



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Desarrollo de nuevos métodos de detección de SARS-CoV-2 basados en sistemas
CRISPR-Cas

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Erick Gustavo Valdés Galindo

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Armando Hernández García
[Instituto de Química](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera
[Instituto de Biotecnología](#)

Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas
[Instituto de Biotecnología](#)

Ciudad de México. Junio, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

VALDÉS GALINDO ERICK GUSTAVO
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **14 de noviembre de 2022**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestría en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Desarrollo de nuevos métodos de detección de SARS-CoV-2 basados en sistemas CRISPR-Cas**", dirigida por el/la Dr(a). **HERNÁNDEZ GARCÍA ARMANDO**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

RODRÍGUEZ ROMERO ADELA	PMDCBQ	PRESIDENTE
GALVEZ MARISCAL MARÍA AMANDA	PMDCBQ	SECRETARIO
CUEVAS VELAZQUEZ CESAR LUIS	PMDCBQ	VOCAL
FIERRO GONZÁLEZ NORA ALMA	PMDCBQ	VOCAL
GONZALEZ ANDRADE MARTIN	PMDCBQ	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 18 de noviembre de 2022



Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con el número de apoyo 759102 y al Instituto de Química (IQ) por el apoyo económico otorgado mediante los recursos de ingresos extraordinarios del proyecto "ENCAPSULACIÓN DE PROPOXUR".

Al Dr. Armando Hernández García (Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, UNAM) por su guía y apoyo para la realización de este proyecto.

A los miembros del comité tutor, Dra. Laura Alicia Palomares y el Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas por las críticas y recomendaciones a este proyecto.

A los miembros del jurado, Dra. Adela Rodríguez Romero, Dra. Amanda María Gálvez Mariscal, Dr. Cesar Luis Cuevas Velázquez, Dra. Nora Alma Fierro González y el Dr. Martín González Andrade por sus comentarios y sugerencias a este proyecto.

Al Dr. Alfredo Torres Larios por sus comentarios siempre atinados e inspirarme en el quehacer científico.

A Amairani y Majo por cada experiencia vivida y el estar siempre a lo largo de todos estos años.

A todos los integrantes del laboratorio el BioNano y compañeros del IQ, pero en especial a Melissa, Jesuso e Idalia por hacer todo más divertido.

A mi madre Alicia, por siempre apoyarme y confiar en todas mis metas.

*Esta generación en lugar de temerle al cambio dice bienvenido y sigue
avanzando*

Jin BTS

Índice

Resumen	6
Introducción	7
La era dorada del diagnóstico molecular.....	7
Antecedentes	10
Generalidades de SARS-CoV-2	10
Métodos de diagnóstico molecular para SARS-CoV-2	11
CRISPR-Cas como método para detectar de ácidos nucleicos.....	16
Detección de SARS-CoV-2 mediante CRISPR-Cas	19
Diseño de métodos basados en CRISPR-Cas para detectar el gen N de SARS-CoV-2	21
Hipótesis	25
Objetivos	25
Objetivo general.....	25
Objetivos específicos.....	25
Estrategia experimental general	26
Producción y purificación de las proteínas dCas9 y dCas12a	26
Conjugación química de las proteínas dCas con fluoróforos.....	28
Selección de la secuencia de DNA diana.....	29
Amplificación de la secuencia de DNA diana mediante PCR	29
Diseño de los crRNAs.....	30
Ensayo de unión a DNA por las proteínas dCas9.....	31
Detección de una región de gen N con CRISPR-dCas9 usando FRET	31
Detección de una región de gen N con CRISPR-dCas12a mediante tiras de flujo lateral	32

Análisis estadístico	32
Resultados y discusión	33
Expresión y purificación de las proteínas dCas9 y dCas12a	33
Caracterización del etiquetado de las proteínas	37
Selección y amplificación de la secuencia a detectar	39
Método de detección basado en fluorescencia	42
Análisis de especificidad de los crRNAs para dCas9	42
Caracterización del efecto FRET para la detección del gen N	43
Método de detección basado en flujo lateral	48
Conclusiones	55
Perspectivas	56
Referencias	57
Anexo.....	64
Producción científica.....	67

Resumen

La detección específica de ácidos nucleicos es un objetivo importante para el diagnóstico molecular, ya que permite identificar el origen molecular de diferentes patologías como cáncer, fibrosis quística, Huntington y enfermedades infecciosas de distribución global como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y la enfermedad por coronavirus (COVID-19) provocada por el Coronavirus de tipo 2, causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2). Debido a esto surge la necesidad de implementar nuevas herramientas que permitan mejorar o auxiliar a los métodos de detección molecular basados en PCR punto final, amplificación isotérmica mediada por asa o bucle de ácido nucleico (LAMP) y secuenciación de nueva generación (NGS). En los últimos años el sistema CRISPR-Cas ha tenido grandes avances en la edición genómica, gracias a su programabilidad para reconocer cualquier secuencia de interés, y también se ha impulsado como una de las herramientas más prometedoras para la detección de ácidos nucleicos, incluso se ha reportado que puede detectar variantes de un virus con una resolución de un solo nucleótido. En el presente proyecto se acopló la PCR punto final al sistema CRISPR-Cas para detectar una región del gen N de SARS-CoV-2 mediante dos enfoques: fluorescencia y tiras de flujo lateral. Para ambos enfoques se demostró la prueba de concepto de que se puede detectar una secuencia de SARS-CoV-2 de manera eficiente y sencilla.

Introducción

La era dorada del diagnóstico molecular

El diagnóstico molecular se define como el conjunto de técnicas de biología molecular para la detección de ácidos nucleicos (DNA y RNA) y proteínas con el propósito de diagnosticar, clasificar, pronosticar y monitorear la respuesta a un tratamiento (Poste G., 2001). Las bases del diagnóstico molecular se originaron en 1949 con Linus Pauling que introdujo el término “enfermedad molecular” al determinar el origen de la anemia falciforme, que consiste en una mutación puntual en el gen codificante de la cadena beta de la hemoglobina (HBB), ocasionando una sustitución de un glutamato por valina (Strasser B. J., 2002). Esta sustitución hace que la hemoglobina sea menos soluble y más susceptible a formar eritrocitos defectuosos. *A priori*, las exploraciones de Pauling sentaron las bases del diagnóstico molecular, pero las contribuciones de la biología molecular en ese entonces eran limitadas y por ello, los métodos moleculares no eran técnicamente viables.

Las primeras contribuciones al diagnóstico molecular ocurrieron entre los años de 1950-1980 con la revolución de la biología molecular, al determinar la estructura del DNA, desarrollar la clonación de genes mediante el uso de enzimas de restricción, la secuenciación de Sanger para DNA y la secuenciación de Edman para proteínas (Edman et al., 1967; Abelson J., 1980). Estos desarrollos experimentales proporcionaron los conocimientos básicos sobre la secuencia de diversos genes y proteínas, lo que permitió la elaboración de sondas indispensables para las primeras técnicas de detección de biomoléculas basadas en *blotting*, como Southern Blot (SB), Northern Blot (NB) y Western Blot (WB).

En la década de 1970, Edward Southern creó el método de SB para detectar y cuantificar fragmentos de DNA (Southern E. M., 1975). Dicho proceso consiste en digerir el DNA con enzimas de restricción, separar la digestión mediante una electroforesis en gel y después transferirlos a una membrana de nitrocelulosa o nylon. La membrana resultante se incuba con una sonda de DNA que hibrida con el DNA complementario. La sonda puede ser etiquetada con antígenos, moléculas

fluorescentes o con isótopos radiactivos, que permiten la visualización del gen de interés (Brown T., 2001). Si en la membrana se coloca RNA, se llama NB, pero si se transfieren proteínas y la sonda está conformada por anticuerpos, el método se denomina WB (Van Oss C.J. et al., 1987).

En 1976 se utilizó por primera vez la técnica SB para diagnosticar la α -talasemia (Kan et al, 1976), una enfermedad que genera deleciones en el gen codificante de la cadena alfa de la hemoglobina (HBA1) pero, en la actualidad, en el diagnóstico de la α -talasemia se utiliza la amplificación de sondas dependientes de ligandos múltiples (MLPA, por sus siglas en inglés de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) ya que es mucho más sensible y confiable (Vijian D. et al., 2021). Aunque, para identificar deleciones de DNA desconocidas en la α -talasemia se sigue utilizando SB, por lo que su uso sigue vigente. Por otro lado, el NB es un método que ayuda a comparar parámetros normales *versus* patológicos, relacionados a la abundancia de RNA, y se ha empleado para identificar un transcrito específico asociado a un trastorno inflamatorio que afecta el sistema digestivo, conocido como enfermedad de Crohn (Lafontaine D. A. et al., 1998). En cambio, el WB, se considera el principal método diagnóstico para confirmar de manera definitiva la presencia del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana Adquirida (AIDS por sus siglas en inglés), al detectar las proteínas p24 o p41 (Centers for Disease Control, 1989).

Pese a los avances técnicos, el diagnóstico de enfermedades mediante métodos de biología molecular seguía presentando complicaciones respecto a la sensibilidad y especificidad, de modo que, su implementación se volvió un reto para los laboratorios clínicos. Pero, no fue sino hasta después de 1985, con el desarrollo de un método *in vitro*, que amplifica DNA de manera específica con el uso de enzimas, conocido como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Mullis K. et al., 1986), que las publicaciones y patentes relacionadas con el diagnóstico molecular comenzaron a crecer exponencialmente (**Figura 1**).

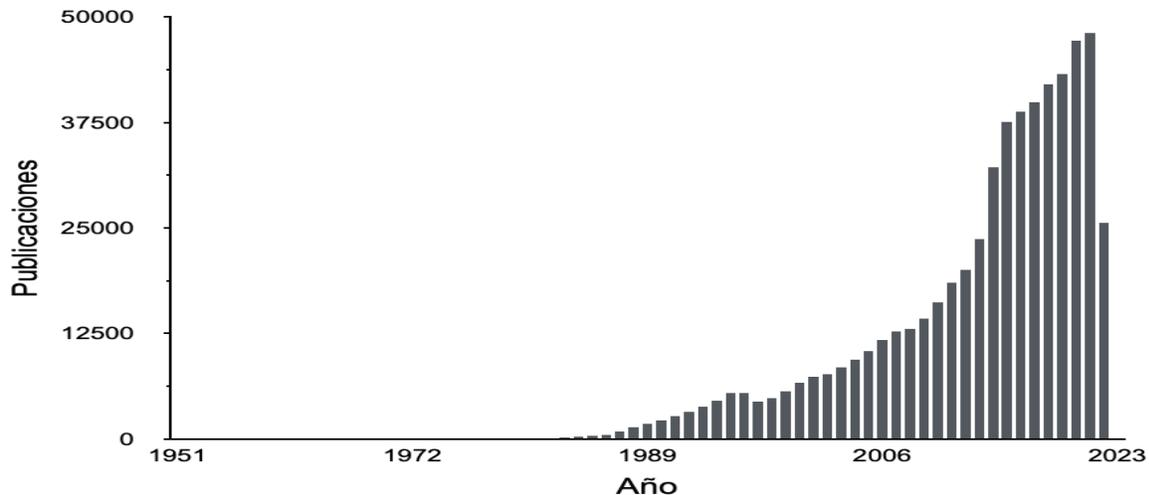


Figura 1. Publicaciones sobre Diagnóstico Molecular en Pubmed. El gráfico presenta publicaciones que incluyen el término “Molecular Diagnostics”. Fuente: Obtenido de PubMed (2022).

La invención de la PCR revolucionó el diagnóstico molecular al reducir los tiempos de respuesta, ya que a diferencia de los métodos basados en *blotting* que podían durar hasta 5 días, la PCR generaba resultados en un máximo de 4-6 horas. Esto ayudó a identificar de manera eficiente, el origen molecular de diferentes patologías como cáncer, fibrosis quística, enfermedad de Huntington y la detección de diversos agentes etiológicos causantes de enfermedades infecciosas como el HIV, virus del herpes, citomegalovirus, etc. (National Laboratory of Enteric Pathogens et al., 1991; Gupta V. et al., 2016). A decir verdad, la PCR es de gran utilidad en el curso actual de la pandemia del AIDS (Vandamme A. M., 1994) y en la reciente Enfermedad del Coronavirus 2019 (COVID19) causada por el Coronavirus de tipo 2 responsable del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV-2) (Zhu N. et al., 2020).

