

УДК 543.9

РЕКОМБИНАЗНАЯ ПОЛИМЕРАЗНАЯ И ПЕТЛЕВАЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ В ДНК-ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

© 2024 г. Л. К. Курбатов^а, К. Г. Птицын^а, С. А. Хмелева^а, С. П. Радько^а, А. В. Лисица^{а, б},

Е. В. Супрун^{а, с, *}

^а Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

ул. Погодинская, 10, стр. 8, Москва, 119121, Россия

^б Тюменский государственный университет

ул. Володарского, 6, Тюмень, 625003, Россия

^с Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
Ленинские горы, 1, стр. 3, ГСП-1, Москва, 119991, Россия

* E-mail: lenasuprun@mail.ru

Поступила в редакцию 02.06.2023 г.

После доработки 17.07.2023 г.

Принята к публикации 27.07.2023 г.

Рекомбиназная полимеразная и петлевая изотермическая амплификация может быть проведена во внелабораторных условиях, что делает эти методы перспективными для разработки экспресс-тестов для ДНК-диагностики инфекционных заболеваний человека, а также сельскохозяйственных животных и растений в формате оказания медицинской помощи на месте (англ. “point-of-care” testing) или полевой детекции (англ. “in-field” detection). В обзоре рассмотрены основные принципы, на которых основаны данные методы, а также их современное состояние с акцентом на неинструментальные методы регистрации результата изотермической амплификации с помощью колориметрии и иммунохроматографических тест-полосок. Подробно освещены подходы к повышению селективности изотермической амплификации путём её объединения с CRISPR/Cas-детекцией или путём объединения двух методов по принципу гнездовой амплификации.

Ключевые слова: ДНК-диагностика, инфекционное заболевание, изотермическая амплификация, CRISPR/Cas-нуклеаза, неинструментальный метод анализа.

DOI: 10.31857/S0044450224030025, **EDN:** vrjshp

Современная ДНК-диагностика представлена широким спектром методов анализа образцов генетического материала и может быть разделена на молекулярно-генетическую ДНК-диагностику, которая сфокусирована на идентификации индивидуальных геномов (например, диагностика наследственных заболеваний), и ДНК-диагностику инфекционных заболеваний, нацеленную на выявление в образцах различного происхождения (биомедицинские, сельскохозяйственные, из окружающей среды и т. п.) патогенных микроорганизмов и вирусов [1]. В настоящее время доминирующим методом ДНК-диагностики инфекционных заболеваний является метод на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), изобретённой Кэри Муллисом 40 лет назад [2]

и получивший широкое распространение в рутинной практике клинических и санитарно-эпидемиологических лабораторий [3]. В последние десятилетия наблюдается растущий интерес к децентрализации ДНК-диагностики — проведению тестирования вне специализированных ПЦР-лабораторий в формате так называемого тестирования “у постели больного” (“point-of-care” testing) [4], получившего дополнительный импульс к развитию в рамках борьбы с пандемией COVID-19 [5, 6]. Хотя выражение “point-of-care” testing является доминирующим в современной литературе для обозначения внелабораторной ДНК-диагностики, в рамках данного обзора мы будем использовать термин “point-of-need” testing (PONT) [7] как более корректный. Действительно, децентрализация

ДНК-диагностики также представляет интерес для сельского хозяйства и пищевой индустрии, поскольку позволяет оперативно выявлять инфекционные агенты, вызывающие заболевания растений и животных, или загрязнения продукции [4, 7, 8].

ПЦР-анализ, вне всякого сомнения, остаётся золотым стандартом ДНК-диагностики, поэтому одним из направлений его развития в формате PONT является создание мобильных автономных систем для проведения анализа во внелабораторных условиях [9, 10]. Однако такие аналитические системы всё ещё нуждаются в достаточно сложном и дорогостоящем оборудовании. Альтернативный подход, который можно отнести к развитию неинструментальных методов ДНК-диагностики, основан на использовании изотермической амплификации нуклеиновых кислот [11, 12]. В отличие от ПЦР, которая требует многократного контролируемого циклического изменения температуры в ходе протекания реакции, изотермическая амплификация идет при постоянной температуре, тем самым значительно снижая техническую сложность необходимого оборудования, что делает её привлекательным технологическим направлением развития ДНК-диагностики в формате PONT [6, 8, 11–13]. В настоящее время для обнаружения инфекционных агентов разработаны различные методы изотермической амплификации ДНК [11–13], среди которых на практике наиболее широкое распространение получила петлевая изотермическая амплификация (англ. loop-mediated isothermal amplification, **LAMP**) [14]. Среди методов изотермической амплификации можно выделить и рекомбиназную полимеразную амплификацию (англ. recombinase polymerase amplification, **RPA**) [11, 15], интерес к которой в последние годы резко вырос. Так, поиск в базе научных публикаций PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) по словосочетанию recombinase polymerase amplification показал более чем 4-кратный рост числа публикаций, относящихся к использованию RPA, за последние пять лет (с 220 до 1006).

В целом изотермическая амплификация, включая LAMP и RPA, имеет меньшую селективность по сравнению с ПЦР, особенно если ПЦР проводят в формате TaqMan [15]. В ходе изотермической амплификации ДНК-мишени (здесь под ДНК-мишенью понимается участок геномной ДНК, ограниченный последовательностями праймеров) наряду с целевыми ампликонами могут синтезироваться в сопоставимых количествах ампликоны, источником которых не является последовательность ДНК-мишени (например, другие

участки генома детектируемого микроорганизма или вируса, геномов других микроорганизмов и вирусов, присутствующих в образце, участки генома инфицированного организма), что может приводить к ложноположительным результатам. Очевидно, что выбор ДНК-мишени и праймеров является фактором, в наибольшей степени определяющим селективность амплификации. Несмотря на наличие компьютерных программ для дизайна праймеров для LAMP [16, 17] и RPA [18], подбор праймеров, обеспечивающих желаемую селективность изотермической амплификации, требует их экспериментальной проверки и остаётся крайне трудоёмким процессом без гарантированного успеха [15]. Как альтернатива в настоящее время наметились два подхода к решению проблемы недостаточной селективности изотермической амплификации. Один из них связан с открытием и введением в исследовательскую практику новых типов РНК-направляемых CRISPR/Cas-нуклеаз (англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats, **CRISPR**; CRISPR associated protein, **Cas**) [19–21]. Примером другого подхода является объединение RPA и LAMP в формате “гнездовой” амплификации [22].

Цель данного обзора — познакомить заинтересованного читателя с принципами RPA и LAMP, форматами наработки ДНК-ампликонов, совместимыми с требованиями PONT, а также подходами к повышению селективности данных методов изотермической амплификации путём их комбинирования с CRISPR/Cas-нуклеазами или объединения по типу “гнездовой” амплификации. В связи со значительным числом публикаций, посвящённых разработке тестов на основе RPA и LAMP для обнаружения инфекционных агентов в формате PONT, их невозможно охватить в единичном обзоре. Только часть опубликованных работ процитирована как иллюстративные примеры основных направлений развития экспресс-ДНК-диагностики инфекционных заболеваний. Вне рамок обзора остались вопросы, связанные с выбором ДНК-мишеней и молекулярным дизайном праймеров для RPA и LAMP, заслуживающие отдельного рассмотрения.

ПЕТЛЕВАЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ И РЕКОМБИНАЗНАЯ ПОЛИМЕРАЗНАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ

Как в случае LAMP, так и при RPA амплификация ДНК осуществляется ДНК-полимеразой, обладающей так называемой цепь-вытесняющей

активностью (англ. strand-displacing DNA polymerase); синтез новой цепи происходит на одной из цепей двухцепочечной ДНК-матрицы (дцДНК) с образованием новой дцДНК, при этом вторая цепь не разрушается, а вытесняется, высвобождаясь в раствор в виде полинуклеотида (одноцепочечная ДНК, оцДНК), которая также может служить матрицей для синтеза ДНК. Для проведения LAMP достаточно только ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью, в то время как для RPA необходима довольно сложная ферментативная смесь, дополнительно включающая рекомбиназу и белки, специфически связывающиеся с оцДНК (англ. single-stranded DNA binding proteins, **SSB-белки**).

Наряду с ДНК, в качестве мишени может использоваться и комплементарная ДНК (кДНК). кДНК получают путём обратной транскрипции *in vitro* (англ. reverse transcription, **RT**) — энзиматического синтеза ревертазой (обратной транскриптазой) оцДНК на РНК-матрице. Это позволяет определять методами LAMP и RPA микроорганизмы, используя специфические для них последовательности транскриптов, а также РНК-вирусы (например, такие как SARS-CoV-2), добавлением обратной транскриптазы в реакционную смесь.

Рекомбиназная полимеразная амплификация. Метод RPA предложен в 2006 году группой исследователей под руководством Армса [23] и основан на использовании рекомбиназы UvsX фага Т4. Рекомбиназа формирует комплекс с праймером и в присутствии АМФ осуществляет его встраивание в дцДНК на участке, содержащем комплементарную праймеру последовательность, при этом образующийся локально участок оцДНК стабилизируется SSB-белком gp32 фага Т4 (рис. 1). После диссоциации комплекса рекомбиназа/ДНК праймер достраивается Bsu-полимеразой с цепь-вытесняющей активностью с использованием одной из цепей ДНК как матрицы. Вновь синтезированная дцДНК и вытесненная цепь выступают как новые матрицы, тем самым обеспечивая экспоненциальную амплификацию ДНК-мишени (рис. 1). Рекомендованный размер ДНК-мишени (и соответственно длина образующихся ампликонов) в RPA лежит в интервале от 100 до 500 пар оснований (п. о.) [11, 24]. Амплификация протекает при 37—42 °С, обеспечивая увеличение количества копий ДНК-мишени до 10^9 раз в течение 20—40 мин (что позволяет обнаружить нескольких копий ДНК-мишени в тест-пробирке при удачном подборе праймеров), и не требует использования какого-либо оборудования [23, 24]. Если в качестве мишени

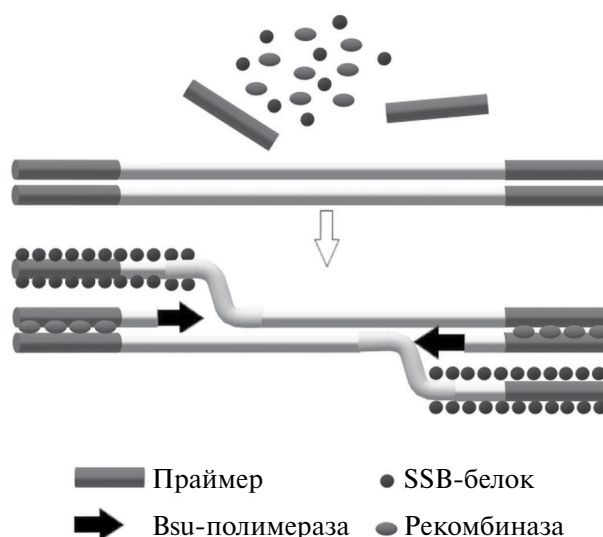


Рис. 1. Схематическое изображение рекомбинантной полимеразной амплификации (RPA).

используется кДНК, ревертаза для синтеза кДНК может быть добавлена непосредственно в реакционную смесь (англ. reverse transcription-RPA, **RT-RPA**) [22, 23]. Смесь реагентов для проведения RPA может быть лиофилизована для целей транспортировки и хранения и регидрирована перед применением [11] с повышением таким образом соответствия RPA требованиям PONT.

