

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.52.10>

CRISPR-ДИАГНОСТИКА ФИТОПАТОГЕНОВ: ПЕРВЫЕ ШАГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Обзор

Курбатов Л.К.^{1,*}, Хмелева С.А.², Птицын К.Г.³, Радько С.П.⁴, Лисица А.В.⁵

¹ ORCID : 0000-0002-8859-0118;

² ORCID : 0000-0001-6224-4041;

³ ORCID : 0000-0002-3197-6415;

⁴ ORCID : 0000-0002-0519-1745;

⁵ ORCID : 0000-0003-2852-102X;

^{1, 2, 3, 4, 5} Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (kurbatov[at]mail.ru)

Аннотация

Использование CRISPR/Cas-нуклеаз для детекции нуклеиновых кислот (CRISPR-диагностика) стало активно развиваться с 2017-2018 гг., после появления первых диагностических платформ – DETECTR и SHERLOCK. В основе CRISPR-диагностики лежит сопряжение методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот с селективным распознаванием целевых ампликонов Cas-нуклеазами. Поскольку для проведения изотермической амплификации и CRISPR/Cas-детекции не требуется сложного оборудования, а результат может оцениваться неинструментальными методами, данный подход перспективен для проведения диагностики во внелабораторных условиях, в том числе для полевой ДНК-диагностики заболеваний сельскохозяйственных растений. В данном обзоре коротко рассмотрены основные принципы CRISPR/Cas-детекции и изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот, применяемые сегодня в CRISPR-диагностике. Также обсуждаются примеры их сопряжения для идентификации различных фитопатогенов в лабораторных и внелабораторных условиях и перспективы дальнейшего развития CRISPR-диагностики фитопатогенов.

Ключевые слова: CRISPR/Cas-нуклеазы, детекция нуклеиновых кислот, фитопатогены, ДНК-диагностика.

CRISPR DIAGNOSTICS OF PHYTOPATHOGENS: FIRST STEPS AND PROSPECTS

Review article

Kurbatov L.K.^{1,*}, Khmeleva S.A.², Ptitsin K.G.³, Radko S.P.⁴, Lisitsa A.V.⁵

¹ ORCID : 0000-0002-8859-0118;

² ORCID : 0000-0001-6224-4041;

³ ORCID : 0000-0002-3197-6415;

⁴ ORCID : 0000-0002-0519-1745;

⁵ ORCID : 0000-0003-2852-102X;

^{1, 2, 3, 4, 5} Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russian Federation

* Corresponding author (kurbatov[at]mail.ru)

Abstract

The use of CRISPR/Cas-nucleases for nucleic acid detection (CRISPR-diagnostics) has been actively developed since 2017-2018, after the first diagnostic platforms – DETECTR and SHERLOCK – emerged. CRISPR diagnostics is based on the pairing of isothermal nucleic acid amplification methods with selective recognition of target amplicons by Cas-nucleases. Since isothermal amplification and CRISPR/Cas detection do not require sophisticated equipment and the results can be evaluated by non-instrumental methods, this approach is promising for non-laboratory diagnostics, including field DNA diagnostics of agricultural plant diseases. This review briefly discusses the basic principles of CRISPR/Cas detection and isothermal nucleic acid amplification methods used in CRISPR diagnostics today. Examples of their coupling for the identification of different phytopathogens under in vitro and out-of-laboratory conditions and prospects for further development of CRISPR diagnostics of phytopathogens are also reviewed.

Keywords: CRISPR/Cas-nucleases, nucleic acid detection, phytopathogens, DNA diagnostics.

Введение

CRISPR-диагностика – направление в ДНК-диагностике, нацеленное на создание биосенсорных платформ для лабораторной и внелабораторной (формат «point-of-care testing» [1] и «point-of-need testing» [2]) диагностики заболеваний человека, сельскохозяйственных животных и растений, в первую очередь инфекционных. Термин «CRISPR-диагностика» (англ. CRISPR diagnostics) был впервые введён в научный лексикон в 2021 г. в ряде публикаций в ведущих научно-исследовательских журналах (таких как Nature и Science) [3], [4], [5] как новое направление в ДНК-диагностике.

Сегодня «золотым стандартом» диагностики инфекционных заболеваний является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), часто в формате ПЦР в реальном времени, что позволяет проводить количественную детекцию патогенных микроорганизмов и вирусов. Начиная с 1988 г., когда была открыта и внедрена в практику

термостабильная ДНК-полимераза из *Thermus aquaticus* (Таq-полимераза), ПЦР-анализ начал своё широкое распространение, создав основу для развития нового направления – ДНК-диагностики инфекционных заболеваний, в том числе и ДНК-диагностики заболеваний сельскохозяйственных растений [6]. Благодаря своей чувствительности и селективности, ПЦР быстро стал частью арсенала методов, рекомендованных для проведения фитосанитарного контроля и мониторинга состояния агрокультур [7].