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO), entre los factores que pueden causar enfermedades emergentes como la tuberculosis, Ébola y COVID19, se encuentran la migración humana y animal, los cambios ambientales y la resistencia a los antibióticos. Por consiguiente, es imprescindible complementar y expandir las herramientas existentes, para mejorar la sensibilidad y especificidad de detección. En este proyecto usamos proteínas guiadas por RNA y etiquetadas con fluoróforos para detectar específicamente una secuencia del genoma de SARS-CoV-2 mediante fluorescencia e inmunoensayos de flujo lateral (LFIA).

Antecedentes

Generalidades de SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 es un *betacoronavirus* (β -CoV) perteneciente a la familia *Coronaviridae* del orden *Nidovirales* (Afzal A., 2020; Habibzadeh et al., 2020). Se identificó por primera vez en diciembre del 2019, a partir de un lavado broncoalveolar (LBA), perteneciente a pacientes que ingresaron al Hospital Central Wuhan, China (Zhu N et al., 2020). Su material genético es de RNA de cadena sencilla con sentido positivo (ssRNA+) y tiene un tamaño de ~30 kb (Kim D. et al., 2022). El genoma de SARS-CoV-2 está formado por dos genes con marco de lectura abierto (ORF1a y ORF1b), que se traducen en 16 proteínas no estructurales (nsp) involucradas en los procesos de replicación y ensamblaje viral como la helicasa (nsp 13) y RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) (Afzal A., 2020), más un grupo de genes que codifican para las proteínas estructurales como Spike (S), Envoltura (E), Matriz (M), Nucleocápside (N) y proteínas accesorias como 3a, 6, 7a, 7b, 8 y 9b (Brant A. C. et al., 2021) **(Figura 2a)**. Los viriones de SARS-CoV-2 tienen un diámetro de aproximadamente 80 nm, en cuya superficie exhibe la proteína S, que presenta una alta afinidad de unión ($k_D = 14.7$ nM) por los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), facilitando la entrada viral a la célula hospedera (Nguyen H. L. et al., 2020; Yao H. et al., 2020) **(Figura 2b)**.

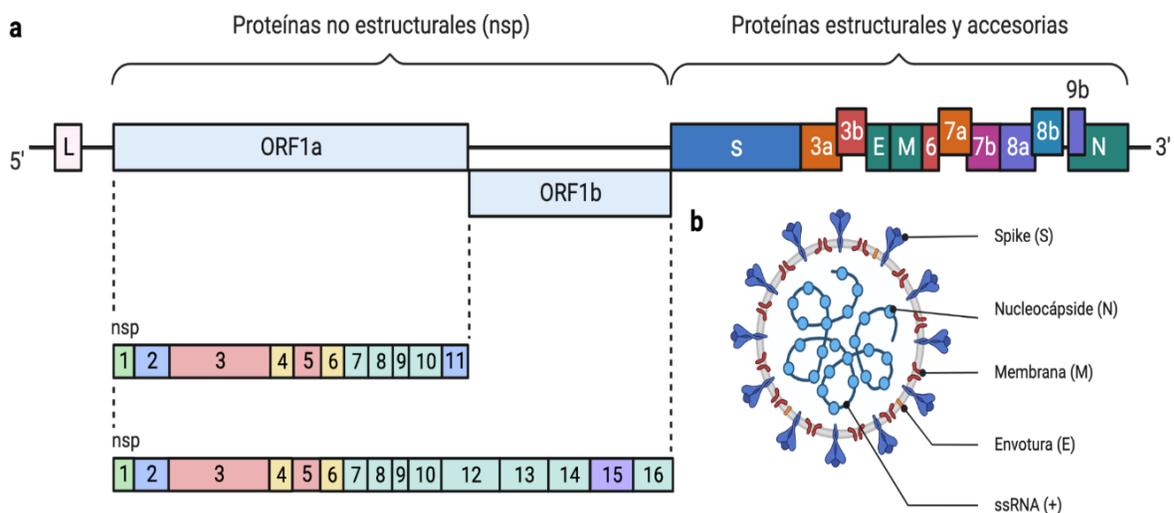


Figura 2. Aspectos generales de SARS-CoV-2. (a) El genoma viral se divide en dos grupos de genes que codifican proteínas no estructurales (nsp) y proteínas estructurales-accesorias. **(b)** Las partículas virales presentan en la superficie a la proteína S que facilita su entrada a la célula. Obtenido y modificado de BioRender (2022).

La principal forma de transmisión de SARS-CoV-2 ocurre por vía aérea, al inhalar gotículas provenientes de un paciente infectado (Greenhalgh T. et al., 2022) y el cuadro clínico de los individuos infectados suele ser variable, presentándose desde portadores asintomáticos hasta pacientes con fallo multiorgánico (Zaim S. et al., 2020). Esto ha contribuido a que la COVID-19 se propague aceleradamente a nivel mundial, reflejando hasta este momento, un total de 596 millones de casos y 6.45 millones de muertes confirmadas por la WHO. Por ello, es importante desarrollar métodos de detección específicos y sensibles que puedan ayudar a identificar individuos infectados, para controlar y detener la propagación de la infección.

Métodos de diagnóstico molecular para SARS-CoV-2

En la actualidad, existen dos tipos de métodos para identificar moléculas asociadas al genoma y proteoma de SARS-CoV-2: el primero utiliza anticuerpos, para reconocer antígenos como la proteína N o S; y el segundo detecta el genoma viral mediante PCR, amplificación isotérmica, secuenciación y recientemente con el sistema de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas (CRISPR, del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) asociadas a proteínas CRISPR (Cas, del inglés *CRISPR associated protein*).

La mayor parte de las pruebas diagnósticas de antígeno son inmunoensayos cromatográficos, que detectan la proteína N a partir de muestras nasofaríngeas (Frew E. et al., 2021). La WHO, junto con la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), recomiendan una sensibilidad del 80% y especificidad del 97% para las pruebas diagnósticas de antígeno (Peeling RW et al., 2021). Estas pruebas, además de ser fáciles de usar, ofrecen una sensibilidad analítica de 4,660-54,900 copias virales/hisopo (Bourassa L. et al., 2021) y brindan resultados en un máximo de 30 minutos (Chaimayo C. et al., 2020). Sin embargo, una de sus

desventajas es que es dependiente de la carga viral, es decir que la detección positiva es más probable con muestras que tengan una viremia alta, aumentando las posibilidades de obtener un falso negativo (Weitzel T. et al., 2021). Así mismo, tampoco se recomienda el uso de estas pruebas en entornos de baja prevalencia, ya que aumentan los falsos positivos (Peeling R. W. et al., 2021). Se ha reportado que la mutación D399N de la proteína N, es capaz de reducir hasta 1,000 veces la sensibilidad de las pruebas de antígeno, pero dicha mutación sólo corresponde al 0.02% del total de genomas reportados (Bourassa L. et al., 2021). A pesar de que estas pruebas no son tan precisas como los métodos para detectar ácidos nucleicos, sí son más asequibles en términos de disposición y practicidad, lo que habilita su uso frecuente en entornos fuera del laboratorio, incluso existen modelos que respaldan que en el contexto de una alta prevalencia como una pandemia, es más importante la frecuencia de la prueba que la sensibilidad (Larremore D.B. et al., 2021).

La PCR en tiempo real acoplada a retrotranscripción (RT-qPCR) es el método más utilizado y recomendado por la WHO y FDA para detectar los genes N, E y RdRp, ya que presentan una baja homología respecto a otros virus de la familia *Coronaviridae*, disminuyendo así la obtención de falsos positivos (Corman V. M. et al., 2020; Habibzadeh et al., 2021). Este método consiste en la extracción de RNA viral para generar DNA complementario (cDNA) mediante retrotranscripción, para después evaluar la concentración absoluta o relativa del gen de interés mediante fluorescencia (Habibzadeh et al., 2021). Para estimar la presencia de SARS-CoV-2 se cuantifica el umbral de ciclos (Ct), que es el número de ciclos en el cual la señal fluorescente cruza este umbral. El valor de Ct es inversamente proporcional a la cantidad del gen de interés presente en una muestra, por lo que un menor valor de Ct se suele relacionar con una mayor carga viral, incluso se ha establecido que un valor de Ct >37 es considerada clínicamente negativo (Tom MR et al., 2020; Afzal A, 2020). Diferentes reportes indican que la RT-qPCR tiene una especificidad del 100% y sensibilidad de 91.8-98.2%, además es capaz de detectar hasta 2.9 copias virales/reacción (Bisoffi Z. et al., 2020; Corman V. M. et al., 2020; Chung Y. S. et al., 2021).

Las principales desventajas de la RT-qPCR radican en la necesidad de tener personal capacitado para el manejo y procesamiento de muestras (Afzal A., 2020). Incluso los protocolos de

detección están adecuados para laboratorios de diagnóstico centralizados y especializados, que limitan su uso en puntos de atención rápida (POC, por sus siglas en inglés *Point Of Care*) y, aunque el proceso se completa en un máximo de 4-6 horas, los tiempos de respuesta suelen ser de hasta 24 horas, afectando así la toma de decisiones clínicas (Sheridan C, 2020). La RT-qPCR es el estándar de oro para detectar SARS-CoV-2, sin embargo, mutaciones en diferentes regiones objetivo (deleciones en el gen N) y una viremia baja en fases muy tempranas o tardías de la infección, incrementan las probabilidades de obtener falsos negativos (Medical Devices., 2022; Habibzadeh et al., 2021). Los falsos positivos tampoco se descartan, debido a la contaminación cruzada, y a que la RT-qPCR no es capaz de diferenciar entre el virus funcional y el RNA viral, ya que se ha demostrado la existencia de individuos que dan positivo hasta meses después de superar la COVID-19, posiblemente por la presencia de RNA residual a nivel sistémico (Habibzadeh et al., 2020; Mouliou D. S. et al., 2021).

A diferencia de la RT-qPCR, la amplificación isotérmica mediada por bucle (del inglés LAMP) funciona a una temperatura constante, generalmente entre 60-65 °C; esto se debe a que ocupa una DNA polimerasa conocida como Bst 2.0 (producida por *Bacillus stearothermophilus*) con actividad helicasa, que evita la desnaturalización del DNA mediante calor, por lo tanto, se vuelve innecesario el uso de un termociclador (Mautner L. et al., 2020). Para amplificar el gen objetivo es preciso diseñar de 4-6 oligos, que posibilitan una amplificación altamente específica y rápida (**Figura 3**), de aproximadamente 20-30 minutos (Vindeirinho J. M. et al., 2022) y si el material genético es de RNA, como el de SARS-CoV-2, LAMP se puede acoplar a una transcriptasa reversa (RT-LAMP) o utilizar la Bst 3.0 que presenta una actividad retrotranscriptasa mucho más elevada que la Bst 2.0 (Rabe B. A. et al., 2020; Basing L. et al., 2020). Los genes que se han detectado mediante RT-LAMP son el gen N y ORF1ab, con una sensibilidad de 86-97.62% y especificidad de 92.4-100%, pero con un límite de detección de entre 20-500 copias virales/reacción (Lim B. et al., 2021; Mautner L. et al., 2020).

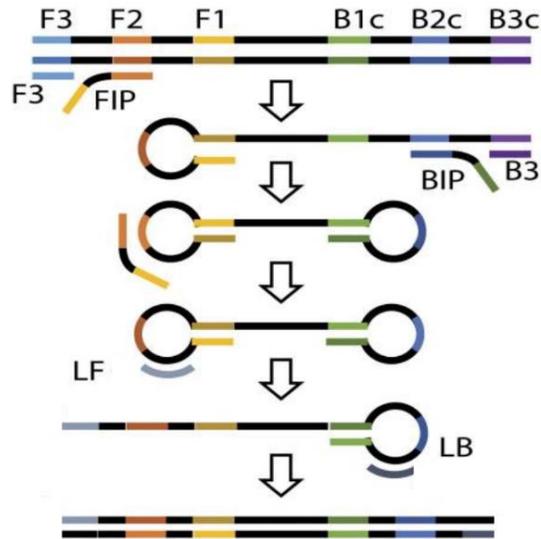


Figura 3. Principio de LAMP mediante el uso de 6 oligos (F3, FIP, BIP, B3, LF y LB). Los oligos se unen a diferentes regiones del DNA objetivo, y al mismo tiempo la DNA polimerasa con actividad helicasa amplifica el DNA a temperatura constante, por lo general entre 60-65 °C. Tomado y modificado de Basing L et al. (2020).

