

М.Ж. Аманжолова^{1,2}, А.М. Шайзадинова³, С.К. Абельденов^{1*}

¹Национальный центр биотехнологии МЗ РК, Астана, Казахстан;

²Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, Астана, Казахстан;

³Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

*Автор для корреспонденции: abeldenov@gmail.com

Экспрессия и очистка рекомбинантной ДНК эндонуклеазы CRISPR/Cas системы

В настоящее время ведется активная исследовательская работа по изучению и применению сайт-специфических РНК-направляющих эндонуклеаз в качестве инструментов для использования в области геномного редактирования и диагностики в биомедицинской и биотехнологической сфере. На сегодняшний день наиболее эффективным методом в этой области является метод CRISPR. Благодаря своей простоте нацеливания эта система была быстро принята в качестве метода выбора для редактирования геномов множества организмов. Совсем недавно в бактериальных геномах была обнаружена еще одна новая эндонуклеаза CRISPR-Cas класса 2 с характерными особенностями: Cas12a. Фермент Cas12a — это сайт-специфическая РНК-направляющая эндонуклеаза, которая может быть использована для точного редактирования генома в различных типах клеток разных видов, а также применяться в диагностике. Поиск, идентификация и характеристика новых неизученных гомологов расширит потенциал использования ферментов. В данной работе проведена экспрессия и двухэтапная хроматографическая очистка рекомбинантного фермента Cas12a высокой чистоты. Были получены *in vitro* синтезированные сгРНК, рибонуклеопротеиновый комплекс, и была подтверждена эндонуклеазная активность фермента в отношении субстрата, содержащего целевую последовательность для расщепления в соответствующем сайте. Полученный фермент может быть использован для дальнейшего описания его кинетических параметров, которые могут быть применены в разработке новых диагностик следующего поколения.

Ключевые слова: CRISPR, рекомбинантный белок, эндонуклеаза, аффинная хроматография, сгРНК, диагностика, нуклеиновые кислоты.

Введение

Благодаря быстрому развитию технологий высокопроизводительного секвенирования и биоинформатики ученые за короткое время добились больших успехов в области геномного редактирования. Новый подход, названный «редактирование генома», широко используется в исследованиях функциональной геномики, трансгенных организмов и генной терапии в течение последних нескольких лет. Редактирование генома основано на сконструированных, программируемых и высокоспецифичных нуклеазах, которые могут индуцировать сайт-специфические изменения в геномах клеточных организмов. Последующий процесс репарации клеточной ДНК создает вставки, делеции или замены в интересующих локусах [1].

На данный момент все большую популярность набирает метод CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), или сгруппированные, регулярно расположенные короткие полиндромные повторы. Этот метод является отличной альтернативой уже существующих механизмов геномного редактирования, таких как ZFN и TALEN. В отличие от данных методов, CRISPR зависит от малых РНК для специфичного к последовательности расщепления [2]. Ключевым ферментом данного метода изначально выступала эффекторная нуклеаза Cas9 [3]. Однако в ходе поиска и расшире-

ния спектра используемых гомологов были обнаружены и охарактеризованы другие типы эндонуклеаз, одним из которых является Cas12a. CRISPR-Cas12a класса II типа V — это новая РНК-управляемая эндонуклеаза, которая недавно была использована в качестве альтернативного инструмента редактирования генома. Преимуществом данного типа фермента является использование одного вида малой РНК — crРНК [4]. В последнее время технологии CRISPR/Cas систем с использованием Cas12a эндонуклеазы широко используются в диагностических и аналитических исследованиях благодаря их высокой чувствительности, специфичности и надежности. В настоящей работе описывается получение рекомбинантной эндонуклеазы Cas12a (*Moraxellaequi*).

Материалы и методы

Очистка рекомбинантного белка Cas12a.