В отличие от ПЦР, где длина праймеров составляет 18—25 нуклеотидов (нт), рекомендованная длина праймеров в RPA составляет 30—35 нт. Относительно низкая температура проведения амплификации (≤ 42 °С) и большая длина праймеров повышают вероятность формирования ими устойчивых димеров, а также “шпилек” внутри праймера, что может снижать эффективность RPA вплоть до её полного ингибирования [11, 24]. Кроме того, рекомбиназа допускает наличие нескольких неспаренных оснований между праймером и комплементарным участком в цепи ДНК [25], что, в свою очередь, может приводить к появлению нецелевых ампликонов. Таким образом, подбор и проверка праймеров, обеспечивающих необходимые эффективность и специфичность RPA, становится крайне время- и ресурсозатратной задачей. Как попытка упростить решение этой проблемы, недавно предложен способ, основанный на использовании праймеров, содержащих модифицированные основания, присутствие которых существенно снижает вероятность формирования праймерами димеров и “шпилек” [26].

Петлевая изотермическая амплификация. Метод LAMP разработан в 2000 году Нотоми с соавт.

[27]. В данном методе используют только один фермент — Bst-полимеразу с цепь-вытесняющей активностью, но, в отличие от RPA, не одну, а две пары праймеров, первая из которых обозначается как “внешние” (англ. outer primers), а вторая — “внутренние” (англ. inner primers) [27, 28]. Внутренние праймеры сконструированы определённым образом: с 5'-конца они имеют участок, комплементарный участку ДНК-мишени, а с 3'-конца — участок, чья последовательность идентична последовательности участка ДНК-мишени (рис. 2, шаг 1). Такая конструкция внутренних праймеров в сочетании с внешними и способностью Bst-полимеразы отодвигать цепь ДНК при синтезе новой цепи по ДНК-матрице приводит к формированию гантелеподобных ДНК-структур (рис. 2, шаг 2), которые далее экспоненциально амплифицируются с участием внутренних праймеров и Bst-полимеразы (рис. 2, шаг 3). LAMP проводят при постоянной температуре в интервале 60—65 °С, однако для начала амплификации, в отличие от RPA, необходимо предварительно денатурировать ДНК-матрицу (что достигается прогреванием реакционной смеси при

95 °С в течение 5 мин) для последующего связывания внутренних и внешних праймеров с комплементарными им участками цепей дцДНК при понижении температуры до 60—65 °С [27, 28]. Для обнаружения микроорганизмов по специфическим транскриптам или РНК-вирусов обратная транскрипция должна быть выполнена либо отдельно от LAMP, либо в формате “одной пробирки” непосредственно перед амплификацией (до прогревания LAMP-пробы при 95 °С) внесением в реакционную смесь обратной транскриптазы (англ. reverse transcription LAMP, **RT-LAMP**) [28]. Поскольку для проведения LAMP могут использоваться такие рекомбинантные полимеразы, как Bst-3.0 и OmniAmp, которые обладают ревертазной активностью, детекция РНК-мишени возможна и в формате “одной пробирки” без добавления обратной транскриптазы [29, 30]. Как и в случае RPA, смесь реагентов для LAMP может быть лиофилизована и регидрирована перед использованием [31, 32].

LAMP в большинстве случаев обеспечивает не менее чем 10^9 -кратное увеличение количества копий ДНК-мишени, однако типичное время

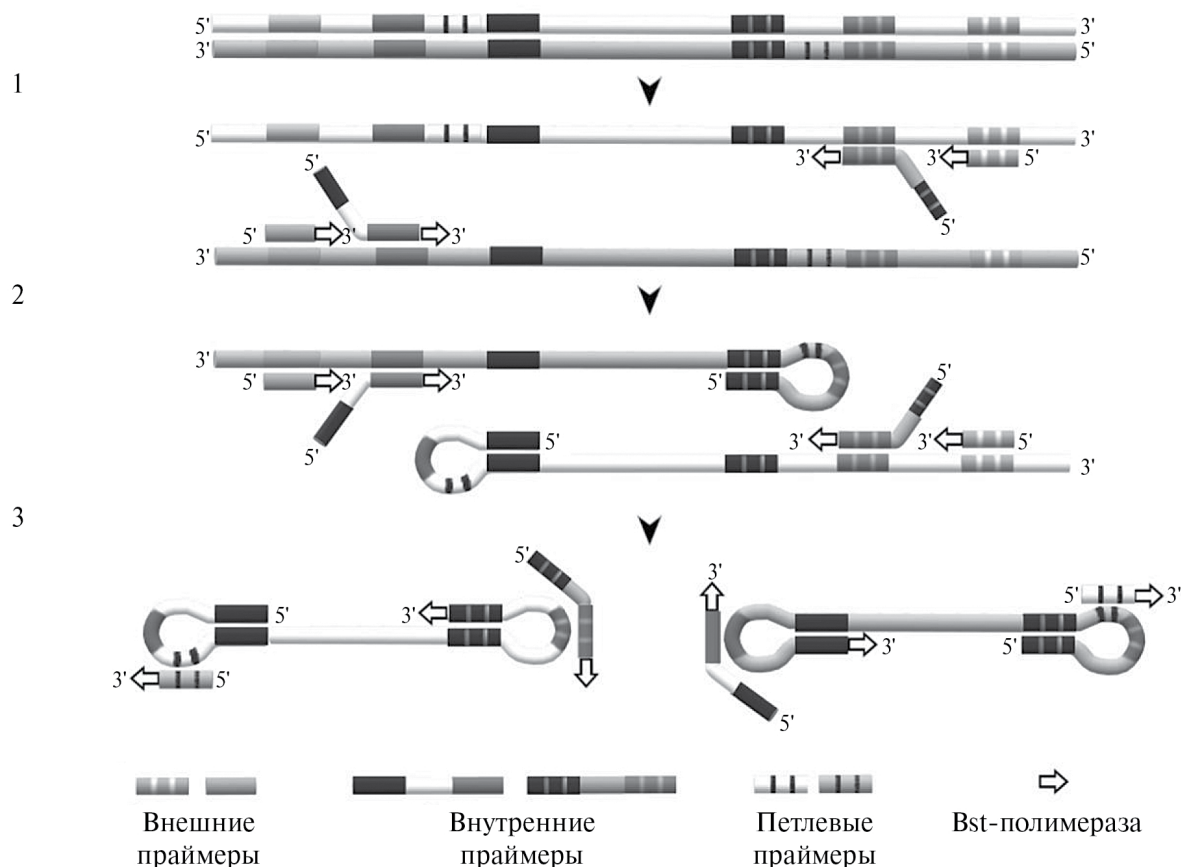


Рис. 2. Схематическое изображение петлевой амплификации (LAMP).

реакции амплификации составляет около 1 ч. Для снижения времени реакции Нагамине с соавт. [33] в 2002 году модифицировали метод, дополнительно введя ещё одну пару праймеров (петлевые праймеры), комплементарных последовательностям в петлях гантелеподобных ампликонов (рис. 2, шаг 3). Использование трёх пар праймеров позволило сократить время амплификации практически вдвое [33].

МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ РЕЗУЛЬТАТА ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

RPA и LAMP характеризуются образованием продукта амплификации в виде фрагментов дцДНК в количестве на порядок превышающем выход стандартной ПЦР [11, 14, 24]. Значительное количество дцДНК позволяет зарегистрировать результат реакции визуально (невооружённым глазом) по изменению цвета красителей, включая такой распространённый флуоресцентный краситель ДНК, как SYBR Green I, широко используемый для наблюдения за протеканием ПЦР в реальном времени [2, 3]. Следует отметить, что слежение за RPA и LAMP в реальном времени также возможно с использованием SYBR Green I, хотя в последнем случае присутствие данного красителя может замедлять реакцию амплификации [24, 34]. В связи с этим LAMP в реальном времени часто проводят с привлечением турбидиметрии (на основе precipitation пирофосфата магния) [35] или специально сконструированных флуоресцентно-меченных праймера и зонда, чья флуоресценция изменяется при встраивании в ампликоны [36]. Однако количественная оценка как мутности, так и интенсивности флуоресценции требует использования довольно сложных аналитических устройств. В данном обзоре упор сделан на регистрацию результата амплификации неинструментальными методами по завершении реакции (по конечной точке, англ. end-point detection) с использованием одноразовых иммунохроматографических тест-полосок (англ. lateral flow assays, LFA) [37] или путем фиксации изменения цвета красителя в реакционной пробе невооружённым глазом.

Колориметрические методы анализа. Как уже упоминалось выше, такой флуоресцентный интеркалирующий ДНК-краситель, как SYBR Green I, в присутствии большого количества дцДНК изменяет свой цвет с жёлто-оранжевого на жёлто-зелёный [38], что делает возможным визуальную фиксацию результата RPA или LAMP. Однако, несмотря на простоту такого подхода,

он характеризуется высоким значением предела обнаружения. Например, в случае обнаружения бактерий *M. tuberculosis* предел обнаружения составил 0.05 нг бактериальной ДНК в RPA-пробе [39], что, исходя из размера генома (~ 4.4 млн п.о. [40]), соответствует около 10 000 бактерий. Когда анализ этих же RPA-образцов проводили с помощью агарозного гель-электрофореза в присутствии флуоресцентного красителя и визуализацией полос ДНК помещением геля на ультрафиолетовый (УФ) трансиллюминатор, то предел обнаружения снижался до 0.05 пг бактериальной ДНК в реакционной пробе (около 10 бактерий) [39]. Стоит отметить, что предел обнаружения для прямого (визуального) определения невооружённым глазом при добавлении SYBR Green I в RPA-пробу может быть также существенно снижен при использовании такого простого устройства, как УФ-лампа. Например, проявление окраски пробы при её освещении УФ-лампой позволило идентифицировать бактерии *Yersinia enterocolitica* (вызывают иерсиниоз — острое желудочно-кишечное инфекционное заболевание) с пределом обнаружения в 10 колониеобразующих единиц (КОЕ) на RPA-образец [41]. Для LAMP регистрация ДНК-ампликонов по конечной точке реакции без использования какого-либо оборудования, основанная на изменении цвета SYBR Green I, также давно известна [42]. Интересно, что в случае LAMP предел обнаружения ниже, чем для RPA, вероятно, вследствие более высокого выхода ДНК-ампликонов в результате реакции. Например, авторы работы [43] сообщают о пределе обнаружения 10 бактерий *Escherichia coli* на реакцию. Однако из работы [43] неясно, относится ли этот предел к регистрации аналитического сигнала по изменению цвета SYBR Green I при обычном освещении или при освещении УФ-светом, поскольку использовались оба подхода. С другой стороны, предел обнаружения 4—8 паразита на LAMP-образец установлен при определении *Plasmodium knowlesi* (патогенный микроорганизм, вызывающий малярию) по изменению цвета SYBR Green I при обычном освещении [44]. Сравнение различных флуоресцентных красителей — SYBR Green I и шести красителей семейства SYTO — показало, что наиболее эффективным среди них является SYTO-24, использование которого позволило обнаружить бактерию *Salmonella typhimurium* (использовалась как модельный организм) по изменению цвета LAMP-образца при обычном освещении с пределом обнаружения 14 КОЕ на 1 мл крови (бактерии выделены из 1 мл крови с использованием магнитных частиц

с иммобилизованными антителами к сальмонелле) [45]. Из других распространённых флуоресцентных интеркалирующих ДНК-красителей, которые применялись для регистрации результата LAMP, можно отметить пропидий йодид [43] и PicoGreen [46, 47]. Однако предел обнаружения при их использовании был выше 100 000 патогенов в реакционной пробе.

