

Степанська Д. – ст. гр. ЛДБС-2023-2025

Національний університет «Києво-Могилянська академія»

СИСТЕМИ CRISPR CAS ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

Науковий керівник: Білько Д. І.

Stepanska D.

National University of "Kyiv-Mohyla Academy"

CRISPR-CAS SYSTEMS FOR TUBERCULOSIS DIAGNOSTICS

Supervisor: Bilko D.

Ключові слова: туберкульоз, CRISPR-Cas, ДНК, ПЛР, ізотермічна ампліфікація, молекулярна діагностика

Keywords: tuberculosis, CRISPR-Cas, DNA, PCR, isothermal amplification, molecular diagnostics

Рання та точна діагностика туберкульозу має вирішальне значення для зусиль з ліквідації туберкульозу, але діагностика туберкульозу залишається складною, і понад 35% оцінених випадків туберкульозу в усьому світі не діагностуються поточними зусиллями (2).

Тести CRISPR є високочутливими та специфічними, програмованими та простими у використанні. Ці функції дозволяють надчутливо виявляти мішені НК, присутні на слідових рівнях у складних зразках, швидко перемикаючи мішені з різними crRNA і розробку спрощених платформ для аналізу, які можна використовувати в умовах обмежених ресурсів.(2)

Аналізи CRISPR мають значні переваги перед звичайними тестами, коли вони використовуються для аналізу зразків із низькою концентрацією *Mtb*, і, отже, особливо корисні в популяціях, де це відома проблема (наприклад, маленькі діти, пацієнти, які живуть з ВІЛ, тощо). Наприклад, звичайні аналізи на туберкульоз демонструють дуже погану діагностичну ефективність у дітей, які живуть з ВІЛ, що є найгіршим сценарієм для цих аналізів. Проте аналіз крові на основі CRISPR на безклітинну ДНК *Mtb* діагностував 83,3% дітей.(2). Найнижча концентрація цільової одноланцюгової або дволанцюгової ДНК, виявлена Cas12b, становила близько 1 нМ. Поєднання технологій Cas12b і LAMP забезпечує специфічне виявлення лише 0,01 фМ ДНК.(1) що набагато нижче межі виявлення традиційних методів на основі ПЛР. Чутливість ПЛР складає концентрації на рівні 1–10 пікомоляр (пМ).

Подальший розвиток діагностичних інструментів на основі CRISPR обіцяє кардинально змінити молекулярну діагностику, зробивши її легкодоступною та доступною практично в будь-якій точці світу.(2)

Модифікований метод HOLMESv2 використовує ізотермічну ампліфікацію нуклеїнових кислот за допомогою Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) і розпізнавання цільових дволанцюгових або одноланцюгових ДНК-матриць за допомогою білка Cas12b з подальшою деградацією одноланцюгових флуоресцентних зондів ДНК за допомогою колатеральної активності Cas12b. Пік колатеральної активності досягається протягом 10 хвилин після розпізнавання Cas12b цільових одноланцюгових молекул ДНК і зніщується до 30 хвилин, коли Cas12b розпізнає

дволанцюгову ДНК. Ця властивість вказує на складні відмінності між Cas12b і Cas12a, причому перший білок є більш активним щодо дволанцюгової ДНК.(1)

Після виділення ДНК зразок піддається етапу ізотермічної ампліфікації, який має менші вимоги у порівнянні з методом ПЛР. На відміну від ПЛР, де температура циклічно змінюється (денатурація, відпал, елонгація), LAMP працює при одній постійній температурі — зазвичай 60–65°C, та є більш специфічним через використання 4-6 праймерів, що розпізнають 6-8 ділянок цільової ДНК.