Для получения рекомбинантного белка Cas12a клетки *E. coli* Rosetta 2 (DE3) использовали плазмидур ET28c(+)/Cas12a (синтезирована в GenScript). Единичную трансформированную колонию культивировали в бульоне LB с канамицином (50 мкг/мл) до середины экспоненциальной (логарифмической) фазы (OD₆₀₀=0,6). Клетки индуцировали 0,2мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG). Инкубацию индуцированных клеток продолжали при комнатной температуре при 100 об/мин в течение 16 ч. Клетки собирали при + 4 °С, 6000 × g в течение 7 мин. Осадок ресуспендировали в буфере 20 мМ TrisрН8,0, 50 мМ NaCl с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (RocheDiagnostics). Клетки инкубировали с лизоцимом в концентрации 3 мг/мл в течение 20 мин при комнатной температуре и дополнительно обрабатывали ультразвуком (50 кГц) в импульсном режиме на льду. Лизат центрифугировали при + 4 °С, 40 000 × g в течение 1 ч. В осветленном лизате концентрацию NaCl довели до 500 мМ. Осветленный лизат загружали в колонку HisTrapHP (GEHealthcare), активированную ионами Ni²⁺. С помощью хроматографа FPLCAKТАPurifier 10 (GEHealthcare) фракционировали в линейном градиенте имидазола от 20 мМ до 500 мМ. Полученные фракции с целевым белком объединяли и загружали в колонку HiTrapHeparinHP (GEHealthcare), после чего фракционировали в линейном градиенте от 50 мМ до 1000 мМ NaCl. Гомогенность полученных фракций проверяли разделением в 12 % ПААГ-ДСН. Для очистки и фракционирования элюата в линейном градиенте NaCl от 50 мМ до 1 М использовали хроматографическую систему FPLCAKТАPurifier 10 (GEHealthcare). Фракции, содержащие рекомбинантный белок, хранили при –20 °С в 50 % глицерине.

Синтез crРНК

crРНК для анализа расщепления *in vitro* синтезировали с использованием набора HiScribeT7 High-YieldRNASynthesisKit (NewEnglandBiolabs). Набор для синтеза РНК T7 HighYield разработан для транскрипции РНК *in vitro* с использованием T7 РНК-полимеразы. Олигонуклеотидные дуплексы ДНК, соответствующие последовательности РНК-мишени, синтезировали в РГП «Национальный центр биотехнологии» (Лаборатория органического синтеза) и отжигали друг с другом. Синтезированные ДНК олигонуклеотиды были использованы в качестве матриц для *in vitro* транскрипции с помощью набора для синтеза РНК при условии, что они содержали двухцепочечную промоторную область T7 перед транскрибируемой последовательностью. При дизайне гидовых РНК была учтена ее длина, поэтому для фермента Cas12a был проведен синтез целевых последовательностей протяженностью не менее 16 нуклеотидов для достижения расщепления целевой ДНК *in vitro*. В качестве целевой последовательности выступала последовательность гена нуклеокапсидного белка возбудителя COVID–19 — SARS-CoV2. Транскрипцию проводили в течение 4 ч при 37°С. Протокол реакции был следующим: вода, свободная от нуклеаз, 10X реакционный буфер — 2 мкл; АТФ/ГТФ/УТФ/ЦТФ 100 мМ — 2 мкл (10 мМ конечная концентрация); матричная ДНК; смесь T7 РНК полимеразы; общий объем реакции — 20 мкл. Очистку синтезированной РНК проводили с помощью набора Monarch® RNA CleanupKit (NewEnglandBiolabs).

Олигонуклеотиды

Для получения дуплексов с целью дальнейшей транскрипции были использованы следующие олигонуклеотиды:

crРНК-T7	GAACGCTGAAGCGCTGGGGGATCTACACTTAGTAGAAATTACCCTATAGTGAGTCGTA TTAGAATT
crРНК-T7-compl	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGTAATTTCTACTAAGTGATAGATCCCCAGCGCTTC AGCGTTC

Для получения ПЦР продукта ДНК-субстрата были использованы следующие олигонуклеотиды:
 substrate-FWD ААТТСТААТАСГАСТСАСТАТАГГГАСТССАГГСАГСАГТАГГГГААСТТСТС
 substrate-REV СТГТТТСТТСТГТСТТСТГСГГТААГГСТТГ

Cas12a in vitro реакция

Для анализа расщепления *in vitro* комплекс crРНК-Cas12a формировали путем инкубации 1 мкг crРНК и 2 мкг Cas12a в течение 10 мин при 25 °С. Далее добавляли ДНК-субстрат (300 нг) и совместно инкубировали при 37°С в течение 30 мин.