Присоединение нуклеотида к растущей цепи ДНК-полимеразой сопровождается образованием побочного продукта — пирофосфата [48], который, как упоминалось выше, при взаимодействии с ионами магния образует нерастворимую соль [35]. Однако регистрация образования пирофосфата магния по изменению мутности пробы невооружённым глазом затруднительна [49]. В связи с этим предложен другой подход, основанный на использовании колориметрических металлоиндикаторов, которые конкурируют за ионы металлов с пирофосфатом. Один из первых металлоиндикаторов, использованных для фиксирования результата LAMP, — кальцеин (флуорексон), который вместе с хлоридом марганца вносили в LAMP-пробу до начала реакции (конечная концентрация ионов марганца составляла 1 мМ) [49]. Успешное прохождение амплификации сопровождалось изменением цвета пробы от желтоватого к изумрудно-зелёному. Этот способ использован для выявления ряда инфекционных вирусных заболеваний у сельскохозяйственных животных и птиц на основе метода LAMP в формате PONT [50]. Например, применительно к бактерии *Plesiomonas shigelloides*, которая вызывает серозно-геморрагическое воспаление кожи у рыб и представляет серьёзную угрозу в промышленном рыболовстве, предел обнаружения составил 200 копий ДНК-мишени на реакционную пробу [51]. Наряду с кальцеином, использовали такие колориметрические металлоиндикаторы, как гидроксинафтол синий (hydroxynaphthol blue, HNB) и малахитовый зелёный (тетраметил-4,4'-диаминотрифенилметан). В случае HNB бесцветная реакционная проба приобретала голубой цвет, при этом были достигнуты пределы обнаружения около 30 и 50 молекул ДНК-мишени на LAMP-образец при определении золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) и гонококка (*Neisseria gonorrhoeae*) соответственно [52, 53]. Так же как кальцеин и малахитовый зелёный, HNB может быть добавлен в смесь до начала реакции, при этом цвет меняется от фиолетового к голубому при успешном прохождении амплификации. В случае золотистого стафилококка, предел обнаружения с HNB составил 8 копий при

использовании очищенной плазмиды, несущей последовательность ДНК-мишени, и 400 КОЕ бактерий на LAMP-образец [54]. Сравнение вариантов анализа с использованием HNB, кальцеина и SYBR Green I (в последнем случае с освещением пробы УФ-лампой) показало, что HNB и SYBR Green I дают существенно более низкий предел обнаружения, чем кальцеин — около 160 копий фала λ на LAMP-пробу против 1600 [55]. Возможно, это связано с тем, что ионы марганца могут снижать эффективность LAMP [56].

В то время как колориметрические металлоиндикаторы относительно часто применяют для регистрации результата LAMP, нам удалось найти только одну публикацию, касающуюся RPA: HNB использовали для идентификации сельскохозяйственного вредителя *Thrips palmi* [57]. Причиной может быть низкая чувствительность определения с использованием металлоиндикаторов из-за недостаточного количества ДНК, синтезируемой в ходе RPA и, соответственно, более низкого количества пирофосфата.

Наряду с образованием пирофосфата, присоединение нуклеотида ДНК-полимеразой сопровождается высвобождением протона, что в случае низкой буферной ёмкости реакционной смеси может привести к заметному изменению значения pH: с начального 8.8 до 6.0—6.5 в конце реакции [56]. Как оказалось, Bst-полимераза, используемая в LAMP, может с приемлемой эффективностью амплифицировать ДНК в буферных растворах с низкой ёмкостью в широком диапазоне значений pH от 6 до 10 [56]. Это позволило в случае LAMP применить колориметрические pH-индикаторы для регистрации результата реакции. Ряд индикаторов, таких как феноловый красный (фенолсульфоталеин), крезоловый красный (*o*-крезолсульфоталеин), нейтральный красный (3-амино-6-диметиламино-2-метилфеназоний хлорид) и метакрезоловый пурпурный (*m*-крезолсульфоталеин), оказался хорошо совместимым с LAMP [56]. Так, нейтральный красный использовали для обнаружения паразитов *Plasmodium falciparum* и *Plasmodium vivax*, вызывающих малярию (после их выделения из крови больных) с пределом обнаружения от 12 до 18 клеток на LAMP-образец (в зависимости от участка в геноме паразитов, используемого как ДНК-мишень) [58]. Индикатор, добавленный в пробу перед реакцией, изменяет окраску образца с желтой на розовую после успешного завершения амплификации. Крезоловый красный применяли для контроля присутствия спор бактерии *Clostridium tyrobutyricum* (вызывает порчу продукта

в сыроделии) в молоке — цвет пробы менялся от розового к жёлтому, при этом предел обнаружения составил 2 споры на LAMP-образец [59, 60].

Использование колориметрических pH-индикаторов для регистрации результата LAMP коммерциализировано компанией New England Biolabs (Великобритания), которая выпустила набор WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA). Набор даёт возможность обнаружить присутствие патогенов методом LAMP за 15—40 мин по изменению цвета пробы от розового к жёлтому. Использование данного набора позволило определить SARS-CoV-2 в формате RT-LAMP с пределом обнаружения, равным 25 копий вируса в реакционной пробе [61].

Таким образом, сегодня существует широкий класс красителей, совместимых с изотермической амплификацией, которые могут быть использованы для неинструментального анализа образцов на содержание инфекционных агентов в формате PONT. При этом можно отметить, что колориметрические металло- и pH-индикаторы используют, как правило, в LAMP, в то время как определение по изменению цвета флуоресцентных красителей — в RPA. Возможность внесения красителя до начала реакции амплификации является значительным преимуществом, поскольку позволяет проводить анализ без вскрытия пробирки с реакционной пробой и, следовательно, избежать контаминации окружающего пространства продуктами амплификации, таким образом понижается вероятность получения ложноположительного результата.

Анализ с использованием иммунохроматографических тест-полосок. LFA основан на перемещении раствора аналита (в данном случае ДНК-ампликонов) через различные зоны пористой полимерной мембраны без помощи внешних сил в результате капиллярного эффекта, аналогично тому, как это происходит в тонкослойной хроматографии [62]. Как правило, ампликоны мечены одновременно флуоресцеином (чаще всего 5(6)-карбоксифлуоресцеином, FAM) и биотином, что достигается использованием в амплификации олигонуклеотидных зондов и/или праймеров, конъюгированных с этими молекулами [24, 37]. По окончании амплификации реакционную смесь наносят на впитывающую часть тест-полоски, где она смешивается с находящимися там антителами к FAM, конъюгированными с наночастицами (например, коллоидным золотом), которые используют для усиления окраски. При перемещении по мембране комплексы ампликонов с наночастицами проходят через зону с иммобилизованным

биотин-связывающим белком (тест-зона), формируя визуально наблюдаемую полосу красного цвета, и далее через зону с иммобилизованными вторичными антителами, формируя вторую (контрольную) полосу. В случае отсутствия ампликонов формируется только контрольная полоса [24, 37, 62]. Можно отметить, что как альтернатива праймерам/зонду, конъюгированным с биотином и флуоресцеином, ампликоны могут быть помечены этими молекулами с использованием модифицированных нуклеотидов, конъюгатов биотина и флуоресцеина с дезоксинуклеозидтрифосфатами, выступающими в роли субстратов применяемых в RPA и LAMP полимераз [63, 64].

Комбинирование RPA с LFA (RPA-LFA) использовано для определения уровня содержания инфекционных агентов, значимых с точки зрения здравоохранения и сельхозпроизводства, а также для мониторинга состояния окружающей среды [65—67]. При определении вируса гепатита В человека (ДНК-содержащий вирус) методом RPA-LFA предел обнаружения составил 6 копий вируса в реакционной пробе [65]. Применительно к такому РНК-вирусу, как SARS-CoV-2 анализ образцов в формате RT-RPA-LFA характеризовался пределом обнаружения 180 вирионов на RPA-образец (при этом использование очищенной вирусной РНК дало предел обнаружения 13 копий мишени на образец) [68]. Интересно, что размер (длина) генерируемых RPA-ампликонов может изменять эффективность их определения с использованием LFA, по-видимому, по-разному влияя на агрегацию наночастиц золота [69].

Метод LAMP также может быть совмещен с регистрацией результата амплификации с помощью LFA (LAMP-LFA) и показывать при этом значения предела обнаружения, сопоставимые со значениями для RPA-LFA. Так, предел обнаружения вируса SARS-CoV-2 методом RT-LAMP-LFA составил у разных авторов 20 [70] и 30 [71] копий РНК-мишени на реакцию, что сопоставимо со значением для RT-RPA-LFA — 13 копий РНК-мишени SARS-CoV-2 в пробе [68]. Применительно к бактерии *Listeria monocytogenes* предел обнаружения метода LAMP-LFA составил около 100 копий ДНК-мишени в LAMP-пробе [72]. Сопоставление LFA с колориметрическим методом регистрации результата LAMP, а именно: с помощью красителя SYBR Green I, показало, что предел обнаружения в обоих подходах одинаков [73]. Однако в другом исследовании [72] анализ с помощью LFA оказался значительно более чувствительным, чем по варианту с применением SYBR Green I — пределы

обнаружения различались в 100 раз. Представляется наиболее вероятным, что такая разница между двумя способами регистрации результата реакции амплификации связана с использованием различных концентраций красителя, который может влиять на эффективность LAMP.

Анализ образцов в форматах RPA-LFA и LAMP-LFA требует переноса ампликонов из реакционной пробы на тест-полоску, что создаёт потенциальную возможность контаминации окружающего пространства продуктами амплификации, что, в свою очередь, может привести к появлению ложноположительных результатов. В случае LAMP для устранения влияния контаминации на результат анализа предложен способ, аналогичный ранее разработанному для ПЦР [74] и основанный на использовании 2'-дезокситимидин-5'-трифосфата (dTTP) вместо 2'-дезокситимидин-5'-трифосфата (dTTP) в реакционной смеси (это также потребовало замены Bst-полимеразы на полимеразу Bst 2.0) [75]. В рамках этого способа в реакционную смесь добавляют урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ), которая удаляет урацил в ампликонах, попавших в пробу, тем самым блокируя их последующую амплификацию (УДГ в дальнейшем инактивируется при повышении температуры до 60 °C или выше в ходе LAMP) [75].

Таким образом, регистрация результатов RPA и LAMP с помощью LFA характеризуется простотой и достаточно высокой чувствительностью, отвечающими требованиям PONT. Пределы обнаружения RPA-LFA и LAMP-LFA сопоставимы с пределами обнаружения, которые достигаются при использовании колориметрических методов регистрации продуктов амплификации. Однако, как и в случае колориметрических методов регистрации, LFA не позволяет дифференцировать целевые и нецелевые продукты амплификации, так что селективность теста полностью определяется тем, насколько удачным оказался выбор праймеров.

КОМБИНИРОВАНИЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ С CRISPR/CAS-АНАЛИЗОМ

CRISPR/Cas-нуклеазы являются основой иммунной системы бактерий и архей, обеспечивая их устойчивость к чужеродным генетическим элементам, таким как бактериофаги и плазмиды [76]. Cas-нуклеазы образуют комплексы с направляющей РНК (нРНК) — молекулой РНК определенной последовательности, состоящей из участка, ответственного за взаимодействие с Cas-нуклеазой, и участка (спейсер), комплементарного

последовательности в мишени (протоспейсер) [19]. Cas-нуклеаза активируется только в том случае, если образуется гетеродуплекс между спейсером и протоспейсером, что *in vivo* приводит к расщеплению последовательности-мишени. Такие CRISPR/Cas-нуклеазы, как Cas12a, Cas12b и Cas13a при активации в условиях *in vitro* приобретают сопутствующую (коллатеральную) активность — способность неселективно расщеплять молекулы РНК (Cas13a) или оцДНК (Cas12a и Cas12b) [19], при этом реакция эффективно протекает при 37–41 °C (а в случае Cas12b — при 60–65 °C).

