащих 5 850 копий ДНК в реакции (статистически значимое увеличение уровня флуоресценции отмечено, начиная с 10-й минуты реакции, рис. 7).

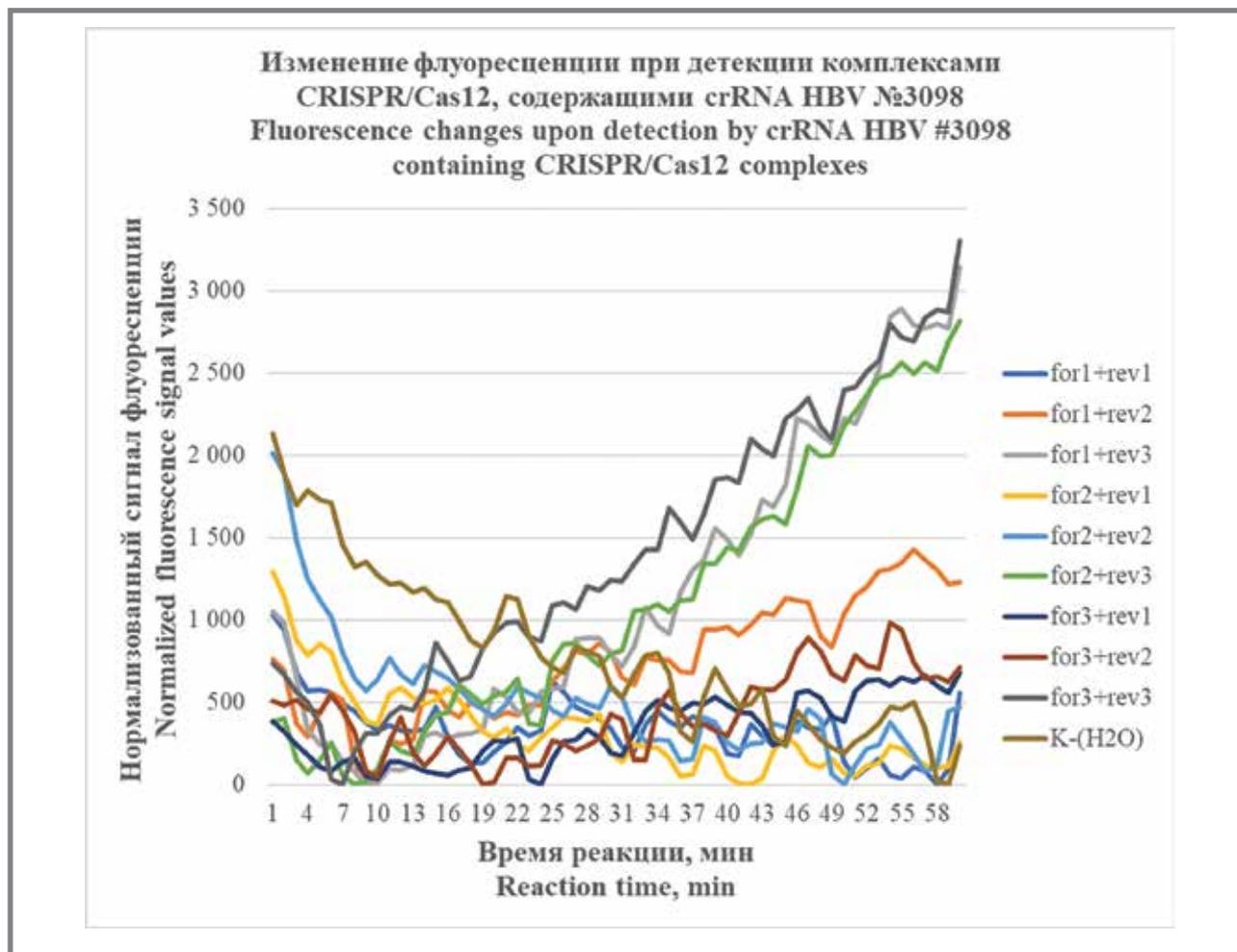
Оптимизированный метод выявления ДНК ВГВ с помощью систем CRISPR/Cas характеризуется более высоким значением соотношения «сигнал»/«шум» при работе с образцами со средней нагрузкой ДНК. Статистически значимое увеличение соотношения «сигнал»/«шум» отмечено, начиная с 10-й минуты реакции (рис. 8), при этом в исходной системе соотношение «сигнал»/«шум» превышает пороговое значение (равное 5) на четвертой минуте анализа, а в оптимизированной системе – на второй.

**Оптимизация этапа детекции при работе с образцами с низкой нагрузкой ДНК**

Наконец, в ходе экспериментов было показано, что уровень флуоресценции в образцах с низкой нагрузкой ДНК, содержащих 6 копий ДНК в реакции, в среднем достигал значений, превышающих значения «шума», только на 15-й минуте анализа (725,88 относительных единиц флуоресценции) и на 30-й ми-

**Рисунок 3. Профиль флуоресценции в реальном времени для предварительно амплифицированных фрагментов генома ВГВ, обработанных рибонуклеопротеиновым комплексом, содержащим направляющую РНК crRNA ВГВ №3098 и белок LbCpf1**

**Figure 3. Real-time fluorescence profile of pre-amplified hepatitis B virus genome fragments treated with ribonucleo-protein complex containing ВГВ crRNA #3098 and LbCpf1 protein**



нута анализа составлял 2512,39 относительных единиц флуоресценции при проведении анализа с помощью исходного метода. При этом соотношение «сигнал»/«шум» составляло 5 и 18 соответственно.

При использовании оптимизированного метода уровень флуоресценции в образцах со средней нагрузкой ДНК в среднем достигал 39 155,68 относительных единиц флуоресценции на 5-й минуте анализа, 117 353,07 – на 10-й минуте, 206 422,39 – на 15-й минуте и 458 692,71 – на 30-й минуте анализа. При этом соотношение «сигнал»/«шум» было равно 61, 243, 370 и 755 соответственно.

Отметим, что применение оптимизированного метода позволяет существенно увеличить уровень флуоресценции в образцах с низкой нагрузкой ДНК, содержащих 6 копий ДНК в реакции (статистически значимое увеличение уровня флуоресценции отмечено, начиная с 10-й минуты реакции, рис. 9).

Так же оптимизированный метод выявления ДНК с помощью систем CRISPR/Cas характеризуется более высоким значением соотношения «сигнал»/«шум» при работе с образцами с низкой

нагрузкой ДНК. Статистически значимое увеличение соотношения «сигнал»/«шум» отмечено, начиная с 10 минуты реакции (рис. 10), при этом в исходной системе соотношение «сигнал»/«шум» превышает пороговое значение (равное 5) на 15 минуте анализа, а в оптимизированной системе – на второй.

В результате проделанной работы было показано, что оптимизация метода выявления ДНК ВГВ с помощью систем CRISPR/Cas позволяет не только повысить уровень флуоресценции, но и увеличить значение соотношения «сигнал»/«шум» при работе с образцами как с высокой, средней и особенно низкой нагрузкой ДНК. Преимуществом оптимизированного метода систем CRISPR/Cas является также сокращение вдвое времени, затрачиваемого на выявление ДНК ВГВ.