Электрофорез

Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот проводили в 1 % агарозном геле в буфере ТАЕ. Разделение проводили при напряжении 110 В, время 30 мин. Детекция осуществлялась при ультрафиолетовом излучении на длине волны 312 нм.

Электрофоретическое разделение белков проводили по методу Лэммли [5] в 12 % полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Электрофорез осуществляли при 150 В в течение 1 ч. Окрашивание гелей проводили с использованием Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) в 10 % уксусной кислоте и 50 % этаноле.

Определение концентрации белка

Количественное определение концентрации белка определяли по Бредфорду [6].

Результаты и их обсуждение

Выбор экспрессионного штамма для наработки рекомбинантного белка Cas12a

Для наработки рекомбинантного белка была проведена работа по подбору экспрессионного штамма. Были использованы следующие штаммы *E. coli*: ArcticExpress (DE3) RP, BL21 (DE3) и Rosetta2 (DE3). Накопление рекомбинантного белка Cas12a во фракциях тотального экстракта и растворимой фракции культур *E. coli* происходит уже через 3 ч инкубации с ИПТГ и продолжается на протяжении всего периода инкубации. Для экспрессии рекомбинантного белка Cas12a был выбран штамм Rosetta2 (DE3). Электрофореграмма по индукции рекомбинантного белка в течение 16 ч представлена на рисунке 1.

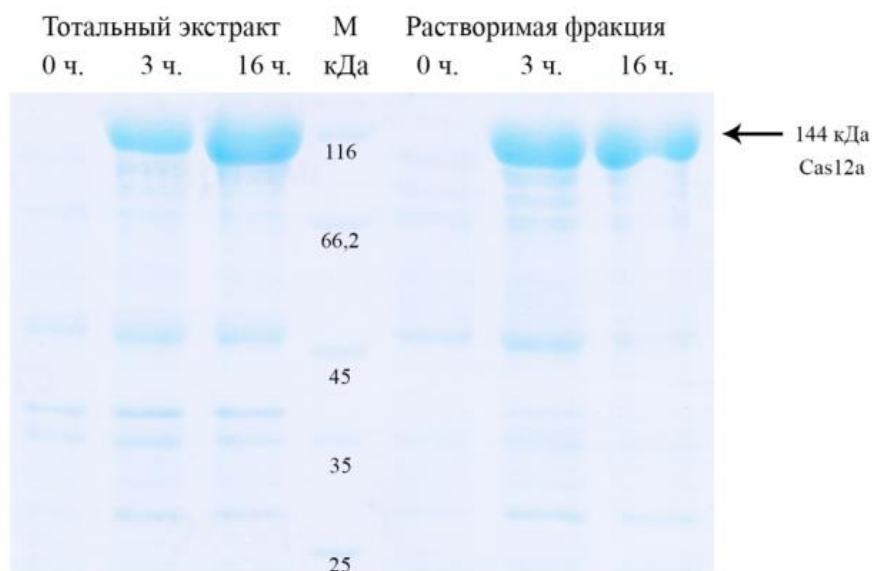


Рисунок 1. Пробная индукция рекомбинантного белка Cas12 в культуре *E. coli* Rosetta2 (DE3)

Очистка рекомбинантного белка методом аффинной хроматографии

В синтезированной генетической конструкции рЕТ-28с(+)/Cas12a результирующий белок Cas12a содержит дополнительный домен из 20 аминокислот на N-конце, содержащий шестигисти-

новую метку. Таким образом, рекомбинантный Cas12a белок состоит из 1250 аминокислотных остатков, общей расчетной молекулярной массой 144 кДа.