Коллатеральная активность CRISPR/Cas-нуклеаз положена в основу методов определения концентрации нуклеиновых кислот (рис. 3), где целевые продукты RPA или LAMP (или фрагменты РНК, синтезированные по ним как матрицам) селективно узнаются комплексом CRISPR/Cas-нуклеазы с нРНК (рис. 3, шаг 2). При этом в реакционной смеси присутствуют короткие РНК- или ДНК-олигонуклеотиды (“репортёры”), меченные FAM и молекулой-“гасителем” (англ. quencher); их расхождение в пространстве при расщеплении олигонуклеотида приводит к росту интенсивности флуоресценции (рис. 3, шаги 3 и 4). Напротив, для сопряжения с LFA “репортёры” несут на концах FAM и биотин. При этом стоит отметить, что в случае CRISPR/Cas-анализа положения контрольной и тестовой полос в LFA меняются местами. Это связано с тем, что регистрируют не появление ампликонов, меченных FAM и биотином, а исчезновение несущих их “репортёров” в результате расщепления Cas-нуклеазами. В случае использования Cas13a ампликоны, представляющие фрагменты дцДНК, содержат промотор РНК-полимеразы фага T7 для синтеза фрагментов РНК (рис. 3, шаг 1), что достигается дополнением последовательности одного из праймеров в RPA и LAMP участком с последовательностью промотора [77]. После формирования направляющей РНК, находящейся в комплексе с CRISPR/Cas-нуклеазой, дуплекса с последовательностью-мишенью (либо непосредственно с одной из нитей дцДНК, либо с РНК, транскрибированной с дцДНК как матрицей), происходит активация нуклеазы с приобретением ферментом коллатеральной активности [19]. Расщепление молекул-репортёров приводит к появлению флуоресценции, которую можно наблюдать визуально при освещении пробы синим светом, либо к исчезновению (ослаблению) первой полосы на тест-полоске.

CRISPR/Cas-13a-нуклеаза является РНК-направляемой рибонуклеазой, узнающей

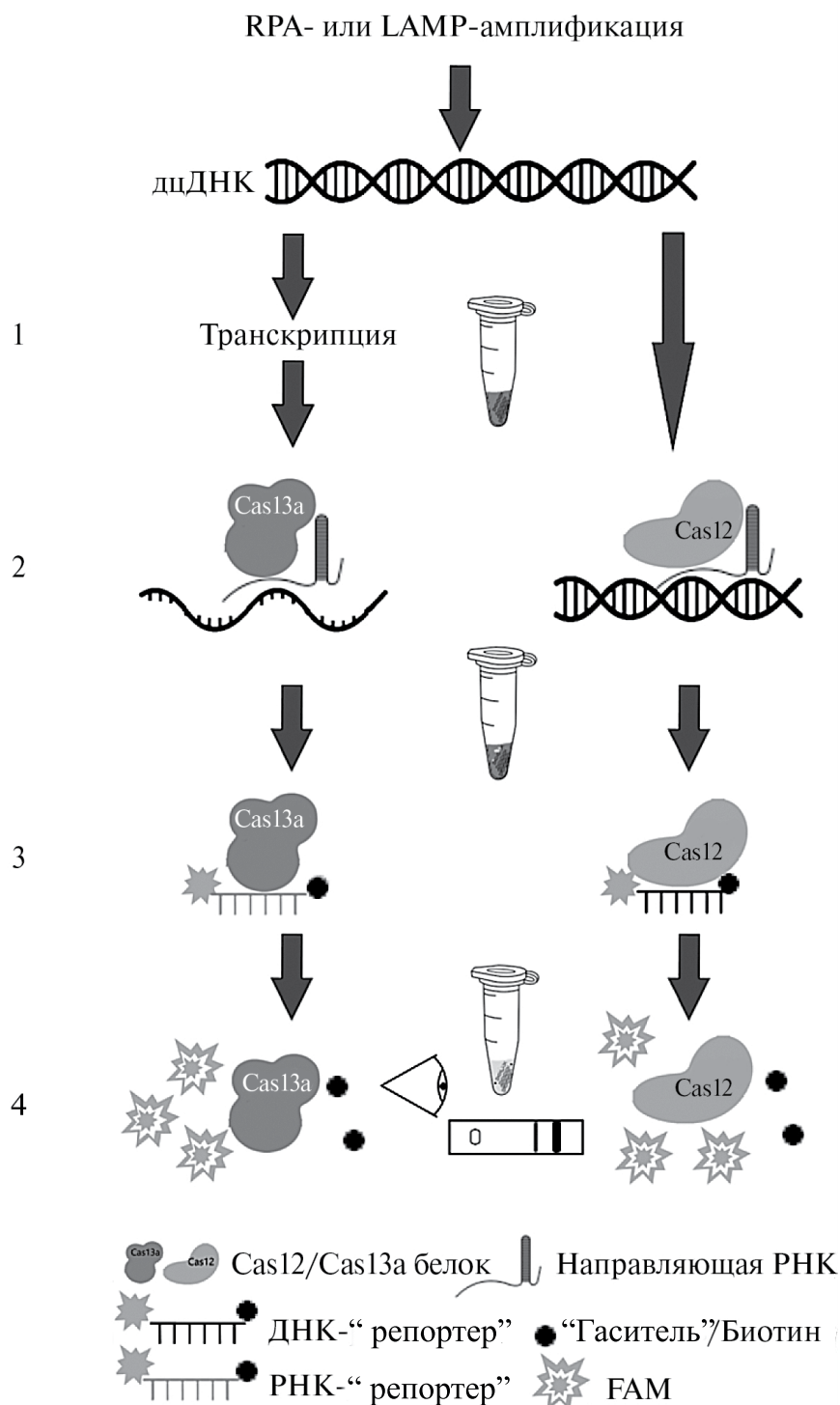


Рис. 3. Схематическое изображение детекции RPA- и LAMP-ампликонов с использованием CRISPR/Cas-нуклеаз Cas13a и Cas12 (Cas12a или Cas12b).

последовательность РНК-мишени. Первая работа, демонстрирующая возможность комбинирования изотермической амплификации (RPA и RT-RPA) с CRISPR-нуклеазой Cas13a опубликована Гутенбергом с соавт. в 2017 году [77]. CRISPR/

Cas13a-детекция требует введения этапа транскрипции, где ДНК-ампликоны, образующиеся в ходе RPA или LAMP, используются в качестве матрицы для ферментативного синтеза молекул РНК, выступающих в роли узнаваемой Cas13a-нуклеазой

мишени. Предложенный метод биохимического анализа получил название SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter un-LOCKing). Чуть позже [78] та же группа исследователей показала возможность сопряжения метода с LFA (SHERLOCK-LFA) для обнаружения вирусов денге и Зика с пределом обнаружения 1 копия генома вируса на микролитр образца. В дальнейшем SHERLOCK-LFA использовали, например, для определения РНК-вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней с пределом обнаружения 172 копии вируса на RPA-образец (при этом другие вирусы, также вызывающие эпизоотии у свиней, такие как вирус свиного герпеса, парвовирус и цирковир 2 свиней, не мешали определению) [79] и для высокоселективного определения вируса тембуса у уток с пределом обнаружения 1 вирус в реакционной пробе при высокой селективности [80].

Ещё в первой работе [77] по методу SHERLOCK показано, что все стадии (RPA, транскрипция и последующий CRISPR/Cas13a-анализ) могут выполняться в одной реакционной смеси. Такая схема проведения анализа в дальнейшем реализована, например, для определения бактерий, вызывающих сальмонеллёз, с пределом обнаружения 200 бактерий на реакционную пробу, что сравнимо с аналитическими характеристиками ПЦР, но заметно выше, чем в случае проведения стадии CRISPR/Cas-регистрации отдельно (20 бактерий на RPA-образец) [81]. Интересно, что предложен также способ, где амплификацию и CRISPR/Cas-анализ проводили в одной тест-пробирке, но последовательно [82]. Для этого в тест-пробирку помещали вторую пробирку меньшего размера из гидрофобного материала с отверстием в дне, через которое в обычных условиях реакционная смесь не проходила. RPA и транскрипция протекали во внутренней пробирке, после чего её содержимое переносили в реакционную смесь для Cas13a-регистрации либо центрифугированием тест-пробирки (лабораторные условия), либо путем её интенсивного встряхивания (внелабораторные условия). Во втором случае (совместим с PONT) результат может быть определён визуально с использованием УФ-лампы или светодиодного светильника с голубым светом с пределом обнаружения 30 копий вируса африканской чумы свиней на пробу [82]. Другой подход к визуальному определению коллатеральной активности Cas13a-нуклеазы, который можно отнести к колориметрическим, предложен в работе [83]: нуклеаза расщепляла РНК-олигонуклеотиды, иммобилизованные на

поверхности золотых наночастиц, что приводило к агрегации последних и изменению цвета пробы от пурпурного к сиреневому и далее к фиолетовому.

Наряду с RPA LAMP дополнена CRISPR/Cas13a-анализом. Так, вирус SARS-CoV-2 определили с пределом обнаружения 10 вирусных частиц на реакцию в RT-LAMP-Cas13a-тесте, сопряжённом с LFA [84]. Несмотря на значительное количество примеров успешной реализации метода SHERLOCK для обнаружения инфекционных агентов, у него есть существенный недостаток — необходимость получения РНК с ДНК-ампликонов в качестве матрицы требует добавления к одному из праймеров последовательности промотора полимеразы фага T7, что значительно усложняет подбор праймеров из-за возможности нежелательного спаривания остатков оснований промотора и праймеров.

Нуклеазы CRISPR/Cas-12a и CRISPR/Cas-12b. CRISPR/Cas12-нуклеаза в комплексе с нРНК узнаёт заданную последовательность в одной из цепей дцДНК, что устраняет необходимость этапа транскрипции. Однако, в отличие от Cas13a, данная CRISPR/Cas-нуклеаза для эффективной активации требует наличия так называемого PAM (англ. protospacer adjacent motif) — последовательности TTTV, непосредственно примыкающей к участку, комплементарному протоспейсеру с 5'-конца [85]. Наряду с TTTV ряд других последовательностей из четырёх нуклеотидов также может выступать в качестве PAM, однако за счёт заметного снижения эффективности активации Cas12-нуклеазы (субоптимальные PAM) [86].

Метод определения целевых RPA-ампликонов с использованием нуклеазы CRISPR/Cas12a предложен в 2018 году [87] и получил название DETECTR (англ. DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter). Годом позже показано [88], что обе стадии DETECTR (RPA или RT-RPA и определение целевых ампликонов) могут быть проведены в одной реакционной смеси, что, очевидно, наиболее соответствует требованиям PONT. Такой формат DETECTR стал преобладающим в последнее время для определения уровня содержания различных инфекционных агентов с высокой селективностью и пределом обнаружения до нескольких молекул РНК- или ДНК-мишени на реакционную пробу [85, 86, 88–93].