Однако для выполнения ПЦР необходимы лабораторные условия, включая наличие квалифицированного персонала и достаточно сложных приборов, обеспечивающих циклический процесс амплификации и оптическую детекцию сигнала. Всё это затрудняет использование ПЦР как основы для развития полевой ДНК-диагностики фитопатогенов. Для успешного развития полевых тест-систем должны использоваться технологии детекции, характеризующиеся компактностью, низкой энергоёмкостью, простотой использования, которые при этом позволяли бы оперативно (в течение 1-2 часов) получать результаты и интерпретировать их с помощью простого и недорогого оборудования. Хотя иммунохимические тесты отвечают этим требованиям, они характеризуются, как правило, невысокой чувствительностью и, часто, недостаточной селективностью. В настоящее время наиболее перспективной технологией для создания высокочувствительных и селективных тест-систем для полевой диагностики фитопатогенов представляется использование CRISPR/Cas-нуклеаз в сочетании с изотермической амплификацией нуклеиновых кислот [8].

Технологические основы CRISPR/Cas-диагностики

В основу CRISPR-диагностики положена способность CRISPR/Cas-нуклеаз приобретать так называемую коллатеральную активность (или *trans*-активность) после узнавания комплексом нуклеазы и нРНК (направляющая РНК; *англ.* guide RNA) ДНК- или РНК-мишени [9], [10]. Узнавание происходит путём формирования дуплекса между участком нРНК («спейсер») длиной 20-30 нуклеотидов с комплементарным ему участком («протоспейсер») ДНК- или РНК-мишени. Появление коллатеральной активности, указывающие на присутствие мишени, детектируется чаще всего по измерению интенсивности флуоресценции, которое вызывается расщеплением активированной Cas-нуклеазой коротких ДНК- или РНК-олигонуклеотидов – «репортёров». «Репортёры» несут на 5'- и 3'-концах флуорофор (как правило, флуоресцеин) и молекулу, способную поглощать испускаемые флуорофором фотоны («гаситель»). При их расхождении в пространстве при деградации «репортёра» Cas-нуклеазой, «гаситель» теряет способность эффективно поглощать испускаемые фотоны, что приводит к значительному (в десятки и сотни раз) возрастанию интенсивности флуоресценции. Возрастание флуоресценции может быть определено как инструментальными методами с использованием флуориметра, так и визуально, невооружённым глазом (неинструментальная детекция), при освещении тест-пробы синим (длина волны 400-500 нм) светом по изменению её окраски (колориметрический метод) [11]. Также возможна детекция иммунохимическим методом с помощью коммерческих тест-полосок – для этого «репортёры» должны нести на концах молекулы флуоресцеина и биотина [12].

К наиболее широко используемым в диагностических платформах CRISPR/Cas-нуклеазам относятся Cas13a, Cas12a и Cas12b, при этом мишенью для первой является молекула РНК, в то время как нуклеазы Cas12 распознают в качестве мишени как двухнитевые, так и однонитевые последовательности ДНК [13]. Также в качестве детектирующих нуклеаз могут быть использованы Cas9, Cas3 и Cas12f, однако их применение в тест-системах либо ограничивается необходимостью использования сложных рибопротеиновых комплексов, требующих отдельной экспрессии и очистки (как в случае Cas3), либо не имеет преимуществ перед более распространёнными нуклеазами. На рисунке 1 схематически показан принцип детекции полинуклеотидной молекулы с использованием CRISPR/Cas-нуклеаз, включающий связывание направляющей РНК с ферментом с последующим распознаванием целевой последовательности [13].

Хотя CRISPR/Cas-детекция может быть использована для прямого определения ДНК- и РНК-мишеней, такой подход не позволяет обеспечить чувствительность и селективность, требуемую для большинства практических приложений. Методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот (см. табл. 1), с другой стороны, часто не способны обеспечить необходимую селективность детекции из-за формирования неспецифических ампликонов в силу использования относительно невысоких температур проведения реакции амплификации и/или сложной структуры и большого размера используемых праймеров [14], [15]. Однако сочетание изотермической амплификации с CRISPR/Cas-детекцией целевых ампликонов позволяет устранить недостатки каждого из подходов по отдельности.

