

УДК: 57.088.3

## ОДНОСТАДИЙНАЯ ОЧИСТКА CRISPR-НУКЛЕАЗЫ Cas13a МЕТОДОМ МЕТАЛЛ-ХЕЛАТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПОСЛЕ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ С СОХРАНЕНИЕМ КОЛЛАТЕРАЛЬНОЙ РИБОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2020 г. Л. К. Курбатов<sup>1, \*</sup>, С. П. Радько<sup>1, \*\*</sup>, С. В. Кравченко<sup>2</sup>,  
О. И. Киселёва<sup>1</sup>, Н. Д. Дурманов<sup>2</sup>, А. В. Лисица<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, Москва, 119121 Россия

<sup>2</sup>Тюменский государственный университет, Западно-Сибирский межрегиональный научно-образовательный центр, Тюмень, 625003 Россия

\*e-mail: kurbatovl@mail.ru

\*\*e-mail: radkos@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.04.2020 г.

После доработки 24.06.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

CRISPR/Cas13a-нуклеаза рассматривается сегодня как основа для создания нового поколения биосенсоров для ультрачувствительной, в том числе полевой детекции бактериальных и вирусных патогенов. Получена рекомбинантная Cas13a-нуклеаза с функциональной активностью в результате гетерологической экспрессии в *E. coli* с помощью простой одностадийной очистки металл-хелатной хроматографией с использованием N-концевой полигистидиновой метки. Упрощение процедуры очистки Cas13a-нуклеазы расширяет возможности разработки и практического использования диагностических биосенсорных систем на её основе. Масс-спектрометрическая идентификация показала, что неохарактеризованный ранее белок U2PWF1 *Leptotrichia wadei* является Cas13a-нуклеазой.

**Ключевые слова:** CRISPR-Cas, рибонуклеаза Cas13a, очистка, металл-хелатная хроматография, коллатеральная активность

**DOI:** 10.31857/S0555109920060070

CRISPR-нуклеазы являются неотъемлемой частью молекулярных систем CRISPR-Cas (CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; Cas, CRISPR associated protein), ответственных за иммунитет бактерий и архей к чужеродным генетическим элементам, таким как бактериофаги и плазмиды [1, 2]. Способность систем CRISPR-Cas селективно узнавать последовательности ДНК и расщеплять их в определенных местах легла в основу наиболее широко распространенной на сегодня технологии направленного редактирования геномов, в первую очередь с использованием нуклеазы Cas9 и ее генетически модифицированных вариантов (технология CRISPR-Cas9 [3]). Селективность узнавания определяется формированием комплекса Cas-нуклеазы с направляющей РНК (нРНК – guide RNA – gRNA), которая содержит участок (спейсер), комплементарный участку целевой ДНК (протоспейсер), и участок, ответственный за связывание с Cas-нуклеазой (повтор). При формировании гетеродуплекса “спейсер-протоспейсер” находящаяся в ком-

плексе с нРНК Cas-нуклеаза расщепляет ДНК-мишень при наличии в непосредственной близости к протоспейсеру определённого нуклеотидного мотива (PAM, protospacer adjacent motif) [3].

CRISPR-нуклеаза Cas13a принадлежит к VI типу CRISPR-Cas систем и обладает рядом особенностей, отличающих ее от большей части CRISPR-нуклеаз, включая Cas9. Cas13a является рибонуклеазой с функцией селективного узнавания целевой молекулы РНК (через формирование комплементарного дуплекса спейсера нРНК с соответствующим участком РНК-мишени) с последующим ее расщеплением, которое не зависит от наличия PAM [4, 5]. После активации и расщепления РНК-мишени нуклеаза теряет специфичность (активность только в отношении РНК-мишени) и приобретает так называемую ‘коллатеральную активность’, начиная расщеплять любые молекулы РНК. При этом коллатеральная активность Cas13a проявляется в условиях *in vitro* и при гетерологической коэкспрессии Cas13a и нРНК в бактериальных клетках, но отсутствует при их

экспрессии в эукариотических клетках [6, 7]. Следует отметить, что последнее создаёт основу для развития технологии направленного редактирования транскриптома.