Для проведения амплификации и CRISPR/Cas-анализа в одной реакционной пробе используют два подхода: либо все компоненты сразу смешивают в реакционной смеси [88, 94, 95], либо

реакции протекают в одной тест-пробирке, но последовательно, для чего предложено помещать реакционную смесь для RPA на дно пробирки, а реакционную смесь, содержащую Cas12a-нуклеазу, на нижнюю часть крышки пробирки [96]. При этом смеси могут дополнительно разделяться нанесением слоя минерального масла на реакционную смесь для RPA [97]. После прохождения RPA обе смеси смешивают либо центрифугированием (лабораторные условия) [96], либо встряхиванием тест-пробирки (формат PONT) [96, 97].

Хотя проведение обеих реакций одновременно со смешиванием всех компонентов в одной реакционной смеси кажется более предпочтительным, изначально такой подход столкнулся с проблемой более низкой чувствительности, что связано с расщеплением активированной Cas12a-нуклеазой как участков оцДНК, формирование которых сопровождается RPA, так и, возможно, праймеров [85, 98, 99]. Интересно, что частично эта проблема может быть решена добавлением в реакционную смесь глицерина [98]. Однако более успешным решением стало понижение коллатеральной активности Cas12a-нуклеазы, которое достигалось отказом от необходимости наличия РАМ в последовательности RPA-ампликона или выбором субоптимального РАМ [85, 86, 90, 99]. Хотя при этом значительно снижается эффективность активации Cas12a-нуклеазы и, соответственно, проявление её коллатеральной активности, такое снижение компенсируется увеличением числа мишеней в ходе успешного прохождения RPA. Отказ от РАМ одновременно существенным образом упрощает подбор комбинации RPA-праймеров и последовательности спейсера нРНК. Дополнительно предложено использовать мутантные варианты Cas12a-нуклеазы с пониженной коллатеральной активностью [90].

В формате PONT результат RPA-CRISPR/Cas12a-детекции может быть определён визуально по появлению зеленоватой окраски пробы при её освещении синим светом (с использованием светодиодного светильника) с применением коротких ДНК-олигонуклеотидов, несущих на концах FAM и “гаситель” в качестве “репортёров” [85, 89, 92]. С другой стороны, при использовании “репортёров”, меченных FAM и биотином, результат может быть определён с помощью LFA [100, 101]. Кроме того, для визуального обнаружения применяли наночастицы золота, конъюгированные с ДНК-олигонуклеотидами [102, 103], а также колориметрические методы, основанные на использовании производных политиофена (образуют комплекс с оцДНК; при деградации оцДНК, активированной

Cas12a-нуклеазой, происходит конформационная реорганизация политиофена, сопровождающаяся изменением цвета реакционной смеси с красного на жёлтый) [93] и тетраметилбензидина [104]. В последнем случае реализована сложная схема анализа, в которой расщепление ДНК-аптамера активированной Cas12a-нуклеазой вызывало высвобождение связанных аптамером ионов серебра, что, в свою очередь, приводило к окислению тетраметилбензидина, сопровождавшемуся развитием окраски синего цвета [104].

Наряду с RPA сопряжение LAMP с CRISPR/Cas12a-анализом также получило широкое распространение. Первая работа, демонстрирующая возможность комбинирования CRISPR/Cas12a и LAMP, опубликована в 2019 году [105]. Хотя первоначально LAMP и CRISPR/Cas12a-анализ выполнялись последовательно в разных тест-пробирках (например, в работе [106], где SARS-CoV-2 определён с пределом обнаружения 20 вирусов на LAMP-образец), довольно быстро был реализован вариант анализа, где реакция выполнялась в одной тест-пробирке [107, 108]. Как и в случае RPA-Cas12a-анализа, реакционную смесь для RT-LAMP помещали на дно пробирки, а содержащую Cas12a — на нижнюю сторону крышки пробирки. Обе смеси были разделены слоем воздуха и минерального масла, которое наслаивалось на нижнюю реакционную смесь. Только нижняя часть пробирки подвергалась нагреванию. После прохождения реакции обе части смешивали интенсивным встряхиванием тест-пробирки. Результат определяли визуально при освещении пробы синим светом, при этом предел обнаружения составил 50 копий РНК-мишени (фрагмент генома SARS-CoV-2) [107]. Кроме того, LAMP-Cas12a-детекция может быть интегрирована с LFA [109, 110], а также с колориметрическим методом с использованием наночастиц золота [111].

Одновременная регистрация несколько мишеней (мультиплексная детекция) является несомненным достоинством любого теста. Возможность проведения анализа в таком формате продемонстрирована в случае комбинирования CRISPR/Cas12a как с RPA [91, 102], так и с LAMP [112]. Однако это требует раздельного проведения реакций амплификации и Cas-анализа: амплификация выполняется одновременно с несколькими наборами праймеров, а затем присутствие специфических ампликонов определяется в отдельных реакциях с использованием комплексов Cas12a с нРНК, селективно узнающей заданный ампликон. Кроме того, показана возможность одновременной

регистрации двух мишеней в одной реакционной пробе после RT-RPA комбинированием нуклеаз Cas12a и Cas13a и “репортёров”, представляющих собой короткие ДНК- и РНК-олигонуклеотиды, меченные разными флуорофорами, соответственно [113].

CRISPR/Cas-нуклеаза, аналогичная Cas12a, но обнаруженная в термофилах, получила название CRISPR/Cas12b. Существенно большая термостабильность потенциально позволяет комбинировать её с LAMP в одной реакционной смеси. Впервые такая возможность продемонстрирована в работе [114] для рекомбинантной CRISPR/Cas12b-нуклеазы термофильной бактерии *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Однако данная Cas-нуклеаза показывала приемлемую коллатеральную активность при температурах не выше 55 °С, что требовало понижения температуры LAMP и приводило к значительному увеличению времени анализа. Позднее было предложено использовать рекомбинантную CRISPR/Cas12b-нуклеазу из *Brevibacillus sp.* с более высокой термостабильностью, что позволило определить различные варианты вируса SARS-CoV-2 с пределом обнаружения от 60 до 2500 копий на реакцию в комбинации с RT-LAMP и температурой проведения амплификации 60—62 °С [115]. Интересно, что реакционная смесь для RT-LAMP-Cas12b может быть лиофилизована и регидрирована перед анализом [115], что является несомненным плюсом при тестировании в формате PONT.

Таким образом, к настоящему времени опубликовано значительное количество экспериментальных работ, показывающих возможность интегрирования CRISPR/Cas-нуклеаз с RPA и LAMP для разработки высокоселективных и высокочувствительных тестов для ДНК-диагностики инфекционных заболеваний, позволяющих регистрировать конечный результат визуально по окраске пробы (с использованием простых и дешёвых светодиодных светильников) или с помощью LFA.

“ГНЕЗДОВАЯ” ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ

В 2017 году группа исследователей под руководством Бай [22] предложила совместить RPA и LAMP на том же принципе, на котором основана “гнездовая” ПЦР. При этом на первом этапе происходит амплификация ДНК-мишени, а на втором — амплификация участка дцДНК, находящегося внутри ДНК-мишени между последовательностями праймеров [3]. Разработанный

способ биохимического анализа получил название “Penn-RAMP” [22]. При проведении Penn-RAMP сначала выполняется амплификация ДНК-мишени методом RPA, после чего RPA-ампликоны используют как стартовый материал для LAMP. Соответственно, последовательности праймеров для LAMP должны подбираться так, чтобы они были комплементарны участкам ДНК, находящимся внутри целевых RPA-ампликонов. Как следствие, нецелевые RPA-ампликоны не амплифицируются на втором шаге, что обеспечивает требуемую селективность определения ДНК-мишени при сохранении высокой чувствительности, обеспечиваемой RPA. При этом оптимальное время для первой реакции (RPA) составляет 10—20 мин (при 37 °С), для второй реакции (LAMP) — около 15 мин (при 65 °С) [22]. В итоге реакция Penn-RAMP занимает 30—40 мин.

Очевидным недостатком первоначального варианта метода Penn-RAMP была необходимость проведения его в двух тест-пробирках, что в силу высокой чувствительности метода могло приводить к ложноположительным результатам из-за возможности контаминации окружающего пространства ампликонами. Для преодоления этого недостатка предложено проводить обе реакции в одной тест-пробирке [116]: первая стадия (RPA или RT-RPA) происходит на крышке пробирки в 5 мкл реакционной смеси при 39 °С в течение 15—20 мин, первая смесь затем смешивается с 70 мкл второй реакционной смеси (LAMP) при помощи короткого центрифугирования и инкубируется при 65 °С в течение 40 мин. Применительно к образцам SARS-CoV-2 данный вариант метода показал 10-кратное снижение предела обнаружения по сравнению с RT-LAMP и ПЦР с обратной транскрипцией [116]. В 2022 году метод Penn-RAMP в формате “одной пробирки” получил дальнейшее развитие [117]: RPA проводили над слоем застывшего докозана (англ. docosane; относится к классу парафинов, совместим с LAMP) с температурой плавления 45 °С, под которым помещали раствор ингредиентов, необходимых для проведения LAMP, в буферном растворе, который при смешивании с реакционной смесью для RPA давал буферный раствор, совместимый с проведением LAMP. Это позволило обнаружить вирусы гепатита человека В и С с пределами обнаружения 10 и 25 вирионов в тест-пробирке соответственно в течение 30 мин [117]. Результат Penn-RAMP может быть зарегистрирован любым методом, используемым для LAMP и отвечающим требованиям PONT, в том числе с использованием флуоресцентных

и колориметрических красителей, а также иммунохроматографических тест-полосок [14, 28].

