



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



ПРИМЕНЕНИЕ CRISPR-ЛОКУСОВ НЕ ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ

Кулуев Б.Р., Баймиев Ан.Х., Чемерис Д.А., Матниязов Р.Т.,
Герашенков Г.А., Никоноров Ю.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, chemeris@anrb.ru

Резюме

В статье рассмотрены различные применения CRISPR-локусов и их компонентов: а) для генотипирования штаммов некоторых бактерий (CRISPR-кассеты); б) для исследования фундаментальных вопросов функционирования отдельных генов, генных сетей и РНК-транскриптов (CRISPR/dCas системы); в) для высокочувствительной CRISPR-Dx детекции специфичных последовательностей нуклеиновых кислот (нуклеаза Cas13a).

Ключевые слова: CRISPR/Cas система, CRISPR-локусы, CRISPR-кассеты, сполиготипирование, рекомбиназная полимеразная амплификация, РПА, CRISPR-Dx, CRISPR/dCas9, Cas13a, CRISPRi, CRISPRa, CRISPRi/a

Содержание

	Стр.
Введение	271
Генотипирование микроорганизмов с помощью CRISPR-кассет	271
Исследование функционирования генов с помощью CRISPR/dCas систем	273
Изотермическая амплификация и CRISPR-Dx детекция специфичных последовательностей нуклеиновых кислот	275
Заключение	277
Литература	278

Введение

CRISPR/Cas-системы находят применение не только для редактирования геномов различных организмов. Исторически первым оказалось использование CRISPR-кассет для генотипирования штаммов бактерий, которое началось задолго до того, как стала ясна роль CRISPR-локусов в жизнедеятельности микроорганизмов. Причем оно продолжается и поныне преимущественно для ряда патогенных микроорганизмов. CRISPR/Cas системы в виде комплекса из гидовых РНК (гидРНК) с каталитически неактивными dCas белками используются для получения фундаментальных знаний о функционировании генов и геномов организмов различных уровней генетической сложности. Недавно одну из Cas нуклеаз (Cas13a или C2c2) предложено использовать для CRISPR-Dx детекции в режиме реального времени результатов предварительной амплификации с помощью рекомбиназной полимеразной амплификации, что сулит определенные преимущества, в том числе благодаря изотермичности этого процесса.

Генотипирование микроорганизмов с помощью CRISPR-кассет

Методов выявления полиморфизма ДНК, применяемых для генотипирования микроорганизмов, существует немало. Большинство из них предложены достаточно давно, некоторые прошли ряд усовершенствований и до сих пор активно используются, а часть осталась в прошлом. Многие из применяемых и сейчас методов генотипирования штаммов микроорганизмов описаны, например, в обзоре Li и соавторов [Li et al., 2009], озаглавленном «Bacterial strain typing in the genomic era», подготовленном после появления методов полногеномного секвенирования новых поколений, которое также является основой для генотипирования штаммов. Здесь мы не ставим целью рассматривать все существующие методы и подходы и тем более их сравнивать на предмет большей пригодности в тех или иных случаях для ДНК-паспортизации / ДНК-идентификации отдельных штаммов, поскольку фактически коснемся

лишь одного метода, основанного на различиях спейсерных участков в составе CRISPR-кассет¹.

В заглавной статье данного номера журнала [Кулуев и др., 2017] нами затронуты вопросы истории изучения CRISPR-локусов, где было отмечено, что сначала некие особые последовательности нуклеотидов были найдены у кишечной палочки *E.coli* [Ishino et al., 1987], затем подобные участки были выявлены также у грамм-положительных бактерий [Hermans et al., 1991] и еще через некоторое время - у архей [Mojica et al., 1993]. Получилось так, что именно обнаружение в геноме археи *Haloferax mediterranei* почти совершенных повторов длиной 30 п.н., разделенных спейсерами сходного размера, послужило развитию дальнейших исследований в этой области и привело в итоге через два десятилетия к нынешней CRISPR/Cas технологии геномного редактирования. При этом в начале 90-х прошлого столетия после обнаружения необычных повторов у туберкулезной палочки *Mycobacterium tuberculosis* [Hermans et al., 1991] параллельно стало развиваться и это направление исследований, приведшее к разработке способа ДНК-идентификации штаммов некоторых видов бактерий, в первую очередь патогенных в виде DVR-PCR (Direct Variable Repeat) амплификации [Groenen et al., 1993]. Спустя несколько лет на основе полиморфизма тех же повторов был предложен иной метод, получивший название spoligotyping (spacer oligonucleotide typing) [Agnaz et al., 1996], в основе которого лежит амплификация CRISPR-кассет с помощью фланкирующих квазитандемные повторы праймеров, (один из которых мечен биотином), сопровождаемая молекулярной гибридизацией с выбранными 43 спейсерами, сорбированными на нейлоновых фильтрах, с последующим ферментативным проявлением результатов гибридизации и их оцифровкой [Molhuizen et al., 1998; Botelho et al., 2015; Mokrousov, Rastogi, 2015].

Сполиготипирование штаммов (преимущественно патогенных микроорганизмов) используется на протяжении многих лет и востребовано в настоящее время [Goguet de la Salmonière et al., 1997; Goyal et al., 1997; Kamerbeek et al., 1997; Sola et al., 1998; Driscoll, 2009; Mokrousov, Rastogi, 2015; Sola, 2015; Suzana et al., 2017], считаясь даже «золотым стандартом» генотипирования для туберкулезных палочек *M.tuberculosis* [Shariat, Dudley, 2014]. Были проведены исследования на предмет глобального распространения конкретных штаммов

туберкулезной палочки на разных континентах различными исследовательскими группами из многих стран, включая Россию [Filliol et al., 2002; 2003]. Выработаны соответствующие рекомендации, созданы специализированные базы данных по сполиготипированию штаммов *M.tuberculosis*, разработаны разнообразные программные продукты [Dale et al., 2001; Sebban et al., 2002; Brudey et al., 2006; Grissa et al., 2008; Tang et al., 2008; Demay et al., 2012]. Также предложены различные модификации сполиготипирования [Cowan et al., 2004; Honisch et al., 2010; Zhang et al., 2010; Ruettger et al., 2012; Bespyatykh et al., 2014; Tu et al., 2016], в том числе объединенного с выявлением мутаций в рифампициновом гене, что получило название «spoligorifotyping» [Gomgnimbou et al., 2012].

В одной из статей [Mokrousov, Rastogi, 2015] упоминается, что при поиске в базе данных PubMed терминов «spoligotyping» и «spoligotype» с булевым оператором OR по состоянию на 3 апреля 2015 г. таких статей оказывается 1117. Проведенный нами спустя два с половиной года аналогичный поиск показал цифру в 1261 опубликованную статью, начиная с 1996 г. При этом мы проследили выход публикаций с такими терминами по годам, из которого видно начавшееся в этом столетии нарастание, достигшее пика в 110 статей в 2012 г., и затем некоторый наметившийся спад таких публикаций. Причем, как отмечают те же авторы [Mokrousov, Rastogi, 2015] в последние годы сполиготипирование используется для идентификации штаммов практически только туберкулезной палочки, хотя некоторое время назад полиморфизм CRISPR-кассет применялся и для других патогенных бактерий, вызывающих, например, тиф, дифтерию [Pourcel et al., 2005; Mokrousov et al., 2007; 2009; Cui et al., 2008], что тоже могло сказаться на снижении числа статей с этими терминами. Хотя в некоторых обзорных статьях говорится о применении полиморфизма CRISPR-кассет для генотипирования и других микроорганизмов, в том числе и патогенных [Grissa et al., 2009; Barrangou, Dudley, 2015], тем более, что благодаря полногеномному секвенированию с помощью биоинформатического подхода CRISPR-локусы стало относительно легко находить. При этом сполиготипирование все же не может служить универсальным методом для всех бактерий, поскольку используемые на этапе молекулярной гибридизации спейсеры являются по сути уникальными для каждой группы микроорганизмов, да и не все микроорганизмы такие локусы содержат. Компьютерным программам для поиска *in silico* CRISPR-кассет в секвенированных последовательностях микроорганизмов и базам данным по таковым посвящена специальная статья [Баймиев и др., 2017].