Очистку рекомбинантного белка Cas12a проводили из 600 мл культуры с помощью металлохелатной хроматографии на ионах Ni^{2+} с использованием колонки HisTrapHP 1 ml. После наработки культуры в объеме 600 мл осветленный лизат нанесли на HisTrapHP колонку и провели хроматографическую очистку Cas12a на ионах Ni^{2+} . На рисунках 2 и 3 представлены хроматограмма и результат белкового электрофореза фракционированных элюатов.

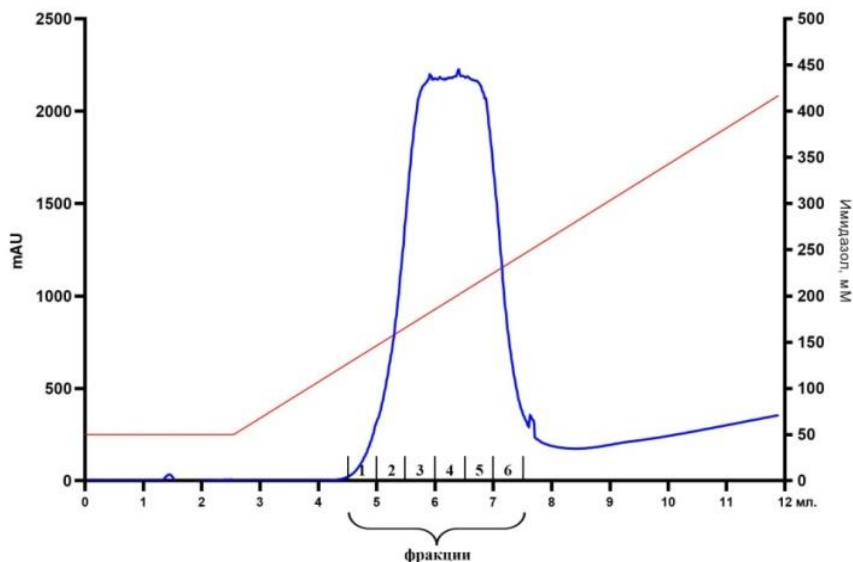


Рисунок 2. Результат хроматографической очистки рекомбинантной эндонуклеазы Cas12a из водорастворимой фракции на HisTrapHP колонке

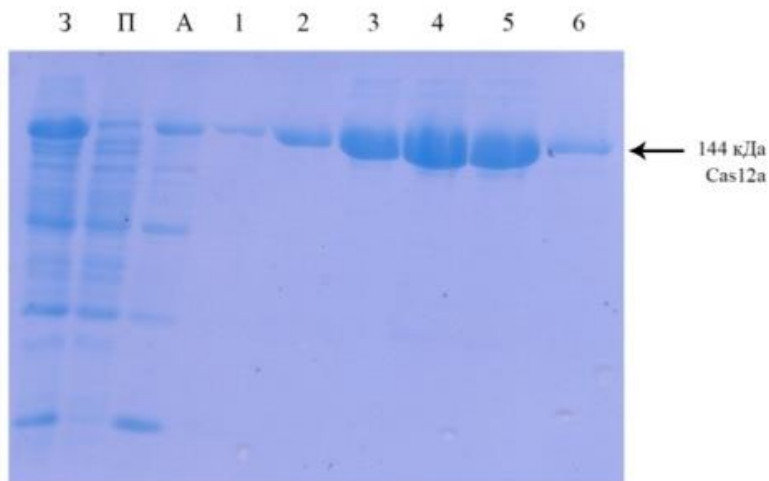


Рисунок 3. Электрофореграмма отобранных фракций: 3 — фракция загрузки образца; П — фракция проскока образца; А — фракция промывки колонки буфером А; 1–6 — фракции, отобранные при использовании линейного градиента по имидазолу

Согласно результатам, приведенным на рисунке 3, целевой белок Cas12a недостаточно чистый, и во фракциях содержались контаминирующие примеси других белков. Согласно результатам рисунка 2 белок элюировал при 160–240 mM концентрации имидазола. Фракции под номером 3–5 были объединены, и была проведена дополнительная хроматографическая очистка Cas12a на гепариновой ко-

лонке, так как белок является ДНК-связывающим ферментом, а иммобилизованный в колонке гепарин имеет мимикрирующие ДНК свойства. Хроматограмма и электрофореграмма фракционированных элюатов представлены на рисунках 4 и 5.