Локусы, кодирующие нуклеазу Cas13a (ранее известную как C2c2), были впервые идентифицированы в геномах пяти бактериальных таксонов:  $\alpha$ -протеобактерии, *Bacilli*, *Clostridia*, *Fusobacteria* и *Bacteroidetes* [8]. В настоящее время в экспериментальных исследованиях наиболее интенсивно используются Cas13a-нуклеазы, кодируемые геномами бактерий рода *Leptotrichia* [4, 6, 9–11]. Экспериментальное тестирование 15 ортологов Cas13a показало, что LwaCas13a – Cas13a-нуклеаза, обнаруженная у вида *Leptotrichia wadei* – наиболее эффективно подавляет рост клеток *E. coli* при гетерологичной коэкспрессии Cas13a и нРНК [6]. Нуклеотидная последовательность гена нуклеазы LwaCas13a включает ~3.5 тыс. пар оснований и кодирует полипептид длиной 1162 аминокислотных остатка (а. о.), молекулярный вес белка ~138 кДа. Коллатеральная активность LwaCas13 была положена в основу недавно предложенного метода ультрачувствительной детекции бактерий и вирусов, получившего название SHERLOCK (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing) [11–13]. В методе SHERLOCK на первом этапе проводится изотермическая амплификация целевого фрагмента нуклеиновой кислоты, а затем – детекция продуктов амплификации с применением LwaCas13a в комплексе с нРНК. Коллатеральная активность LwaCas13a приводит к деградации добавленных в реакционную смесь коротких молекул РНК, меченных флуорофором и тушителем (РНК-субстрат или РНК-репортеры), с последующей регистрацией флуоресцентного сигнала [11–13]. Все реакции не требуют специализированного оборудования, а детекция может проводиться в формате тест-полосок (при замене флуорофора на биотиновую метку), что открывает перспективы для полевой диагностики бактериальных и вирусных патогенов [14]. Cas13a и аналогичные ей CRISPR-нуклеазы, чья коллатеральная активность проявляется при селективном узнавании заданных последовательностей в целевых ДНК и РНК, рассматриваются сегодня как основа для создания нового поколения биосенсоров с чувствительностью детекции на уровне единичных ДНК/РНК молекул [15].

В настоящее время рибонуклеазы Cas13a с высокой удельной коллатеральной активностью получают путем гетерологической экспрессии в *E. coli* с последующей трёхстадийной очисткой, включающей последовательно аффинную хроматографию (Strep-tag, 1), ионообменную хроматографию (2) и эксклюзионную ВЭЖХ (гель-фильтрацию, 3) [11–13].

Цель работы – показать возможность получения рекомбинантного белка Cas13a с высокой удельной коллатеральной РНКазной активностью в результате гетерологической экспрессии в *E. coli* с помощью одностадийной очистки методом металл-хелатной хроматографии с использованием *N*-концевой полигистидиновой метки (6xHis-tag) и гравитационных хроматографических колонок.

## МЕТОДИКА

Для бактериальной экспрессии белка Cas13a использовали плазмидный вектор pET His6-TwinStrep-SUMO-LwaCas13a, предоставленный компанией “Novoprolabs” (КНР; Кат. №V10159). Согласно спецификации поставщика, вектор идентичен плазмиде pC013 His6-TwinStrep-SUMO-LwCas13a, депонированной в репозиторий ADDGENE ([www.addgene.org/90097](http://www.addgene.org/90097)), которая была сконструирована для гетерологичной экспрессии рекомбинантного белка LwaCas13a [11]. Конструкция данного вектора предполагает индуцированную экспрессию с T7-промотора, при этом в последовательность целевого белка с *N*-конца включены последовательно 6xHis-tag/(Twin)Strep-tag/SUMO. Это позволило проводить очистку рекомбинантного белка с помощью либо металл-хелатной хроматографии, либо аффинной хроматографии на сефарозе с иммобилизованным Strep-Tactin.

Экспрессионный вектор pET His6-TwinStrep-SUMO-LwaCas13a был трансформирован в штамм Rosetta™ 2(DE3)pLysS Singles™ Competent Cells (“Merck”, Германия). Ночную культуру (2 мл) *E. coli*, выращенную на среде LB (“ДиаМ”, Россия) с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) и хлорамфеникола (34 мкг/мл), вносили в 300 мл среды Terrific Broth следующего состава (г/л): триптон – 12, пептон – 2, дрожжевой экстракт – 24 (“Becton Dickinson”, Франция), глицерин – 5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 12.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 2.3 и после добавления ампициллина до конечной концентрации 100 мкг/мл клетки культивировали при 37°C. Рост клеток контролировали измерением оптической плотности при 600 нм (D<sub>600</sub>). При достижении значения D<sub>600</sub> – 0.6 в культуру добавляли индуктор экспрессии изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 50 мкМ. Экспрессию целевого белка проводили в течение 16 ч при 18°C (если не указано иначе). Клетки осаждали центрифугированием (4000 g, 15 мин, 4°C), промывали фосфатно-солевым буфером (“Sigma-Aldrich”, США) и использовали для получения целевого белка.

Все операции по получению целевого белка проводились при 4°C. Осадок, полученный после осаждения клеток из 300 мл экспрессионной сре-