¹ Организация CRISPR-локусов в геномах прокариот рассмотрена нами в другой статье этого номера [Баймиев и др., 2017].

Исследование функционирования генов с помощью CRISPR/dCas систем

Кроме внесения наследуемых изменений в редактируемые геномы различных организмов с помощью CRISPR/Cas технологии², с использованием модифицированной системы CRISPR/dCas можно также исследовать функционирование отдельных генов путем временной (обратимой) репрессии или активации их транскрипции, изменением их эпигенетического статуса, а также маркировать отдельные участки генома *in vivo*. Это открывает небывалые перспективы для изучения работы всего генетического аппарата, и переводит подобные исследования фактически на новый методологический уровень, недостижимый ранее. Такое расширение спектра возможностей CRISPR/Cas систем позволило одному из известных специалистов, стоявших у истоков нынешнего геномного редактирования G.Church и его соавторам сравнить CRISPR/Cas технологию со знаменитым швейцарским армейским ножом, имеющим, как известно, не только простое лезвие [Voga et al., 2016].

Так, вскоре после того как была разработана CRISPR/Cas9 технология редактирования геномов организмов различных уровней генетической сложности, был предложен метод временного блокирования, репрессии работы отдельных генов или их нокдауна, получивший название CRISPR interference (CRISPRi) на примере бактерий и культуры клеток человека [Qi et al., 2013]. Ключевым моментом в таких исследованиях явилось использование ферментативно неактивного белка dCas9 (dead Cas9), у которого произведены инактивирующие мутации в обоих каталитических доменах³. Было продемонстрировано, что комплекс из такой нуклеазы с гидРНК, нацеленной благодаря гомологии ее нуклеотидной последовательности на конкретный участок какого-либо гена, включая его промоторную область, мешает работе РНК-полимеразы и таким образом соответствующая мРНК не образуется. Причем, в цитируемой работе на культуре клеток человека было показано, что можно одновременно проводить мультитаргетный нокдаун различных генов без видимых off-target эффектов. В своей следующей работе этой группе авторов удалось заметно повысить эффективность нокдауна генов у

дрожжевых клеток и клеток человека [Gilbert et al., 2013].

В случае необходимости вызвать активацию работы конкретного гена (CRISPRa) в нужное место (в промоторную область) требуется доставить соответствующий белок-активатор транскрипции, «пришив» его к dCas9 нуклеазе и направив ее в виде комплекса с гидРНК к выбранному месту в геноме, зная последовательность этого участка. Так, было показано, что нокдаун генов человека в культуре клеток может достигнуть 90 - 99%-ной эффективности, а совместное действие репрессии/активации (CRISPRi/a) способно обеспечить тысячекратную модуляцию генной экспрессии [Gilbert et al., 2014]. Собственно, с помощью специально подобранной гидРНК можно доставить dCas9 белок, сшитый с каким-либо подходящим белковым доменом практически в любое место генома *in vivo* и наблюдать результат такого воздействия. Так, например, к dCas9 нуклеазе были добавлены каталитические домены некоторых ДНК метилтрансфераз, что позволило наблюдать метилирование CpG сайтов в промоторных областях ряда генов, с которыми связались гидРНК [Liu et al., 2016; Vojta et al., 2016; Xu et al., 2016].

Помимо того, что с dCas9 нуклеазой можно получать различные fusion-белки, присоединяя соответствующие домены на NH₂- или COOH-концы белковой молекулы, в одной из работ было показано, что за счет того, что так называемые тетрапетля и петля 2 гидРНК при образовании комплекса с Cas9 нуклеазами не принимает участия в РНК/белок взаимодействиях, то в эти места можно добавить экстрапоследовательности РНК в виде неких аптамерных молекул, связывающих какие-либо другие белки, что расширило возможности использования подобных комплексов для исследования функционирования генов [Konermann et al., 2015].

К сожалению, пока работ по различным модификациям геномов (CRISPRi, CRISPRa) с растительными объектами крайне мало, тем не менее, таковые уже есть. Так, например, блокируя с помощью CRISPR интерференции транскрипцию некоторых генов мевалонатного пути биосинтеза терпеноидов, удалось повысить выход изопрена – мономера натурального каучука [Kim et al., 2016]. На арабидопсисе было показано, что с помощью нескольких гидРНК в комплексе с dCas9 белком можно проводить мультиплексное ингибирование транскрипции [Lowder et al., 2015]. Однако все же в некоторых случаях, когда требуется инактивировать работу сразу ряда генов с помощью CRISPRi подхода, одной нуклеазы dCas9 может оказаться недостаточно, и поэтому было предложено

² Что рассмотрено нами в других статьях данного выпуска журнала – Кулуев и др., 2017; Баймиев и др., 2017а.

³ Об использовании dCas9 нуклеазы вкуче с каталитическим доменом рестрикционной эндонуклеазы *FokI* для геномного редактирования говорится в другой нашей статье этого номера – Вершинина и др., 2017.

использовать две разных нуклеазы (точнее то чего от них осталось), поскольку каталитическими свойствами такие белки обладать не должны. Так, недавно описано применение комплекса из гидПНК и мутантного белка ddCpf1 (DNase-dead) вместе с dCas9 со «своей» гидПНК для одновременного блокирования работы двух разных генов [Zhang et al., 2017]. Более чем 10-кратное блокирование транскрипции miR159b с помощью ddCpf1 продемонстрировано на арабидопсисе [Tang et al., 2017].

В одной из работ на примере комплексов dCas9 белка со 155 гидПНК, мишенями для которых служил 41 ген, было показано, что эффективность CRISPRi подхода сильно зависит от дизайна гидПНК и мест их таргетирования, которые желательно, чтобы приходились на сайт инициации транскрипции генов, работу которых требуется заблокировать [Radzishchanskaya et al., 2016]. Для оптимального дизайна гидПНК для CRISPRi и CRISPRa вариантов написаны две компьютерные программы **CRISPR-ERA** и **SSC**, рассмотренные в плане их применения для геномного редактирования в другой нашей статье [Чемерис и др., 2017].