Las principales ventajas de RT-LAMP se deben a su practicidad, porque no necesita de equipos costosos o especializados que requieran de personal capacitado, inclusive la detección de RNA se puede realizar sin la necesidad de una etapa de extracción (Mautner L. et al., 2020), adicionalmente la amplificación genera grandes cantidades de DNA que permiten reportar la detección mediante fluorescencia, cambios en el pH y hasta turbidez, haciendo a la RT-LAMP mucho más rápida y accesible para sectores con recursos limitados (Rabe B. A. et al., 2020). En la práctica, se ha determinado que el costo promedio de una RT-qPCR es de 15.75 dólares, mientras que el de la RT-LAMP es de 8.45 dólares, reafirmando su accesibilidad para los sitios POC (Iqbal B. N. et al., 2022).

Las desventajas de RT-LAMP se asocian a que el diseño de los oligos es complejo y por eso es necesario el uso de software especializado, asimismo, se ha observado amplificación inespecífica en ausencia y fuera del DNA objetivo, por lo que analizar muestras mediante turbidez o con agentes intercalantes como SYBR Green, podría generar falsos positivos (Lim B. et al., 2021; Iqbal B. N. et al., 2022). Igualmente, se han reportado falsos negativos, particularmente en muestras que

presentan un Ct >25, por lo tanto, la carga viral se vuelve una limitante, también se ha determinado que alteraciones de un solo nucleótido en regiones clave, afectan la unión de los oligos con el gen N, limitando así su amplificación (Iqbal B. N. et al., 2022).

La secuenciación de nueva generación (NGS) es una herramienta que determina *de novo* la composición genómica de los sistemas biológicos, por lo que se puede utilizar para la detección de agentes etiológicos sin conocimiento previo (Nooij S. et al., 2018). Esto ha permitido que mediante la plataforma GISAID (del inglés, *Global Initiative on Sharing All Influenza Data*) se compartan hasta la fecha de hoy un total de 13,295,477 secuencias genómicas de SARS-CoV-2. Actualmente, la aplicación de NGS en el área del diagnóstico molecular se encuentra muy limitada, sin embargo es capaz de detectar 0.125-1 copia viral/ μ L con una especificidad del 99.4% y sensibilidad del 91.1% en un tiempo de 12-18 horas (John G et al., 2021), además por la inmensa cantidad de datos genómicos que puede generar, facilita el monitoreo filogenético de las diversas variantes de SARS-CoV-2, que circulan en regiones urbanas con altos índices de propagación como la Ciudad de México (Cedro-Tanda A. et al., 2022). A diferencia de otros métodos de diagnóstico, la NGS puede identificar co-infecciones virales o bacterianas de manera precisa en pacientes con COVID-19, de hecho, se han reportado co-infecciones con *Mycoplasma pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Influenza A virus* e *Influenza B virus* (John G et al., 2021). Las limitaciones más importantes de la NGS están asociadas a su accesibilidad ya que se necesita de infraestructura avanzada con profesionales altamente cualificados, y la velocidad de respuesta es muy elevada para su uso rutinario como sistema de diagnóstico (John G. et al., 2021; Habibzadeh et al., 2021).

Como se puede observar, cada uno de los métodos actuales presentan ventajas y desventajas (**Tabla 1**), por consiguiente, es necesario desarrollar nuevas herramientas que faciliten y mejoren el diagnóstico molecular. En años recientes, ha surgido un creciente interés por el sistema CRISPR-Cas, gracias a su especificidad y sensibilidad, lo que lo impulsa a ser una de las herramientas más prometedoras para la detección de ácidos nucleicos (Jia F. et al., 2020).

Tabla 1. Comparación de los métodos de diagnóstico molecular.

Sensibilidad	Media	Alta	Media	Alta
Especificidad	Baja-alta	Baja-alta	Baja-media	Alta
Velocidad	Minutos	Horas	Minutos	Horas-días
Costos	Bajo	Medio	Medio	Alto
Libre de infraestructura	Si	No	Si	No
Portabilidad	Alta	Baja	Alta	Muy baja
Dificultad	Fácil	Media	Fácil-media	Difícil

CRISPR-Cas como método para detectar de ácidos nucleicos

El sistema CRISPR-Cas está presente en procariontas y es un mecanismo de defensa adaptativo contra ácidos nucleicos provenientes de fagos y plásmidos invasores (Sorek R. et al., 2013). Estos sistemas de defensa emplean un CRISPR RNA (crRNA) que es complementario a la secuencia objetivo, y una endonucleasa Cas con la cual forma un complejo ribonucleoproteico (RNP), que sirve para reconocer y escindir de manera específica al ácido nucleico extraño. Durante el reconocimiento del ácido nucleico es necesaria la presencia de un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) cerca de la secuencia diana (Westra E. R. et al., 2013) (Figura 4).

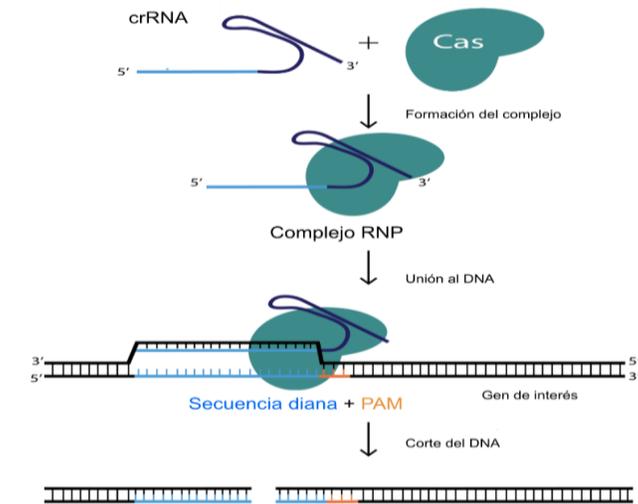


Figura 4. Mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas. El complejo RNP reconoce un sitio PAM para abrir el DNA e hibridar con la secuencia de crRNA. Después de la unión al DNA se procede a la escisión. Tomado y modificado de CRISPR-Cas9 AAV y Adenovirus. (2022).

Las endonucleasas más conocidas del sistema CRISPR-Cas son Cas9 y Cas12a. Ambas proteínas presentan una estructura similar, compuesta por dos lóbulos proteicos: el REC que se encarga de interactuar y reconocer al DNA, y el NUC que presenta actividad nucleasa. Cada lóbulo contiene dominios con actividades específicas: el lóbulo REC es esencial para reconocer partes del crRNA y mantener la interacción entre el heterodímero crRNA-DNA, y el lóbulo NUC contiene los dominios de las nucleasas; HNH y RuvC para Cas9 y RuvC para Cas12a (Yamano T. et al., 2016). Las principales diferencias que existen entre Cas9 y Cas12a se observan en el crRNA, secuencia del sitio PAM y las constantes de disociación. Cas9 utiliza un crRNA de entre 99-100 nt y Cas12a necesita un crRNA de entre 42-44 nt. Además, el sitio PAM que reconoce Cas9 es 5'NGG3' (N puede ser cualquier nucleótido) mientras que el sitio PAM de Cas12a es 5'TTTV3' (V puede ser cualquier nucleótido excepto T); y finalmente se ha determinado que la afinidad de unión es mucho mayor en Cas12a ($k_a= 54$ fM) que en Cas9 ($k_a= 1.85$ nM) (Strohkendl I. et al., 2018; Raper A. T. et al., 2018) (Tabla 2).

Tabla 2. Diferencias entre las proteínas Cas9 y Cas12a.

Masa	158.3 kDa	151.2kDa
Tipo de crRNA	crRNA-tracrRNA	crRNA
Longitud de crRNA	99-100 nt	42-44 nt
Secuencia del sitio PAM	5'NGG3'	5'TTTV3'
Constante de afinidad (K_a)	1.85 nM	54 fM

El sistema CRISPR-Cas no sólo ha revolucionado la ingeniería genómica, sino también áreas enfocadas a la detección de ácidos nucleicos, gracias a la programabilidad del crRNA, ya que puede diseñarse para reconocer cualquier secuencia de interés con una alta afinidad y especificidad (Gootenberg, J. S. et al., 2017). De hecho, el primer uso del sistema CRISPR-Cas como método de diagnóstico molecular fue capaz de discriminar variantes africanas y americanas del virus del Zika

(ZIKV) con una resolución de un solo nucleótido (Pardee K. et al., 2016). Más tarde en 2018, surgió el sistema CAS-EXPAR™ (del inglés, *Cas9 triggered exponential amplification reaction*) que presenta una sensibilidad analítica de hasta 0.82 attomolar (aM) y se utilizó para detectar RNA mensajero (mRNA) de *Lysteria monocytogenes*, aunque tuvo complicaciones para detectar microRNAs (miRNAs), ya que los crRNAs presentan un tamaño mayor al de los miRNAs (Huang M et al., 2018). También surgieron métodos basados en la versión catalíticamente inactiva de Cas9 (dCas9) que presenta mutaciones en HNH (H840A) y RuvC (D10A), que funciona como un complejo exclusivo de reconocimiento de DNA, en lugar de una nucleasa dirigida (Josephs E. A. et al., 2015), y dentro de estos métodos se encuentra uso de 2 proteínas dCas9 fusionadas genéticamente a una enzima partida, que al reconocer secuencias adyacentes se permite la reconstitución de la enzima (Zhang Y. et al., 2017) (**Figura 5**). Este sistema de enzimas partidas acoplada a dCas9, se ha utilizado para detectar miRNAs como como let-7 y genes de *Mycobacterium tuberculosis* con una sensibilidad aM (Qiu X. Y. et al., 2018; Zhang Y. et al., 2017).

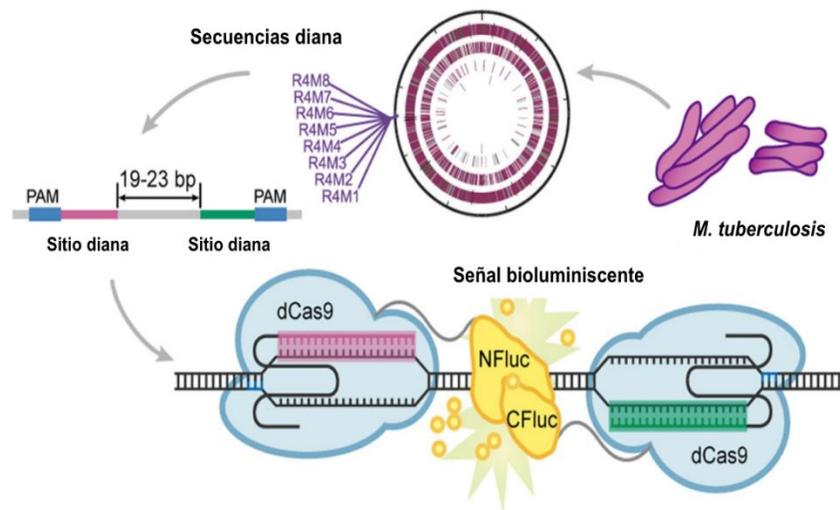


Figura 5. Sistema dCas9 fusionado a enzimas partidas. dCas9 está fusionado a mitades de la enzima luciferasa de luciérnaga (CFluc o NFluc) y el posicionamiento de dCas9 sobre los sitios diana reconstituye la actividad de la enzima que cataliza una reacción bioluminiscente. Tomado y modificado de Zhang Y et al. (2017).