ды, ресуспендировали в буфере LEW (50 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 мМ  $\text{NaCl}$ , pH 8.0) из набора к колонкам Protino Ni-TED 1000. Дополнительно в буфер вносился лизоцим (“Sigma-Aldrich”, США) до конечной концентрации 1 мг/мл, фенилметансульфонил фторид (“Sigma-Aldrich”, США) до 1 мМ и ДНКазы (DNase I, “Roche”, Швейцария) до 1 мг/мл. После инкубации на льду в течение 30 мин клетки разрушали механическим способом на френч-прессе FA-078AE (“Thermo Electron Corporation”, США). Полученный гомогенат осветляли центрифугированием при 20 000 g, 40 мин, 4°C – и делили на две равные части. Каждую часть наносили на колонку Ni-TED. Очистку рекомбинантного белка проводили на колонках Protino Ni-TED 1000 (“Macherey-Nagel”, Германия) в соответствии с протоколом производителя. После промывания колонок, связавшийся белок элюировали буфером, содержащим 250 мМ имидазола, последовательно собирая фракции объемом 0.5 мл. Фракции анализировали методом электрофореза по Лэммли в 9%-ном ПААГ с окраской красителем Кумасси G-250 (“Bio-Rad”, США). Относительное количество целевого белка оценивали, сопоставляя площади пиков, соответствующих белковым полосам на геле, после их денситометрии на гель-сканере ImageScanner III (“GE Healthcare”, США). Очищенный аффинной хроматографией целевой белок переводили в буфер для хранения (600 мМ  $\text{NaCl}$ , 50 мМ трис- $\text{HCl}$ , pH 7.5, 5%-ный глицерин, 2 мМ ДТТ) с помощью диализа. Диализ проводили с использованием мембран SnakeSkin Dialysis Tubing 7000 MWCO (“Thermo Fisher Scientific”, США). Концентрацию целевого белка измеряли методом Брэдфорда, используя растворы БСА в качестве стандартов. Аликвоты раствора целевого белка хранили на –80°C.

Для масс-спектрометрической идентификации целевого белка представляющие интерес белковые полосы после электрофореза в ПААГ вырезали из полиакриламидного геля и подвергали трипсинолизу в геле в соответствии с протоколом, описанным в работе [16]. Полученную смесь пептидов анализировали на времяпролетном MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре Bruker Ultraflex II (“Bruker Daltonics”, Германия) и методом тандемной хромато-масс-спектрометрии (LC-ESI-MS/MS) на масс-спектрометре Orbitrap Q-Exactive (“Thermo Fisher Scientific”, США), соединенным с хроматографической системой Agilent HPLC 1100 Series (“Agilent Technologies”, США). В последнем случае использовали аналитическую колонку Zorbax 300SB-C18 (“Agilent Technologies”, США) с обращенной фазой.

Спектры пептидов, полученные методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, сравнивали с теоретически ожидаемыми спектрами из базы данных NCBI при помощи веб-платформы Mas-

cot Peptide Mass Fingerprint (“Matrix Science”, Великобритания), используя следующие параметры: точность измерения моноизотопных масс пептидов не хуже 50 м.д., пропионамидирование цистеина считали фиксированной модификацией, окисление метионина – вариабельной, допускали один пропуск сайта трипсинолиза. В случае LC-ESI-MS/MS, масс-спектры обрабатывали с помощью программных продуктов SearchGUI (v. 3.3.16) [17] и PeptideShaker (v. 1.16.42) [18]. Поиск проводили тремя поисковыми алгоритмами (X! Tandem, MS-GF+ и OMSSA) [19–21] в кастомизированных библиотеках белковых последовательностей, включающих последовательности белков *E. coli* K12 (Swiss-Prot, release 09-2019, 4533 белковые последовательности) и лабораторных белков-контaminантов cRAP (Swiss-Prot, release 01-2012, 115 последовательностей), а также последовательности белков *Leptotrichia wadei* (штамм F0279; UniProt Proteome ID UP000016626, 2277 белков) и *Leptotrichia buccalis* (UniProt Proteome ID UP000001910; 2218 белков). При обработке результатов хромато-масс-спектрометрического анализа устанавливали следующие параметры поиска: погрешность определения массы пептидного иона – 10 ppm, фрагментного иона – 0.05 Да, один пропуск сайта трипсинолиза, фиксированная модификация – карбамидометилирование цистеина, вариабельная – окисление метионина. Белок считали идентифицированным, если удавалось детектировать не менее двух протеотипических пептидов, на каждый из которых приходилось не меньше 2 совпадений теоретического спектра со спектром экспериментальным (peptide-spectra match, PSM). Отсечение по ложноположительным идентификациям как для пептидов, так и для белков было установлено на уровне 1%.

Для синтеза нРНК использовали ДНК-матрицу D8R, содержащую на 3'-конце участок, комплементарный последовательности промотора ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага T7, и олигонуклеотид T7F с последовательностью T7-промотора (табл. 1). ДНК-олигонуклеотиды были синтезированы компанией “Синтол” (Россия). Эквимолярную смесь олигонуклеотидов D8R и T7F отжигали для формирования дуплекса (2 мин при 96°C с охлаждением до 25°C со скоростью 2°C/с) и использовали для синтеза *in vitro* нРНК с помощью набора TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США), согласно инструкции производителя. Очистку нРНК от примесей проводили смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт 25 : 24 : 1 (“Acros Organics”, Бельгия) с последующим осаждением этанолом. Осадок растворяли в воде, свободной от нуклеаз, концентрацию нРНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (“Thermo Fisher Scientific”, США). Аликвоты рас-

**Таблица 1.** Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе. (Последовательность, комплементарная последовательности T7-промотора, показана курсивом. Полуужирным шрифтом выделена последовательность спейсера)

Название	Последовательность (5' → 3')
D8R	TTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGGTTTGTAGTCCCCTT CGTTTTTGGGGTAGTCTAAATCCCCTATAGTGAGTCGTATTA
T7F	TAATACGACTCACTATAGGG
нРНК	GGGGAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACC CAGCGUUCAAUCUGAGCCAUGAUGAAA

твора нРНК хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Последовательность нРНК представлена в табл. 1.