* * *

Суммируя изложенное, можно заключить, что рекомбиназная полимеразная и петлевая изотермическая амплификация позволяет определять РНК- и ДНК-мишени во внелабораторных условиях в отсутствие технически сложного оборудования. Оба метода амплификации характеризуются сопоставимыми значениями пределов обнаружения, которые могут варьироваться в диапазоне от нескольких копий ДНК-мишени до более чем тысячи копий в реакционной пробе, что определяется в первую очередь тем, насколько удачно подобраны праймеры в каждом случае. Сочетание RPA и LAMP в формате “гнездовой” амплификации позволяет на порядок понизить предел обнаружения по сравнению с использованием только RPA. В настоящее время предложены и апробированы различные простые способы регистрации результата амплификации: визуально по изменению окраски реакционной пробы или с помощью иммунохроматографических тест-полосок. Текущий уровень развития технологий изотермической амплификации, особенно возможность их сопряжения с селективным определением целевых ампликонов с помощью CRISPR/Cas-нуклеаз, открывает широкие возможности для практической разработки тестов для экспресс ДНК-диагностики инфекций человека, а также сельскохозяйственных животных и растений.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 19-14-00247, <https://rscf.ru/project/19-14-00247/>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Erdmann V.A., Jurga S., Barciszewski J. RNA and DNA Diagnostics. N.Y.: Springer, 2015. P. 359.
2. Schmitz J.E., Stratton C.W., Persing D.H., Tang Y.W. Forty years of molecular diagnostics for infectious diseases // J. Clin. Microbiol. 2022. V. 60. № 10. Article e0244621. DOI: 10.1128/jcm.02446-21
3. Rolfs A., Schuller I., Finckh U., Weber-Rolfs I. PCR: Clinical Diagnostics and Research. N.Y.: Springer, 2011. P. 386.
4. Abel G. Current status and future prospects of point-of-care testing around the globe // Expert Rev. Mol. Diagn. 2015. V. 15. № 7. P. 853. DOI: 10.1586/14737159.2015.1060126
5. Fernandes R.S., de Oliveira Silva J., Gomes K.B., Azevedo R.B., Townsend D.M., de Paula Sabino A., Branco de Barros A.L. Recent advances in point of care testing for COVID-19 detection // Biomed. Pharmacother. 2022. V. 153. Article 113538. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113538
6. De Felice M., De Falco M., Zappi D., Antonacci A., Scognamiglio V. Isothermal amplification-assisted diagnostics for COVID-19 // Biosens. Bioelectron. 2022. V. 205. Article 114101. DOI: 10.1016/j.bios.2022.114101
7. Vidic J., Vizzini P., Manzano M., Kavanaugh D., Ramarao N., Zivkovic M., Radonic V., Knezevic N., Giouroudi I., Gadjanski I. Point-of-need DNA testing for detection of foodborne pathogenic bacteria // Sensors (Basel). 2019. V. 19. № 5. P. 1100. DOI: 10.3390/s19051100
8. Baldi P., La Porta N. Molecular approaches for low-cost point-of-care pathogen detection in agriculture and forestry // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. Article 570862. DOI: 10.3389/fpls.2020.570862
9. Demetria C., Kimitsuki K., Yahiro T., Saito N., Hashimoto T., Khan S., Chu M.Y.J., Manalo D., Mananggit M., Quiambao B., Nishizono A. Evaluation of a real-time mobile PCR device (PCR 1100) for the detection of the rabies gene in field samples // Trop. Med. Health. 2023. V. 51. № 1. P. 17. DOI: 10.1186/s41182-023-00501-3
10. Nguyen P.Q.M., Wang M., Ann Maria N., Li A.Y., Tan H.Y., Xiong G.M., Tan M.M., Bhagat A.A.S., Ong C.W.M., Lim C.T. Modular micro-PCR system for the onsite rapid diagnosis of COVID-19 // Microsyst. Nanoeng. 2022. V. 8. P. 82. DOI: 10.1038/s41378-022-00400-3
11. Jiang H., Li Y., Lv X., Deng Y., Li X. Recent advances in cascade isothermal amplification techniques for ultra-sensitive nucleic acid detection // Talanta. 2023. V. 260. Article 124645. DOI: 10.1016/j.talanta.2023.124645
12. Bodulev O.L., Sakharov I.Y. Isothermal nucleic acid amplification techniques and their use in bioanalysis // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. № 2. P. 147. DOI: 10.1134/S0006297920020030
13. Ivanov A.V., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. The potential use of isothermal amplification assays for in-field diagnostics of plant pathogens // Plants (Basel). 2021. V. 10. № 11. Article 2424. DOI: 10.3390/plants10112424
14. Wong Y.P., Othman S., Lau Y.L., Radu S., Chee H.Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A versatile technique for detection of micro-organisms // J. Appl. Microbiol. 2018. V. 124. № 3. P. 626. DOI: 10.1111/jam.13647
15. Oliveira B.B., Veigas B., Baptista P.V. Isothermal amplification of nucleic acids: The race for the next “Gold Standard” // Front. Sens. 2021. V. 2. Article

752600.
DOI: 10.3389/fsens.2021.752600
16. *Torres C., Vitalis E.A., Baker B.R., Gardner S.N., Torres M.W., Dzenitis J.M.* LAVA: An open-source approach to designing LAMP (loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures // *BMC Bioinformatics*. 2011. V. 12. P. 240.
DOI: 10.1186/1471-2105-12-240
 17. *Jia B., Li X., Liu W., Lu C., Lu X., Ma L., Li Y.Y., Wei C.* GLAPD: Whole genome based LAMP primer design for a set of target genomes // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 2860.
DOI: 10.3389/fmicb.2019.02860
 18. *Higgins M., Ravenhall M., Ward D., Phelan J., Ibrahim A., Forrest M.S., Clark T.G., Campino S.* PrimedRPA: Primer design for recombinase polymerase amplification assays // *Bioinformatics*. 2019. V. 35. № 4. P. 682.
DOI: 10.1093/bioinformatics/bty701
 19. *Yuan B., Yuan C., Li L., Long M., Chen Z.* Application of the CRISPR/Cas system in pathogen detection: A review // *Molecules*. 2022. V. 27. № 20. Article 6999.
DOI: 10.3390/molecules27206999
 20. *García-Bernalt Diego J., Fernández-Soto P., Muro A.* The future of point-of-care nucleic acid amplification diagnostics after COVID-19: Time to walk the walk // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 22. Article 14110.
DOI: 10.3390/ijms232214110
 21. *Ivanov A.V., Safenkova I.V., Drenova N.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* Comparison of biosensing methods based on different isothermal amplification strategies: A case study with *Erwinia amylovora* // *Biosensors (Basel)*. 2022. V. 12. № 12. Article 1174.
DOI: 10.3390/bios12121174
 22. *Song J., Liu C.C., Mauk M.G., Rankin S.C., Lok J.B., Greenberg R.M., Bau H.H.* Two-stage isothermal enzymatic amplification for concurrent multiplex molecular detection // *Clin. Chem.* 2017. V. 63. № 3. P. 714.
DOI: 10.1373/clinchem.2016.263665
 23. *Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L., Armes N.A.* DNA detection using recombination proteins // *PLoS Biol.* 2006. V. 4. № 7. Article e204.
DOI: 10.1371/journal.pbio.0040204
 24. *Lobato I.A., O'Sullivan C.K.* Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances // *Trends Anal. Chem.* 2018. V. 98. P. 19.
DOI: 10.1016/j.trac.2017.10.015
 25. *Higgins M., Stringer O.W., Ward D., Andrews J.M., Forrest M.S., Campino S., Clark T.G.* Characterizing the impact of primer-template mismatches on recombinase polymerase amplification // *J. Mol. Diagn.* 2022. V. 24. № 11. P. 1207.
DOI: 10.1016/j.jmoldx.2022.08.005
 26. *Yang Z., Le J.T., Hutter D., Bradley K.M., Overton B.R., McLendon C., Benner S.A.* Eliminating primer dimers and improving SNP detection using self-avoiding molecular recognition systems // *Biol. Methods Protoc.* 2020. V. 5. № 1. Article bpaa004.
DOI: 10.1093/biomethods/bpaa004
 27. *Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. № 12. Article e63.
DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
 28. *Park J.W.* Principles and applications of loop-mediated isothermal amplification to point-of-care tests // *Biosensors (Basel)*. 2022. V. 12. № 10. Article 857.
DOI: 10.3390/bios12100857
 29. *Estrela P.F., Mendes G.M., Oliveira K.G., Bailão A.M., Soares C.M., Assunção N.A., Duarte G.R.* Ten-minute direct detection of *Zika virus* in serum samples by RT-LAMP // *J. Virol. Methods*. 2019. V. 271. Article 113675.
DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.113675
 30. *Ji J., Chen Q., Sui C., Hu W., Yu Z., Zhang Z., Mu X., Xu X., Yao L., Kan Y., Xie Q.* Rapid and visual detection of novel *Astroviruses* causing fatal gout in goslings using one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification // *Poult. Sci.* 2020. V. 99. № 9. P. 4259.
DOI: 10.1016/j.psj.2020.05.024
 31. *Chen H.W., Weissenberger G., Ching W.M.* Development of lyophilized loop-mediated isothermal amplification reagents for the detection of *Leptospira* // *Mil. Med.* 2016. V. 181. № 5. P. 227.
DOI: 10.7205/MILMED-D-15-00149
 32. *Song X., Coulter F.J., Yang M., Smith J.L., Tafesse F.G., Messer W.B., Reif J.H.* A lyophilized colorimetric RT-LAMP test kit for rapid, low-cost, at-home molecular testing of SARS-CoV-2 and other pathogens // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. Article 7043.
DOI: 10.1038/s41598-022-11144-5
 33. *Nagamine K., Hase T., Notomi T.* Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers // *Mol. Cell. Probes*. 2002. V. 16. № 3. P. 223.
DOI: 10.1006/mcpr.2002.0415
 34. *Fischbach J., Xander N.C., Frohme M., Glokler J.F.* Shining a light on LAMP assays – A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine // *Biotechniques*. 2015. V. 58. № 4. P. 189.
DOI: 10.2144/000114275
 35. *Mori Y., Nagamine K., Tomita N., Notomi T.* Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation // *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2001. V. 289. № 1. P. 150.
DOI: 10.1006/bbrc.2001.5921
 36. *Shirato K.* Detecting amplicons of loop-mediated isothermal amplification // *Microbiol. Immunol.* 2019. V. 63. № 10. P. 407.
DOI: 10.1111/1348-0421.12734
 37. *Chatterjee S., Mukhopadhyay S.* Recent advances of lateral flow immunoassay components as “point of

- need" // J. Immunoassay Immunochem. 2022. V. 43. № 6. P. 579.
DOI: 10.1080/15321819.2022.2122063
38. Lai M.Y., Lau Y.L. Detection of *Plasmodium knowlesi* using recombinase polymerase amplification (RPA) combined with SYBR Green I // Acta Tropica. 2020. V. 208. Article 105511.
DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105511
 39. Singpanomchai N., Akeda Y., Tomono K., Tamaru A., Santanirand P., Ratthawongjirakul P. Naked eye detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by recombinase polymerase amplification-SYBR green I assays // J. Clin. Lab. Anal. 2019. V. 33. № 2. Article e22655.
DOI: 10.1002/jcla.22655
 40. Waman V.P., Vedithi S.C., Thomas S.E., Bannerman B.P., Munir A., Skwark M.J., Malhotra S., Blundell T.L. Mycobacterial genomics and structural bioinformatics: opportunities and challenges in drug discovery // Emerg. Microbes Infect. 2019. V. 8. № 1. P. 109.
DOI: 10.1080/22221751.2018.1561158
 41. Zheng Y., Hu P., Ren H., Wang H., Cao Q., Zhao Q., Li H., Zhang H., Liu Z., Li Y., Wang C., Liu Z., Lu S. RPA-SYBR Green I based instrument-free visual detection for pathogenic *Yersinia enterocolitica* in meat // Anal. Biochem. 2021. V. 621. Article 114157.
DOI: 10.1016/j.ab.2021.114157
 42. Parida M., Horioka K., Ishida H., Dash P.K., Saxena P., Jana A.M., Islam M.A., Inoue S., Hosaka N., Morita K. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay // J. Clin. Microbiol. 2005. V. 43. № 6. P. 2895.
DOI: 10.1128/JCM.43.6.2895-2903.2005
 43. Hill J., Beriwal S., Chandra I., Paul V.K., Kapil A., Singh T., Wadowsky R.M., Singh V., Goyal A., Jahnukainen T., Johnson J.R., Tarr P.I., Vats A. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of *Escherichia coli* // J. Clin. Microbiol. 2008. V. 46. № 8. P. 2800.
DOI: 10.1128/JCM.00152-08
 44. Lai M.Y., Ooi C.H., Lau Y.L. Validation of SYBR green I based closed-tube loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for diagnosis of knowlesi malaria // Malar. J. 2021. V. 20. № 1. Article 166.
DOI: 10.1186/s12936-021-03707-0
 45. Vinayaka A.C., Golabi M., Than T.L.Q., Wolff A., Bang D.D. Point-of-care diagnosis of invasive non-typhoidal *Salmonella enterica* in bloodstream infections using immunomagnetic capture and loop-mediated isothermal amplification // N. Biotechnol. 2022. V. 66. P. 1.
DOI: 10.1016/j.nbt.2021.08.003
 46. Curtis K.A., Rudolph D.L., Owen S.M. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) // J. Virol. Methods. 2008. V. 151. № 2. P. 264.
DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.04.011
 47. Dukes J.P., King D.P., Alexandersen S. Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus // Arch. Virol. 2006. V. 151. № 6. P. 1093.
DOI: 10.1007/s00705-005-0708-5
 48. Kottur J., Nair D.T. Pyrophosphate hydrolysis is an intrinsic and critical step of the DNA synthesis reaction // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. № 12. P. 5875.
DOI: 10.1093/nar/gky402.
 49. Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products // Nat. Protoc. 2008. V. 3. № 5. P. 877.
DOI: 10.1038/nprot.2008.57
 50. Mansour S.M., Ali H., Chase C.C., Cepica A. Loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of 18 World Organization for Animal Health (OIE) notifiable viral diseases of ruminants, swine and poultry // Anim. Health Res. Rev. 2015. V. 16. № 2. P. 89.
DOI: 10.1017/S1466252315000018
 51. Liu H., Yu H., Peng Z.Q., Yu Y.Y., Xie J.F., Yang Y. Visual and rapid detection of *Plesiomonas shigelloides* using loop-mediated isothermal amplification method // Lett. Appl. Microbiol. 2019. V. 69. № 6. P. 411.
DOI: 10.1111/lam.13225
 52. Chen X., Ma K., Yi X., Xiong L., Wang Y., Li S. The rapid and visual detection of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex loop-mediated isothermal amplification linked to a nanoparticle-based lateral flow biosensor // Antimicrob. Resist. Infect. Control. 2020. V. 9. № 1. Article 111.
DOI: 10.1186/s13756-020-00774-x
 53. Chen X., Zhou Q., Wu X., Wang S., Liu R., Dong S., Yuan W. Visual and rapid diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* using loop-mediated isothermal amplification combined with a polymer nanoparticle-based biosensor in clinical application // Front. Mol. Biosci. 2021. V. 8. Article 702134.
DOI: 10.3389/fmolb.2021.702134
 54. Wu C., Zeng Y., He Y. Rapid visualization and detection of *Staphylococcus aureus* based on loop-mediated isothermal amplification // World J. Microbiol. Biotechnol. 2021. V. 37. № 12. Article 209.
DOI: 10.1007/s11274-021-03178-0
 55. Goto M., Honda E., Ogura A., Nomoto A., Hanaki K. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue // Biotechniques. 2009. V. 46. № 3. P. 167.
DOI: 10.2144/000113072
 56. Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes // Biotechniques. 2015. V. 58. № 2. P. 59.
DOI: 10.2144/000114253
 57. Priti, Jangra S., Baranwal V.K., Dietzgen R.G., Ghosh A. A rapid field-based assay using recombinase polymerase amplification for identification of *Thrips*