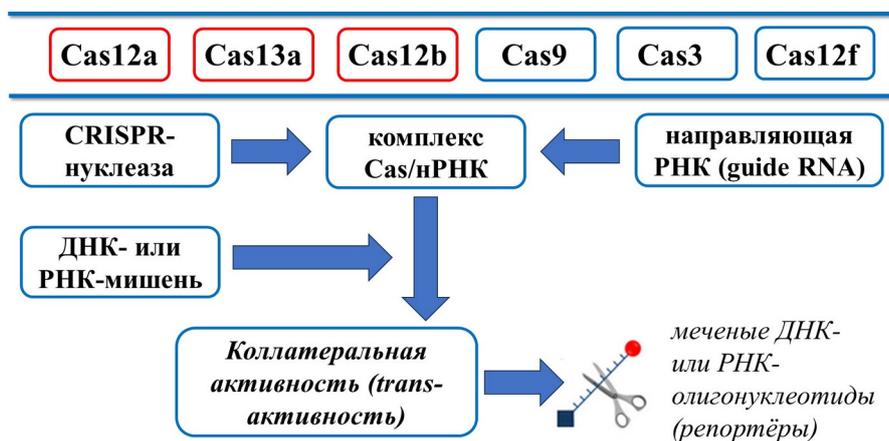


Рисунок 1 - Схематическая иллюстрация метода CRISPR/Cas-детекции. Красным отмечены Cas-нуклеазы, наиболее часто используемые в CRISPR-диагностике

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.52.10.1>

Таблица 1 - Методы изотермической амплификации, используемые в комбинации с CRISPR/Cas-детекцией ампликонов

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.52.10.2>

Метод амплификации	Мишень	Продукт	Температура (°C)	Время (мин)
LAMP (loop mediated amplification)	ДНК	ДНК-ампликоны	60-65	60
RPA (recombinase polymerase amplification)	ДНК	ДНК-ампликоны	37	20-30
NASBA (nucleic acid sequence based amplification)	РНК	РНК-ампликоны	41	90

К недостаткам тестирования с помощью сочетания CRISPR/Cas-детекции с изотермической амплификацией можно отнести необходимость проведения реакций в два этапа с переносом ампликонов в новую пробирку, содержащую смесь Cas-нуклеазы с направляющей РНК и молекулами-репортёрами, а также чувствительность основных ферментов к повышенной температуре и циклам замораживания-оттаивания, что создает сложности при транспортировке и хранении тест-систем в полевых условиях.

Для решения указанных выше проблем в настоящее время сформировалось несколько основных трендов в полевой диагностике, основанной на CRISPR/Cas-детекции. В первую очередь при разработке новых тест-систем исследователи стремятся к осуществлению диагностики в формате одной пробирки [13]. В том случае, если буферные системы изотермической амплификации и Cas-детекции оказываются несовместимыми, применяют физическое разделение компонентов за счет размещения одной из реакций на крышке пробирки в виде капли. Однако данный подход затруднителен в случае, когда амплификация ДНК происходит с помощью метода LAMP, который проводится при достаточно высоких температурах. Для сопряжения LAMP с CRISPR/Cas-детекцией в формате одной тест-пробирки было предложено использовать термостабильную Cas-нуклеазу Cas12b, которая может проявлять коллатеральную активность при температурах вплоть до 67°C [16]. Также проводятся исследования возможности использования реagentных смесей (включая ферменты для изотермической амплификации и Cas-нуклеазы) в лиофилизированном виде [17] (что в значительной степени решает проблемы хранения и транспортировки reagentов при комнатных температурах) и интегрирования изотермической амплификации и CRISPR/Cas-детекции ампликонов с микрофлюидными системами, упрощающими проведение CRISPR-диагностики во внелабораторных условиях.

Современное состояние CRISPR-диагностики фитопатогенов

Несмотря на стремительный рост числа исследований в области CRISPR-диагностики за последние 5 лет, примеры её использования для детекции фитопатогенов немногочисленны, поскольку подавляющая часть работ посвящена выявлению возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных, либо технологическим аспектам разрабатываемых биосенсорных платформ с использованием CRISPR/Cas-нуклеаз. Одним из примеров биосенсорных платформ на основе CRISPR/Cas-нуклеаз для идентификации фитопатогенов является работа Y. Guo с соавт. [18]. Комбинация RPA и детекции ампликонов с помощью Cas12a-нуклеазы позволила создать тест-систему для

идентификации *Phytophthora ramorum* (фитопатогенный оомицет, вызывающий фитофтороз древесных и кустарниковых культур) с чувствительностью на уровне 100 пг геномной ДНК в исходной пробе за 25 минут при 37°C. Результаты теста могли быть оценены как с помощью планшетного ридера, так и визуально, при освещении пробирок светом с длиной волны 470 нм.