В качестве мишени для оценки эндонуклеазной активности полученного рекомбинантного белка использовали рибосомальную РНК 16S *E. coli* штамма XL1 Blue. Суммарную РНК *E. coli* выделяли с помощью реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия) согласно инструкции производителя. Реакционная смесь для оценки коллатеральной активности включала буфер (40 мМ Трис-НСI pH 7.3; 60 мМ NaCl; 6 мМ MgCl<sub>2</sub>), 45 нМ рекомбинантный белок, 22.5 нМ нРНК, 125 нМ субстрат из набора RNase Alert v2 (“Thermo Fisher Scientific”, США), 2 мкл ингибитора РНКаз (MURINE RNase Inhibitor, “New England Biolabs”, Великобритания), 100 нг референсной РНК (Universal Human Reference RNA, “Agilent Technologies”, США) в качестве фона и различное количество суммарной РНК *E. coli*. Перед добавлением суммарной РНК *E. coli*, референсной РНК и субстрата из набора RNase Alert v2, смесь инкубировали в течение 15 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ . После их добавления, реакционную смесь инкубировали 1.5–2 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . Флуоресценция, возникающая при деградации субстрата из набора RNase Alert v2 для оценки РНКазной активности, детектировалась с помощью планшетного ридера Infinite M200 PRO (“TECAN”, Швейцария), используя длины волн 490 и 520 нм для возбуждения и эмиссии, соответственно. Значения флуоресценции в указанный момент времени,  $F$ , и флуоресценции в начальный момент в отсутствие целевого белка,  $F_0$ , использовали для вычисления относительной флуоресценции,  $F/F_0$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время для очистки рекомбинантных рибонуклеаз Cas13a используется трёхстадийная схема, последовательно включающая аффинную (с помощью колонок с Strep-Tactin, иммобилизованным на сефарозе за счет Strep-tag целевого белка), катион-обменную и гель-фильтрационную хроматографию с промежуточным этапом концентрирования продукта и заменой буфера методом диализа для последующего хра-

нения препарата очищенного белка при  $-80^{\circ}\text{C}$  [11–13]. Следует отметить, что стадия аффинной хроматографии в этой схеме включает длительное инкубирование Strep-Tactin-сефарозы со связавшимся целевым белком с SUMO-протеазами для его элюции с сефарозы путем ферментатического удаления Strep-tag с N-конца полипептидной цепи целевого белка. Поскольку последовательность целевого белка, кодируемого вектором pET His6-TwinStrep-SUMO-LwaCas13a, также содержит гистициновую метку – 6xHis-tag, в рамках данной работы мы исследовали возможность одностадийной очистки предполагаемой рекомбинантной Cas13a-нуклеазы с помощью колонок Ni-TED. Как видно из рис. 1, после пропускания через колонки гомогената клеток *E. coli*, трансфицированных плазмидой pET His6-TwinStrep-SUMO-LwaCas13a, последующая элюция связавшегося материала содержащим имидазол буфером характеризуется присутствием белка с молекулярной массой, соответствующей с ожидаемой (~140 кДа), который является доминирующей белковой компонентой элюата.

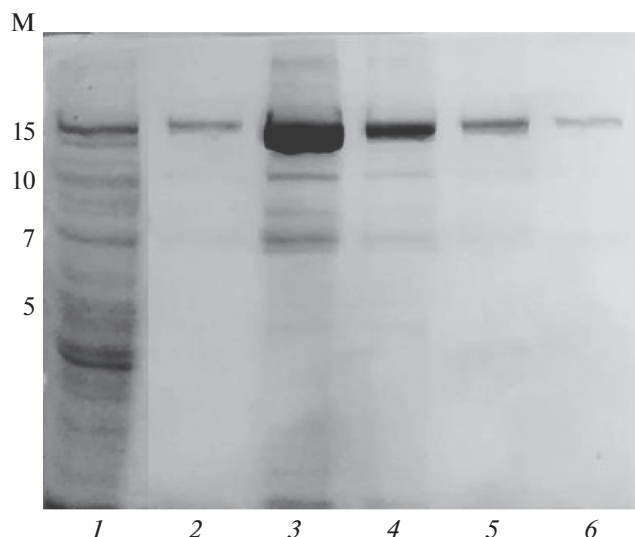
MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ пептидов, полученных в результате трипсинолиза белкового материала доминантной полосы в геле после ПААГ-электрофореза элюатов (отмечена стрелкой, рис. 1), позволил идентифицировать белок с высокой достоверностью как неохарактеризованный белок U2PWF1 *L. wadei*, штамм F0279 (ожидаемая длина белка – 1152 а. о.). Было зарегистрировано 38 пептидов, соответствующих расчетным пептидам – продуктам гидролиза белка U2PWF1 трипсином, которые покрывали 31% его последовательности (данные не показаны). Значение параметра ‘Mowse score’, определяющего достоверность идентификации белка в поисковой программе ‘Mascot’, составляло 172 (значение выше 96 соответствует достоверности идентификации более 95%; www.matrixscience.com). В настоящее время для генома *L. wadei* в базе данных NCBI присутствуют шесть геномных сборок, относящихся к шести штаммам, при этом ген, кодирующий не охарактеризованный белок U2PWF1, отсутствует по меньшей мере у двух штаммов – DSM 19186 и KA00185. Следует отметить, что в гено-