Так, с помощью программы **CRISPR-ERA** (<http://crispr-era.stanford.edu>) [Liu et al., 2015] можно осуществлять дизайн гидПНК не только для геномного редактирования в виде нокаутирования отдельных генов (**E**diting), но и для изучения процессов репрессии (**R**epression) и активации (**A**ctivation) транскрипции интересующих исследователя генов. При работе с этой программой после выбора типа манипуляции с геномом (в рамках темы данной статьи – это может быть репрессия или активация гена), появляется возможность выбрать организм из небольшого списка (Human, Mouse, Rat, Zebrafish, *D.melanogaster*, *C.elegans*, *S.cerevisiae*, *E.coli*, *B.subtilis*; для CRISPRa – только эукариоты), затем указать конкретный ген и координаты мест для подбора гидПНК (от -1500 до +1500 нуклеотидов относительно сайта инициации транскрипции (СИТ) для CRISPRi и от -1500 до 0 нуклеотидов также относительно СИТ для CRISPRa и запустить процесс поиска. Программа выдаст результаты поиска гидПНК, которым будет присвоены оценки E (эффективность) и C (специфичность), а также сумма E+C.

Web-ресурс **SSC** (Sequence Scan for CRISPR) [Xu et al., 2015], находящийся по адресу <http://cistrome.org/SSC/>, позволяет осуществлять дизайн гидПНК не только для геномного редактирования, но и для проведения экспериментов по ингибированию и активации (CRISPRi/a) генных систем. Было обнаружено, что в отличие от нокаутирования подбор гидПНК для CRISPRi/a

экспериментов имеет свои особенности и некоторые предпочтения. В частности, при анализе большого числа удачных гидПНК для CRISPRi/a экспериментов не наблюдается преимущественного нахождения цитозина в положении -3 относительно PAM, что характерно для нокаутных экспериментов, видимо потому что в CRISPRi/a исследованиях не требуется внесения разрывов в цепи ДНК. Для осуществления экспериментов по ингибированию и активации генов для подбора гидПНК с помощью программы **SSC** необходимо ввести через буфер обмена интересующую экспериментатора последовательность ДНК (не более 10 тысяч нуклеотидов), выбрать длину спейсера из 19 или 20 нуклеотидов и запустить процесс поиска подходящих участков, в результате которого наиболее эффективные гидПНК будут вверху списка и выданные программой **SSC** данные могут быть сохранены в разных форматах.

Такой метод как FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) является мощным инструментом при изучении хромосомной организации генетического материала, но его главным недостатком служит использование фиксированных цитологических препаратов. Предложенный вариант этого метода в виде CASFISH, основанный на использовании dCas9 белка, несущего подходящие флуорохромы, позволяет на нативных препаратах ядер в формате 3D регистрировать свечение красителей в местах, определяемых гидПНК, причем за этим процессом можно следить в динамике [Deng et al., 2015].

Недавно также *in situ* было продемонстрировано, что биотинилированный dCas9 белок в комплексе с соответствующей гидПНК способен узнавать участки хроматина и с помощью биотин-стрептавидиновой системы таковые изолировать [Liu et al., 2017], что может оказаться весьма востребованным, поскольку, таким образом, после предварительной фрагментации тем или иным способом геномной ДНК (хроматина) становится возможным провести изоляцию или обогащение интересующих экспериментатора участков генов в их природном состоянии в ощутимых количествах, а не работать с их амплифицированными копиями. Сходная работа по выделению целевых участков хроматина с помощью dCas9 нуклеазы и иммунопреципитации была выполнена ранее [Fujita, Fujii, 2013]. Используется для визуализации геномных последовательностей в живых клетках в качестве маркера и зеленый флуоресцентный белок, который для этого сшивается с инактивированной dCas9 нуклеазой [Chen, Huang, 2014].

Различным аспектам использования CRISPR/dCas систем в последнее время посвящено немало обзорных статей [Dominguez et al., 2015; La

Russa, Qi, 2015; Ceasar et al., 2016; Enríquez, 2016; Miles et al., 2016; Wang, Qi, 2016; Canver et al., 2017; Donohoue et al., 2017; Marchisio, Huang, 2017; Plummer et al., 2017], в том числе с акцентом на растительную тематику [Puchta, 2016; Noman et al., 2016; Dreissig et al., 2017; Liu et al., 2017a; Seth, Harrish, 2017], однако ввиду нехватки информации авторы в них вынуждены уделять значительное внимание животным и бактериальным системам.

Прежде чем перейти к рассмотрению в следующем разделе нуклеазы Cas13a, разрушающей молекулы РНК и используемой для выявления специфичных последовательностей нуклеиновых кислот, необходимо остановиться на недавно предложенном применении аналогичной нуклеазы Cas13b [Cox et al., 2017]. Так, показано, что специально созданная каталитически неактивная форма нуклеазы dCas13b из микроорганизма *Prevotella sp.*, будучи объединенной с аденозиндеаминой, способна в специфичных местах РНК транскриптов превращать аденозины в инозины (воспринимаемые системой трансляции как гуанозины) и таким образом исправлять нежелательные мутации на посттранскрипционном уровне. Созданная система получила удачное название REPAIR (RNA Editing for Programmable A to I Replacement), прямо соответствующее выполняемому процессу. Также сообщено, что система REPAIRv2 характеризуется почти тысячекратным увеличением специфичности своего действия.

Изотермическая амплификация и CRISPR-Dx детекция специфичных последовательностей нуклеиновых кислот

Недавно был разработан новый высокочувствительный способ детекции специфичных последовательностей нуклеиновых кислот, получивший броское название SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing), также обозначаемый как CRISPR-Dx [Gootenberg et al., 2017]. Одним из ключевых ферментов, обеспечивающих как раз детекцию нарабатываемых ампликонов, служит нуклеаза Cas13a (ранее известная как C2c2), относящаяся к VI-A типу CRISPR/Cas систем, мишенью для которых служат молекулы РНК. Но прежде чем приступить к описанию такого способа детекции фрагментов РНК как SHERLOCK, необходимо уделить некоторое внимание начальному этапу этой CRISPR-Dx диагностической системы в виде пока относительно малоизвестной РПА - Рекомбиназной Полимеразной Амплификации (RPA – Recombinase Polymerase Amplification), разработанной еще в 2006 г. [Piepenburg et al., 2006], но только в последние годы,

набирающей популярность, как ее коммерциализацией вплотную занялась английская фирма TwistDx Ltd (<https://www.twistdx.co.uk>)⁴. Так, в настоящее время этой фирмой выпускается несколько TwistAmp[®] наборов общего применения, рассчитанных на детекцию интересующих экспериментатора⁵ специфичных фрагментов ДНК или РНК как в реальном времени, так и по конечной точке гель-электрофорезом, регистрацией флуоресценции, либо иммунодетекцией с помощью специальных полосок. Также еще производятся три специальных TwistAmp[®] набора с готовыми праймерами для обнаружения некоторых патогенных бактерий. Причем, благодаря изотермичности РПА, протекающей в диапазоне от 37 до 42°C, и отсутствию потерь времени на переходы от одной температуре к другой (что имеет место во время ПЦР) амплификация нужных фрагментов с фемтомолярной и даже аттомолярной чувствительностью завершается обычно за 3-20 мин в зависимости от используемого протокола.

Пожалуй, стоит отметить, что кроме детекции различных вирусов и микроорганизмов, в том числе в цельной крови [Euler et al., 2012; 2013; Clancy et al., 2015; Ma et al., 2017; Moore, Jaykus, 2017; Wang et al., 2017; Wu et al., 2017 и др.], в литературе имеются публикации об использовании РПА в исследованиях по растительной тематике. Так, сообщается об успешной с высокой чувствительностью и за короткое время детекции ГМ-ингредиентов в кукурузе, рисе, сое, хлопчатнике [Xu et al., 2014; Chandu et al., 2016], выявлении возбудителя фитофторы при анализе почти 30 видов растений [Miles et al., 2015], обнаружении *Agrobacterium tumefaciens* в корончатых галлах табака [Fuller et al., 2017].