В работе Kang с сотр. [19] для диагностики патогенных грибов *Magnaporthe oryzae Triticum* (инфекция, вызывающая пирикулярриоз – ожог колоса пшеницы) использовалась как изотермическая амплификация LAMP, так и сочетание CRISPR/Cas-нуклеазы Cas12a с RPA. Актуальность теста на данное заболевание обусловлена тем, что заражение не вызывает визуальных симптомов у пшеницы до стадии колошения, когда применение фунгицидов уже неэффективно. Амплификация целевого участка генома *Magnaporthe oryzae Triticum* с помощью LAMP позволила однозначно дифференцировать его от родственного патотипа *Magnaporthe oryzae Oryzae*, поражающего рис. Однако более перспективным подходом для создания полевого теста была признана комбинация Cas12a с изотермической амплификацией RPA. Для визуальной оценки результатов проводился второй раунд RPA с праймерами, мечеными FAM (левый праймер) и биотином (правый праймер), целевая последовательность для которых находилась в одноцепочечной ДНК, добавляемой в реакцию в качестве неспецифической мишени для нуклеазы Cas12a. По окончании реакции результаты оценивались с помощью коммерческих иммунохроматографических тест-кассет. В том случае, если в исходной пробе находились целевые ампликоны, активированная нуклеаза Cas12a деградировала неспецифическую мишень и не синтезировался продукт с двумя мечеными праймерами, что приводило к появлению одной полоски на тест-кассете. При отсутствии в пробе геномной ДНК *Magnaporthe oryzae Triticum* в процессе второй RPA мишень для меченых праймеров остается интактной и на тесте проявляются две полоски. Авторами также показано, что подобный подход позволил не только повысить чувствительность на порядок (обнаружение 0.001 мкг на мкл⁻¹ вместо 0.01 мкг на мкл⁻¹ геномной ДНК) по сравнению с обычной ПЦР, но и сократить срок обнаружения инокулированной инфекции до 2-х дней вместо 4-х [19].

Также для идентификации патогенов может быть адаптирована платформа Bio-SCAN [20], в которой используются нРНК и меченая биотином рекомбинантная версия мутантной CRISPR-нуклеазы Cas9, лишённая нуклеазной активности (bio-dCas9). Меченый FAM (6-карбоксифлуоресцеин) ампликон, получаемый в результате RT-RPA (амплификация, сопряжённая с обратной транскрипцией), дополняется биотиновой меткой только в том случае, если он целевой и может быть узнан комплексом нРНК/ bio-dCas9. Селективное связывание bio-dCas9 с целевыми ампликонами детектируется с помощью коммерчески доступных иммунохроматографических тест-полосок (содержащих зону с иммобилизованным стрептавидином). В работе Sanchez с сотр. [21] описывается применение технологии Bio-SCAN для выявления устойчивых аллелей пшеницы, синтетических мутантов риса, ГМО (по наличию промоторов, используемых для экспрессии трансгенов), патогенных вирусов (вирус желтого скручивания листьев томата (TYLCV), вирус табачной мозаики (TMV) и картофельный вирус Y (PVY)), грибковой инфекции *Puccinia striiformis f. sp. tritici* и *Magnaporthe oryzae Triticum* (MoT) у пшеницы, а также бактериальные патогены *Pseudomonas* и *Agrobacterium tumefaciens* у *N. benthamiana*. Относительная простота, универсальность, высокая специфичность и чувствительность делают данную платформу перспективным инструментом полевого скрининга при селекции сельскохозяйственных культур, трансгенезе растений, синтетической эволюции растений и для быстрого выявления фитопатогенов.

Сочетание визуализации результатов с помощью иммунохроматографических тест-полосок и RPA/Cas12a-детекции использовалось и для идентификации возбудителя пирикулярриоза (ожога) риса *Magnaporthe oryzae* [22]. Важным дополнением тест-системы в данном случае являлась использованная авторами [22] методика выделения геномной ДНК из рисовых листьев и мицелия с помощью полосок фильтровальной бумаги, осуществляемая при комнатной температуре и без этапов центрифугирования [23].