ДНК мішень розпізнається crRNA, що кодує комплементарну послідовність, яка утворює crRNP з молекулами Cas12 або Cas13, що призводить до активації їх домену транс-розщеплення. Синтетичні репортерні олігонуклеотиди вивільняються з молекули гасника після транс-розщеплення crRNP і зчитування флуоресцентного сигналу. (3)

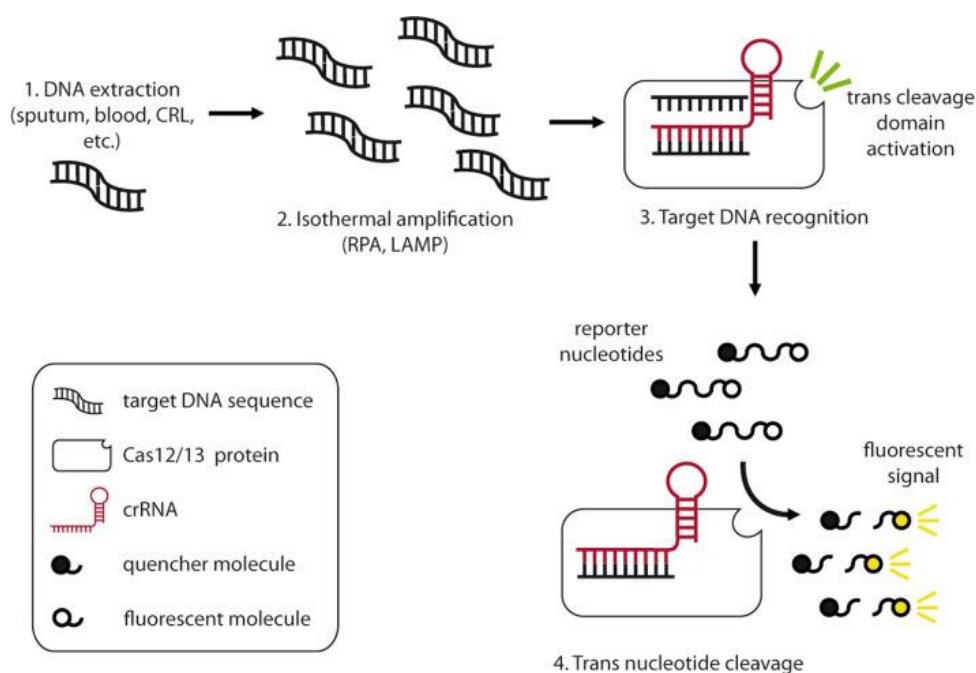


Рис. 1 Схема методу CRISPR-діагностики на основі CRISPR-Cas12b HOLMES

CRISPR-Cas12b HOLMES є перспективним інструментом для молекулярної діагностики туберкульозу, особливо в умовах обмежених ресурсів. Її використання може значно покращити раннє виявлення захворювання та сприяти ефективнішому контролю за його поширенням.

Підводячи підсумок, аналізи CRISPR-TB мають великий потенціал для покращення діагностики туберкульозу, але необхідні клінічні валідаційні дослідження, щоб дозволити регулятивним органам затвердити та комерціалізувати діагностику та оцінку лікування туберкульозу. (2)

Література

1. Kostyusheva A, Brezgin S, Babin Y, Vasilyeva I, Glebe D, Kostyushev D, Chulanov V. CRISPR-Cas systems for diagnosing infectious diseases. *Methods*. 2022 Jul;203:431-446. doi: 10.1016/j.ymeth.2021.04.007. Epub 2021 Apr 9. PMID: 33839288; PMCID: PMC8032595.
2. Huang Z, Zhang G, Lyon CJ, Hu TY, Lu S. Outlook for CRISPR-based tuberculosis assays now in their infancy. *Front Immunol*. 2023 Aug 3;14:1172035. doi: 10.3389/fimmu.2023.1172035. PMID: 37600797; PMCID: PMC10436990.
3. Zein-Eddine R, Refrégier G, Cervantes J, Yokobori NK. The future of CRISPR in Mycobacterium tuberculosis infection. *J Biomed Sci*. 2023 May 27;30(1):34. doi: 10.1186/s12929-023-00932-4. PMID: 37245014; PMCID: PMC10221753.