Важной особенностью РПА, проистекающей, в том числе, из ее изотермичности, является возможность детекции ДНК или РНК в полевых условиях с помощью простых электрических приборов, или даже пользуясь теплом тела человека, поскольку для РПА не требуется даже предварительного этапа денатурации ДНК [Crannel et al., 2014; Liljander et al., 2015; Mondal et al., 2016]. К тому же TwistAmp[®] наборы продаются как в жидком, так и в лиофилизированном виде, допускающем хранение не на холоде. Было продемонстрировано, что после хранения набора при 25°C в течение 12 недель

⁴ В России, Белоруссии и Украине дистрибьютором продукции TwistDx Ltd является ООО «Максим Медикал» (<http://www.maxmedikal.com>).

⁵ Праймеры (кроме контрольных) в наборы не входят, и экспериментатор подбирает их самостоятельно для своих задач.

или 3 недели при 45°C чувствительность детекции оставалась прежней и позволяла выявлять 10 копий вируса иммунодефицита человека [Lillis et al., 2016]. Итак, что же за система ферментов обеспечивает такие необычные условия амплификации специфичных фрагментов ДНК или РНК?

Надо сказать, что используемый ферментный комплекс в РПА до некоторой степени имитирует происходящие в клетках природные процессы. Основными компонентами этой реакции являются: фермент рекомбиназа (T4 *UvsX*); белок, связывающий одноцепочечную ДНК (SSB или T4 *gp32*); ДНК полимеразы с вытесняющей цепь ДНК-активностью (например, *Bsu* из *Bacillus subtilis*) [Piepenburg et al., 2006]. Для достижения лучших результатов в реакционной смеси присутствует вспомогательный белок T4 *UvsY* и ряд других компонентов, помимо обязательных ДНТФ, праймеров и матричной ДНК. Процесс начинается с формирования филаментов из рекомбиназы и праймеров, которые для этого должны иметь длину 30-35 нуклеотидов⁶, после чего данный комплекс «сканирует» двуцепочечную ДНК, ища гомологичные участки, и в таких местах происходит образование D-петель, а вытесненную цепь ДНК, чтобы она не конкурировала со спарившимся праймером, связывает SSB-белок. Поскольку места расположения праймеров, как и в ПЦР, подбирают на противоположных цепях, недалеко друг от друга и с таким расчетом, чтобы вновь синтезируемые цепи ДНК их перекрывали, то после элонгации праймеров и построения новых цепей ДНК с помощью фермента со смещающей цепь ДНК-активностью, вновь образуются двуцепочечные структуры, и новые порции праймеров в комплексе с рекомбиназой, гомологичные соответствующим участкам таких ампликонов, вытесняют одну из цепей, тем самым обеспечивая цикличность процесса. Это несколько упрощенное описание происходящего в ходе РПА, тем не менее, оно дает общее представление об этапах данной реакции и для цели рассмотрения процесса SHERLOCK его вполне достаточно. Желая ознакомиться с РПА более подробно могут обратиться для этого к соответствующим обзорным статьям [James, Macdonald, 2015; Daher et al., 2016] и к литературе, представленной на сайте фирмы-производителя.

И именно РПА была выбрана в качестве предварительного этапа новой реакции детекции специфичных фрагментов ДНК SHERLOCK, хотя на

пригодность для этой же цели испытывалась и такая реакция как NASBA⁷ [Compton, 1991], но она не удовлетворила авторов метода SHERLOCK [Gootenberg et al., 2017], поскольку не позволила повысить чувствительность детекции. И это не удивительно и легко объяснимо, так как накапливающимися (и периодически исчезающими) ампликонами в NASBA являются молекулы РНК, а после РПА такие надо еще генерировать, дополнительно увеличивая количество детектируемых молекул. Но, чтобы задействовать нуклеазу Cas13a, нацеленную на разрушение молекул РНК, эти самые молекулы в реакционной смеси после завершения РПА должны откуда то взяться. Для этого к одному из используемых в РПА праймеров достаточно на 5'-конец добавить последовательность промотора бактериофага T7, в ходе амплификации становящаяся двуцепочечной и способной управлять работой T7 РНК полимеразы, которую надо также дополнительно добавлять в реакционную смесь вместе с рибонуклеотидтрифосфатами, что в итоге приводит к наработке значительного количества молекул РНК, комплементарных части ДНК-ампликона (без T7 промотора), обеспечивая детекцию даже единичных исходных копий (имеется в виду до РПА) [Gootenberg et al., 2017]. Причем авторы совершенно справедливо замечают, что первой стадией SHERLOCK может быть практически любая реакция амплификации, в которой возможно использование одного из праймеров, содержащих промотор фага T7 или аналогичный ему. Но с учетом многих факторов их выбор все же пал на РПА. Таким образом CRISPR-Dx диагностика на платформе SHERLOCK по сути является комбинацией метода амплификации РПА с последующей транскрипцией ампликонов с помощью T7 РНК полимеразы и разрушением репортерных молекул РНК

⁷ Не можем удержаться от того, чтобы не заметить, что NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) неправильное название, абсолютно неотражающее суть метода, поскольку все реакции амплификации нуклеиновых кислот основаны на нуклеотидных последовательностях, точнее их специфичности или уникальности. Причем данный метод ранее назывался 3SR (Self-Sustained Sequence Replication) [Guatelli et al., 1990], а его предшественник имел название TAS (Transcription-based Amplification System) [Kwoh et al., 1989], но для данной реакции «самоподдерживающейся репликации» или «транскрипции, обусловленной репликацией», которую можно также назвать еще и «транскрипционной цепной реакцией», что было бы вполне справедливо и соответствовало происходящим процессам, «прижилось», как ни странно, именно обозначение NASBA.

⁶ На сайте фирмы TwistDx в разделе Q&A (<https://www.twistdx.co.uk/en/support/faqs>) говорится, что могут использоваться праймеры и меньшей длины как для обычной ПЦР, но эффективность спаривания и амплификации может быть несколько снижена.

Cas13a нуклеазой, которая активируется ампликонами РПА, содержащими участок крРНК данного фермента. Образно говоря, нуклеаза Cas13a после активации фермента специфичной РНК «входит в раж» и расщепляет уже неспецифически все присутствующие в реакционной смеси молекулы РНК, а так как специально добавленные репортерные молекулы РНК несут флуорохром и гаситель, то после физического разобщения последних вследствие разрушения всех подряд молекул РНК флуоресцентный краситель начинает светиться, что и детектируется с помощью соответствующих устройств.

Детальное изучение особенностей функционирования CRISPR/Cas13a систем, выполненные почти одновременно учеными с восточного и западного побережий США⁸ [Abudayyeh et al., 2016; East-Seletsky et al., 2016], являющимися признанными лидерами в CRISPR/Cas технологиях, показали, что нуклеаза Cas13a имеет две РНКазные активности, как катализирующую созревание крРНК, так и отвечающую за программируемую смерть инфицированной бактериофагом клетки, вызванную деградацией остальной РНК. В другой своей статье, полученной редакцией 21 февраля 2017 и опубликованной в мае 2017 г., J.A.Doudna с соавторами [East-Seletsky et al., 2017] только отметили возможное использование нуклеазы Cas13a для целей диагностики, тогда как 6 февраля 2017 г. редакцией другого журнала была получена рукопись статьи, вышедшей в апреле 2017 г., где как раз была предложена система SHERLOCK [Gootenberg et al., 2017]. «Запад» же недавно «ответил» публикацией, в которой описывается кристаллическая структура Cas13a нуклеазы из *Lachnospiraceae bacterium* в комплексе с крРНК, объясняющей почему работа каталитического домена этой нуклеазы блокируется до тех пор пока фермент не свяжется с целевой мишенью [Knott et al., 2017]. Проявление неспецифической рибонуклеазной активности нуклеазы Cas13a происходит только после ее активации специфической крРНК, что показано в предыдущей работе этих авторов [East-Seletsky et al., 2016].