### Обсуждение

Первоначальный метод выявления ДНК ВГВ с помощью систем CRISPR/Cas, разработанный в 2021 г., включал этап предварительной амплификации методом ПЦР и затем детекцию с использованием CRISPR/

**Таблица 3. Комбинации, использованные для оптимизации реакции предварительной амплификации комбинации олигонуклеотидов**  
**Table 3. Oligonucleotide combinations used to optimize the pre-amplification step**

Прямой олигонуклеотид Forward oligonucleotide	Обратный олигонуклеотид Reverse oligonucleotide	Размер амплифицированного фрагмента, п.н. Size of amplified fragment, bp
648_for_1	648_rev_1	279
648_for_2	648_rev_1	269
648_for_3	648_rev_1	230
648_for_4	648_rev_1	212
648_for_5	648_rev_1	172
648_for_1	648_rev_2	277
648_for_2	648_rev_2	267
648_for_3	648_rev_2	228
648_for_4	648_rev_2	210
648_for_5	648_rev_2	170
648_for_1	648_rev_3	234
648_for_2	648_rev_3	224
648_for_3	648_rev_3	185
648_for_4	648_rev_3	167
648_for_5	648_rev_3	127
1690_for_1	1690_rev_1	205
1690_for_2	1690_rev_1	201
1690_for_3	1690_rev_1	198
1690_for_1	1690_rev_2	157
1690_for_2	1690_rev_2	153
1690_for_3	1690_rev_2	150
1690_for_1	1690_rev_3	156
1690_for_2	1690_rev_3	152
1690_for_3	1690_rev_3	149
1690_for_1	1690_rev_4	155
1690_for_2	1690_rev_4	151
1690_for_3	1690_rev_4	148
1690_for_1	1690_rev_5	150
1690_for_2	1690_rev_5	146
1690_for_3	1690_rev_5	143
3098_for_1	3098_rev_1	241
3098_for_2	3098_rev_1	236
3098_for_3	3098_rev_1	223
3098_for_1	3098_rev_2	169
3098_for_2	3098_rev_2	164
3098_for_3	3098_rev_2	151
3098_for_1	3098_rev_3	168
3098_for_2	3098_rev_3	163
3098_for_3	3098_rev_3	150

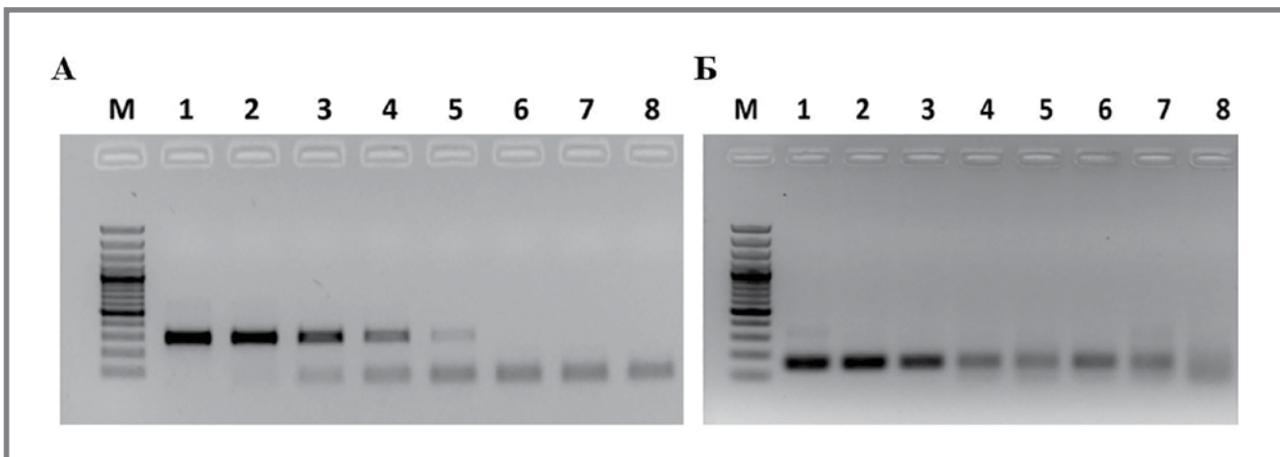
**Таблица 4. Серийные разведения образцов модельной матрицы, содержащей фрагмент генома вируса гепатита В**  
**Table 4. Serial dilutions of the model matrix samples containing a fragment of the hepatitis B virus genome**

Разведение, № п/п Dilution, #	1	2	3	4	5	6	7
Количество копий ДНК на реакцию Number of DNA copies per reaction	5,85×10 <sup>6</sup>	5,85×10 <sup>5</sup>	5,85×10 <sup>4</sup>	5850	585	59	6

**Таблица 5. Сравнительная характеристика исходного и оптимизированного метода выявления единичных копий ДНК вируса гепатита В**  
**Table 5. Comparative characteristics of the original and optimized method for detecting single copies of hepatitis B virus DNA**

Метод Method	Направляющая РНК Guide RNA	Время приготовления комплекса для детекции, мин Preparation time of the detection complex, min	Реакционный буфер Reaction buffer	Способ предварительной амплификации Pre-amplification method	Время предварительной амплификации, мин Pre-amplification time, min	Время детекции (значение сигнала превышает значение «шума» в 5 и более раз), мин Detection time (signal value exceeds noise value by 5 or more times), min			Значение флуоресценции (5, 10, 15 и 30 минут анализа) Fluorescence value (5, 10, 15 and 30 minutes of analysis)		
						5 850 000 копий/реакция copies/reaction	5 850 копий/реакция copies/reaction	6 копий/реакция copies/reaction	5 850 000 копий/реакция copies/reaction	5 850 копий/реакция copies/reaction	6 копий/реакция copies/reaction
Исходный Original	РНК, полученная методом <i>in vitro</i> транскрипции <i>In vitro</i> transcribed RNA	15	10× Cas12 реакционный буфер 10× Cas12 reaction buffer	ПЦР PCR	68	3	4	15	> 3000 > 9000 > 17000 > 42000	> 1700 > 5900 > 10000 > 24000	< 100 < 100 < 1000 > 2500
Новый Optimized	Синтетический олигорибонуклеотид Synthetic oligoribonucleotide	10	10× HOLMES 1 буфер с модификациями 10× HOLMES 1 buffer with modifications [14]	RPA	30	2	2	2	> 100000 > 270000 > 400000 > 530000	> 210000 > 510000 > 680000 > 820000	> 39000 > 117000 > 206000 > 458000

**Рисунок 4. Визуализация амплифицированного фрагмента генома вируса гепатита В после предварительной амплификации методом ПЦР (А) и методом RPA (Б) при помощи электрофореза в агарозном геле**  
**Figure 4. Visualization of the amplified fragment of HBV virus genome after preliminary amplification by PCR (A) and RPA (B) using electrophoresis in agarose gel**



Примечание: цифрами обозначены продукты, полученные в ходе амплификации: 1 – 5 850 000 копий модельной матрицы pGEM-T-ВГВ-1674-1900; 2 – 585 000 копий модельной матрицы pGEM-T-ВГВ-1674-1900; 3 – 58 500 копий модельной матрицы pGEM-T-ВГВ-1674-1900; 4 – 5850 копий модельной матрицы pGEM-T-ВГВ-1674-1900; 5 – 585 копий модельной матрицы pGEM-T-ВГВ-1674-1900; 6 – 59 копий модельной матрицы pGEM-T-ВГВ-1674-1900; 7 – 6 копий модельной матрицы pGEM-T-ВГВ-1674-1900; 8 – отрицательный контроль, не содержащий модельной матрицы pGEM-T-ВГВ-1674-1900; М – стандарты молекулярных масс: снизу вверх 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000 пар нуклеотидов (GeneRuler 100 bp Plus, Thermo Fisher Scientific, США).

