

Тест-система для детекции хромосомных перестроек с использованием *in vitro* cleavage assay на основе нуклеазы Cas12a

В.В. Шептий, А.Д. Золотаренко, С.А. Брускин*

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

* brouskin@vigg.ru

Ключевые слова: Cas12a; молекулярная диагностика; разрезание *in vitro*

In vitro cleavage assay for the detection of chromosomal rearrangements in clinical samples using Cas12a nuclease

V.V. Sheptiy, A.D. Zolotareno, S.A. Bruskin*

Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia

* brouskin@vigg.ru

Key words: Cas12a; molecular diagnostics; *in vitro* cleavage assay

Развитие методов геномного редактирования на основе систем CRISPR/Cas открывает новые горизонты в молекулярной диагностике. В частности, использование программируемых нуклеаз для проведения диагностики *in vitro* позволило разработать такие специфичные и высокочувствительные инструменты, как DETECTR (на основе нуклеазы Cas12a) и SHERLOCK (на основе Cas13), для определения присутствия целевой (например, вирусной) нуклеиновой кислоты в образце.

В рамках данного проекта мы разработали прототип диагностической платформы для детекции хромосомных перестроек, который основан на *in vitro* cleavage assay с применением рекомбинантного белка Cas12a. В отличие от систем на основе Cas9, Cas12a работает с одной направляющей РНК, что упрощает дизайн и производство реагентов. Предлагаемая тест-система позволяет выявить мутации: хромосомные перестройки, инсерции и делеции – в клинических образцах.

Система основана на детекции сайта-мишени с помощью направляющей РНК, его разрезании с образованием липких концов, обогащении смеси целевыми фрагментами, приготовлении библиотеки и последующем высокопроизводительном секвенировании. Анализ результатов секвенирования позволяет не только подтвердить наличие перестройки, но и оценить ее представленность в образце, что является критическим преимуществом по сравнению с классическими методами. За счет применения нуклеазы Cas12a, образующей в ходе редактирования липкие концы, лигирование адаптеров происходит более эффективно, что делает систему более экономичной.

В ходе реализации разработки было проведено тестирование активности полученного рекомбинантного белка и направляющих РНК на синтетической матрице путем *in vitro* cleavage assay. Анализ подтвердил активность и специфичность разработанной системы. Таким образом, система детекции на основе Cas12a представляет собой перспективную альтернативу существующим подходам для детекции хромосомных перестроек, обеспечивая высокую точность и возможность количественной оценки.

Финансирование: Исследование проведено в рамках государственного задания ИОГен РАН «Изучение генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека», № 125040704886-1.