ме штамма F0279 *L. wadei* присутствует последовательность, аннотированная как Cas13a-нуклеаза, однако уровень ее сходства с последовательностью белка U2PWF1 составляла 26.2%. При поиске в базе данных UniProt с использованием программы BLAST наибольшая гомология найдена с Cas13a-нуклеазой из *L. buccalis* (80.7%). Во всех остальных случаях, включая Cas13a-нуклеазу из *Leptotrichia shahii*, гомология не превышала 25%. Предположение, что экспрессированный белок может представлять Cas13a-нуклеазу из *L. buccalis* (UniProt идентификатор C7NBY4), было опровергнуто хромато-масс-спектрометрическим анализом, в ходе которого было надежно детектировано 44 триптических пептида, равномерно картирующихся по всей аминокислотной последовательности U2PWF1 (данные не представлены). Значительная часть детектированных пептидов (15 из 44) являлась протеепептическими, то есть соответствующими исключительно последовательности белка U2PWF1 и никаким прочим белкам, включая Cas13a-нуклеазу из *L. buccalis*. Тем не менее, высокая гомология между белком U2PWF1 и Cas13a-нуклеазой из *L. buccalis* указывала на то, что с высокой вероятностью экспрессированный белок (соответственно, неохарактеризованный белок U2PWF1 *L. wadei*, штамм F0279) также являлся Cas13a-нуклеазой.

С целью исключения ошибки на уровне экспрессирующего вектора (поскольку он был получен не напрямую от ADDGENE) было проведено полное секвенирование вставки. По результатам данного секвенирования кодирующая белок вставка полностью соответствовала гену Lw-Cas13a из плазмиды pC013 [11]. В то же время следует отметить, что прямое сравнение в BLAST данного гена LwCas13a с кодирующей неохарактеризованный белок U2PWF1 последовательностью HMPREF9015\_01858 дает лишь 70% идентичности при 99% покрытии. Это обусловлено тем, что в вектор включена оптимизированная по кодонам последовательность для экспрессии в клетках млекопитающих.

Выход предполагаемой рекомбинантной Cas13a-нуклеазы при элюции с колонки был максимальным в третьей фракции (рис. 1), при этом в первой и восьмой фракциях целевой белок полностью отсутствовал. Существенное количество целевого белка также присутствовало в четвертой фракции. Материал третьей и четвертой фракций был объединен и использован для тестирования функциональной активности рекомбинантного белка как Cas13a-нуклеазы. Чистота препаратов Cas13a, полученных объединением третьей и четвертой фракций элюата, была в пределах 80–90%.

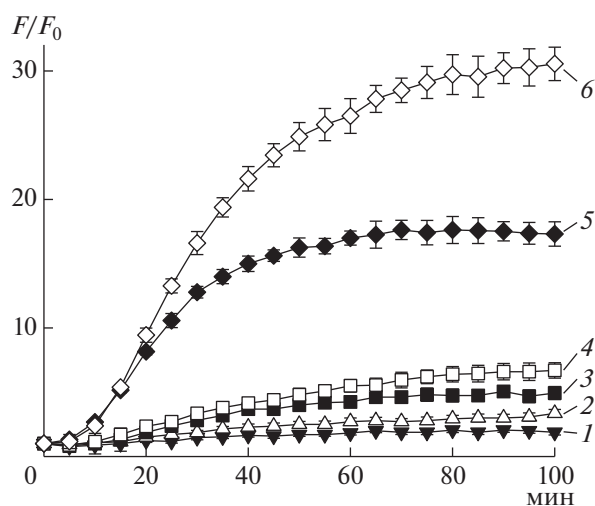
В качестве мишени для проверки функциональной активности очищенного белка была выбрана рибосомальная РНК 16S штамма XL1 Blue