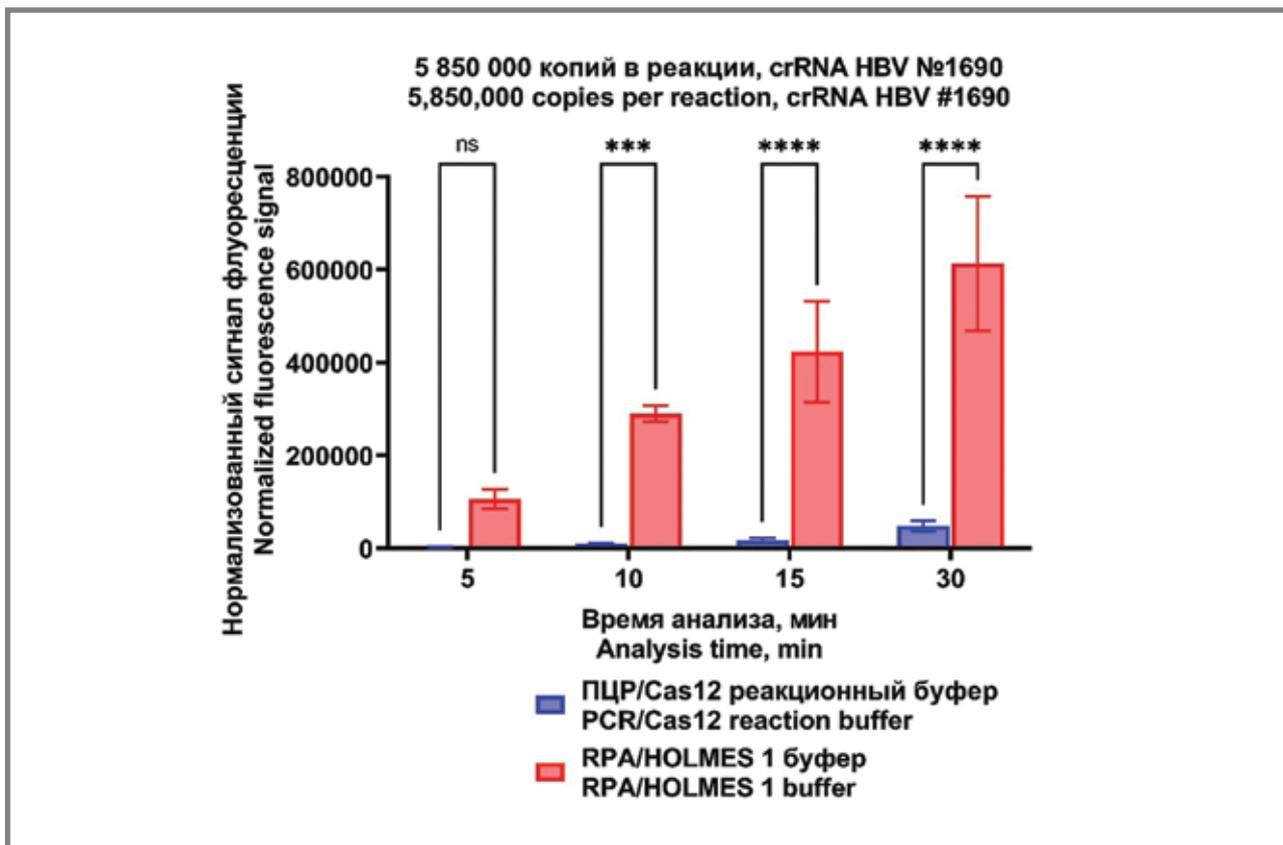
Note: the numbers indicate the products obtained during amplification: 1 – 5,850,000 copies of the model pGEM-T-ВГВ-1674-1900 template; 2 – 585,000 copies of the model pGEM-T-ВГВ-1674-1900 template; 3 – 58,500 copies of the model pGEM-T-ВГВ-1674-1900 template; 4 – 5,850 copies of the model pGEM-T-ВГВ-1674-1900 template; 5 – 585 copies of the model pGEM-T-ВГВ-1674-1900 template; 6 – 59 copies of the model pGEM-T-ВГВ-1674-1900 template; 7 – 6 copies of the model pGEM-T-ВГВ-1674-1900 template in the reaction; 8 – negative control not containing the model pGEM-T-ВГВ-1674-1900 template; M – molecular weight standards: from bottom to top 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000 nucleotide pairs (GeneRuler 100 bp Plus, Thermo Fisher Scientific, USA).

Cas. Направляющую РНК, применяемую для создания рибонуклеопротеинового комплекса CRISPR/Cas, получали методом *in vitro* транскрипции [15].