В качестве Cas13a нуклеазы в системе детекции SHERLOCK был использован фермент бактерии *Leptotrichia wadei* вместо ранее лучше изученного из *L.shahii* ввиду более мощной РНКазной активности первого. С помощью цифровой монокапельной ПЦР в качестве контроля было показано, что на платформе SHERLOCK можно детектировать единичные мишени. Было отмечено,

что лиофилизированная T7 РНК полимеразы сохраняет свою активность, лишь незначительно ее теряя при хранении при комнатной температуре, что является дополнительным аргументом в пользу выбора РПА как реакции, обеспечивающей предварительную наработку целевых ампликонов, поскольку такая T7 РНК полимеразы оказывается удобным дополнительным компонентом лиофилизированных наборов для РПА. Чтобы убедиться в эффективности и чувствительности новой диагностической системы CRISPR-Dx на платформе SHERLOCK в цитируемой работе [Gootenberg et al., 2017] были проведены различные эксперименты по успешной детекции вирусов Зика и Денге (в том числе в «походном» варианте в виде тест полосок), по распознаванию однонуклеотидных замен в человеческой ДНК, а также искусственно формируя мишени с неспаривающимися нуклеотидами в крРНК, что подтвердило высокую специфичность данной реакции.

Заключение

Данная статья завершает посвященную CRISPR/Cas системам серию публикаций, составивших отдельный тематический номер журнала Биомика. Безусловно, не все аспекты применения CRISPR-локусов оказались в них рассмотренными, в том числе и в этой статье. Тем не менее, мы сконцентрировали здесь внимание на трех совершенно разных направлениях использования CRISPR/Cas систем. Исторически первой является уже много лет применяющаяся технология генотипирования штаммов разных бактерий, преимущественно патогенных, называемая сполитипированием, где микроорганизмы идентифицируются на основе присутствия у них определенных «следов» в виде CRISPR-кассет, оставленных атаками бактериофагов, являющаяся пока «золотым стандартом» для обнаружения и идентификации такого опасного патогена как туберкулезная палочка. Очень перспективным представляется использование каталитически неактивных Cas белков для фундаментальных исследований функционирования генов и геномов, позволяя *in vivo* оказывать определенные воздействия на гены в виде их активации, репрессии, изменения эпигенетического статуса, визуализации конкретных генов или прочих участков ДНК также *in vivo*, что еще не так давно было просто технологически не доступно. Не было обойдено вниманием и совсем новое направление использования CRISPR/Cas систем для целей ДНК/РНК диагностики в виде технологии CRISPR-Dx на платформе SHERLOCK, которой еще только предстоит «доказывать» свое право на широкое применение.

⁸ В другой нашей статье этого номера мы уже упоминали о противостоянии восточного и западного побережий США в вопросах патентования CRISPR/Cas9 технологии [Баймиев и др., 2017a].

Литература

1. Баймиев Ан.Х., Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Матниязов Р.Т., Валеев А.Ш., Баймиев Ал.Х., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Биоинформатические ресурсы для *in silico* поиска CRISPR локусов в геномах прокариот // Биомика. 2017. Т.9. С.229-244.
2. Баймиев Ан.Х., Кулуев Б.Р., Вершинина З.Р., Князев А.В., Чемерис Д.А., Рожнова Н.А., Геращенко Г.А., Михайлова Е.В., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. CRISPR/Cas редактирование геномов (растений) и общество // Биомика. 2017а. Т.9. С.183-202.
3. Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Князев А.В., Чемерис Д.А., Гумерова Г.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Эволюция методов редактирования геномов // Биомика. 2017. Т.9. С.245-270.
4. Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Баймиев Ан.Х., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матниязов Р.Т., Гумерова Г.Р., Михайлова Е.В., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. CRISPR/Cas редактирование геномов растений // Биомика. 2017. Т.9. С.155-182.
5. Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Геращенко Г.А., Кулуев Б.Р., Рожнова Н.А., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Биоинформатические ресурсы для CRISPR/Cas редактирования геномов // Биомика. 2017. Т.9. С.203-228.
6. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Konermann S., Joung J., Slaymaker I.M., Cox D.B., Shmakov S., Makarova K.S., Semenova E., Minakhin L., Severinov K., Regev A., Lander E.S., Koonin E.V., Zhang F. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector // Science. 2016. V. 353:aaf5573.
7. Aranaz A., Liébana E., Mateos A., Dominguez L, Vidal D, Domingo M, Gonzolez O, Rodriguez-Ferri EF, Bunschoten AE, Van Embden JD, Cousins D. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis // J. Clin Microbiol. 1996. V. 34. P. 2734-2740.
8. Barrangou R., Dudley E.G. CRISPR-based typing and next-generation tracking technologies // Annu. Rev. Food Sci. Technol. 2016. V. 7. P. 395-411.
9. Bespyatykh J.A., Zimenkov D.V., Shitikov E.A., Kulagina E.V., Lapa S.A., Gryadunov D.A., Ilina E.N., Govorun V.M. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates using hydrogel oligonucleotide microarrays // Infect. Genet. Evol. 2014. V. 26. P. 41-46.
10. Botelho A., Canto A., Leão C., Cunha M.V. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) analysis of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex // Methods Mol. Biol. 2015. V. 1247. P. 373-389.
11. Brudey K., Driscoll J.R., Rigouts L., Prodinger W.M., Gori A., Al-Hajj S.A., Allix C., Aristimuño L., Arora J., Baumanis V., Binder L., Cafrune P., Cataldi A., Cheong S., Diel R., Ellermeier C., Evans J.T., Fauville-Dufaux M., Ferdinand S., Garcia de Viedma D., Garzelli C., Gazzola L., Gomes H.M., Gutierrez M.C., Hawkey P.M., van Helden P.D., Kadival G.V., Kreiswirth B.N., Kremer K., Kubin M., Kulkarni S.P., Liens B., Lillebaek T., Ho M.L., Martin C., Martin C., Mokrousov I., Narvskaja O., Ngeow Y.F., Naumann L., Niemann S., Parwati I., Rahim Z., Rasolofoa-Razanamparany V., Rasolonavalona T., Rossetti M.L., Rüsç-Gerdes S., Sajduda A., Samper S., Shemyakin I.G., Singh U.B., Somoskovi A., Skuce R.A., van Soolingen D., Streicher E.M., Suffys P.N., Tortoli E., Tracevska T., Vincent V., Victor T.C., Warren R.M., Yap S.F., Zaman K., Portaels F., Rastogi N., Sola C. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology // BMC Microbiol. 2006. V. 6:23.
12. Canver M.C., Bauer D.E., Orkin S.H. Functional interrogation of non-coding DNA through CRISPR genome editing // Methods. 2017. V. 121-122. P. 118-129.
13. Ceasar S.A., Rajan V., Prykhodzhiy S.V., Berman J.N., Ignacimuthu S. Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9 // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1863. P. 2333-2344.
14. Chandu D., Paul S., Parker M., Dudin Y., King-Sitzes J., Perez T., Mittanck D.W., Shah M., Glenn K.C., Piepenburg O. Development of a rapid point-of-use DNA test for the screening of Genuity® Roundup Ready 2 Yield® soybean in seed samples // Biomed Res. Int. 2016:3145921.
15. Chen B., Huang B. Imaging genomic elements in living cells using CRISPR/Cas9 // Methods Enzymol. 2014. V. 546. P. 337-354.
16. Clancy E., Higgins O., Forrest M.S., Boo T.W., Cormican M., Barry T., Piepenburg O., Smith T.J. Development of a rapid recombinase polymerase amplification assay for the detection of *Streptococcus pneumoniae* in whole blood // BMC Infect. Dis. 2015. V. 15:481.
17. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification // Nature. 1991. V.350. P.91-92.
18. Cowan L.S., Diem L., Brake M.C., Crawford J.T. Transfer of a *Mycobacterium tuberculosis* genotyping method, spoligotyping, from a reverse