В работе Aman с сотр. [24] было показано успешное применение комбинации RT-RPA и CRISPR/Cas-нуклеазы Cas12a для идентификации вирусных инфекций растений. Это позволило создать тест-системы для детекции вируса табачной мозаики (TMV) и вирусов картофеля X и Y (PVX и PVY). При этом удалось совместить стадии обратной транскрипции, амплификации и CRISPR/Cas-детекции. Вся процедура детекции занимала 20 мин и проходила при 42°C. Показано, что в таком формате тестирования возможно обнаружение вирусной РНК в пикомолярных концентрациях, однако увеличение времени инкубации может снизить этот показатель до фемтомолярного уровня. Также стоит отметить, что для визуализации результатов в работе [24] была показана возможность успешного использования простого и компактного прибора оптической детекции (стоимостью 35 долларов США), что делает предложенные тест-системы полностью отвечающими требованиям полевой диагностики.

На примере диагностики наиболее распространенных вирусных патогенов яблони, а именно вируса некротической мозаики (ArNMV), вируса ямчатости древесины (ASPV), вируса борозчатости древесины (ASGV), вируса хлоротической пятнистости листьев (ACLSV) яблони и вириода рубцовой кожицы яблони (ASSVd) была показана возможность мультиплексного анализа в формате CRISPR-детекции [25]. Платформа CRISPR/Cas12a-RT-RPA продемонстрировала чувствительность, сопоставимую с RT-qPCR, при этом пределы обнаружения достигали 250 копий вируса на реакцию для ASPV и ASGV и 2500 копий для остальных. Однако по сравнению со стандартным тестом с помощью RT-qPCR этот протокол был более быстрым и простым и требовал не более часа с момента сбора листьев. Такое сокращение времени анализа достигалось за счет упрощения процедуры выделения РНК (гомогенизация листьев в щелочном растворе полиэтиленгликоля) и использования неочищенного экстракта для RT-RPA, а также применения методики визуализации результатов невооруженным глазом благодаря конъюгированным с олигонуклеотидами золотым наночастицам.

В 2024 году коллективом авторов данного обзора была опубликована статья, описывающая успешный опыт по применению технологии DETECTR для детекции *Dickeya solani* — опасного фитопатогена, вызывающего заболевание картофеля, известное как “черная ножка”, с пределом обнаружения 1 копия бактериального генома на реакцию

амплификации [26]. При этом было показано, что даже в случае, когда изотермическая амплификация (в данном случае использовался метод RPA) не обладает необходимой селективностью для специфической детекции *D. solani*, последующая детекция целевых ампликонов с помощью CRISPR-нуклеазы Cas12a обеспечивает требуемую специфичность детекции для системы в целом [26].

Для другого бактериального патогена – *Clavibacter sepedonicus*, вызывающего кольцевую гниль картофеля, этим же коллективом авторов был разработан метод детекции, основанный на сочетании активности CRISPR-нуклеазы Cas13a с методом изотермической амплификацией NASBA [27]. В формате анализа с проведением амплификации и Cas-детекции в отдельных пробирках, предел обнаружения составил 1000 копий целевой 16S рРНК на реакцию NASBA (одна бактериальная клетка содержит около 10 тыс. копий 16S рРНК) или около 24 колониеобразующих единиц (КОЕ) *C. sepedonicus* на 1 г ткани клубня картофеля. В формате "one-pot testing" (тестирование в одной пробирке) чувствительность понижалась до 10 тыс. копий 16S рРНК или около 100 КОЕ на 1 г ткани клубня. Тестирование может быть выполнено как с использованием флуориметра (инструментальная детекция), так и визуально по изменению цвета пробы при её освещении синим светом (неинструментальная детекция) [27]. При этом общее время анализа не превышало 2 ч.

Заключение

Разработанные к настоящему времени платформы идентификации растительных инфекций продемонстрировали высокую чувствительность и селективность детекции и полное совпадение результатов определения фитопатогенов с результатами, полученными методом ПЦР, которая является «золотым стандартом» современной ДНК-диагностики. Однако до настоящего времени эффективность таких платформ была продемонстрирована исключительно в лабораторных условиях. Очевидно, что перспективы внедрения в сельскохозяйственную практику биосенсорных платформ для ДНК-диагностики фитопатогенов на основе CRISPR/Cas-нуклеаз, как предложенных к настоящему времени, так и разработанных в будущем, будут зависеть от результатов верификации их эффективности в условиях использования на агропредприятиях.

Финансирование

Программа фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы) (№ 122030100170-5).

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Сообщество рецензентов Международного научно-исследовательского журнала
DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.52.10.3>

Funding

Program of Fundamental Scientific Research in the Russian Federation for the Long-Term Period (2021-2030) (№ 122030100170-5).

Conflict of Interest

None declared.