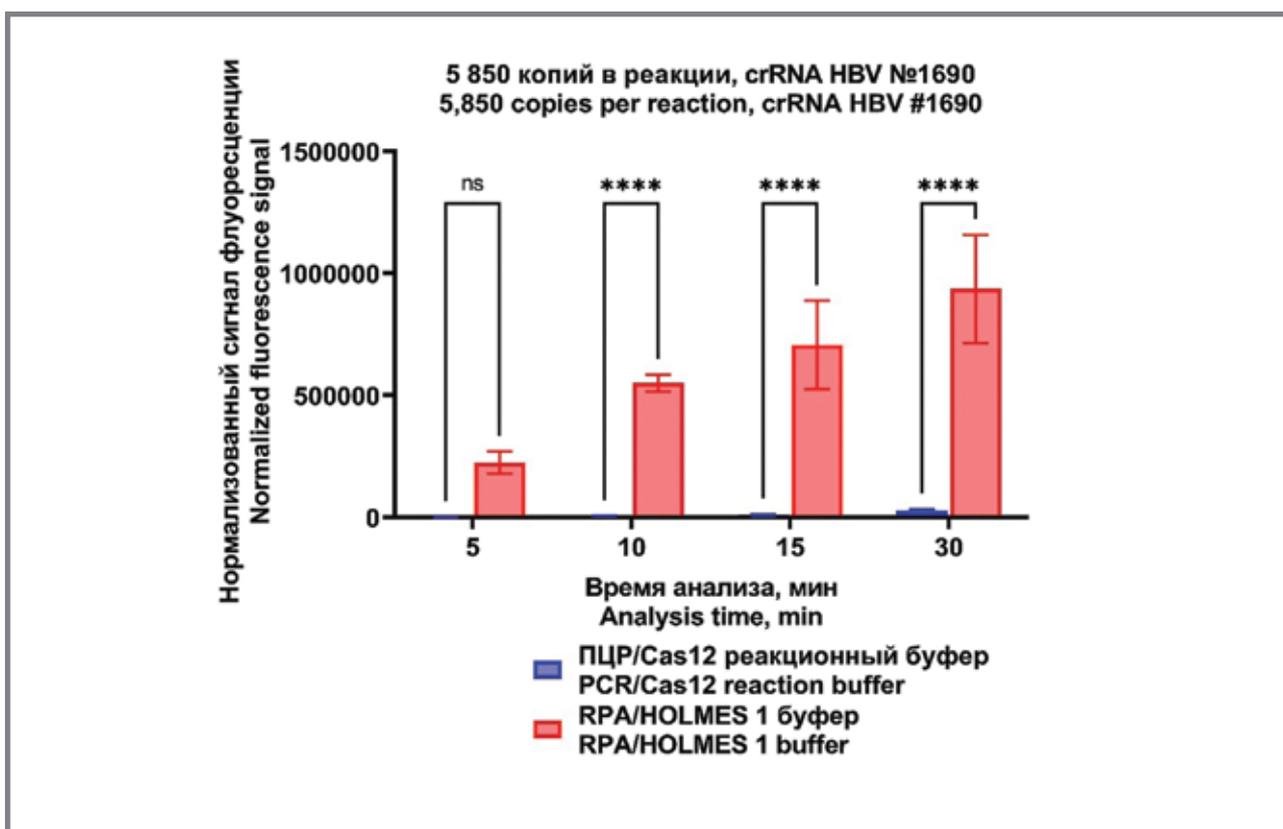
Для оптимизации разработанного ранее метода выявления ДНК ВГВ с помощью систем CRISPR/

Cas было принято решение, во-первых, модифицировать этап предварительной амплификации, заменив метод ПЦР на метод изотермической амплификации (А); во-вторых, модифицировать этап детекции, применив новый реакционный буфер

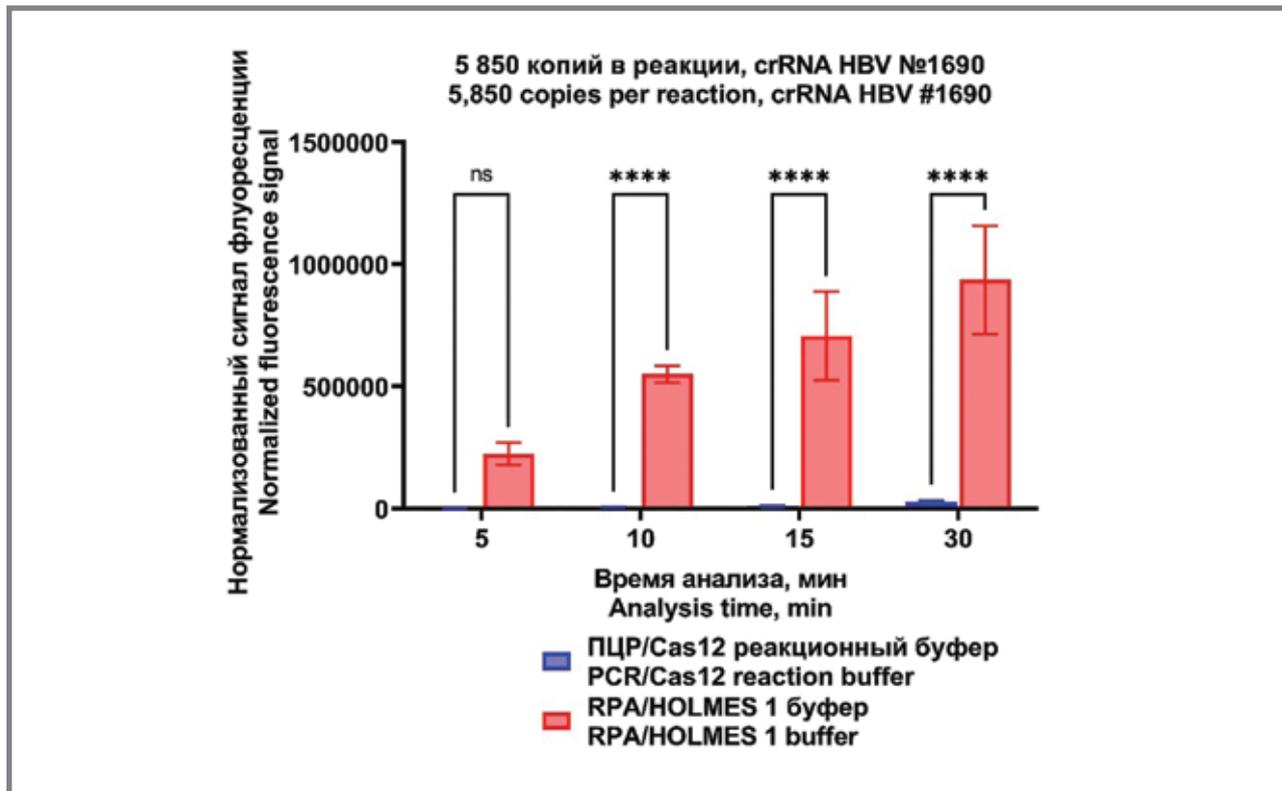
**Рисунок 5. Значения нормализованного сигнала флуоресценции для исходного и оптимизированного методов выявления ДНК вируса гепатита В с помощью систем CRISPR/Cas в образцах с высокой нагрузкой ДНК**  
**Figure 5. Normalized fluorescence signal values for the original and optimized methods for detecting HBV DNA using CRISPR/Cas systems in samples with high DNA loads**