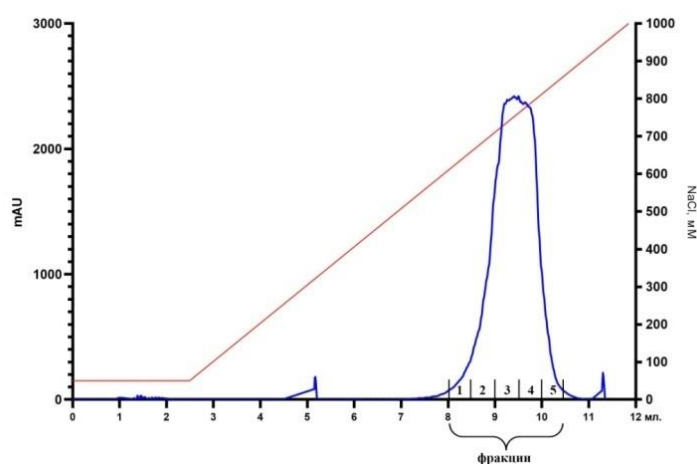


Рисунок 4. Результат хроматографической очистки рекомбинантной эндонуклеазы Cas12a на гепариновой колонке (HiTrapHeparinHP)

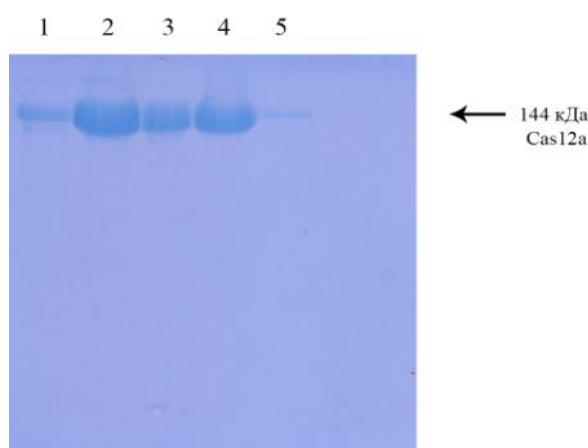


Рисунок 5. Электрофореграмма отобранных фракций (цифрами 1–5 обозначены полученные фракции белка)

Таким образом, в результате хроматографической очистки с 600 мл индуцированной культуры было получено 5 мг рекомбинантного белка Cas12a. Очищенный Cas12a обладает более 99 % чистоты и не содержит значительного количества примесей белков.

Определение эндонуклеазной активности Cas12a

Для подтверждения активности полученного высокоочищенного белка Cas12a был проведен соответствующий анализ. Активность белка была проверена на ДНК-субстрате, содержащий ген нуклеокапсида коронавируса. Для этого в 25 мкл реакционной смеси были использованы такие компоненты, как очищенная вода без содержания нуклеаз, реакционный буфер 10x, 1мкгсРНК, 2мкгCas12a и ДНК-субстрат в виде продукта ПЦР. Реакцию останавливали путем добавления ProteinaseK.

Подготовка ДНК-матрицы (дуплекса) для получения сРНК: для *invitro* транскрипции в качестве матрицы выступали синтетические ДНК-олигонуклеотиды, содержащие двухцепочечную область T7 промотора перед последовательностью, необходимой для транскрипции. Минимальная последовательность промотора T7 представляет собой: 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАGГG. На рисунке 6 представлен анализ активности полученного белка в агарозном электрофорезе (рис. 6).