- line-blot hybridization, membrane-based assay to the Luminex multianalyte profiling system // *J. Clin. Microbiol.* 2004. V. 42. P. 474-477.
19. Cox D.B.T., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Franklin B., Kellner M.J., Joung J., Zhang F. RNA editing with CRISPR-Cas13 // *Science*. 2017. pii: eaaq0180.
 20. Crannell Z.A., Rohrman B., Richards-Kortum R. Equipment-free incubation of recombinase polymerase amplification reactions using body heat // *PLoS One*. 2014. V. 9:e112146.
 21. Cui Y., Li Y., Gorgé O., Platonov M.E., Yan Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S.V., Balakhonov S.V., Wang X., Song Y., Anisimov A.P., Vergnaud G., Yang R. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats // *PLoS One*. 2008. V.9;3(7):e2652.
 22. Daher R.K., Stewart G., Boissinot M., Bergeron M.G. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications // *Clin. Chem.* 2016. V.62. P.947-958.
 23. Dale J.W., Brittain D., Cataldi A.A., Cousins D., Crawford J.T., Driscoll J., Heersma H., Lillebaek T., Quitugua T., Rastogi N., Skuce R.A., Sola C., Van Soolingen D., Vincent V. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2001. V.5. P.216-219.
 24. Demay C., Liens B., Burguière T., Hill V., Couvin D., Millet J., Mokrousov I., Sola C., Zozio T., Rastogi N. SITVITWEB - a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology // *Infect. Genet. Evol.* 2012. V.12. P.755-766.
 25. Deng W., Shi X., Tjian R., Lionnet T., Singer R.H. CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated *in situ* labeling of genomic loci in fixed cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. P. 11870-11875.
 26. Dominguez A.A., Lim W.A., Qi L.S. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2016. V. 17. P. 5-15.
 27. Donohoue P.D., Barrangou R., May A.P. Advances in industrial biotechnology using CRISPR-Cas Systems // *Trends Biotechnol.* 2017. pii: S0167-7799(17)30187-7.
 28. Dreissig S., Schiml S., Schindele P., Weiss O., Rutten T., Schubert V., Gladilin E., Mette M.F., Puchta H., Houben A. Live-cell CRISPR imaging in plants reveals dynamic telomere movements // *Plant J.* 2017. V. 91. P. 565-573.
 29. Driscoll J.R. Spoligotyping for molecular epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* complex // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 551. P. 117-128.
 30. East-Seletsky A., O'Connell M.R., Knight S.C., Burstein D., Cate J.H., Tjian R., Doudna J.A. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection // *Nature*. 2016. V. 538. P. 270-273.
 31. East-Seletsky A., O'Connell M.R., Burstein D., Knott G.J., Doudna J.A. RNA targeting by functionally orthogonal type VI-A CRISPR-Cas enzymes // *Mol. Cell*. 2017. V. 66. P. 373-383.e3.
 32. Enríquez P. CRISPR-Mediated epigenome editing // *Yale J. Biol. Med.* 2016. V.89. P.471-486.
 33. Euler M., Wang Y., Otto P., Tomaso H., Escudero R., Anda P., Hufert F.T., Weidmann M. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Francisella tularensis* // *J. Clin. Microbiol.* 2012. V. 50. P. 2234-2238.
 34. Euler M., Wang Y., Heidenreich D., Patel P., Strohmeier O., Hakenberg S., Niedrig M., Hufert F.T., Weidmann M. Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of biothreat agents // *J. Clin. Microbiol.* 2013. V. 51. P. 1110-1117.
 35. Filliol I., Driscoll J.R., Van Soolingen D., Kreiswirth B.N., Kremer K., Valétudie G., Anh D.D., Barlow R., Banerjee D., Bifani P.J., Brudey K., Cataldi A., Cooksey R.C., Cousins D.V., Dale J.W., Dellagostin O.A., Drobniowski F., Engelmann G., Ferdinand S., Gascoyne-Binzi D., Gordon M., Gutierrez M.C., Haas W.H., Heersma H., Källenius G., Kassa-Kelembho E., Koivula T., Ly H.M., Makristathis A., Mammina C., Martin G., Moström P., Mokrousov I., Narbonne V., Narvskaya O., Nastasi A., Niobe-Eyangoh S.N., Pape J.W., Rasoloflo-Razanamparany V., Ridell M., Rossetti M.L., Stauffer F., Suffys P.N., Takiff H., Texier-Maugein J., Vincent V., De Waard J.H., Sola C., Rastogi N. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes // *Emerg. Infect. Dis.* 2002. V.8. P.1347-1349.
 36. Filliol I., Driscoll J.R., van Soolingen D., Kreiswirth B.N., Kremer K., Valétudie G., Dang D.A., Barlow R., Banerjee D., Bifani P.J., Brudey K., Cataldi A., Cooksey R.C., Cousins D.V., Dale J.W., Dellagostin O.A., Drobniowski F., Engelmann G., Ferdinand S., Gascoyne-Binzi D., Gordon M., Gutierrez M.C., Haas W.H., Heersma H., Kassa-Kelembho E., Ho M.L., Makristathis A., Mammina C., Martin G., Moström P., Mokrousov I., Narbonne V., Narvskaya O., Nastasi A., Niobe-Eyangoh S.N., Pape J.W., Rasoloflo-Razanamparany V., Ridell M., Rossetti M.L., Stauffer F., Suffys P.N., Takiff H.,