- palmi*, a vector of tospoviruses // J. Pest Sci. 2021. V. 94. № 2. P. 219.
DOI: 10.1007/s10340-020-01284-w
58. Nolasco O., Montoya J., Ana L., Barrientos S., Rosanas-Urge A., Gamboa D. Multicopy targets for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* detection by colorimetric LAMP // Malar. J. 2021. V. 20. № 1. Article 225.
DOI: 10.1186/s12936-021-03753-8
 59. Cecere P., Gatto F., Cortimiglia C., Bassi D., Lucchini F., Cocconcelli P.S., Pompa P.P. Colorimetric point-of-care detection of *Clostridium tyrobutyricum* spores in milk samples // Biosensors (Basel). 2021. V. 11. Article 293.
DOI: 10.3390/bios11090293
 60. Cibecchini G., Cecere P., Tumino G., Morcia C., Ghizzoni R., Carnevali P., Terzi V., Pompa P.P. A fast, naked-eye assay for varietal traceability in the durum wheat production chain // Foods. 2020. V. 9. № 11. Article 1691.
DOI: 10.3390/foods9111691
 61. Aldossary A.M., Tawfik E.A., Altammami M.A., Alquait A.A., Booq R.Y., Sendy B.K., Alarawi M.S., Gjobori T., Altamimi A.M., Alaijan T.A., Albarrag A.M., Alyamani E.J. Development and validation of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a simple and rapid diagnostic tool for SARS-CoV-2 detection // Diagnostics (Basel). 2022. V. 12. № 9. Article 2232.
DOI: 10.3390/diagnostics12092232
 62. Koczula K.M., Gallotta A. Lateral flow assays // Essays Biochem. 2016. V. 60. № 1. P. 111.
DOI: 10.1042/EBC20150012
 63. Kortli S., Jauset-Rubio M., Tomaso H., Abbas M.N., Bashammakh A.S., El-Shahawi M.S., Alyoubi A.O., Ben-Ali M., O'Sullivan C.K. *Yersinia pestis* detection using biotinylated dNTPs for signal enhancement in lateral flow assays // Anal. Chim. Acta. 2020. V. 1112. P. 54.
DOI: 10.1016/j.aca.2020.03.059
 64. Agarwal S., Warmt C., Henkel J., Schrick L., Nitsche A., Bier F.F. Lateral flow-based nucleic acid detection of SARS-CoV-2 using enzymatic incorporation of biotin-labeled dUTP for POCT use // Anal. Bioanal. Chem. 2022. V. 414. № 10. P. 3177.
DOI: 10.1007/s00216-022-03880-4
 65. Mayran C., Foulongne V., Perre P.V., Fournier-Wirth C., Molès J.P., Cantaloube J.F. Rapid diagnostic test for hepatitis B virus viral load based on recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow read-out // Diagnostics (Basel). 2022. V. 12. № 3. Article 621.
DOI: 10.3390/diagnostics12030621
 66. Ivanov A.V., Safenkova I.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Nucleic acid lateral flow assay with recombinase polymerase amplification: Solutions for highly sensitive detection of RNA virus // Talanta. 2020. V. 210. Article 120616.
DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120616
 67. Ivanov A.V., Safenkova I.S., Drenova N.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of lateral flow assay combined with recombinase polymerase amplification for highly sensitive detection of *Dickeya solani* // Mol. Cell. Probes. 2020. V. 53. Article 101622.
DOI: 10.1016/j.mcp.2020.101622
 68. Zheng T., Li X., Si Y., Wang M., Zhou Y., Yang Y., Liang N., Ying B., Wu P. Specific lateral flow detection of isothermal nucleic acid amplicons for accurate point-of-care testing // Biosens. Bioelectron. 2023. V. 222. Article 114989.
DOI: 10.1016/j.bios.2022.114989
 69. Safenkova I.S., Ivanov A.V., Slutskaya E.S., Samokhvalov A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Key significance of DNA-target size in lateral flow assay coupled with recombinase polymerase amplification // Anal. Chim. Acta. 2020. V. 1102. P. 109.
DOI: 10.1016/j.aca.2019.12.048
 70. Chen X., Zhou Q., Li S., Yan H., Chang B., Wang Y., Dong S. Rapid and visual detection of SARS-CoV-2 using multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification linked with gold nanoparticle-based lateral flow biosensor // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2021. V. 11. Article 581239.
DOI: 10.3389/fcimb.2021.581239
 71. Zasada A.A., Mosiej E., Prygiel M., Polak M., Wdowiak K., Formińska K., Ziółkowski R., Żukowski K., Marchlewicz K., Nowiński A., Nowińska J., Rastawicki W., Malinowska E. Detection of SARS-CoV-2 using reverse transcription helicase dependent amplification and reverse transcription loop-mediated amplification combined with lateral flow assay // Biomedicines. 2022. V. 10. № 9. Article 2329.
DOI: 10.3390/biomedicines10092329
 72. Srisawat W., Saengthongpinit C., Nuchchanart W. Development of loop-mediated isothermal amplification-lateral flow dipstick as a rapid screening test for detecting *Listeria monocytogenes* in frozen food products using a specific region on the ferrous iron transport protein B gene // Vet. World. 2022. V. 15. № 3. P. 590.
DOI: 10.14202/vetworld.2022.590-601
 73. Wang L., Chen G.F., Zhang C.Y., Wang Y.Y., Sun R. Rapid and sensitive detection of *Amphidinium carterae* by loop-mediated isothermal amplification combined with a chromatographic lateral-flow dipstick // Mol. Cell. Probes. 2019. V. 43, P. 72.
DOI: 10.1016/j.mcp.2018.11.001
 74. Longo M.C., Berninger M.S., Hartley J.L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions // Gene. 1990. V. 93. № 1. P. 125.
DOI: 10.1016/0378-1119(90)90145-h
 75. Hsieh K., Mage P.L., Csordas A.T., Eisenstein M., Soh H.T. Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP) // Chem. Commun.

- (Camb.). 2014. V. 50. № 28. P. 3747.
DOI: 10.1039/c4cc00540f
76. Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems // *Curr. Opin. Microbiol.* 2017. V. 37. P. 67.
DOI: 10.1016/j.mib.2017.05.008
 77. 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. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 // *Science*. 2017. V. 356. № 6336. P. 438.
DOI: 10.1126/science.aam9321
 78. Myhrvold C., Freije C.A., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Metsky H.C., Durbin A.F., Kellner M.J., Tan A.L., Paul L.M., Parham L.A., Garcia K.F., Barnes K.G., Chak B., Mondini A., Nogueira M.L., Isern S., Michael S.F., Lorenzana I., Yozwiak N.L., MacInnis B.L., Bosch I., Gehrke L., Zhang F., Sabeti P.C. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13 // *Science*. 2018. V. 360. № 6387. P. 444.
DOI: 10.1126/science.aas8836
 79. Chang Y., Deng Y., Li T., Wang J., Wang T., Tan F., Li X., Tian K. Visual detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using CRISPR-Cas13a // *Transbound. Emerg. Dis.* 2020. V. 67. № 2. P. 564.
DOI: 10.1111/tbed.13368
 80. Yin D., Yin L., Wang J., Shen X., Pan X., Hou H., Zhao R., Hu X., Wang G., Qi K., Dai Y. Visual detection of duck Tembusu virus with CRISPR/Cas13: A sensitive and specific point-of-care detection // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022. V. 12. Article 848365. DOI: 10.3389/fcimb.2022.848365
 81. An B., Zhang H., Su X., Guo Y., Wu T., Ge Y., Zhu F., Cui L. Rapid and sensitive detection of salmonella spp. using CRISPR-Cas13a combined with recombinase polymerase amplification // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Article 732426.
DOI: 10.3389/fmicb.2021.732426
 82. Hu F., Liu Y., Zhao S., Zhang Z., Li X., Peng N., Jiang Z. A one-pot CRISPR/Cas13a-based contamination-free biosensor for low-cost and rapid nucleic acid diagnostics // *Biosens. Bioelectron.* 2022. V. 202. Article 113994.
DOI: 10.1016/j.bios.2022.113994
 83. López-Valls M., Escalona-Noguero C., Rodríguez-Díaz C., Pardo D., Castellanos M., Milán-Rois P., Martínez-Garay C., Coloma R., Abreu M., Cantón R., Galán J.C., Miranda R., Somoza Á., Sot B. CASCADE: Naked eye-detection of SARS-CoV-2 using Cas13a and gold nanoparticles // *Anal. Chim. Acta*. 2022. V. 1205. Article 339749.
DOI: 10.1016/j.aca.2022.339749
 84. Ortiz-Cartagena C., Fernández-García L., Blasco L., Pacios O., Blieriot I., López M., Cantón R., Tomás M. Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification-CRISPR-Cas13a technology as a promising diagnostic tool for SARS-CoV-2 // *Microbiol. Spectr.* 2022. V. 10. № 5. Article e0239822.
DOI: 10.1128/spectrum.02398-22
 85. Lin K., Guo J., Guo X., Li Q., Li X., Sun Z., Zhao Z., Weng J., Wu J., Zhang R., Li B. Fast and visual detection of nucleic acids using a one-step RPA-CRISPR detection (ORCD) system unrestricted by the PAM // *Anal. Chim. Acta*. 2023. V. 1248. Article 340938.
DOI: 10.1016/j.aca.2023.340938
 86. Wang P., Guo B., Zhang X., Wang Y., Yang G., Shen H., Gao S., Zhang L. One-pot molecular diagnosis of acute hepatopancreatic necrosis disease by recombinase polymerase amplification and CRISPR/Cas12a with specially designed crRNA // *J. Agric. Food Chem.* 2023. V. 71. № 16. P. 6490.
DOI: 10.1021/acs.jafc.2c08689
 87. Chen J.S., Ma E., Harrington L.B., Da Costa M., Tian X., Palefsky J.M., Doudna J.A. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity // *Science*. 2018. V. 360. № 6387. P. 436.
DOI: 10.1126/science.aar6245
 88. Wang B., Wang R., Wang D., Wu J., Li J., Wang J., Liu H., Wang Y. Cas12aVDet: A CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. № 19. P. 12156.
DOI: 10.1021/acs.analchem.9b01526
 89. Xiao Y., Ren H., Wang H., Zou D., Liu Y., Li H., Hu P., Li Y., Liu Z., Lu S. A rapid and inexpensive nucleic acid detection platform for *Listeria monocytogenes* based on the CRISPR/Cas12a system // *Talanta*. 2023. V. 259. Article 124558.
DOI: 10.1016/j.talanta.2023.124558
 90. Jiao J., Liu Y., Yang M., Zheng J., Liu C., Ye W., Song S., Bai T., Song C., Wang M., Shi J., Wan R., Zhang K., Hao P., Feng J., Zheng X. The engineered CRISPR-Mb2Cas12a variant enables sensitive and fast nucleic acid-based pathogens diagnostics in the field // *Plant Biotechnol. J.* 2023. V. 21. P. 1465.
DOI: 10.1111/pbi.14051
 91. Jiang T., Hu X., Lin C., Xia Z., Yang W., Zhu Y., Xu H., Tang H., Shen J. Rapid visualization of *Clostridioides difficile* toxins A and B by multiplex RPA combined with CRISPR-Cas12a // *Front. Microbiol.* 2023. V. 14. Article 1119395.
DOI: 10.3389/fmicb.2023.1119395
 92. Deng L., He X., Liu K., Li Y., Xia H., Qian H., Lu X., Mao X., Xiang Y. One-pot RPA-Cas12a assay for instant and visual detection of *Burkholderia pseudomallei* // *Anal. Chim. Acta*. 2023. V. 1252. Article 341059.
DOI: 10.1016/j.aca.2023.341059
 93. Hao J., Xie L., Yang T., Huo Z., Liu G., Liu Y., Xiong W., Zeng Z. Naked-eye on-site detection platform for *Pasteurella multocida* based on the CRISPR-Cas12a system coupled with recombinase polymerase amplification // *Talanta*. 2023. V. 255. Article 124220.
DOI: 10.1016/j.talanta.2022.124220