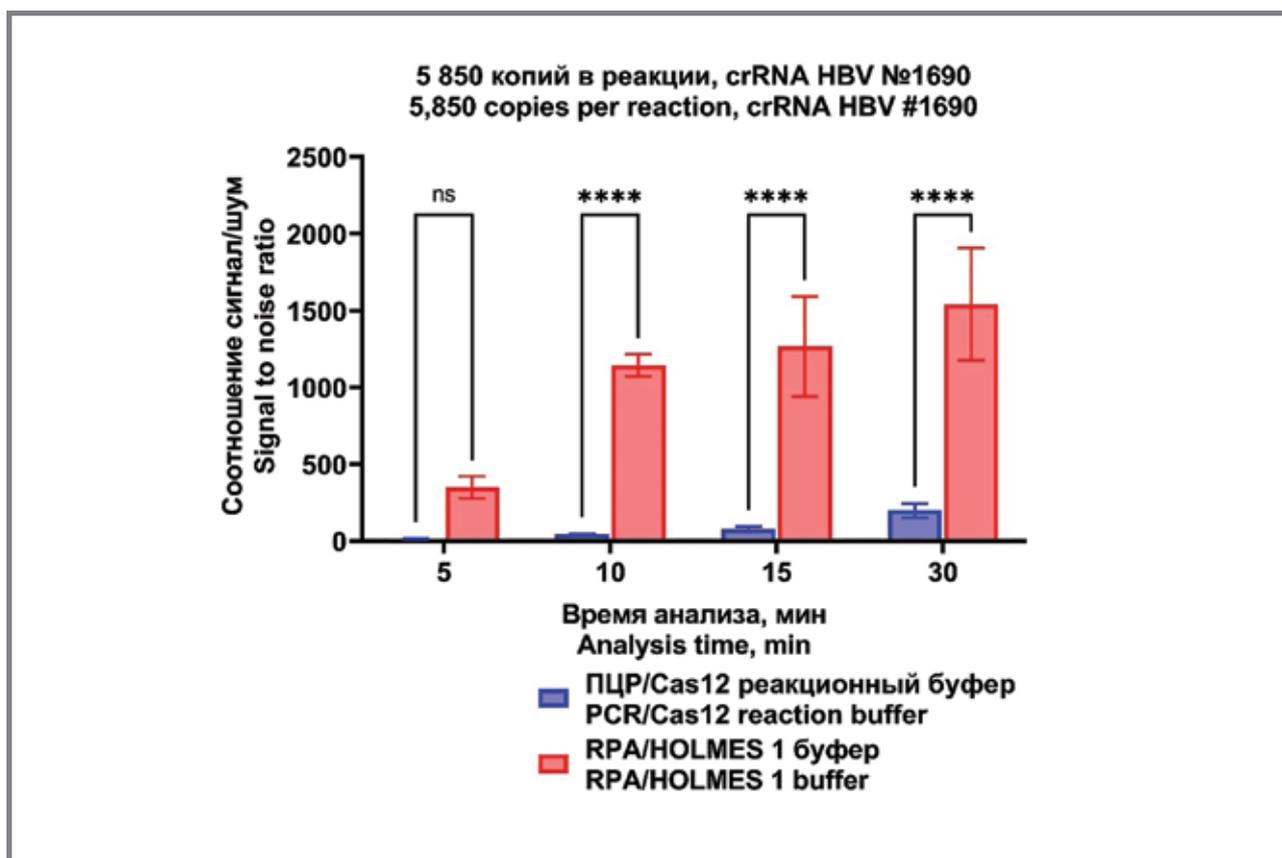
**Рисунок 6. Значения соотношения «сигнал»/«шум» для исходного и оптимизированного методов выявления ДНК вируса гепатита В с помощью систем CRISPR/Cas в образцах с высокой нагрузкой ДНК**  
**Figure 6. Signal-to-noise ratio values for the original and optimized methods for detecting HBV DNA using CRISPR/Cas systems in samples with high DNA loads**



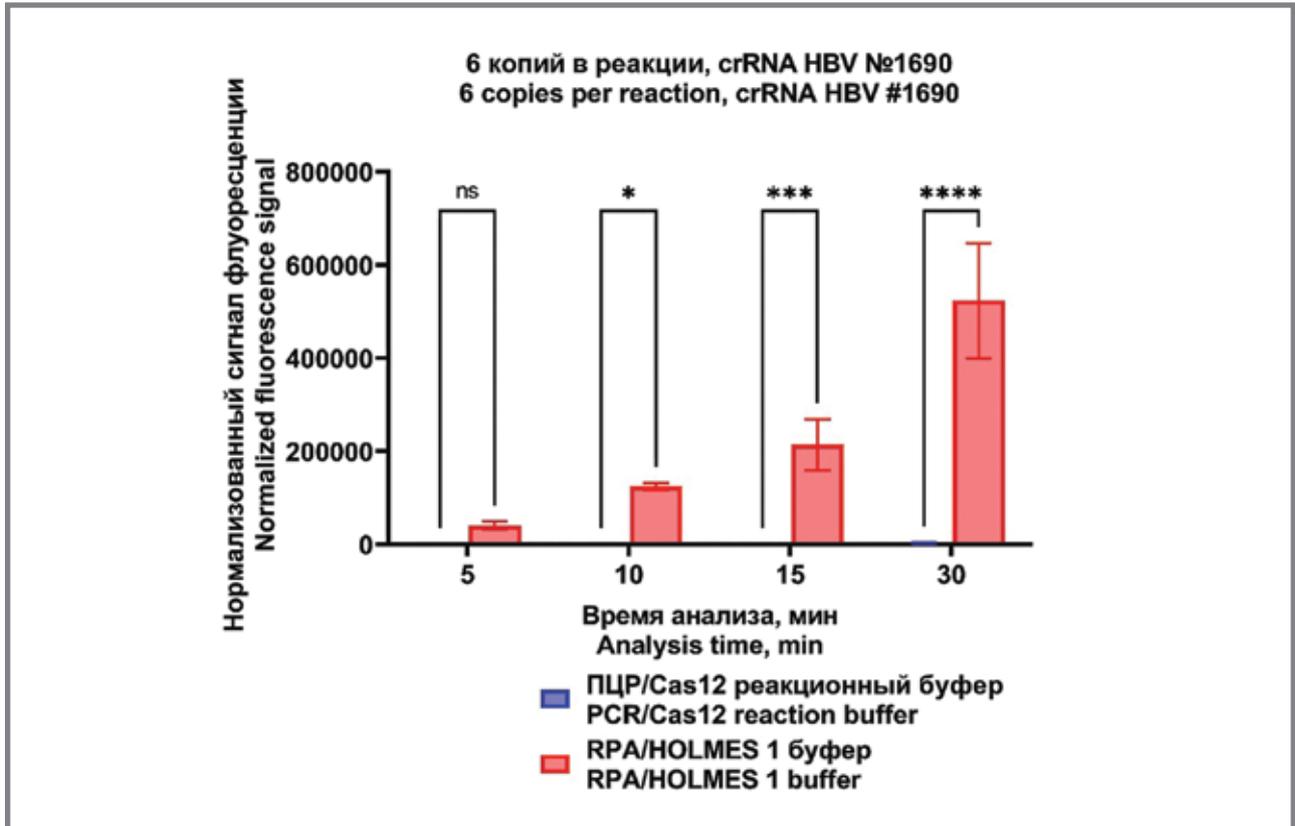
**Рисунок 7. Значения нормализованного сигнала флуоресценции для исходного и оптимизированного методов выявления ДНК вируса гепатита В с помощью систем CRISPR/Cas в образцах со средней нагрузкой ДНК**  
**Figure 7. Normalized fluorescence signal values for the original and optimized methods for detecting HBV DNA using CRISPR/Cas systems in samples with medium DNA load**