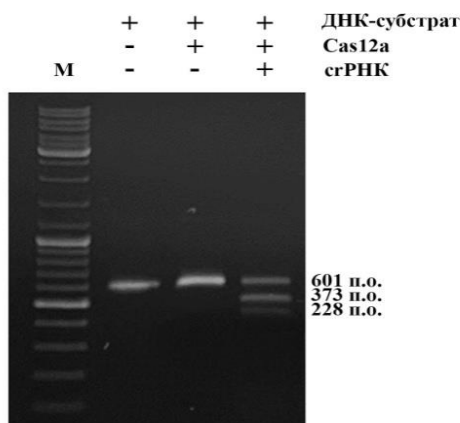


Рисунок 6. Визуализация активности полученной эндонуклеазы Cas12a

Для образования сборки рибонуклеопротеинового комплекса достаточно активного комплекса с Cas12a и опосредования РНК-направляемого расщепления ДНК, были поставлены реакции только с ДНК-субстратом (1), с ДНК-субстратом и ферментом (2), и с ДНК-субстратом, ферментом и с crRNA для расщепления целевой ДНК *in vitro* (3). Фермент Cas12a вместе с crRNA, нацеленной на мишень, был способен эффективно расщеплять расчетную целевую последовательность. Эти результаты демонстрируют достаточность фермента Cas12a и crRNA для РНК-направляемого расщепления ДНК. В результате было определено, что при инкубации рибонуклеопротеинового комплекса crРНК-Cas12a с целевой последовательностью субстрата, содержащего PAM-участок 5'-TTTA-3', происходило расщепление дцДНК в заданном положении.

Заключение

Вспышка SARS-CoV-2 значительно повлияла на традиционные диагностики, инициировав начало к разработке новых диагностических технологий. Технология CRISPR, изначально использовавшаяся в области геномного редактирования, нашла свое применение в области систем быстрой и доступной диагностики. Открытие CRISPR быстро заложило основу как надежного инструмента для геномного редактирования. CRISPR/Cas содержит два компонента: направляющую РНК (гРНК) и CRISPR-ассоциированную эндонуклеазу (белок Cas), которая может выполнять делеции или вставки в последовательности ДНК. гРНК необходима для связывания эффекторного Cas белка. гРНК обеспечивает спейсер длиной около 20 нуклеотидов. Основная функция Cas белков заключается в содействии адаптивному иммунитету бактерий посредством интерференции. На сегодняшний день были обнаружены ортологи фермента Cas12a, которые проявляют различный диапазон активности. Cas12a использует многоступенчатый механизм контроля качества для обеспечения правильного и точного распознавания целевых последовательностей. Известно, что Cas12a эффективно воздействует на таргетные последовательности, следующие за 5' Т-богатой последовательностью PAM, поэтому в исследовании был проведен дизайн мишени с учетом синтеза направляющих РНК с Т-богатыми последовательностями. В данной работе была получена новая эндонуклеаза Cas12a и проверена ее активность в отношении таргетной последовательности. Благодаря высокой способности к накоплению рекомбинантного белка Cas12a в водорастворимой фракции в течение всего периода индукции, с использованием двухступенчатой хроматографии, удалось провести очистку 5 мг рекомбинантного белка Cas12a, обладающего более 99 % степенью чистоты. Работа представляет интерес для расширения спектра используемых эндонуклеаз CRISPR/Cas систем для дальнейшего использования в области геномного редактирования и диагностик следующего поколения.

Данное исследование было профинансировано Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан (BR10764944).