94. *Aman R., Mahas A., Marsic T., Hassan N., Mahfouz M.M.* Efficient, rapid, and sensitive detection of plant RNA viruses with one-pot RT-RPA-CRISPR/Cas12a Assay // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. Article 610872.
DOI: 10.3389/fmicb.2020.610872
95. *Liu S., Tao D., Liao Y., Yang Y., Sun S., Zhao Y., Yang P., Tang Y., Chen B., Liu Y., Xie S., Tang Z.* Highly sensitive CRISPR/Cas12a-Based fluorescence detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus // *ACS Synth. Biol.* 2021. V. 10. № 10. P. 2499.
DOI: 10.1021/acssynbio.1c00103
96. *Xiong Y., Cao G., Chen X., Yang J., Shi M., Wang Y., Nie F., Huo D., Hou C.* One-pot platform for rapid detecting virus utilizing recombinase polymerase amplification and CRISPR/Cas12a // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2022. V. 106. № 12. P. 4607.
DOI: 10.1007/s00253-022-12015-9
97. *Qin C., Liu J., Zhu W., Zeng M., Xu K., Ding J., Zhou H., Zhu J., Ke Y., Li L.Y., Sheng G., Li Z., Luo H., Jiang S., Chen K., Ding X., Meng H.* One-pot visual detection of african swine fever virus using CRISPR-Cas12a // *Front. Vet. Sci.* 2022. V. 9. Article 962438.
DOI: 10.3389/fvets.2022.962438
98. *Lin M., Yue H., Tian T., Xiong E., Zhu D., Jiang Y., Zhou X.* Glycerol additive boosts 100-fold sensitivity enhancement for one-pot RPA-CRISPR/Cas12a assay // *Anal. Chem.* 2022. V. 94. № 23. P. 8277.
DOI: 10.1021/acs.analchem.2c00616
99. *Shao F., Park J.S., Zhao G., Hsieh K., Wang T.H.* Elucidating the role of CRISPR/Cas in single-step isothermal nucleic acid amplification testing assays // *Anal. Chem.* 2023. V. 95. № 7. P. 3873.
DOI: 10.1021/acs.analchem.2c05632
100. *Tang G., Zhang Z., Tan W., Long F., Sun J., Li Y., Zou S., Yang Y., Cai K., Li S., Wang Z., Liu J., Mao G., Ma Y., Zhao G.P., Tian Z.G., Zhao W.* RT-RPA-Cas12a-based assay facilitates the discrimination of SARS-CoV-2 variants of concern // *Sens. Actuators B: Chem.* 2023. V. 381. Article 133433.
DOI: 10.1016/j.snb.2023.133433
101. *Zhu Y., Lin C., Xu H., Xia Z., Yang W., Tang H., Hu X., Jiang T., Liu Z., Shen J.* Establishment and methodological evaluation of a method for rapid detection of helicobacter pylori and virulence genes based on CRISPR-Cas12a // *Infect. Drug Resist.* 2023. V. 16. P. 435.
DOI: 10.2147/idr.s398098
102. *Jiao J., Kong K., Han J., Song S., Bai T., Song C., Wang M., Yan Z., Zhang H., Zhang R., Feng J., Zheng X.* Field detection of multiple RNA viruses/viroids in apple using a CRISPR/Cas12a-based visual assay // *Plant Biotechnol. J.* 2021. V. 19. № 2. P. 394.
DOI: 10.1111/pbi.13474
103. *Zhang W.S., Pan J., Li F., Zhu M., Xu M., Zhu H., Yu Y., Su G.* Reverse transcription recombinase polymerase amplification coupled with CRISPR-Cas12a for facile and highly sensitive colorimetric SARS-CoV-2 detection // *Anal. Chem.* 2021. V. 93. № 8. P. 4126.
DOI: 10.1021/acs.analchem.1c00013
104. *Wei L., Wang Z., Wang J., Wang X., Chen Y.* Aptamer-based colorimetric detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using a CRISPR/Cas12a system and recombinase polymerase amplification // *Anal. Chim. Acta.* 2022. V. 1230. Article 340357.
DOI: 10.1016/j.aca.2022.340357
105. *Qian C., Wang R., Wu H., Zhang F., Wu J., Wang L.* Uracil-mediated new photospacer-adjacent motif of Cas12a to realize visualized DNA detection at the single-copy level free from contamination // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. № 17. P. 11362.
DOI: 10.1021/acs.analchem.9b02554
106. *Chen Y., Shi Y., Chen Y., Yang Z., Wu H., Zhou Z., Li J., Ping J., He L., Shen H., Chen Z., Wu J., Yu Y., Zhang Y., Chen H.* Contamination-free visual detection of SARS-CoV-2 with CRISPR/Cas12a: A promising method in the point-of-care detection // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 169. Article 112642.
DOI: 10.1016/j.bios.2020.112642
107. *Wang R., Qian C., Pang Y., Li M., Yang Y., Ma H., Zhao M., Qian F., Yu H., Liu Z., Ni T., Zheng Y., Wang Y.* opvCRISPR: One-pot visual RT-LAMP-CRISPR platform for SARS-cov-2 detection // *Biosens. Bioelectron.* 2021. V. 172. Article 112766.
DOI: 10.1016/j.bios.2020.112766
108. *Pang B., Xu J., Liu Y., Peng H., Feng W., Cao Y., Wu J., Xiao H., Pabbaraju K., Tipples G., Joyce M.A., Saffran H.A., Tyrrell D.L., Zhang H., Le X.C.* Isothermal amplification and ambient visualization in a single tube for the detection of SARS-CoV-2 using loop-mediated amplification and CRISPR technology // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. № 24. P. 16204.
DOI: 10.1021/acs.analchem.0c04047
109. *Park B.J., Park M.S., Lee J.M., Song Y.J.* Specific detection of influenza A and B viruses by CRISPR-Cas12a-based assay // *Biosensors (Basel).* 2021. V. 11. № 3. Article 88.
DOI: 10.3390/bios11030088
110. *Ding R., Long J., Yuan M., Zheng X., Shen Y., Jin Y., Yang H., Li H., Chen S., Duan G.* CRISPR/Cas12-based ultra-sensitive and specific point-of-care detection of HBV // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 9. Article 4842.
DOI: 10.3390/ijms22094842
111. *Cao Y., Wu J., Pang B., Zhang H., Le X.C.* CRISPR/Cas12a-mediated gold nanoparticle aggregation for colorimetric detection of SARS-CoV-2 // *Chem. Commun. (Camb.).* 2021. V. 57. № 56. P. 6871.
DOI: 10.1039/d1cc02546e
112. *Figueiredo D., Cascalheira A., Goncalves J.* Rapid, multiplex detection of SARS-CoV-2 using isothermal amplification coupled with CRISPR-Cas12a // *Sci.*

- Rep. 2023. V. 13. № 1. Article 849.
DOI: 10.1038/s41598-022-27133-7
113. *Su G., Zhu M., Li D., Xu M., Zhu Y., Zhang Y., Zhu H., Li F., Yu Y.* Multiplexed lateral flow assay integrated with orthogonal CRISPR-Cas system for SARS-CoV-2 detection // *Sens. Actuators B: Chem.* 2022. V. 371. Article 132537.
DOI: 10.1016/j.snb.2022.132537
114. *Li L., Li S., Wu N., Wu J., Wang G., Zhao G., Wang J.* HOLMESv2: A CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation // *ACS Synth. Biol.* 2019. V. 8. № 10. P. 2228.
DOI: 10.1021/acssynbio.9b00209
115. *Nguyen L.T., Macaluso N.C., Pizzano B.L.M., Cash M.N., Spacek J., Karasek J., Miller M.R., Lednicky J.A., Dinglasan R.R., Salemi M., Jain P.K.* A thermostable Cas12b from *Brevibacillus* leverages one-pot discrimination of SARS-CoV-2 variants of concern // *eBioMedicine*. 2022. V. 77. Article 103926.
DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.103926
116. *Song J., El-Tholoth M., Li Y., Graham-Wooten J., Liang Y., Li J., Li W., Weiss S.R., Collman R.G., Bau H.H.* Single- and two-stage, closed-tube, point-of-care, molecular detection of SARS-CoV-2 // *Anal. Chem.* 2021. V. 93. № 38. P. 13063.
DOI: 10.1021/acs.analchem.1c03016
117. *Seok Y., Yin Q., Bai H., Bau H.H.* Sensitive, single-pot, two-stage assay for hepatitis viruses // *Anal. Chem.* 2022. V. 94. № 3. P. 1778.
DOI: 10.1021/acs.analchem.1c04480