- Texier-Maugein J., Vincent V., de Waard J.H., Sola C., Rastogi N. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study // *J. Clin. Microbiol.* 2003. V. 41. P. 1963-1970.
37. Fujita T., Fujii H. Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V.439. P.132-136.
38. Fuller S.L., Savory E.A., Weisberg A.J., Buser J.Z., Gordon M.I., Putnam M.L., Chang J.H. Isothermal amplification and lateral-flow assay for detecting crown-gall-causing *Agrobacterium spp.* // *Phytopathology.* 2017. V.107. P.1062-1068.
39. Gilbert L.A., Larson M.H., Morsut L., Liu Z., Brar G.A., Torres S.E., Stern-Ginossar N., Brandman O., Whitehead E.H., Doudna J.A., Lim W.A., Weissman J.S., Qi L.S. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes // *Cell.* 2013. V.154. P.442-451.
40. Gilbert L.A., Horlbeck M.A., Adamson B., Villalta J.E., Chen Y., Whitehead E.H., Guimaraes C., Panning B., Ploegh H.L., Bassik M.C., Qi L.S., Kampmann M., Weissman J.S. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation // *Cell.* 2014. V.159. P.647-661.
41. Goguet de la Salmonière Y.O., Li H.M., Torrea G., Bunschoten A., van Embden J., Gicquel B. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* 1997. V. 35. P. 2210-2214.
42. Gomgnimbou M.K., Abadia E., Zhang J., Refrégier G., Panaiotov S., Bachiyiska E., Sola C. "Spoligorifotyping," a dual-priming-oligonucleotide-based direct-hybridization assay for tuberculosis control with a multianalyte microbead-based hybridization system // *J. Clin. Microbiol.* 2012. V. 50. P. 3172-3179.
43. 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. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 // *Science.* 2017. V. 356. P. 438-442.
44. Goyal M., Saunders N.A., van Embden J.D., Young D.B., Shaw R.J. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism // *J. Clin. Microbiol.* 1997. V. 35. P. 647-651.
45. Grissa I., Bouchon P., Pourcel C., Vergnaud G. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPRtyping // *Biochimie.* 2008. V. 90. P. 660-668.
46. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) for the genotyping of bacterial pathogens // *Methods Mol Biol.* 2009. V.551. P.105-116.
47. Groenen P.M., Bunschoten A.E., van Soolingen D., van Embden J.D. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method // *Mol. Microbiol.* 1993. V.10. P.1057-1065.
48. Guatelli J.C., Whitfield K.M., Kwoh D.Y., Barringer K.J., Richman D.D., Gingeras T.R. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V.87. P.1874-1878. – Erratum - Guatelli J.C., Whitfield K.M., Kwoh D.Y., Barringer K.J., Richman D.D., Gingeras T.R. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V.87. P.7797.
49. Hermans P.W., van Soolingen D., Bik E.M., de Haas P.E., Dale J.W., van Embden J.D. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains // *Infect. Immun.* 1991. V.59. P.2695-2705.
50. Honisch C., Mosko M., Arnold C., Gharbia S.E., Diel R., Niemann S. Replacing reverse line blot hybridization spoligotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex // *J. Clin. Microbiol.* 2010. V.48. P.1520-1526.
51. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product // *J. Bacteriol.* 1987. V. 169. P. 5429-5433.
52. James A., Macdonald J. Recombinase polymerase amplification: Emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics // *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2015. V.15. P.1475-1489.
53. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology // *J. Clin. Microbiol.* 1997. V. 35. P. 907-914.

54. Kim S.K., Han G.H., Seong W., Kim H., Kim S.W., Lee D.H., Lee S.G. CRISPR interference-guided balancing of a biosynthetic mevalonate pathway increases terpenoid production // *Metab. Eng.* 2016. V. 38. P. 228-240.
55. Knott G.J., East-Seletsky A., Cofsky J.C., Holton J.M., Charles E., O'Connell M.R., Doudna J.A. Guide-bound structures of an RNA-targeting A-cleaving CRISPR-Cas13a enzyme // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017. V.24. P.825-833.
56. Konermann S., Brigham M.D., Trevino A.E., Joung J., Abudayyeh O.O., Barcena C., Hsu P.D., Habib N., Gootenberg J.S., Nishimasu H., Nureki O., Zhang F. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex // *Nature*. 2015. V.517. P.583-588.
57. Kwoh D.Y., Davis G.R., Whitfield K.M., Chappelle H.L., DiMichele L.J., Gingeras T.R. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V.86. P.1173-1177.
58. La Russa M.F., Qi L.S. The new state of the Art: Cas9 for gene activation and repression // *Mol. Cell Biol.* 2015. V.35. P.3800-3809.
59. Li W., Raoult D., Fournier P.E. Bacterial strain typing in the genomic era // *FEMS Microbiol. Rev.* 2009. V.33. P.892-916.
60. Liljander A., Yu M., O'Brien E., Heller M., Nepper J.F., Weibel D.B., Gluecks I., Younan M., Frey J., Falquet L., Jores J. Field-applicable recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma capricolum* subsp. *Capripneumoniae* // *J. Clin. Microbiol.* 2015. V. 53. P. 2810-2815.
61. Lillis L., Siverson J., Lee A., Cantera J., Parker M., Piepenburg O., Lehman D.A., Boyle D.S. Factors influencing Recombinase polymerase amplification (RPA) assay outcomes at point of care // *Mol. Cell. Probes.* 2016. V. 30. P. 74-78.
62. Liu H., Wei Z., Dominguez A., Li Y., Wang X., Qi L.S. CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation // *Bioinformatics.* 2015. V. 31. P. 3676-3678.
63. Liu X.S., Wu H., Ji X., Stelzer Y., Wu X., Czauderna S., Shu J., Dadon D., Young R.A., Jaenisch R. Editing DNA methylation in the mammalian genome // *Cell.* 2016. V.167. P.233-247.e17.
64. Liu X., Xie C., Si H., Yang J. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in plants // *Methods.* 2017. V. 121-122. P. 94-102.
65. Liu X., Zhang Y., Chen Y., Li M., Zhou F., Li K., Cao H., Ni M., Liu Y., Gu Z., Dickerson K.E., Xie S., Hon G.C., Xuan Z., Zhang M.Q., Shao Z., Xu J. In Situ capture of chromatin interactions by biotinylated dCas9 // *Cell.* 2017a. V. 170: 1028-1043.e19.
66. Lowder L.G., Zhang D., Baltes N.J., Paul J.W., Tang X., Zheng X., Voytas D.F., Hsieh T.F., Zhang Y., Qi Y. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation // *Plant Physiol.* 2015. V. 169. P. 971-985.
67. Ma Q., Liu H., Ye F., Xiang G., Shan W., Xing W. Rapid and visual detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex using recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strips // *Mol. Cell. Probes.* 2017. pii: S0890-8508(17)30080-4.
68. Marchisio M.A., Huang Z. CRISPR-Cas type II-based synthetic biology applications in eukaryotic cells // *RNA Biol.* 2017. V. 31. P. 1-8.
69. Miles T.D., Martin F.N., Coffey M.D. Development of rapid isothermal amplification assays for detection of *Phytophthora* spp. in plant tissue // *Phytopathology.* 2015. V.105. P.265-278.
70. Miles L.A., Garippa R.J., Poirier J.T. Design, execution, and analysis of pooled in vitro CRISPR/Cas9 screens // *FEBS J.* 2016. V. 283. P. 3170-3180.
71. Mojica F.J., Juez G., Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified *PstI* sites // *Mol. Microbiol.* 1993. V. 9. P. 613-621.
72. Mokrousov I., Limeschenko E., Vyazovaya A., Narvskaya O. *Corynebacterium diphtheriae* spoligotyping based on combined use of two CRISPR loci // *Biotechnol. J.* 2007. V. 2. P. 901-906.
73. Mokrousov I., Rastogi N. Spacer-based macroarrays for CRISPR genotyping // *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 1311. P. 111-131.
74. Mokrousov I., Vyazovaya A., Kolodkina V., Limeschenko E., Titov L., Narvskaya O. Novel macroarray-based method of *Corynebacterium diphtheriae* genotyping: evaluation in a field study in Belarus // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2009. V. 28. P. 701-703.
75. Molhuizen H.O., Bunschoten A.E., Schouls L.M., van Embden J.D. Rapid detection and simultaneous strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria by spoligotyping // *Methods Mol. Biol.* 1998. V. 101. P. 381-394.
76. Mondal D., Ghosh P., Khan M.A., Hossain F., Böhlken-Fascher S., Matlashewski G., Kroeger A.,