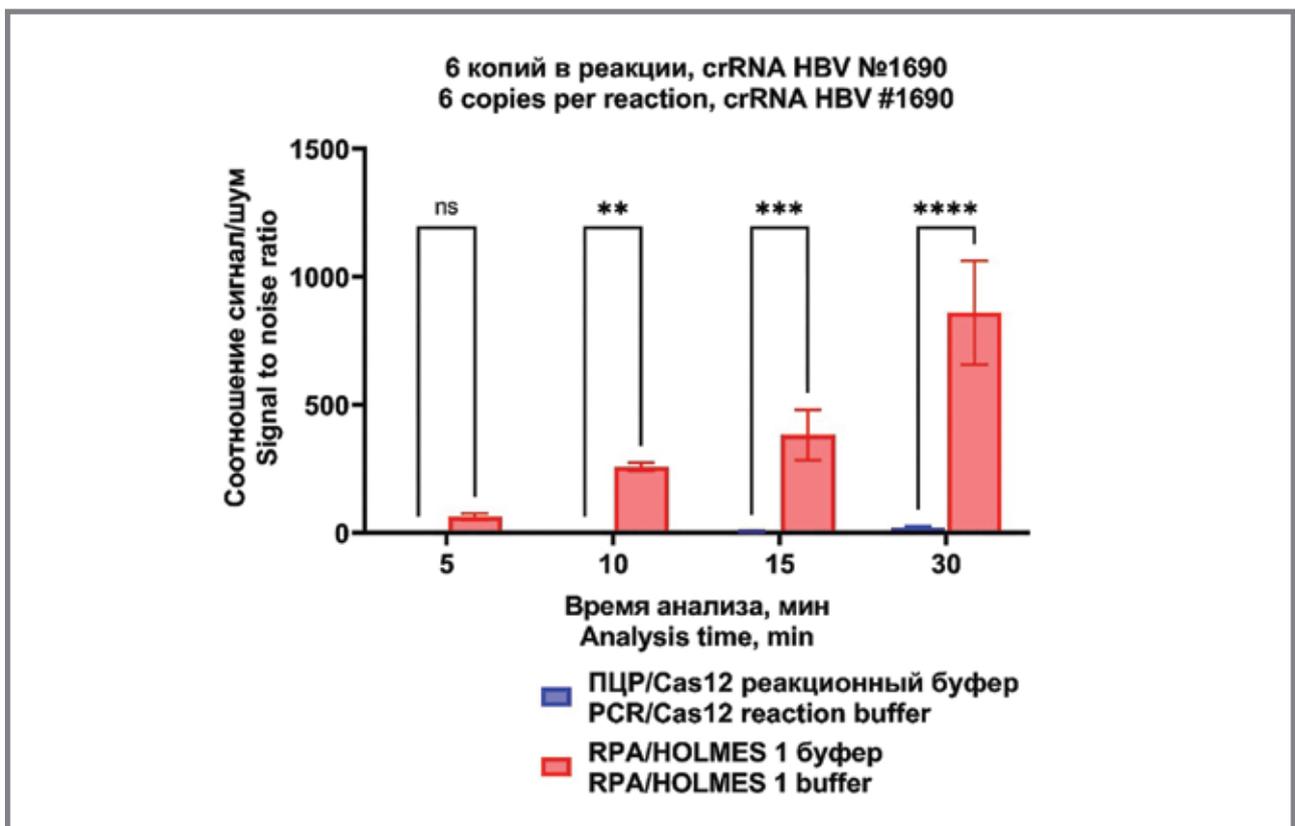
**Рисунок 8. Значения соотношения «сигнал»/«шум» для исходного и оптимизированного методов выявления ДНК вируса гепатита В с помощью систем CRISPR/Cas в образцах со средней нагрузкой ДНК**  
**Figure 8. Signal-to-noise ratio values for the original and optimized methods for detecting HBV DNA using CRISPR/Cas systems in samples with medium DNA load**



**Рисунок 9.** Значения нормализованного сигнала флуоресценции для исходного и оптимизированного методов выявления ДНК вируса гепатита В с помощью систем CRISPR/Cas в образцах с низкой нагрузкой ДНК  
**Figure 9.** Normalized fluorescence signal values for the original and optimized methods for detecting HBV DNA using CRISPR/Cas systems in samples with low DNA load



**Рисунок 10.** Значения соотношения «сигнал»/«шум» для исходного и оптимизированного методов выявления ДНК вируса гепатита В с помощью систем CRISPR/Cas в образцах с низкой нагрузкой ДНК  
**Figure 10.** Signal-to-noise ratio values for the original and optimized methods for detecting HBV DNA using CRISPR/Cas systems in samples with low DNA load



(HOLMES 1). Кроме того, в качестве направляющей РНК было принято решение использовать синтетические олигорибонуклеотиды. Применение синтетических направляющих РНК упрощает и существенно (в 1,5 раза) сокращает время получения готового рибонуклеопротеинового комплекса CRISPR/Cas, предназначенного для диагностических целей (табл. 5). При этом системы детекции на основе амплификации, совмещенной с CRISPR/Cas, в состав которых входят синтетические направляющие РНК, обладают чувствительностью схожей или даже большей, чем с системы, содержащие направляющие РНК, полученные классическим методом *in vitro* транскрипции (неопубликованные данные).

Применение на этапе предварительной амплификации метода RPA вместо ПЦР, позволило нам также сократить время указанного этапа более чем в 2 раза (см. табл. 5). RPA, или рекомбиназная полимеразная амплификация, относится к методам изотермической амплификации. Одним из преимуществ RPA является то, что реакция достигает экспоненциальной амплификации без необходимости предварительной обработки образца ДНК (стадия денатурации). RPA – это чувствительный и специфичный метод, амплификация проходит быстро при постоянной относительно низкой температуре (37 °C) [16]. RPA не требует наличия специализированного оборудования, благодаря чему метод может быть использован при разработке высокочувствительных и высокотехнологичных прототипов диагностических систем нового поколения на основе генетических технологий, таких как CRISPR/Cas, для совершенствования методов диагностики инфекционных заболеваний, пригодных для применения у постели больного и/или в полевых условиях.

Использование на этапе детекции буфера HOLMES 1 позволило не только сократить время анализа, но увеличить чувствительность метода (табл. 5). В результате применения модифицированного буфера увеличились значения флуоресценции и соотношения «сигнал»/«шум» при работе с образцами как с высокой, средней и особенно низкой нагрузкой ДНК.

Известно, что буфер HOLMES 1 отличается от стандартного Cas12 буфера добавлением спермидина, ПЭГ, ДТТ, Triton® X-100 и глицина [14]. Спермидин – это полиамин, который связывается с нуклеиновыми кислотами [21] и способен нейтрализовать электрический заряд ДНК. Полиамины часто играют важную роль в ферментных системах, где должны взаимодействовать удаленные сегменты ДНК [22]. Например, было показано, что спермидин улучшает точность интеграты *Escherichia coli* CRISPR Cas1–Cas2 [23].

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) является наиболее широко используемым концентрирующим агентом. Концентрирующие агенты могут защищать макромолекулы от термической денатурации, ускорять сворачивание белка и облегчать ренатурацию нуклеиновых кислот, тем самым увеличивая скорость ферментативных реакций и даже изменяя продукты реакции [24–29].

Дитиотреитол (ДТТ) – это сероорганическое соединение, которое действует как окислительно-восстановительный реагент. ДТТ обычно используется во многих буферах ферментов молекулярной биологии (включая буферы хранения белков CRISPR/Cas [30]) и для поддержания белков в активном состоянии.