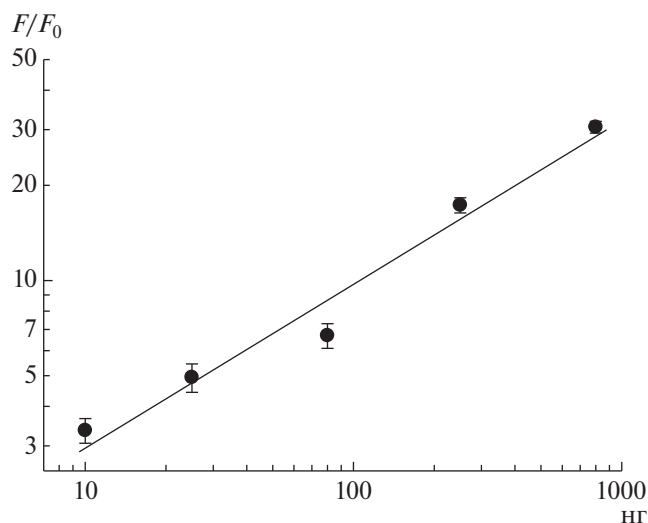
**Рис. 1.** Электрофорез в ПААГ исходного гомогената клеток *E. coli* и фракций элюата при очистке целевого белка металл-хелатной хроматографией на колонках Protino Ni-TED 1000. 1 – гомогенат клеток, 2–6 – фракции элюата, целевой белок обозначен стрелкой. М – метчики молекулярные массы, кДа.

*E. coli*. Такой выбор определялся доступностью данного штамма и простотой получения суммарной РНК, в которой рибосомальная РНК 16S была одной из доминирующих. Последовательности возможных нРНК были подобраны с помощью программы CRISPR-RT [22], исходя из того, что полученный рекомбинантный белок представлял рибонуклеазу LwaCas13a. Последующий анализ вторичной структуры предложенных программой CRISPR-RT последовательностей нРНК с помощью программы Mfold [23] показал, что среди них присутствовало значительное число последовательностей, у которых с высокой вероятностью могли образовываться нежелательные дуплексные участки между последовательностями спейсера и повтора. Такие дуплексы могли препятствовать формированию последовательностью повтора характерной шпильчатой структуры, ответственной за взаимодействие с Cas13a [11]. В результате проведенного анализа, последовательность нРНК, представленная в табл. 1, была выбрана как наиболее оптимальная. Последовательность спейсера данной нРНК комплементарна участку с 12 по 40 нуклеотид молекулы 16S РНК *E. coli* (протоспейсер).

Оценка функциональной рибонуклеазной активности полученного рекомбинантного белка, проведенная с помощью набора для детекции рибонуклеазной активности RNase Alert v2, показала, что в отсутствие РНК-мишени белок не проявлял рибонуклеазной активности (рис. 2). Однако при добавлении РНК-мишени наблюдалось развитие флуоресцентного сигнала, связанное с расщеплением РНК-репортеров в результате по-



**Рис. 2.** Зависимость относительной флуоресценции ( $F/F_0$ ), флуоресцентно-меченного РНК-субстрата от времени инкубации (мин) с целевым белком при 37°C. 1 – изменение флуоресценции в отсутствии РНК-мишени; 2, 3, 4, 5 и 6 – в присутствии 10, 25, 80, 250 и 800 нг суммарной РНК *E. coli* соответственно. Показаны среднеарифметические значения и среднеквадратичные отклонения для трехкратных измерений.



**Рис. 3.** Изменение относительной флуоресценции  $F/F_0$  после инкубации в течение 100 мин флуоресцентно-меченного РНК-субстрата с целевым белком при 37°C как функция количества суммарной РНК *E. coli* (нг).

явившейся рибонуклеазной активности. Таким образом, полученный рекомбинантный белок обладает мишень-зависимой коллатеральной рибонуклеазной активностью, типичной для Cas13a-нуклеаз. В серии последовательных разведений суммарной РНК *E. coli* была показана зависимость развития флуоресцентного сигнала от кон-

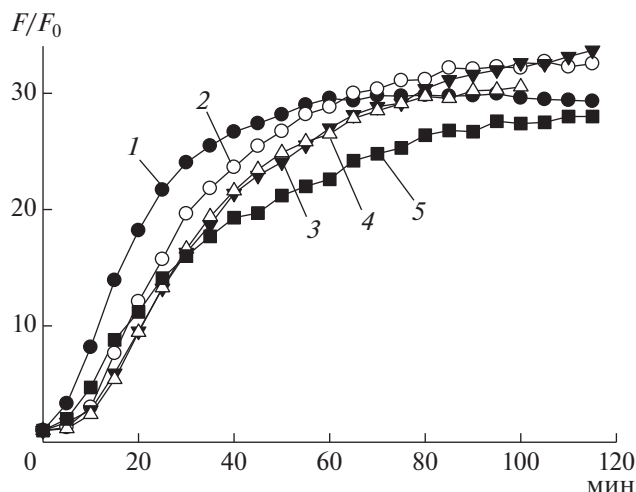
центрации мишени, которая в логарифмических координатах могла быть хорошо аппроксимирована линейной функцией (рис. 3).