Detección de SARS-CoV-2 mediante CRISPR-Cas

Para la detección de SARS-CoV-2 con el sistema CRISPR-Cas se han desarrollado varios enfoques acoplados a PCR punto final o amplificación isotérmica, y los genes que se han identificado son el N, E, S, M, RdRP entre otros, con una especificidad del 97.5%, sensibilidad del 95%, y un límite de detección de entre 2.5-5000 copias virales/reacción (Hernandez-Garcia A. et al., 2022). La mayoría de estos enfoques emplean Cas12a (aproximadamente 65%) y Cas9 (aproximadamente 5%) mientras que el porcentaje restante corresponde a otras proteínas Cas (Hernandez-Garcia A. et al., 2022). Esto se debe a que Cas12a presenta un efecto llamado actividad colateral, que consiste en degradar DNA de cadena sencilla (ssDNA) una vez que ha reconocido y escindido la secuencia específica de interés (Li S. Y. et al., 2018). Algunos métodos como DETECTR™, explotan esta actividad usando sondas de ssDNA etiquetadas con un fluoróforo y un quencher, de manera que cuando el material genético de SARS-CoV-2 es reconocido, se enciende la actividad de DNAsa colateral y comienza a degradar la sonda presente en el medio, generando una señal fluorescente (Broughton J. P. et al., 2020) **(Figura 6a)**.

Respecto a Cas9, se ha implementado un método llamado VIGILANT™, un LFIA que usa una proteína quimérica de dCas9-VirD2 para detectar el gen N, con un límite de detección de 2.5 copias virales/ μ L y sin reactividad cruzada con MERS o SARS-CoV-1. En este método es necesaria la amplificación del gen N con oligos biotinilados mediante amplificación isotérmica con recombinasa-polimerasa (RPA) y el etiquetado de la proteína dCas9-VirD2 con fluoresceína-5-maleimida (FAM). Una vez que la etiqueta de biotina se une a la estreptavidina y dCas9-VirD2 ha reconocido al gen N, la etiqueta de FAM se detecta mediante anticuerpos anti-FAM conjugados con partículas de oro (antiFAM-AuNP), generando una señal colorimétrica que indica la presencia de SARS-CoV-2 (Marsic T. et al., 2021) **(Figura 6b)**.

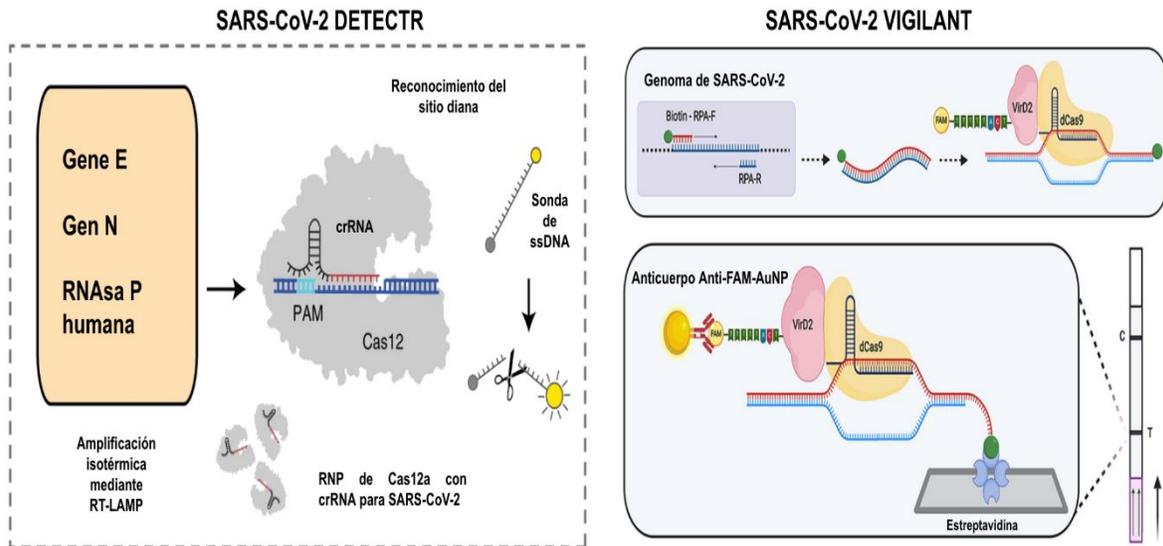


Figura 6. Detección de SARS-CoV-2 mediante CRISPR-Cas. (Izquierda) La actividad colateral es activada por el reconocimiento de la secuencia específica y se inicia el corte de la sonda, al separarse el fluoróforo del quencher la fluorescencia se hace visible y es detectada. **(Derecha)** La superficie recubierta con estreptavidina captura los amplicones etiquetados con biotina y el complejo dCas9-VirD2 que se ha unido al amplicón es reconocido por el anticuerpo antiFAM-AuNP, que da como resultado una señal colorimétrica. Tomado y modificado de Broughton JP et al. (2020) & Marsic T et al. (2021).

Estos avances han permitido que la FDA haya autorizado en el 2020 el uso de emergencia de un método de diagnóstico basado en CRISPR para detectar SARS-CoV-2, conocido como Sherlock™, que es capaz de brindar resultados en un tiempo de entre 40-70 minutos y con un límite de detección de 100 copias virales/reacción (Joung J. et al., 2020). Aunque todavía existen complicaciones relacionadas al efecto “off-target” (reconocimiento fuera del gen objetivo), lo que podría comprometer la detección genética de manera precisa (Kostyusheva A. et al., 2022), pero hasta el momento los resultados experimentales posicionan al sistema CRISPR-Cas como uno de los métodos de diagnóstico molecular más prometedores e innovadores de los últimos años, motivando así el desarrollo de nuevos enfoques.

Diseño de métodos basados en CRISPR-Cas para detectar el gen N de SARS-CoV-2

Para detectar el gen N en este trabajo se propusieron dos estrategias: la primera es una detección enfocada en fluorescencia que utiliza un par de proteínas dCas9 etiquetadas con fluoróforos; mientras que la segunda es una detección enfocada en LFIA que utiliza DNA biotinilado, que es reconocido por dCas12a (D908A) etiquetado con FAM. Para aumentar la sensibilidad analítica de ambos enfoques fue necesario acoplarlos a PCR punto final.

Detección enfocada en fluorescencia: La fluorescencia es un proceso fisicoquímico de dos etapas en el que un fluoróforo absorbe fotones de longitud de onda más corta (excitación), seguido de la liberación de fotones de longitud de onda más larga (emisión) (Marshall J & Johnsen S. 2017) (**Figura 7**). Este proceso se puede observar en la transferencia de energía resonante Förster (FRET), que ocurre cuando un fluoróforo excitado (Donador) transfiere su energía de forma no radiativa a otro fluoróforo (Aceptor). Para que esto suceda el espectro de emisión del donador debe superponerse, al menos parcialmente, con el espectro de absorción del aceptor, además los fluoróforos deben tener una orientación definida y estar muy próximos, entre 10-100 Å, lo cual se conoce como distancia de Förster (Berney C. & Danuser G., 2003). El fenómeno de FRET indica que la energía liberada de la relajación del donador es absorbida por un aceptor que se encuentra en las proximidades, ocasionando la excitación de uno de sus electrones y por consecuencia la emisión de un fotón por el aceptor en lugar del donador (Berezin M. Y. & Achilefu S., 2010).

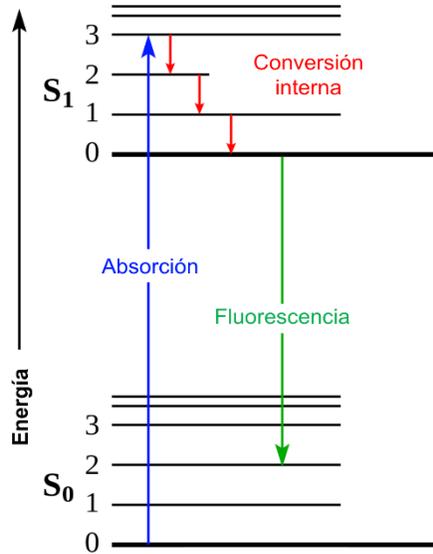


Figura 7. Diagrama de Jablonsky para la fluorescencia. Cuando un fotón interactúa con el fluoróforo los fotones son absorbidos (flecha azul), provocando que un electrón pase de un nivel de energía menor a uno mayor (S_1). El electrón en un estado excitado pierde inmediatamente su energía mediante un proceso llamado conversión interna (flechas rojas) y desde ahí regresa a su estado basal (S_0) pero emitiendo un fotón (fluorescencia) con energía equivalente a la energía absorbida (flecha verde).

Para detectar el gen N, se propuso un sistema de dos proteínas dCas9 etiquetadas con los fluoróforos Atto550 (excitación 554 nm/emisión 575 nm) y Cy5 (excitación 649 nm/emisión 666 nm). Estos fluoróforos presentan una distancia de Förster de 73 Å (7.3 nm), por lo que se diseñaron crRNAs que dirigen a las proteínas hacia dos secuencias específicas del gen N, que permiten la proximidad para observar el efecto FRET entre Atto550 y Cy5, lo cual se puede reflejar como una disminución de la fluorescencia del fluoróforo donador (Atto550) y un aumento en la fluorescencia del fluoróforo aceptor (Cy5) (**Figura 8**). Con este enfoque esperamos una mayor especificidad respecto a los métodos de diagnóstico como las pruebas de antígeno ya que es necesario que el DNA tenga ambas secuencias que posibiliten la cercanía entre los fluoróforos, lo cual indicará la presencia del gen N de SARS-CoV-2.

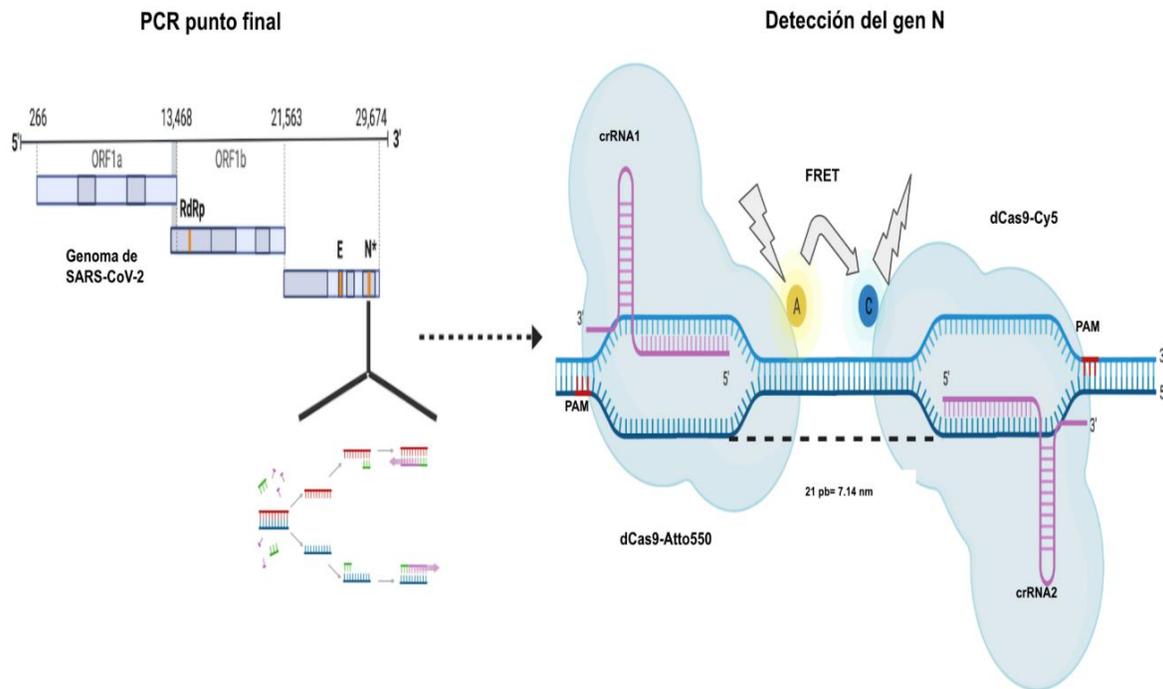


Figura 8. Detección enfocada en fluorescencia. El DNA que se amplifica mediante PCR punto final es reconocido por dCas9-Atto550 y dCas9-Cy5, esto permite la proximidad de los fluoróforos para observar el efecto FRET, indicando así la presencia del gen N de SARS-CoV-2. Obtenido y modificado de BioRender (2022).