Triton X-100 – это неионогенное поверхностно-активное вещество, которое, как известно, улучшает чувствительность системы Cas12, но механизм усиления активности Cas12 до сих пор неизвестен [14,31].

Глицин – это аминокислота, которая действует как осмолит и играет ключевую роль в стабилизации белка против денатурации [32].

Наличие всех вышеупомянутых компонентов значительно повышает эффективность флуоресцентного анализа на основе CRISPR/Cas и сокращает время анализа. Этот факт согласуется с результатами, опубликованными ранее [14].

При работе по оптимизации метода выявления ДНК ВГВ нам удалось сохранить чувствительность оптимизированного метода на уровне исходного (выявление единичных копий ДНК ВГВ). Чувствительность оптимизированного метода выявления ДНК ВГВ с помощью систем CRISPR/Cas превышает в 1,5–23 раза чувствительность описанных ранее методов, основанных на применении CRISPR/Cas, [11–13]. Кроме того, при проведении оптимизации нам удалось сократить время, необходимое для проведения анализа. Так, время, необходимое для выявления единичных копий (6 копий в реакции) ДНК ВГВ с помощью исходного метода составляет 83 минуты, тогда как для оптимизированного – 32 минуты.

### Заключение

В этом исследовании был оптимизирован метод выявления единичных копий ДНК ВГВ с помощью систем CRISPR/Cas.

В оптимизированном методе этап предварительной амплификации проводится с помощью метода рекомбиназной полимеразной амплификации, что позволяет сократить время, затрачиваемое на проведение этого этапа, вдвое. За этапом предварительной амплификации следует этап обнаружения нуклеиновых кислот или детекции. Обнаружение основано на активности транс-расщепления CRISPR/Cas12a – свойстве неспецифически гидролизовать одноцепочечные ДНК (в т. ч. флуоресцентные репортерные молекулы). Для достижения поставленной цели мы оптимизировали реакционный буфер, в котором проводится детекция. Оптимизированный метод позволяет легко обнаруживать единичные копии ДНК ВГВ (6 копии) в реакции в течение 32 минут, из которых этап предварительной амплификации занимает 30 минут, а этап обнаружения – всего 2 минуты. Оптимизированный метод был успешно использован для выявления единичных копий ДНК ВГВ в экспериментах на модельной матрице.

Описанный в статье оптимизированный метод выявления единичных копий ДНК ВГВ с помощью систем CRISPR/Cas в перспективе мо-

жет быть использован для разработки новых диагностических наборов, в том числе наборов, применимых у постели больного и/или в полевых условиях, которые не только будут обладать высокой чувствительностью и специфичностью, но и не потребуют использования специализированного высокотехнологического оборудования и привлечения квалифицированного персонала. После дальнейшей усовершенствований (например, сокращения времени предварительной амплификации и т. д.) разработанный метод может быть внедрен в практику служб надзора и мони-

торинга как современный метод молекулярной эпидемиологии.

### Финансирование

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках гранта в форме субсидии на создание и развитие «Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий», соглашение № 075-15-2019-1666.