Экспрессия функционально активной рекомбинантной рибонуклеазы Cas13a проводилась при 18°C. В рамках данной работы были протестированы разные температуры культивирования клеток после индукции экспрессии (от 18 до 37°C) и их влияние на уровень экспрессии и функциональную активность целевого белка. Установлено, что повышение температуры до 37°C приводило к тому, что целевой белок за 16 ч инкубации практически весь переходил в клетках в нерастворимую форму. Интересно, что инкубация в температурном диапазоне от 25 до 30°C позволяла получать Cas13a-нуклеазу в растворимой форме, однако полученный при этом рекомбинантный белок проявлял неспецифическую рибонуклеазную активность. Это проявлялось в том, что рекомбинантная Cas13a-нуклеаза расщепляла РНК-репортеры в отсутствие РНК-мишени. Можно предположить, что фолдинг Cas13a-нуклеазы протекал различно при разных температурах. Хотя культивирование при 18°C приводило к относительно невысокому уровню экспрессии целевого белка (количество чистого белка, которое получается в этих условиях, составляло ~1 мг на 100 мл среды), оно обеспечивало экспрессию функционально активной Cas13a-нуклеазы. Также дополнительно кроме штамма Rosetta™ 2(DE3)pLysS была исследована возможность экспрессии Cas13a-нуклеазы в таких штаммах *E. coli*, как BL21(DE3)pLysS и BL21-Gold, трансформированных вектором pET His6-TwinStrep-SUMO-LwaCas13a. Однако уровень экспрессии целевого белка в этих штаммах был крайне низким.

Было протестировано также, как длительность хранения полученного рекомбинантного белка влияла на его мишень-зависимую коллатеральную рибонуклеазную активность. Как видно из рис. 4, в течение 5-месячного хранения белка в концентрации 1.3 мг/мл при -80°C, коллатеральная активность несколько уменьшалась со временем. В отсутствие мишени существенной рибонуклеазной активности не наблюдалось во всех экспериментах. Однако это уменьшение больше проявлялось в замедлении кинетики расщепления РНК-репортеров, и в меньшей степени в уровне флуоресценции, достигаемом к концу 2-часовой инкубации.

Возможность одностадийной очистки Cas13a-нуклеазы была также недавно показана в работе [24]. Используя экспрессионную конструкцию, содержащую ген *cas13a L. wadei* с оптимизированным кодоновым составом, авторы получили функционально активный препарат Cas13a с помощью гетерологической экспрессии в *E. coli*. Однако удельная активность полученного препарата была





**Рис. 4.** Зависимость функциональной активности Cas13a-нуклеазы от времени хранения. 1 — кинетика относительной флуоресценции ( $F/F_0$ ) при инкубации флуоресцентно-меченного РНК-субстрата со свежеприготовленной Cas13a-нуклеазой; 2, 3, 4 и 5 — то же после хранения при  $-80^\circ\text{C}$  в течении 1, 2, 3.5 и 5 мес. соответственно. Количество суммарной РНК *E. coli* — 800 нг. Показаны среднеарифметические значения для трехкратных измерений; относительные среднеквадратичные отклонения не превышали 15%.

сравнительно низка — деградация субстрата из набора RNase Alert наблюдалась при концентрации Cas13a 450 нМ, тогда как в экспериментах в настоящей работе для достижения сопоставимой активности было достаточно 45 нМ Cas13a-нуклеазы. Возможно, чистота препарата целевого белка методом одностадийной очистки, предложенном в работе [24], была ниже, чем в настоящей. Различие в активности также могло быть обусловлено функциональными свойствами белков, полученных в разных штаммах, при разных условиях культивирования и с использованием по-разному оптимизированных генных последовательностей.

Таким образом показано, что рекомбинантная Cas13a-нуклеаза с мишень-зависимой коллатеральной РНКазной активностью может быть получена после гетерологической экспрессии в *E. coli* с помощью простой одностадийной очистки металл-хелатной хроматографии с использованием *N*-концевой полигистидиновой метки. Это расширяет возможности исследования Cas13a-нуклеаз как основы для разработки диагностических биосенсорных систем нового поколения и их последующего практического использования. Кроме того, полученные результаты указывают на то, что неохарактеризованный белок U2PWF1 *L. wadei* представляет собой Cas13a-нуклеазу.

Авторы выражают благодарность Ю.В. Колтевцеву (Сколтех) за дискуссию о перспективах CRISPR-детекторов и сотрудникам ИБМХ

им. В.Н. Ореховича И.Ю. Торопыгину и В.Г. Згода за помощь в проведении масс-спектрометрического анализа.