Список литературы

- 1 Chylinski, K., Makarova, K.S., Charpentier, E., & Koonin, E.V. (2014). Classification and evolution of type II CRISPR-Cas Systems. *Nucleic Acids Research*, 42 (10); 6091–6105. <https://doi.org/10.1093/nar/gku241>
- 2 Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315 (5819); 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- 3 Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., & Jinek, M. (2014). Structural basis of pam-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513 (7519); 569–573. <https://doi.org/10.1038/nature13579>
- 4 Mohanraju, P., Oost, J., Jinek, M., & Swarts, D. (2018). Heterologous expression and purification of the CRISPR-Cas12A/Cpf1 protein. *Bio-Protocol*, 8 (9); 2842. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2842>
- 5 Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the Assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259); 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- 6 Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1–2); 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

М.Ж. Аманжолова, А.М. Шайзадинова, С.К. Абельденов

Рекомбинантты ДНК эндонуклеаза CRISPR/Cas жүйесінің экспрессиясы және тазартылуы

Қазіргі уақытта биомедициналық және биотехнологиялық салаларда геномдық редакциялау және диагностика саласында қолдану құралдары ретінде арнайы сайтта РНК-бағыттаушы эндонуклеазаларды зерттеу және пайдалану бойынша белсенді зерттеу жұмыстары жүргізілуде. Бүгінгі таңда бұл саладағы ең тиімді әдіс CRISPR әдісі болып табылады. Бағыттаудың қарапайымдылығына байланысты бұл жүйе көптеген организмдердің геномдарын редакциялаудың таңдау әдісі ретінде тез қабылданды. Жақында бактериялық геномдарда ерекше белгілері бар тағы бір жаңа CRISPR-Cas класс 2 эндонуклеаза Cas12a табылды. Cas12a ферменті әртүрлі түрлердің түрлі жасушаларында геномды дәл өңдеу үшін, сондай-ақ диагностикалық қолданбалар үшін пайдаланылуы мүмкін арнайы сайтта РНК-ды бағыттайтын эндонуклеаза болып табылады. Жаңа зерттелмеген гомологтарды іздеу, анықтау және сипаттау ферменттерді қолдану мүмкіндіктерін кеңейтеді. Бұл жұмыста жоғары тазалықтағы Cas12a рекомбинантты ферментін экспрессиялау және екі сатылы хроматографиялық тазарту жүргізілді. *In vitro* синтезделген crRNA, рибонуклеопротеиндік кешен алынды және тиісті учаскеде бөліну үшін мақсатты реттілігі бар субстратқа қатысты ферменттің эндонуклеазалық белсенділігі мен расталды. Алынған фермент оның кинетикалық параметрлерін әрі қарай сипаттау үшін пайдаланылуы мүмкін, оны келесі ұрпақтың жаңа диагностикасын әзірлеуде қолдануға болады.

Кілт сөздер: CRISPR, рекомбинантты ақуыз, эндонуклеаза, аффиндік хроматография, crRNA, диагностика, нуклеин қышқылдары.

M.Zh. Amanzholova, A.M. Shaizadinova, S.K. Abeldenov

Expression and purification of recombinant DNA endonuclease of CRISPR/Cas system

Currently, active research work is underway to study and use site-specific RNA-guided endonucleases as tools for use in the field of genome editing and diagnostics in the biomedical and biotechnological fields. To date, the most effective method in this area is the CRISPR method. Due to its ease of targeting, this system was quickly adopted as the method of choice for editing the genomes of numerous organisms. More recently, another novel CRISPR-Cas class 2 endonuclease with characteristic features has been discovered in bacterial genomes: Cas12a. The Cas12a enzyme is a site-specific RNA-guided endonuclease that can be used for precise genome editing in various cell types of different species, as well as for diagnostic applications. The search, identification and characterization of new unexplored homologues will expand the potential of enzyme applications. In this work, the expression and two-stage chromatographic purification of the recombinant enzyme Cas12a of high purity were carried out. *In vitro* synthesized crRNA, ribonucleoprotein complex were obtained and by the endonuclease activity of the enzyme in relation to the substrate containing the target sequence for cleavage in the appropriate site was confirmed. The resulting enzyme can be used to further describe its kinetic parameters, which can be applied in the development of new next-generation diagnostics.

Keywords: CRISPR, recombinant protein, endonuclease, affinity chromatography, crRNA, diagnostics, nucleic acids.