Detección enfocada en LFIA: Los sistemas de LFIA presentan una superficie de estreptavidina conocida como línea test (T), que es capaz de interactuar con etiquetas de biotina, lo que permite adsorber moléculas que presenten dicha etiqueta. También presentan una línea control (C) que esta recubierta con anticuerpos que adsorben anticuerpos antiFAM-AuNP y sirve para validar la funcionalidad del ensayo de detección. Se amplificó una región del gen N con oligos biotinilados mediante PCR y etiquetamos a dCas12a con FAM. Para dirigir a dCas12a-FAM hacia una secuencia específica del gen N se utilizó un crRNA que se encuentra reportado y caracterizado para la detección de SARS-CoV-2 (Broughton J. P. et al., 2020). Una vez que el complejo dCas12a-FAM:GenN-biotina se une a la estreptavidina, la etiqueta de FAM es reconocida por los anticuerpos antiFAM-AuNP, que permiten una detección colorimétrica que indica la presencia de SARS-CoV-2 (Figura 9).

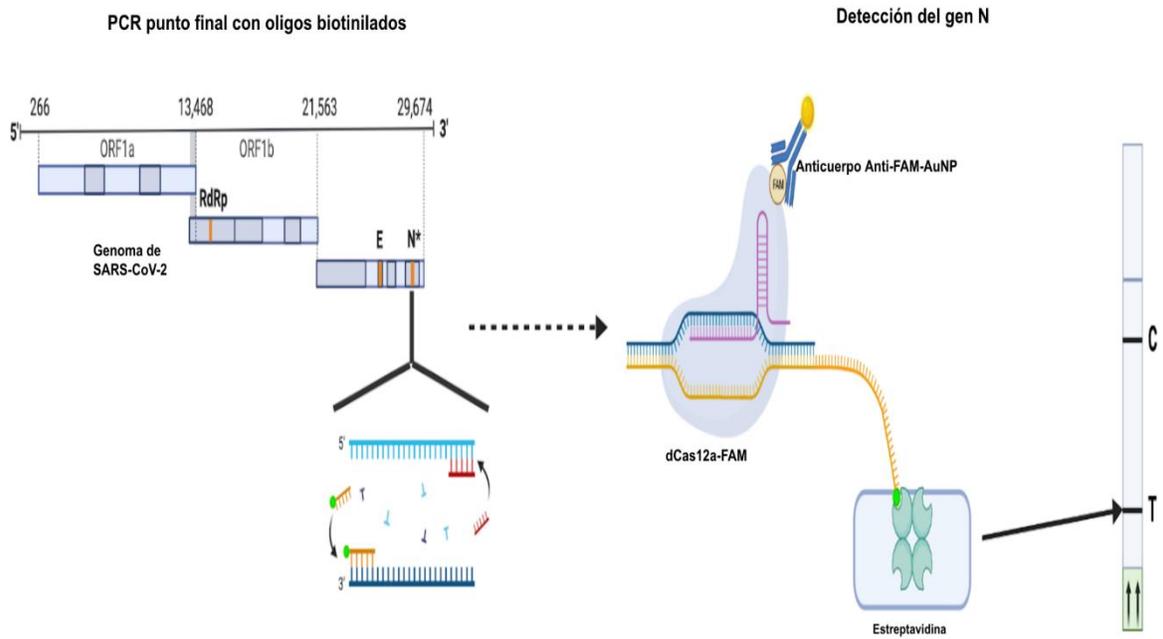


Figura 9. Detección enfocada en LFIA. El DNA biotinilado que se obtiene por PCR punto final es adsorbido por la estreptavidina, y el complejo dCas12a-FAM que se une de manera específica a este DNA es reconocido por el anticuerpo antiFAM-AuNP, lo cual se refleja como una señal colorimétrica, que indica la presencia del gen N. Obtenido y modificado de BioRender (2022).

Hipótesis

Detección enfocada en fluorescencia: Cuando un par de complejos dCas9:crRNA etiquetados con fluoróforos unen secuencias específicas adyacentes de DNA (gen N), ocurrirá el efecto FRET debido a la cercanía de las proteínas

Detección enfocada en LFIA: Cuando dCas12a:crRNA etiquetado con FAM una al DNA (gen N) etiquetado con biotina se formará un complejo que se unirá a la estreptavidina de la tira reactiva, el cual será reconocido por los anticuerpos antiFAM-AuNP, lo que generará una señal colorimétrica.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar nuevos métodos basados en CRISPR-dCas que permitan la detección específica de SARS-CoV-2.

Objetivos específicos

1. Mejorar el proceso de purificación de las proteínas dCas9 y dCas12a
2. Amplificar una región del gen N del SARS-CoV-2 a partir de bajas concentraciones y en un tiempo relativamente corto.
3. Validar la especificidad de los crRNAs para detectar el gen N (método basado en fluorescencia) del SARS-CoV-2
4. Demostrar la presencia del gen N de SARS-CoV-2 con dCas9-Atto550/Cy5 mediante el efecto FRET.
5. Optimizar un método para detectar el gen N mediante el uso de dCas12-FAM basado en LFIA.

Estrategia experimental general

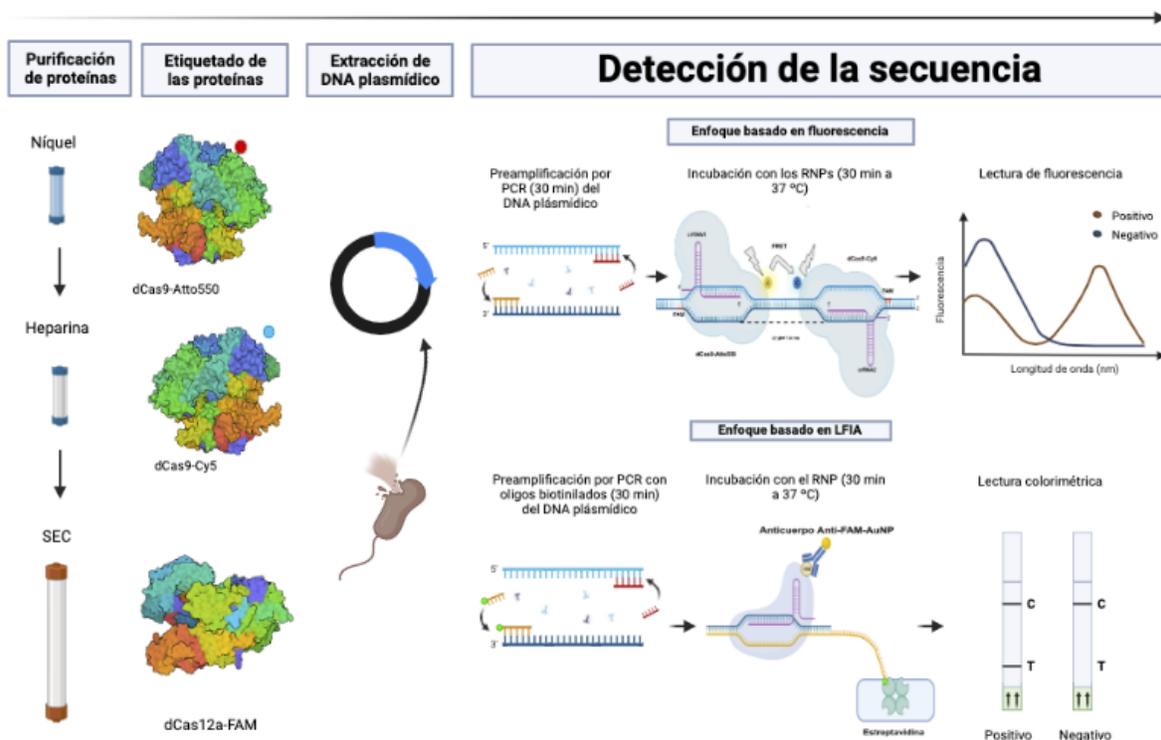


Figura 10. Esquema general para la detección del gen N de SARS-CoV-2. Se resumen los pasos desde la obtención de las proteínas hasta la detección del gen N mediante fluorescencia y colorimetría. Obtenido y modificado de BioRender (2022).

Producción y purificación de las proteínas dCas9 y dCas12a

Se cultivó *E. coli* BL21 (DE3) en medio Luria Bertani (LB) para dCas9 y en medio Terrific Broth (TB) para dCas12a en un matraz Erlenmeyer (1 L) hasta una densidad óptica (DO, a 600 nm), de entre 0.6 - 0.8 unidades de absorbancia (UA) a 37 °C, y posteriormente se disminuyó la temperatura a 18 °C. La expresión de la proteína se indujo con 1 mM de isopropilo β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 30 minutos después de la transición de temperatura y durante 18 h. La selección se hizo con 100 µg / mL de kanamicina para dCas9 y 100 µg / mL de ampicilina para dCas12a.

El sedimento de células obtenido por centrifugación se resuspendió en buffer de lisis (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 10 mM imidazol) y se sonicó con una potencia de 765 Watts por 6 minutos en hielo con ciclos ON / OFF de 5s / 25s. La muestra sonicada se centrifugó durante 35 minutos a 35,000 g y el sobrenadante obtenido se filtró (0.22 μ m) e inyectó a una columna de cromatografía de afinidad de Ni-NTA (Cytiva). La columna se lavó con buffer de lavado (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 20 mM imidazol) y finalmente se eluyó la proteína total con buffer de elución (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 250 mM imidazol). Se agregó la proteasa TEV (del inglés, *Tobacco Etch Virus nuclear-inclusion-a endopeptidase*) y SUMO (del inglés, *small ubiquitin-like modifier*) para remover las etiquetas de histidinas de dCas9 y dCas12a respectivamente (**Figura 10**).

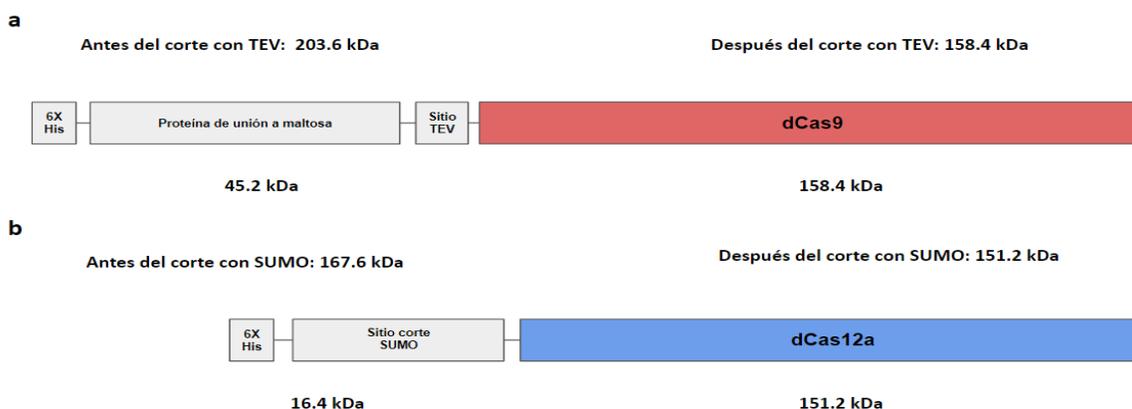


Figura 11. Marco de expresión de las proteínas dCas9 y dCas12a. Después del corte con la enzima TEV el tamaño aproximado de la proteína dCas9 es de 158.4 kDa (**a**) y de 151.2 kDa para la proteína dCas12a después de corte con SUMO (**b**).