- Olliaro P., Abd E., Wahed A. Mobile suitcase laboratory for rapid detection of *Leishmania donovani* using recombinase polymerase amplification assay // *Parasit. Vectors.* 2016. V.9:281.
77. Moore M.D., Jaykus L.A. Development of a recombinase polymerase amplification assay for detection of epidemic human noroviruses // *Sci. Rep.* 2017. V.7:40244.
78. Noman A., Aqeel M., He S. CRISPR-Cas9: Tool for qualitative and quantitative plant genome editing // *Front Plant Sci.* 2016. V. 7:1740.
79. Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L., Armes N.A. DNA detection using recombination proteins // *PLoS Biol.* 2006. V. 4:e204.
80. Plummer R.J., Guo Y., Peng Y. A CRISPR reimagining: new twists and turns of CRISPR beyond the genome-engineering revolution // *J. Cell. Biochem.* 2017.
81. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies // *Microbiology.* 2005. V.151. P.653-663.
82. Puchta H. Using CRISPR/Cas in three dimensions: towards synthetic plant genomes, transcriptomes and epigenomes // *Plant J.* 2016. V. 87. P. 5-15.
83. Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S., Arkin A.P., Lim W.A. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression // *Cell.* 2013. V.152. P.1173-1183.
84. Radzishchanskaya A., Shlyueva D., Müller I., Helin K. Optimizing sgRNA position markedly improves the efficiency of CRISPR/dCas9-mediated transcriptional repression // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44:e141.
85. Ruettger A., Nieter J., Skrypnik A., Engelmann I., Ziegler A., Moser I., Monecke S., Ehrlich R., Sachse K. Rapid spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria by use of a microarray system with automatic data processing and assignment // *J. Clin. Microbiol.* 2012. V.50. P.2492-2495.
86. Sebban M., Mokrousov I., Rastogi N., Sola C. A data-mining approach to spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium tuberculosis* // *Bioinformatics.* 2002. V. 18. P. 235-243.
87. Seth K., Harish. Current status of potential applications of repurposed Cas9 for structural and functional genomics of plants // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. pii: S0006-291X(16)31825-3.
88. Shariat N., Dudley E.G. CRISPRs: molecular signatures used for pathogen subtyping // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 430-439.
89. Sola C., Horgen L., Maïsetti J., Devallois A., Goh K.S., Rastogi N. Spoligotyping followed by double-repetitive-element PCR as rapid alternative to IS6110 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis // *J. Clin. Microbiol.* 1998. V. 36. P. 1122-1124.
90. Sola C. Clustured regularly interspersed short palindromic repeats (CRISPR) genetic diversity studies as a mean to reconstruct the evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex // *Tuberculosis (Edinb).* 2015. V. 95. P. 159-166.
91. Suzana S., Shanmugam S., Uma Devi K.R., Swarna Latha P.N., Michael J.S. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates at a tertiary care hospital in India // *Trop. Med. Int. Health.* 2017. V. 22. P. 703-707.
92. Tang C., Reyes J.F., Luciani F., Francis A.R., Tanaka M.M. spolTools: online utilities for analyzing spoligotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex // *Bioinformatics.* 2008. V. 24. P. 2414-2415.
93. Tang X., Lowder L.G., Zhang T., Malzahn A.A., Zheng X., Voytas D.F., Zhong Z., Chen Y., Ren Q., Li Q., Kirkland E.R., Zhang Y., Qi Y. A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants // *Nat. Plants.* 2017. V.3:17103.
94. Tu Y., Zeng X., Li H., Zheng R., Xu Y., Li Q. A strip array for spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates // *J. Microbiol. Methods.* 2016. V.122. P.23-26.
95. Vojta A., Dobrinić P., Tadić V., Bočkor L., Korać P., Julg B., Klasić M., Zoldoš V. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. P. 5615-5628.
96. Vora S., Tuttle M., Cheng J., Church G. Next stop for the CRISPR revolution: RNA-guided epigenetic regulators // *FEBS J.* 2016. V.283. P.3181-3193.
97. Wang F., Qi L.S. Applications of CRISPR genome engineering in cell biology // *Trends Cell. Biol.* 2016. V.26. P.875-888.
98. Wang J.C., Liu L.B., Han Q.A., Wang J.F., Yuan W.Z. An exo probe-based recombinase polymerase amplification assay for the rapid detection of porcine parvovirus // *J. Virol. Methods.* 2017. V.248. P.145-147.
99. Wu Y.D., Xu M.J., Wang Q.Q., Zhou C.X., Wang M., Zhu X.Q., Zhou D.H. Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow (LF) strip for detection of *Toxoplasma*

- gondii in the environment // *Vet. Parasitol.* 2017. V.243. P.199-203.
100. Xu C., Li L., Jin W., Wan Y. Recombinase polymerase amplification (RPA) of CaMV-35S promoter and nos terminator for rapid detection of genetically modified crops // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. V. 15. P. 18197-18205.
101. Xu H., Xiao T., Chen C.H., Li W., Meyer C.A., Wu Q., Wu D., Cong L., Zhang F., Liu J.S., Brown M., Liu X.S. Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design // *Genome Res.* 2015. V.25. P.1147-1157.
102. Xu X., Tao Y., Gao X., Zhang L., Li X., Zou W., Ruan K., Wang F., Xu G.L., Hu R. A CRISPR-based approach for targeted DNA demethylation // *Cell Discov.* 2016. V.2:16009.
103. Zhang J., Abadia E., Refregier G., Tafaj S., Boschirola M.L., Guillard B., Andremont A., Ruimy R., Sola C. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of 'spoligotyping' with new spacers and a microbead-based hybridization assay // *J. Med. Microbiol.* 2010. V.59. P.285-294.
104. Zhang X., Wang J., Cheng Q., Zheng X., Zhao G., Wang J. Multiplex gene regulation by CRISPR-ddCpf1 // *Cell. Discov.* 2017. V.3:17018.

THE APPLICATION OF THE CRISPR LOCI NOT FOR EDITING OF GENOMES

Kuluev B.R., Baymiev An.Kh., Chemeris D.A., Matniyazov R.T.,
Gerashchenkov G.A., Nikonorov Yu.M., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V.

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Scientific Center of RAS, chemeris@anrb.ru

Resume

The article discusses various applications of CRISPR loci and their components: a) for genotyping of certain bacteria strains (CRISPR-cassettes); b) for studying of fundamental questions of the individual genes function and gene networks and also RNA transcripts (CRISPR/dCas system); c) for highly sensitive CRISPR-Dx detection of specific sequences of nucleic acids (nuclease Cas13a).

Key words: CRISPR/Cas system, CRISPR-loci, CRISPR-cassettes, spoligotyping, recombinase polymerase amplification, RPA, CRISPR-Dx, CRISPR/dCas9, Cas13a, CRISPRi, CRISPRa, CRISPRi/a