Review

International Research Journal Reviewers Community
DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.52.10.3>

Список литературы / References

1. Abel G. Current status and future prospects of point-of-care testing around the globe / G. Abel // *Expert Rev. Mol. Diagn.* — 2015. — № 15 (7). — 853 p.
2. Vidic J. Point-of-need DNA testing for detection of foodborne pathogenic bacteria / J. Vidic, P. Vizzini, M. Manzano [et al.] // *Sensors (Basel)*. — 2019. — № 19 (5). — 1100 p.
3. Kaminski M.M. CRISPR-based diagnostics / M.M. Kaminski, O.O. Abudayyeh, J.S. Gootenberg [et al.] // *Nat. Biomed. Eng.* — 2021. — № 5. — P. 643–656.
4. Abudayyeh O.O. CRISPR diagnostics / O.O. Abudayyeh, J.S. Gootenberg // *Science*. — 2021. — № 372 (6545). — P. 914–915.
5. Brogan D.J. CRISPR Diagnostics: Advances toward the Point of Care / D.J. Brogan, O.S. Akbari // *Biochemistry*. — 2023. — № 62 (24). — P. 3488–3492.
6. Henson J.M. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis / J.M. Henson, R. French // *Annu. Rev. Phytopathol.* — 1993. — № 31. — P. 81–109.
7. Schaad N.W. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues / N.W. Schaad, R.D. Frederick, J. Shaw [et al.] // *Annu. Rev. Phytopathol.* — 2003. — № 41. — P. 305–324.
8. Dorjee L. CRISPR-Cas-based Detection of Plant Pathogens / L. Dorjee, M. Taku // *Biotica Research Today*. — 2023. — № 5. (10). — P. 762–764.
9. Chen J.S. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity / J.S. Chen, E. Ma, L.B. Harrington [et al.] // *Science*. — 2018. — № 360 (6387). — P. 436–439.
10. Abudayyeh O.O. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector / O.O. Abudayyeh, J.S. Gootenberg, S. Konermann [et al.] // *Science*. — 2016. — № 353 (6229).
11. Yuan B. Application of the CRISPR/Cas System in Pathogen Detection: A Review / B. Yuan, C. Yuan, L. Li [et al.] // *Molecules*. — 2022. — № 27 (20). — 6999 p.
12. Myhrvold C. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13 / C. Myhrvold, C.A. Freije, J.S. Gootenberg [et al.] // *Science*. — 2018. — № 360 (6387). — P. 444–448.