Posteriormente la muestra se dializó toda la noche a 4 °C contra buffer de diálisis (20 mM HEPES-KOH pH 7.5, 150 mM KCl, 10% glicerol, 1 mM DTT, 1 mM EDTA) usando una membrana con tamaño de corte de 50 kDa. La muestra dializada y filtrada se inyectó en una columna de Heparin Sepharose High Performance (Cytiva) que se une a proteínas de unión a ácidos nucleicos que se encuentran cargadas positivamente como las proteínas dCas9 y dCas12a, después se eluyó con 2 M de KCl. La solución con la proteína total se concentró hasta aproximadamente 500 μ L mediante centrifugación con unidades de filtración (Cytiva) con tamaño de corte de 100 kDa. La solución

concentrada se inyectó en una columna de exclusión molecular HiLoad (Cytiva), que separa por tamaño. Las fracciones colectadas correspondientes a las proteínas puras se combinaron y concentraron hasta aproximadamente 10 µM. La concentración de la proteína se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop con la opción 1 Abs= 1 mg/mL y un factor de corrección de 1.009 para estimar la concentración real de la proteína (Mohanraju P et al., 2018). La proteína se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70 °C. La pureza e identidad de las proteínas dCas9 y dCas12a se analizaron por SDS-PAGE (del inglés, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) y WB respectivamente. La pureza se determinó densitométricamente mediante el uso del software ImageJ, mientras que la identidad se confirmó con el anticuerpo monoclonal anti-Cas9 (Santa Cruz Biotechnology, 7A9-3A3) y el anticuerpo policlonal anti-Cas12a (GeneTex, 133298).

Conjugación química de las proteínas dCas con fluoróforos

Los fluoróforos que se utilizaron para etiquetar las proteínas son Atto550 (Sigma-Aldrich, 30730), Cy5 (Cytiva, 25031) y FAM (Thermo-Scientific, 62245), cuya particularidad reside en que tienen grupos maleimida capaces de reaccionar el grupo sulfhidrilo (-SH) de las cisteínas (Cys). Las alícuotas de las proteínas se descongelaron lentamente (usando hielo) y se les adicionó 10 µM del agente reductor tris-2-carboxietil-fosfina (TCEP). Posteriormente, se sometió a vacío durante 20 minutos a 20 °C en un ThermoVac para eliminar la presencia de oxígeno. En seguida, se dializó durante 2 horas a 4 °C contra buffer de diálisis (20 mM HEPES-KOH pH 7.5, 150 mM KCl, 10% glicerol) para eliminar el TCEP. Después, se adicionó el fluoróforo correspondiente a una concentración final de 100 µM y se dejó incubando a 4 °C toda la noche con agitación constante. Al día siguiente la proteína etiquetada se concentró mediante centrifugación con unidades de filtración con tamaño de corte de 100 kDa (Cytiva, USA) para eliminar el fluoróforo no unido a las proteínas. Finalmente, las proteínas se almacenaron a -20 °C. Para determinar el número promedio de moléculas de fluoróforo por dCas conjugada (DOL, del inglés *Degree of Labeling*) se utilizó la siguiente fórmula:

$$DOL = \frac{(A_{max})(\epsilon_{280})}{((A_{280}) - (CF)(A_{max}))(\epsilon_{max})}$$

donde A_{\max} es el máximo de absorción medido a la longitud de onda de excitación del fluoróforo, ϵ_{280} el coeficiente de extinción molar de dCas (obtenido mediante ProtParam tool de ExPasy), A_{280} la lectura de absorbancia de la dCas conjugada a 280 nm, CF (del inglés, *factor correction*) que es la absorbancia corregida que sirve para eliminar el aporte del fluoróforo a 280 nm (es exclusivo de cada fluoróforo) y ϵ_{\max} el coeficiente de extinción molar del fluoróforo.

Selección de la secuencia de DNA diana

Se utilizó el programa de alineamiento múltiple de secuencia de ácidos nucleicos Nucleotide-BLAST (NCBI, versión BLASTN 2.13.0+), para el análisis de homología de la región del gen N de SARS-CoV-2 que se desea amplificar. La secuencia diana del gen N se analizó con un enfoque megablast (secuencias muy similares) y los registros obtenidos fueron filtrados por: *betacoronavirus*, *coronavirus*, *coronaviridae*, *Influenza A virus*, *Influenza B virus* y *Homo sapiens*.

Amplificación de la secuencia de DNA diana mediante PCR

El diseño de los oligos se hizo con el software Oligo Analyzer 3.1® de IDT (Integrated DNA Technologies, USA) para descartar estructuras secundarias y Primer-BLAST para evitar amplificación cruzada. Posteriormente los oligos se sintetizaron en T4 OLIGO. Los oligos amplifican una región del gen N generando un amplicón de 359 pares de bases (pb) (**Tabla 3**). La temperatura teórica de alineamiento de los oligos fue de 63 °C y se determinó con *Tm Calculator* (NEB).

Tabla 3. Oligos utilizados para la PCR punto final.

FwPCRgenN	5'GTGGGAATGTTTTGTATGCGT3'	43	56 °C
RvPCRgenN	5'CACTAAGAAATCTGCTGCTGA3'	43	54 °C

%GC: Indica el porcentaje de guanina y citosina y se recomienda un rango de 40-60%.

Tm: Temperatura a la cual el 50 % de los oligos se encuentra en forma monocatenaria y el 50% interactúan con la secuencia complementaria. La diferencia entre la Tm de los oligos no debe ser mayor a 5 °C.

Para amplificar la región de interés del gen N se utilizó el plásmido pET-28a-SARS-CoV-2, donado por el grupo de investigación del Dr. Luis Brieba de la Unidad de Genómica Avanzada del

LANGEBIO. Este plásmido tiene en su secuencia los genes E, N y S del SARS-CoV-2 cepa Wuhan y para su amplificación se utilizó *E. coli* DH5- α en medio LB con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina. El cultivo inicial se incubó en 5 mL durante 8 horas y posteriormente se transfirió a un cultivo de 100 mL durante toda la noche, ambas temperaturas de incubación fueron 37°C. El plásmido se purificó con ZymoPure II Plasmid Midiprep Kit de acuerdo con las sugerencias del fabricante (Zymo Research, USA).

La PCR se llevó a cabo en un termociclador T100 (Biorad). La reacción consiste en 12.5 μL de master mix 2X (Q5 High-Fidelity-NEB), 1.25 μL de oligo Fw (10 μM), 1.25 μL de oligo Rv (10 μM), 9 μL de agua y finalmente 1 μL del plásmido pET-28a-SARS-CoV-2 con la concentración correspondiente. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98 °C por 30 s durante 1 ciclo; desnaturalización a 98 °C por 10 s, alineamiento a 58 °C por 10 s y extensión a 72 °C por 10 s, todo esto por 20 ciclos; extensión final a 72 °C por 2 min y almacenamiento a 12 °C, ambos por 1 ciclo. Finalizada la PCR los amplicones se purificaron mediante precipitación con etanol. El producto de la reacción se tiñó con SYBR Safe y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (60 V / 1 hora).

Diseño de los crRNAs

Los crRNAs de dCas9 que se utilizaron para los ensayos de unión al gen N y determinación del efecto FRET se diseñaron manualmente (**Tabla 4**) y analizó su eficiencia y especificidad mediante los softwares web *ChopChop* y *CRISPOR*. Todos los crRNAs de este trabajo se sintetizaron químicamente (IDT, USA). Las regiones guías de los crRNAs tienen una longitud de 20 nucleótidos y ambos crRNAs reconocen secuencias adyacentes del gen N separadas por 21 pb (**Figura 11**). Para los ensayos de LFIA con dCas12a se utilizó un crRNA que en este proyecto llamaremos crRNA-LFIA (**Tabla 4**), el cual ha sido reportado y caracterizado para reconocer el gen N (Broughton JP et al., 2020).

Tabla 4. Secuencia guía de los crRNAs para reconocer una región del gen N

crRNA1	5'CGAAGAACGCUGAAGCGCUG3'	62	100
crRNA2	5'AAGUCACACCUUCGGGAACG3'	61.42	100
crRNA-LFIA	5'CCCCAGCGCUUCAGCGUUC3'	-	-

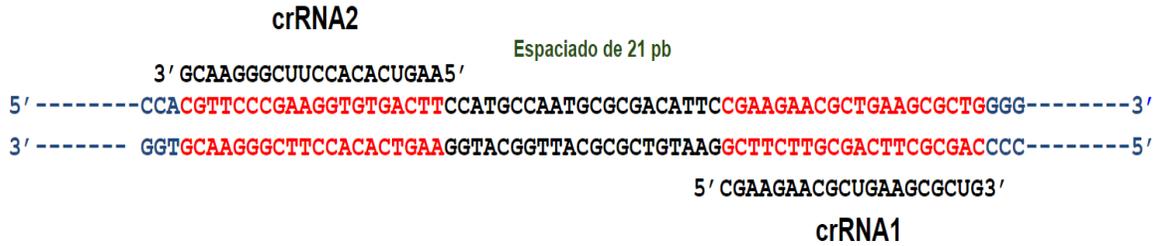


Figura 11. Reconocimiento de los crRNAs en una región del gen N. La distancia que existe entre las secuencias reconocidas por los crRNAs es de 21 pb, equivalente a 7.14 nm.

Ensayo de unión a DNA por las proteínas dCas9

Los complejos RNPs entre las Cas (fluorescentes o no) y los crRNAs se prepararon mediante la incubación a 25 °C de las proteínas dCas9-Atto550 y dCas9-Cy5 con crRNA1 o crRNA2, respectivamente, a una estequiometría 1:1, en buffer de reacción 1X (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 µg/mL BSA pH 7.9) durante 20 minutos. La muestra de DNA (obtenida mediante PCR) se mezcló con el complejo RNP-fluorescente en una estequiometría 1:1 (50 nM DNA:50 nM RNP) en buffer de reacción 1X y la mezcla se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Las muestras se tiñeron con SYBR Safe y se analizaron en un gel de poliacrilamida al 8 % y se corrieron a 80 V / 45 minutos.

Detección de una región de gen N con CRISPR-dCas9 usando FRET

En un volumen final de 35 µL los complejos RNPs-fluorescentes se mezclaron con el producto de PCR en buffer de reacción 1X y después se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en una placa negra con 384 pocillos. Posteriormente, se midió la emisión de fluorescencia en la región

de 560 a 700 nm (excitación a 555 nm), usando un lector de placas Cytation 5 (Biotek, USA). Para comparar la intensidad de FRET de cada muestra y poder determinar si había FRET o no, se usó el cociente resultante entre las fluorescencias máximas emitidas de los fluoróforos aceptor y donador ($\lambda_{fl_{666nm}} / \lambda_{fl_{555nm}}$). Una muestra positiva para FRET tiene un cociente mayor que el del control negativo.

Detección de una región de gen N con CRISPR-dCas12a mediante tiras de flujo lateral

Los complejos RNP-FAM se formaron mediante incubación a 37 °C durante 20 minutos de dCas12a-FAM con el crRNA a una estequiometría 1:1 en buffer de reacción 1X. Posteriormente, se añadieron 5 μ L de producto de PCR de DNA biotinilado y se incubaron con buffer de reacción 1X a 37 °C / 30 minutos en un volumen final de 20 μ L. Esto permite la interacción entre RNP-FAM con DNA-Biotina. Después de la incubación los 20 μ L de la reacción se añaden a la almohadilla de detección de la tira reactiva HybriDetect (Milenia Biotec, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Estas tiras reactivas presentan una línea control con estreptavidina que interactúa con la biotina unida al amplicón que es reconocido por el RNP de dCas12a-FAM que a su vez es reconocido por los anticuerpos antiFAM-AuNP.

Análisis estadístico

Los resultados que se obtuvieron por triplicado se reportaron como media con su respectiva desviación estándar: La significancia entre las medias se analizó con el software GraphPad Prism 9.4.1 utilizando la prueba T no pareada (para dos medias) y el ANOVA de un factor (para tres o más medias) seguido de una comparación múltiple Šidák (para la caracterización de FRET a diferentes estequiometrias de los RNPs) y comparación múltiple Turkey (para la validación de especificidad del sistema de flujo lateral).