В работе использовалось оборудование ЦКП “Протеом человека” ИБМХ им. В.Н. Ореховича

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. van der Oost J., Westra E.R., Jackson R.N., Wiedenheft B. // Nat. Rev. Microbiol. 2014. V. 12. № 7. P. 479–492.
2. Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F. // Curr. Opin. Microbiol. 2017. V. 37. P. 67–78.
3. Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. // Cell. 2014. V. 157. № 6. P. 1262–1278.
4. 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. // Science. 2016. V. 353. № 6299. P. aaf5573.
5. Pickar-Oliver A., Gersbach C.A. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2019. V. 20. № 8. P. 490–507.
6. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Essletzbichler P., Han S., Joung J., Belanto J.J., Verdine V., Cox D.B.T., Kellner M.J., Regev A., Lander E.S., Voytas D.F., Ting A.Y., Zhang F. // Nature. 2017. V. 550. № 7675. P. 280–284.
7. Cox D.B.T., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Franklin B., Kellner M.J., Joung J., Zhang F. // Science. 2017. V. 358. № 6366. P. 1019–1027.
8. Shmakov S., Abudayyeh O.O., Makarova K.S., Wolf Y.I., Gootenberg J.S., Semenova E., Minakhin L., Joung J., Konermann S., Severinov K., Zhang F., Koonin E.V. // Mol. Cell. 2015. V. 60. № 3. P. 385–397.
9. Tambe A., East-Seletsky A., Knott G.J., Doudna J.A., O’Connell M.R. // Cell Rep. 2018. V. 24. № 4. P. 1025–1036.
10. East-Seletsky A., O’Connell M.R., Knight S.C., Burstein D., Cate J.H., Tjian R., Doudna J.A. // Nature. 2016. V. 538. № 7624. P. 270–273.
11. 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. // Science. 2017. V. 356. № 6336. P. 438–442.
12. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Kellner M.J., Joung J., Collins J.J., Zhang F. // Science. 2018. V. 360. № 6387. P. 439–444.
13. Kellner M.J., Koob J.G., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Zhang F. // Nat. Protoc. 2019. V. 14. № 10. P. 2986–3012.
14. Myhrvold C., Freije C.A., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Metsky H.C., Durbin A.F. et al. // Science. 2018. V. 360. № 6387. P. 444–448.
15. Li Y., Li S., Wang J., Liu G. // Trends Biotechnol. 2019. V. 37. № 7. P. 730–743.

16. Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M. // Nat. Protoc. 2006. V. 1. № 6. P. 2856–2860.
17. Barsnes H., Vaudel M. Searchgui: // J. Proteome Res. 2018. V. 17. № 7. P. 2552–2555.
18. Vaudel M., Burkhart J.M., Zahedi R.P., Oveland E., Berven F.S., Sickmann A., Martens L., Barsnes H. // Nat. Biotechnol. 2015. V. 33. № 1. P. 22–24.
19. Bjornson R.D., Carriero N.J., Colangelo C., Shifman M., Cheung K.H., Miller P.L., Williams K. // Proteome Res. 2008. V. 7. № 1. P. 293–299.
20. Kim S., Pevzner P.A. // Nat. Commun. 2014. V. 5. P. 5277.
21. Geer L.Y., Markey S.P., Kowalak J.A., Wagner L., Xu M., Maynard D.M., Yang X., Shi W., Bryant S.H. // J. Proteome Res. 2004. V. 3. № 5. P. 958–964.
22. Zhu H., Richmond E., Liang C. // Bioinformatics. 2018. V. 34. № 1. P. 117–119.
23. Zuker M. // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. № 13. P. 3406–3415.
24. Савинова А.С., Контев Е.Ю., Усачев Е.В., Ткачук А.П., Гушин В.А. // Вестник РГМУ. 2018. Т. 2. P. 21.

## Single Stage Purification of CRISPR/Cas13a Nuclease by Metal-Chelating Chromatography Following Heterologous Expression with Preservation of Collateral Ribonuclease Activity

L. K. Kurbatov<sup>a,\*</sup>, S. P. Radko<sup>a,\*\*</sup>, S. V. Kravchenko<sup>b</sup>, O. I. Kiseleva<sup>a</sup>,  
N. D. Durmanov<sup>b</sup>, and A. V. Lisitsa<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>*N.V. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121 Russia*

<sup>b</sup>*University of Tyumen, West Siberia Interregional Research and Educational Center, Tyumen, 625003 Russia*

\*e-mail: kurbatovl@mail.ru

\*\*e-mail: radkos@yandex.ru

CRISPR/Cas13a nucleases whose collateral ribonuclease activity is revealed upon selective recognition of targeted RNA sequences are considered today as a basis for the development of new generation biosensors for the ultrasensitive in-field detection of bacterial and viral pathogens. To produce the recombinant Cas13a nuclease, a three stage purification procedure is presently employed including consequently affinity (Strep-tag), ion-exchange, and exclusion chromatography. In this work we demonstrated that recombinant Cas13a nuclease can be purified after heterologous expression in *E. coli* by a single step metal-chelating chromatography, utilizing the *N*-terminal polyhistidine tag. The simplified procedure of Cas13a nuclease purification broadens possibilities for a development and further practical application of Cas13a based diagnostic biosensing systems. Besides, our results indicate that currently uncharacterized proteins U2PWF1 of *Leptotrichia wadei* represents Cas13a nuclease.

**Keywords:** CRISPR-Cas, Cas13a ribonuclease, purification, metal-chelating chromatography, collateral activity