13. Хмелёва С.А. Биосенсорные платформы для ДНК-диагностики на основе CRISPR/CAS-нуклеаз: на пути к детекции нуклеиновых кислот на уровне единичных молекул во внелaborаторных условиях / С.А. Хмелёва, К.Г. Птицын, Л.К. Курбатов [и др.] // Биомедицинская химия. — 2024. — № 70 (5). — С. 287–303.
14. Ngoc L.T.N. Current Trends in RNA Virus Detection via Nucleic Acid Isothermal Amplification-Based Platforms / L.T.N. Ngoc, Y.C. Lee // Biosensors (Basel). — 2024. — № 14 (2). — 97 p.
15. Курбатов Л.К. Рекомбиназная полимеразная и петлевая изотермическая амплификация в ДНК-диагностике инфекционных заболеваний / Л.К. Курбатов, К.Г. Птицын, С.А. Хмелева [и др.] // Журнал аналитической химии. — 2024. — Т. 79. — № 3. — С. 210–228.
16. Nguyen L.T. Engineering highly thermostable Cas12b via de novo structural analyses for one-pot detection of nucleic acids / L.T. Nguyen, S.R. Rananaware, L.G. Yang [et al.] // Cell Reports Medicine. — 2023. — № 4 (5).
17. Gootenberg J.S. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2/ J.S. Gootenberg O.O. Abudayyeh, J.W. Lee [et al.] // Science. — 2017. — № 356. — P. 438–442.
18. Guo Y. CRISPR/Cas12a-based approaches for efficient and accurate detection of *Phytophthora ramorum* / Y. Guo, H. Xia, T. Dai [et al.] // W Front. Cell. Infect. Microbiol. — 2023. — № 13. — 1218105 p.
19. Kang H. Rapid detection of wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae triticum* pathotype using genome-specific primers and Cas12a-mediated technology / H. Kang, Y. Peng, K. Hua [et al.] // Engineering. — 2021. — № 7. — P. 1326–1335.
20. Ali Z. Bio-Scan: a CRISPR/dCas9-based lateral flow assay for rapid, specific, and sensitive detection of Sars-CoV-2 / Z. Ali, E. Sanchez, M. Tehseen [et al.] // ACS Synth. Biol. — 2022. — № 11. — P. 406–419.
21. Sánchez E. A CRISPR-based lateral flow assay for plantgenotyping and pathogen diagnostics / E. Sánchez, Z. Ali, I. Tofazzal [et al.] // Plant Biotechnology Journal — 2022. — № 20. — P. 2418–2429.
22. Zhang Y.M. Evaluation of CRISPR/Cas12a-based DNA detection for fast pathogen diagnosis and GMO test in rice / Y.M. Zhang, Y. Zhang, K. Xie // Molecular Breeding. — 2020. — № 40 (11).
23. Zou Y. Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds / Y. Zou, M.G. Mason, Y. Wang [et al.] // PLoS Biol. — 2017. — № 15 (11). — e1002630 p.
24. Aman R. Efficient, rapid, and sensitive detection of plant RNA viruses with one-pot RT-RPA-CRISPR/Cas12a assay / R. Aman, A. Mahas, T. Marsic [et al.] // Frontiers in Microbiology. — 2020. — № 11. — 610872 p.
25. Jiao J. Field detection of multiple RNA viruses/viroids in apple using a CRISPR/Cas12a-based visual assay / J. Jiao, K. Kong, J. Han [et al.] // Plant Biotechnology Journal. — 2021. — № 19 (2). — P. 394–405.
26. Курбатов Л.К. Применение технологии DETECTR для селективной детекции бактериального фитопатогена *Dickeya solani* с использованием рекомбинантной CRISPR-нуклеазы Cas12a, полученной одностадийной хроматографической очисткой / Л.К. Курбатов, С.П. Радько, С.А. Хмелева [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. — 2024. — Т. 60. — № 1. — С. 20–28.
27. Khmeleva S.A. Detection of potato pathogen *Clavibacter sepedonicus* by CRISPR/Cas13a analysis of NASBA amplicons / S.A. Khmeleva, L.K. Kurbatov, K.G. Ptitsyn [et al.] // Int. J. Mol. Sci. — 2024. — № 25. — 12218 p.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Abel G. Current status and future prospects of point-of-care testing around the globe / G. Abel // Expert Rev. Mol. Diagn. — 2015. — № 15 (7). — 853 p.
2. Vidic J. Point-of-need DNA testing for detection of foodborne pathogenic bacteria / J. Vidic, P. Vizzini, M. Manzano [et al.] // Sensors (Basel). — 2019. — № 19 (5). — 1100 p.
3. Kaminski M.M. CRISPR-based diagnostics / M.M. Kaminski, O.O. Abudayyeh, J.S. Gootenberg [et al.] // Nat. Biomed. Eng. — 2021. — № 5. — P. 643–656.
4. Abudayyeh O.O. CRISPR diagnostics / O.O. Abudayyeh, J.S. Gootenberg // Science. — 2021. — № 372 (6545). — P. 914–915.
5. Brogan D.J. CRISPR Diagnostics: Advances toward the Point of Care / D.J. Brogan, O.S. Akbari // Biochemistry. — 2023. — № 62 (24). — P. 3488–3492.
6. Henson J.M. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis / J.M. Henson, R. French // Annu. Rev. Phytopathol. — 1993. — № 31. — P. 81–109.
7. Schaad N.W. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues / N.W. Schaad, R.D. Frederick, J. Shaw [et al.] // Annu. Rev. Phytopathol. — 2003. — № 41. — P. 305–324.
8. Dorjee L. CRISPR-Cas-based Detection of Plant Pathogens / L. Dorjee, M. Taku // Biotica Research Today. — 2023. — № 5. (10). — P. 762–764.
9. Chen J.S. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity / J.S. Chen, E. Ma, L.B. Harrington [et al.] // Science. — 2018. — № 360 (6387). — P. 436–439.
10. Abudayyeh O.O. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector / O.O. Abudayyeh, J.S. Gootenberg, S. Konermann [et al.] // Science. — 2016. — № 353 (6229).
11. Yuan B. Application of the CRISPR/Cas System in Pathogen Detection: A Review / B. Yuan, C. Yuan, L. Li [et al.] // Molecules. — 2022. — № 27 (20). — 6999 p.
12. Myhrvold C. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13 / C. Myhrvold, C.A. Freije, J.S. Gootenberg [et al.] // Science. — 2018. — № 360 (6387). — P. 444–448.
13. Khmeleva S.A. Biosensornye platformy dlja DNK-diagnostiki na osnove CRISPR/CAS-nukleaz: na puti k detekcii nukleinovyh kislot na urovne edinichnyh molekul vo vnelaboratornyh uslovijah [Biosensing platforms for DNA diagnostics based on CRISPR/Cas nucleases: towards the detection of nucleic acids at the level of single molecules in non-laboratory

settings] / S.A. Khmeleva, K.G. Ptitsyn, L.K. Kurbatov [et al.] // *Biomeditsinskaya Khimiya*, [Biomedical Chemistry]. — 2024. — № 70 (5). — P. 287–303 [in Russian]

14. Ngoc L.T.N. Current Trends in RNA Virus Detection via Nucleic Acid Isothermal Amplification-Based Platforms / L.T.N. Ngoc, Y.C. Lee // *Biosensors (Basel)*. — 2024. — № 14 (2). — 97 p.