Resultados y discusión

Expresión y purificación de las proteínas dCas9 y dCas12a

Las proteínas dCas9 y dCas12a se aislaron de la fracción soluble del lisado celular de *E. coli* BL21 (DE3) y se purificaron mediante tres pasos de cromatografía: afinidad a níquel, intercambio iónico y exclusión molecular (SEC) (**Figura 12**). La purificación por afinidad a níquel (**Figura 12a,e**) se realizó gracias a la etiqueta de 6xHis en el amino terminal de la dCas9 y dCas12a; dicha etiqueta se cortó con la enzima TEV para dCas9, y SUMO para dCas12a y se removió de la solución durante el proceso de diálisis. Anteriormente en la purificación por intercambio iónico se utilizaba una columna de HitrapSP (Arroyo, L., 2022), pero para mejorar la pureza de las proteínas se decidió emplear una columna de heparina que presenta grupos carboxilato (COO^-) y sulfonato (SO_3^-), capaces de interactuar con la carga positiva de la proteína de interés. (**Figura 12b,f**). Para que las proteínas dCas obtuvieran carga positiva e interactuaran con la resina de heparina, fue necesario utilizar un buffer con un pH menor al punto isoeléctrico (pI) de las proteínas dCas9 (pI = 8.98) y dCas12a (pI = 8.01). Finalmente, las proteínas se purificaron con base en su tamaño mediante una cromatografía de exclusión molecular (**Figura 12c,g**), y como se observa en los cromatogramas de SEC (**Figura 12d,h**) las proteínas correspondientes a la dCas se observaron en el tercer pico (flecha azul) mientras que las proteínas contaminantes se visualizan en los picos restantes.

molecular. **(d,h)** Cromatograma de la exclusión molecular; con flechas azules se indican las fracciones que presentan a las proteínas dCas9 y dCas12a. Los rectángulos rojos indican a las proteínas dCas9 y dCas12a.

La pureza e identidad de las proteínas se determinó por SDS-PAGE y WB respectivamente **(Figura 13)**. En el análisis de pureza nos podemos percatar que mediante la estrategia de Níquel-Heparina-SEC se obtiene un mayor grado de pureza (>90 %) en comparación con el protocolo original de Níquel-HitrapSP-SEC que presenta una pureza <85 % (Arroyo, L., 2022) **(Figura 13c,g)**. Se ha reportado que esta mejora en la pureza se debe a que la heparina imita la estructura polianiónica de los ácidos nucleicos, por lo que las proteínas Cas, que interactúan con ácidos nucleicos, se unen con mayor fuerza a la resina de heparina de la columna (Mohanraju P. et al., 2018; Gao Y. et al., 2021). Todo esto contribuye a la eliminación de proteínas y ácidos nucleicos contaminantes.

Para confirmar la identidad de las proteínas purificadas se usaron anticuerpos monoclonales anti-Cas9 y policlonales anti-Cas12a. En el WB **(Figura 13d)** se observa una banda de mayor intensidad que indica la presencia de dCas9. La banda de intensidad tenue que se observa para el control negativo (dCas12a) puede deberse a que el anticuerpo monoclonal reconoce un epítipo parecido al de dCas9, lo que suele ser común para proteínas que presentan cierta homología estructural como dCas9 y dCas12a. Para el WB de dCas12a observamos algo similar **(Figura 13h)**, esto se debe a que los anticuerpos al ser policlonales reconocen diferentes epítipos de una misma proteína, lo que aumenta las posibilidades de reacción cruzada en proteínas con estructura similar (Lipman N. S. et al., 2005). Aunque esta inespecificidad también suele asociarse al bloqueo inadecuado de la membrana, por lo que en esta situación los anticuerpos se unen a otra cosa que no necesariamente es la proteína objetivo (Mahmood T. & Yang P. C., 2012)

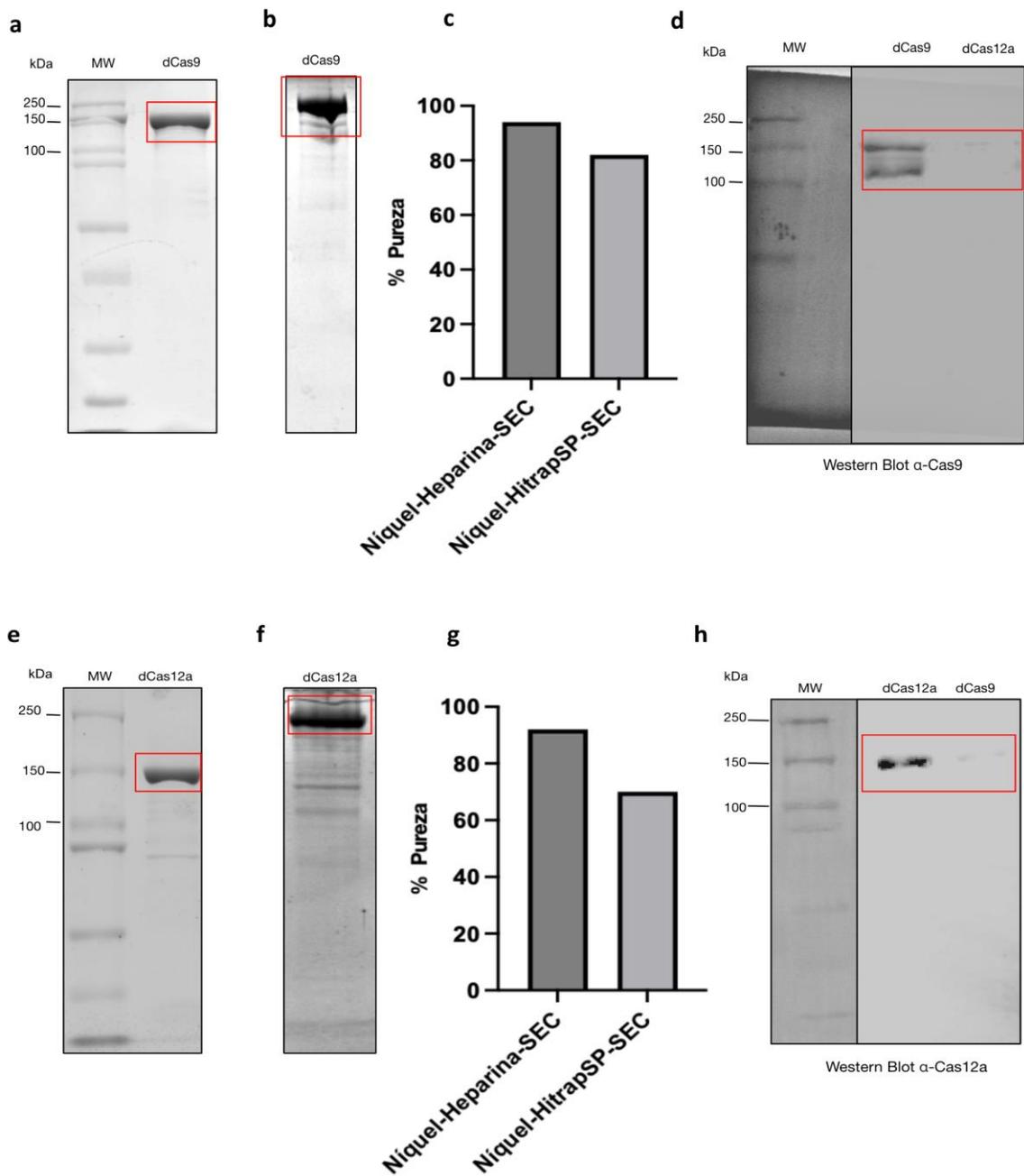


Figura 13. Pureza e identidad de dCas9 y dCas12a. (a-d) dCas9 y **(e-h)** dCas12a. **(a,e)** SDS-PAGE de las proteínas purificadas por Níquel-Heparina-SEC. **(b,f)** SDS-PAGE de las proteínas purificadas por Níquel-HitrapSP-SEC, tomado de Arroyo L. 2022. **(c,g)**. Análisis de pureza de las proteínas purificadas mediante el software ImageJ **(d,h)**. WB de las proteínas purificadas mediante Níquel-Heparina-SEC.

Caracterización del etiquetado de las proteínas

En el proceso de etiquetado utilizamos fluoróforos con grupos maleimida, el cual es capaz de reaccionar con el grupo sulfhidrilo (-SH) de las cisteínas (Cys) presentes en las proteínas dCas9 y dCas12a (**Figura 14**). La reacción forma un enlace covalente tioéter entre la proteína y el fluoróforo con alta eficiencia y selectividad, muy parecida a las reacciones de “química clic” (Northrop B. H. et al., 2015).

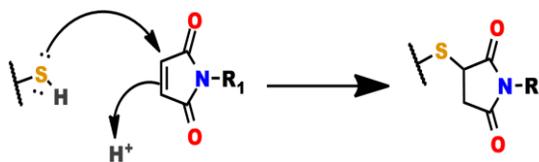


Figura 14. Mecanismo molecular de la reacción sulfhidrilo-maleimida. Los electrones del grupo -SH desplazan a los electrones el grupo maleimida que trae consigo la liberación de un protón y la formación de un enlace tioéter. R₁ indica la posición del fluoróforo. Tomado de Quanta Biodesign Limited (2022).

La proteína dCas9 cuenta con 2 Cys en su secuencia (C80 y C574), por lo que se pueden conjugar a la proteína un máximo de 2 fluoróforos (**Figura 15a**). Para el proceso de etiquetado con Atto550, se obtuvo un valor de DOL de 3.48, mientras que para Cy5 se obtuvo un valor de 2.9. Estos valores indican que las muestras de proteína presentan un exceso de 1.48 fluoróforos. Esta porción representa fluoróforos absorbidos y no unidos covalentemente, los cuales posiblemente no se eliminaron durante el proceso de remoción del exceso de fluoróforo (centrifugación con las unidades de filtración) usado durante la reacción de conjugación. También se obtuvo el espectro de emisión de las proteínas dCas9 conjugadas (**Figura 15b**) y verificó que el proceso de etiquetado no afectó a los picos de emisión de Atto550 y Cy5, ya que se ha reportado que la cercanía de ciertos aminoácidos aromáticos puede generar fotoblanqueo, es decir que los fluoróforos ya no puedan emitir fluorescencia (Smit J. H. et al., 2019).

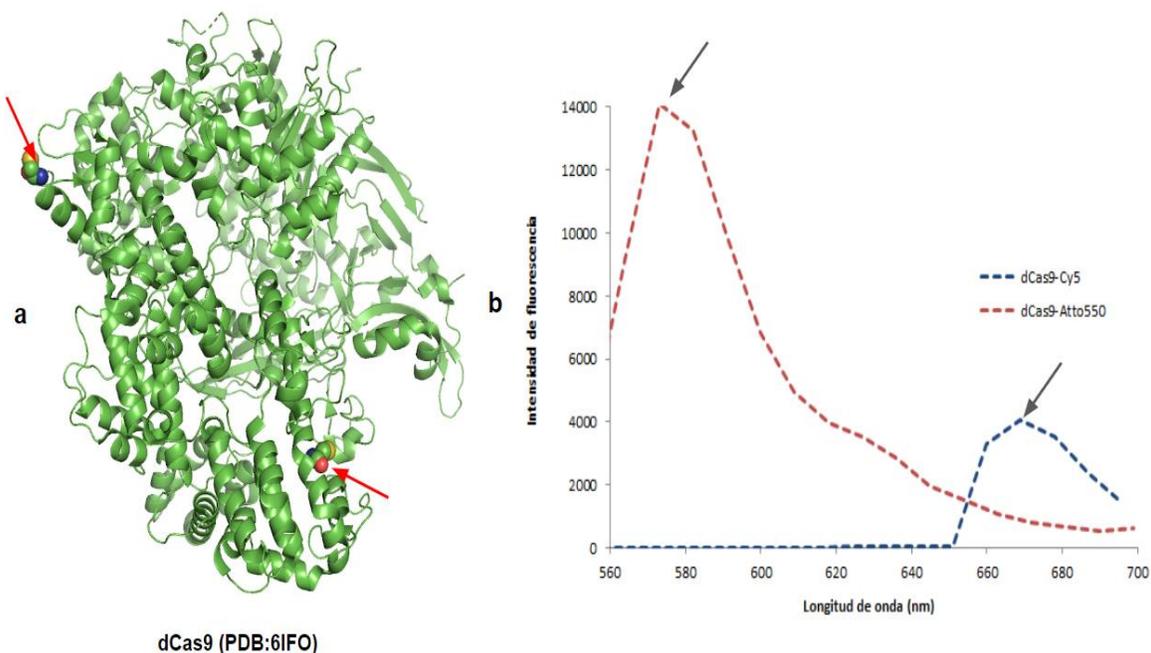
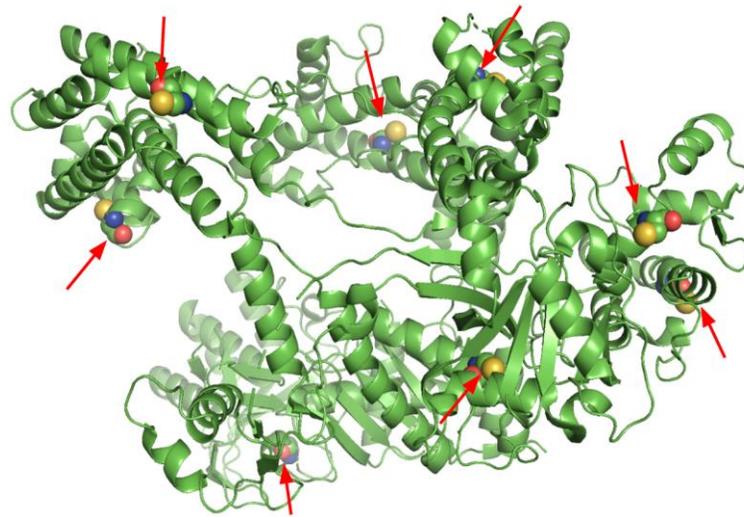


Figura 15. Proteína dCas9 etiquetada con fluoróforos. (a) muestra la estructura cristalográfica de dCas9 (PDB 6IFO) y las flechas rojas señalan las Cys que pueden reaccionar con la maleimida presente en los fluoróforos Atto550 y Cy5. (b) Espectro de emisión de las proteínas dCas9 etiquetadas con los fluoróforos Atto550 (575 nm) y Cy5 (666 nm). Se observan los picos de emisión máxima característicos (flechas negras).