### Литература/References

1. Yuen MF, Chen DS, Dusheiko GM, et al. Hepatitis B virus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):18035. doi:10.1038/nrdp.2018.35
2. Genatum B. Доступно на: Available at <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>. Ссылка активна на 20 ноября 2024. /Gepatit B. Who.int. Accessed November 20, 2024. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
3. Fanning GC, Zoulim F, Hou J, Bertoletti A. Therapeutic strategies for hepatitis B virus infection: towards a cure. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(11):827–844. doi:10.1038/s41573-019-0037-0
4. Huang DQ, Tran A, Yeh ML, et al. Antiviral therapy substantially reduces HCC risk in patients with chronic hepatitis B infection in the indeterminate phase. *Hepatology*. 2023;78(5):1558–1568. doi:10.1097/HEP.0000000000000459
5. Guidelines on Hepatitis B and C testing. Who.int. Accessed November 20, 2024. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254621/9789241549981-eng.pdf;sequence=1>
6. Gu S, Tao Y, Fan C, et al. Impact of hepatitis B virus point-of-care DNA viral load testing compared with laboratory-based standard-of-care approaches on uptake of HBV viral load testing, treatment, and turnaround times: A systematic review and meta-analysis. *Open Forum Infect Dis*. 2024;11(9):ofae483. doi:10.1093/ofid/ofae483
7. Chen JS, Ma E, Harrington LB, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*. 2018;360(6387):436–439. doi:10.1126/science.aar6245
8. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017;356(6336):438–442. doi:10.1126/science.aam9321
9. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*. 2018;360(6387):439–444. doi:10.1126/science.aag0179
10. Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*. 2018;360(6387):444–448. doi:10.1126/science.aas8836
11. Zhou R, Li Y, Dong T, Tang Y, Li F. A sequence-specific plasmonic loop-mediated isothermal amplification assay with orthogonal color readouts enabled by CRISPR Cas12a. *Chem Commun (Camb)*. 2020;56(24):3536–3538. doi:10.1039/d0cc00397b
12. Ding R, Long J, Yuan M, et al. CRISPR/Cas12-based ultra-sensitive and specific point-of-care detection of HBV. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4842. doi:10.3390/ijms22094842
13. Chen X, Tan Y, Wang S, et al. A CRISPR-Cas12b-based platform for ultrasensitive, rapid, and highly specific detection of hepatitis B virus genotypes B and C in clinical application. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:743322. doi:10.3389/fbioe.2021.743322
14. Lv H, Wang J, Zhang J, et al. Definition of CRISPR Cas12a T rans-cleavage units to facilitate CRISPR diagnostics. *Front Microbiol*. 2021;12:766464. doi:10.3389/fmicb.2021.766464
15. Тюменцева А.И., Тюменцева М.А., Преловская А.Н., Акимкин В.Г. Система CRISPR-Cas12 для выявления ДНК вируса гепатита В в ультраанализных концентрациях. Патент РФ на изобретение №2782700.01.11.2022. Бюл. № 31. Доступно на: [https://new.fips.ru/ofstorage/BULLETIN/IZPM/2022/11/10/INDEX\\_RU.HTM](https://new.fips.ru/ofstorage/BULLETIN/IZPM/2022/11/10/INDEX_RU.HTM). Ссылка активна на 20 ноября 2024. /Тюменцева АИ, Тюменцева МА, Преловская АН, Акимкин ВГ. Система CRISPR-Cas12 dlya vy'yavleniya DNK virusa gepatita B v ul'tranaliznykh koncentraciyax. Patent RUS №2782700.01.11.2022. Byul. № 31. Available at: [https://new.fips.ru/ofstorage/BULLETIN/IZPM/2022/11/10/INDEX\\_RU.HTM](https://new.fips.ru/ofstorage/BULLETIN/IZPM/2022/11/10/INDEX_RU.HTM). Accessed: 20 Nov 2024 (In Russ).
16. Piepburg OJ, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol*. 2006;4(7):e204. doi:10.1371/journal.pbio.0040204
17. Anders C, Jinek M. In vitro enzymology of Cas9. *Methods Enzymol*. 2014;546:1–20. doi:10.1016/B978-0-12-801185-0.00001-5
18. Акимкин В.Г., Тюменцев А.И., Тюменцева М.А. Система CRISPR-Cas для детекции провирусной ДНК ВИЧ. Международный патент WO2021118409A1. 17.06.2021. Доступно на: <https://patents.google.com/patent/WO2021118409A1/en?q=WO2021118409A1>. Ссылка активна на 20 ноября 2024. /Akimkin VG, Tyumentsev AI, Tyumentseva MA. Crispr/cas system for detecting proviral hiv dna. World Patent WO2021118409A1. 2021 Jun 17. Available at: <https://patents.google.com/patent/WO2021118409A1/en?q=WO2021118409A1>. Accessed: 20 Nov 2024 (In Russ).
19. Акимкин В.Г., Тюменцев А.И., Тюменцева М.А. Система CRISPR-Cas для выявления гена антибиотикоустойчивости. Международный патент WO2021211012A1. 21.10.2021. Доступно на: <https://patents.google.com/patent/WO2021211012A1/en?q=WO2021211012A1>. Ссылка активна на 20 ноября 2024. /Akimkin VG, Tyumentsev AI, Tyumentseva MA. Crispr/cas system for detecting an antibiotic resistance gene. World Patent WO2021211012A1. 2021 Oct 21. Available at: <https://patents.google.com/patent/WO2021211012A1/en?q=WO2021211012A1>. Accessed: 20 Nov 2024. (In Russ).
20. Тюменцева А.И., Тюменцев М.А., Преловская А.Н., Акимкин В.Г. Система CRISPR-CAS14 для выявления РНК вируса Sars-cov-2 в ультраанализных концентрациях. Международный патент WO2023055255A1. 06.04.2023. Доступно на: <https://patents.google.com/patent/WO2023055255A1/en?q=WO2023055255A1>. Ссылка активна на 20 ноября 2024. /Tyumentsev AI, Tyumentseva MA, Prelovskaya AN, Akimkin VG. Crispr-cas14 system for detecting sars-cov-2 virus rna at ultra-low concentrations. World Patent WO2023055255A1. 2023 Apr 6. Available at: <https://patents.google.com/patent/WO2023055255A1/en?q=WO2023055255A1>. Accessed: 20 Nov 2024. (In Russ).
21. Cohen SS. A Guide to Polyamines. Oxford University Press; 1997.
22. Krasnov MA, Cozzarelli NR. Catenation of DNA rings by topoisomerases. Mechanism of control by spermidine. *J Biol Chem*. 1982;257(5):2687–2693. doi:10.1016/s0021-9258(18)34978-0
23. Plateau P, Moch C, Blanquet S. Spermidine strongly increases the fidelity of Escherichia coli CRISPR Cas1-Cas2 integrase. *J Biol Chem*. 2019;294(29):11311–11322. doi:10.1074/jbc.RA119.007619
24. Akabayov B, Akabayov SR, Lee SJ, Wagner G, Richardson CC. Impact of macromolecular crowding on DNA replication. *Nat Commun*. 2013;4(1):1615. doi:10.1038/ncomms2620
25. Minton AP. The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *J Biol Chem*. 2001;276(14):10577–10580. doi:10.1074/jbc.R100005200
26. Zimmerman SB, Minton AP. Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1993;22(1):27–65. doi:10.1146/annurev.bb.22.060193.000331
27. Wang Q, Liang KC, Czauder A, Waxham MN, Cheung MS. The effect of macromolecular crowding, ionic strength and calcium binding on calmodulin dynamics. *PLoS Comput Biol*. 2011;7(7):e1002114. doi:10.1371/journal.pcbi.1002114
28. van den Berg B, Wain R, Dobson CM, Ellis RJ. Macromolecular crowding perturbs protein refolding kinetics: implications for folding inside the cell. *EMBO J*. 2000;19(15):3870–3875. doi:10.1093/emboj/19.15.3870
29. Sikorav JL, Church GM. Complementary recognition in condensed DNA: accelerated RNA renaturation. *J Mol Biol*. 1991;222(4):1085–1108. doi:10.1016/0022-2836(91)90595-w
30. Akimkin VG, Tyumentsev AI, Tyumentseva MA, Shagin DA. Method for producing a preparation of highly-purified recombinant cas nuclease. World Patent WO2020197436A1. 2020 Oct 1. Available at: <https://patents.google.com/patent/WO2020197436A1/en?q=WO2020197436A1>. Accessed: 20 Nov 2024. (In Russ).
31. Qiu M, Zhou XM, Liu L. Improved strategies for CRISPR-Cas12-based nucleic acids detection. *J Anal Test*. 2022;6(1):44–52. doi:10.1007/s41664-022-00212-4
32. Salehian M, Emamzadeh R, Nazari M, Olayi M. Glycine as a stabilizing osmolyte for Renilla luciferase: A kinetic and molecular dynamics analysis. *Biocatal Bioprocessing*. Published online 2024:1-10. doi:10.1080/10242422.2024.2404451

### Об авторах

- **Марина Алексеевна Тюменцева** – к. б. н., заведующая лабораторией геномного редактирования ОМДиЭ, ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора. +7 (495) 974-96-46 (доб. 2627), tyumentseva@cmd.su. <https://orcid.org/0000-0002-3145-3702>.
- **Александр Игоревич Тюменцев** – к. б. н., заведующий лабораторией экспериментальной фармакологии ОМДиЭ, ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора., Москва. +7 (495) 974-96-46 (доб. 2627), tymentcev@cmd.su. <https://orcid.org/0000-0003-0537-2586>.
- **Анна Николаевна Преловская** – научный сотрудник лаборатории геномного редактирования ОМДиЭ, ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора.. +7 (495) 974-96-46 (доб. 2627), prelovskaya@cmd.su. <https://orcid.org/0000-0002-2471-3844>.
- **Василий Геннадьевич Акимкин** – академик РАН, д. м. н., профессор, директор ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора. +7 (495) 974-96-46, akimkin@pcr.ms. <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>.

Поступила: 22.10.2024. Принята к печати: 21.11.2024.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

### About the Authors

- **Marina A. Tyumentseva** – Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Genome Editing of the OMD&E, Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадzor. +7 (495) 974-96-46 (ext. 2627), tyumentseva@cmd.su. <https://orcid.org/0000-0002-3145-3702>.
- **Aleksandr I. Tyumentsev** – Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Experimental Pharmacology of the OMD&E Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадzor. +7 (495) 974-96-46 (ext. 2627), tymentcev@cmd.su. <https://orcid.org/0000-0003-0537-2586>.
- **Anna N. Prelovskaya** – researcher at the Laboratory of Genome Editing of the OMD&E of the Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадzor. +7 (495) 974-96-46 (ext. 2627), prelovskaya@cmd.su. <https://orcid.org/0000-0002-2471-3844>.
- **Vasily G. Akimkin** – Academician of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Med.), Professor, Director of the Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадzor. +7 (495) 974-96-46, akimkin@pcr.ms. <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>.

Received: 22.10.2024. Accepted: 21.11.2024.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.