15. Kurbatov L.K. Rekombinaznaja polimeraznaja i petlevaja izotermicheseskaja amplifikacija v DNK-diagnostike infekcionnyh zabolevanij [Recombinase polymerase and loop isothermal amplification in DNA diagnostics of infectious diseases] / L.K. Kurbatov, K.G. Ptitsyn, S.A. Khmeleva [et al.] // *Zhurnal Analiticheskoj Khimii* [Journal of Analytical Chemistry]. — 2024. — Vol. 79. — № 3. — P. 210–228. [in Russian]

16. Nguyen L.T. Engineering highly thermostable Cas12b via de novo structural analyses for one-pot detection of nucleic acids / L.T. Nguyen, S.R. Rananaware, L.G. Yang [et al.] // *Cell Reports Medicine*. — 2023. — № 4 (5).

17. Gootenberg J.S. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2/ J.S. Gootenberg O.O. Abudayyeh, J.W. Lee [et al.] // *Science*. — 2017. — № 356. — P. 438–442.

18. Guo Y. CRISPR/Cas12a-based approaches for efficient and accurate detection of *Phytophthora ramorum* / Y. Guo, H. Xia, T. Dai [et al.] // *W Front. Cell. Infect. Microbiol.* — 2023. — № 13. — 1218105 p.

19. Kang H. Rapid detection of wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae* triticum pathotype using genome-specific primers and Cas12a-mediated technology / H. Kang, Y. Peng, K. Hua [et al.] // *Engineering*. — 2021. — № 7. — P. 1326–1335.

20. Ali Z. Bio-Scan: a CRISPR/dCas9-based lateral flow assay for rapid, specific, and sensitive detection of Sars-CoV-2 / Z. Ali, E. Sanchez, M. Tehseen [et al.] // *ACS Synth. Biol.* — 2022. — № 11. — P. 406–419.

21. Sánchez E. A CRISPR-based lateral flow assay for plantgenotyping and pathogen diagnostics / E. Sánchez, Z. Ali, I. Tofazzal [et al.] // *Plant Biotechnology Journal* — 2022. — № 20. — P. 2418–2429.

22. Zhang Y.M. Evaluation of CRISPR/Cas12a-based DNA detection for fast pathogen diagnosis and GMO test in rice / Y.M. Zhang, Y. Zhang, K. Xie // *Molecular Breeding*. — 2020. — № 40 (11).

23. Zou Y. Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds / Y. Zou, M.G. Mason, Y. Wang [et al.] // *PLoS Biol.* — 2017. — № 15 (11). — e1002630 p.

24. Aman R. Efficient, rapid, and sensitive detection of plant RNA viruses with one-pot RT-RPA-CRISPR/Cas12a assay / R. Aman, A. Mahas, T. Marsic [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. — 2020. — № 11. — 610872 p.

25. Jiao J. Field detection of multiple RNA viruses/viroids in apple using a CRISPR/Cas12a-based visual assay / J. Jiao, K. Kong, J. Han [et al.] // *Plant Biotechnology Journal*. — 2021. — № 19 (2). — P. 394–405.

26. Kurbatov L.K. Primenenie tehnologii DETECTR dlja selektivnoj detekcii bakterial'nogo fitopatogena *Dickeya solani* s ispol'zovaniem rekombinantnoj CRISPR-nukleazy Cas12a, poluchennoj odnostadijnoj hromatograficheskoj ochistkoj [Application of DETECTR for Selective Detection of Bacterial Phytopathogen *Dickeya solani* Using Recombinant CRISPR-Nuclease Cas12a Obtained by Single-Stage Chromatographic Purification] / L.K. Kurbatov, S.P. Radko, S.A. Khmeleva [et al.] // *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija* [Applied Biochemistry and Microbiology]. — 2024. — Vol. 60. — № 1. — P. 20–28. [in Russian]

27. Khmeleva S.A. Detection of potato pathogen *Clavibacter sepedonicus* by CRISPR/Cas13a analysis of NASBA amplicons / S.A. Khmeleva, L.K. Kurbatov, K.G. Ptitsyn [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* — 2024. — № 25. — 12218 p.