La proteína dCas12a cuenta con un total de 8 Cys (C65, C205, C334, C379, C608, C674, C1025 y C1248) por lo que existen 8 posibles sitios de conjugación (**Figura 16**). Se obtuvo un valor de DOL de 5.46, lo que indica un sub-etiquetado, es decir que no todas las Cys reaccionaron con el grupo maleimida de FAM. Esto se puede deber a que hay Cys que no se encuentran expuestas al solvente. Para esta proteína no fue necesario obtener un espectro de emisión ya que dCas12a-FAM se utilizó para el enfoque de LFIA cuyo fundamento se basa en el reconocimiento de FAM por anticuerpos y no por detección fluorescente.



dCas12a (PDB:5B43A)

Figura 16. Estructura secundaria de la proteína dCas12a. Se muestra la estructura cristalográfica de dCas12a (PDB 5B43) y con flechas rojas se señalan las Cys que pueden reaccionar con la maleimida de FAM.

Selección y amplificación de la secuencia a detectar

Se seleccionó una región del gen N como secuencia objetivo y, mediante un alineamiento múltiple, se demostró que esta secuencia no presenta homología con otros virus respiratorios de la familia *Coronaviridae* (MERS-CoV, SARS-CoV) y *Orthomyxoviridae* (*Influenza A virus* e *Influenza B virus*). El alineamiento múltiple también arrojó un porcentaje de identidad del 100% con secuencias genómicas exclusivamente relacionadas al gen N de SARS-CoV-2 (Porcentaje de identidad), evidenciando la naturaleza conservada de la región del gen N, lo cual tiene sentido biológico, ya que el gen N codifica para una proteína de unión a RNA que es crucial para el empaquetamiento del genoma viral, por lo que la tasa de mutaciones es relativamente baja en comparación con el gen S (Thakur S. et al., 2022). Este aspecto es muy importante ya que de esta forma se asegura amplificar regiones exclusivas de SARS-CoV-2 que reduzcan la obtención de falsos positivos y se seleccionó regiones conservadas que sean menos susceptibles a deleciones o inserciones para evitar los falsos negativos. Todos los ensayos se diseñaron para detectar esta región del gen N de 356 pb.

Nuestros métodos de detección se acoplaron a una amplificación previa por lo que se diseñó oligos para amplificar la región del gen N por PCR punto final. La temperatura teórica de alineamiento que se determinó para los oligos fue de 63 °C, pero al realizar el gradiente de temperatura nos percatamos que la temperatura de alineamiento adecuada es de 58 °C, ya que se observó una mayor cantidad de amplicones del tamaño esperado (**Figura 17a**). Después, con la temperatura de alineamiento adecuada, se realizó un gradiente de la concentración de DNA plasmídico a amplificar, desde aM a nM, cuyo propósito fue conocer hasta qué punto se podía obtener una cantidad visible de DNA, ya que existen métodos como LAMP capaces de amplificar DNA a partir de concentraciones attomolares, lo cual mejora el límite de detección de métodos CRISPR acoplados a una pre-amplificación (Hernandez-Garcia A. et al., 2022). Por ello, seleccionamos la concentración de 400 aM como la más adecuada para la amplificación por PCR punto final (**Figura 17b**).

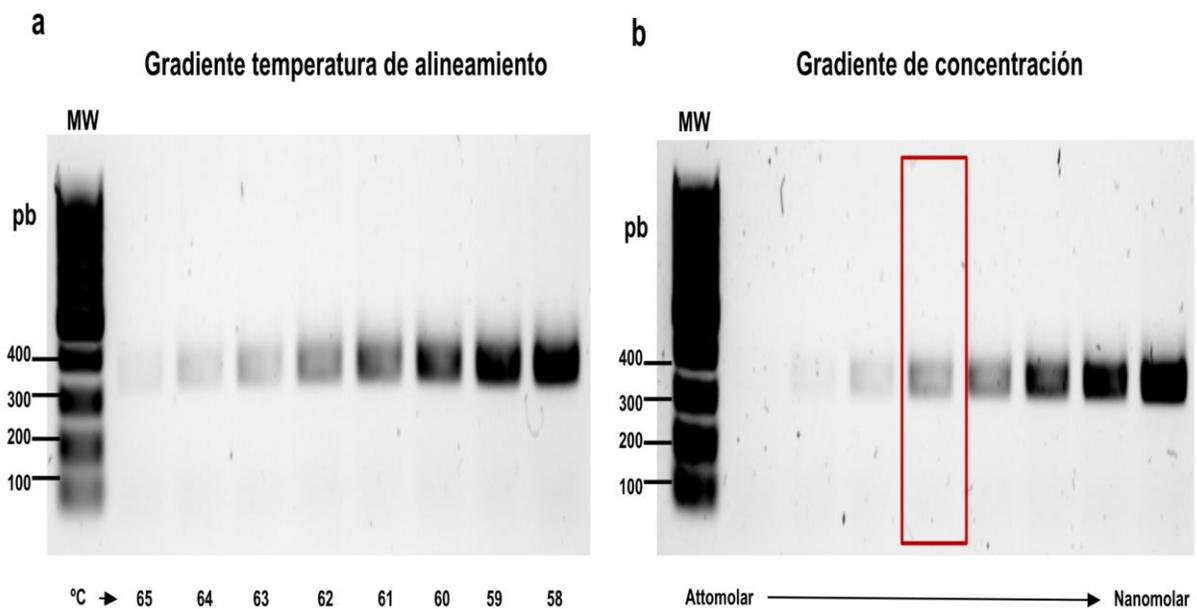


Figura 17. Amplificación de la región del gen N. Geles de agarosa al 1 %. **(a)** PCR de la región del gen N mediante gradiente de temperatura de alineamiento. **(b)** PCR de la región del gen N con concentraciones diferentes de DNA plasmídico. El cuadro rojo indica el producto de PCR obtenido a partir de una concentración de 400 aM. En cada pozo se cargaron 3 μ L del producto de PCR.

Uno de los aspectos más importantes para la detección de ácidos nucleicos es la reducción de los tiempos de reacción, por ello, decidimos probar distintos tiempos para la PCR punto final, y

encontramos que, en un tiempo aproximado de 30 minutos, es suficiente para obtener amplicones de manera específica, validando así la funcionalidad de los oligos (**Figura 18**). La reducción de este tiempo es crucial ya que otros métodos, como LAMP y RPA, necesitan un tiempo de entre 20-25 minutos para amplificar el material genético, por lo que, al menos en este aspecto podemos ser equiparables, y además no observamos amplificaciones inespecíficas y cruzadas que suelen ser comunes con los oligos utilizados en LAMP (Lim B. et al., 2021; Iqbal B. N. et al., 2022).

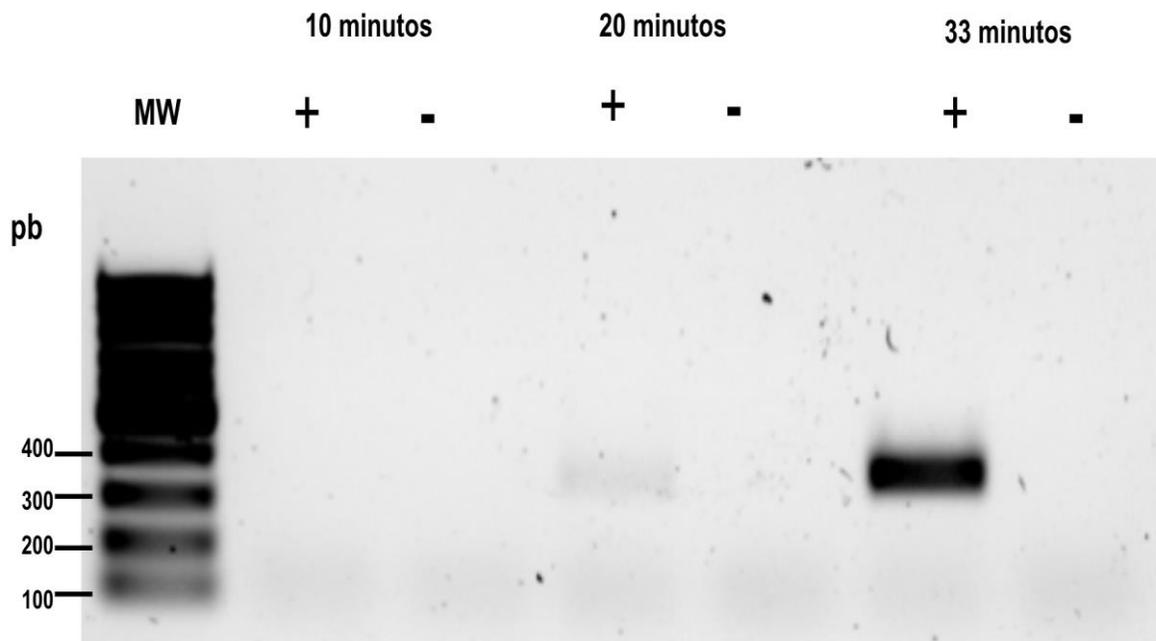


Figura 18. Optimización del tiempo de amplificación. Gel de agarosa al 1 %. Se probaron distintos tiempos de amplificación y se determinó que un tiempo de 33 minutos es suficiente para amplificar de manera específica la región del gen N. En cada pozo se cargaron 5 μ L del producto de PCR.

Método de detección basado en fluorescencia

Análisis de especificidad de los crRNAs para dCas9

La secuencia guía de los crRNAs se analizó *in silico* y se obtuvieron valores respecto a la eficiencia y especificidad. El valor de eficiencia está relacionado con la expresión de los crRNAs bajo el control de un promotor T7 o U6 en un contexto celular, por lo que, para nuestros fines, el valor de eficiencia no tiene importancia alguna. El valor de especificidad está relacionado con el efecto *off-target* y se le asigna un puntaje que varía de 0 a 100 puntos. Un menor número de posibles sitios off-target corresponde a un mayor puntaje de especificidad y se recomiendan valores ≥ 50 para que el crRNA sea específico (Doench J. G. et al., 2016). Los crRNAs que se diseñaron para detectar una región del gen N mediante el enfoque de fluorescencia, tienen un puntaje de 100, por lo que podemos asegurar una detección genética más precisa.

Para validar experimentalmente la funcionalidad de los crRNAs, se realizó un ensayo de unión a DNA (**Figura 19**). Se usó amplicones de la región del gen N como nuestro DNA objetivo (DNA (+)) y un DNA de 120 pb como nuestro control negativo (DNA (-)). Primero se realizó un ensayo control con la proteína dCas9 sin etiquetar, que consistió en la incubación del complejo RNP con el DNA (+) y el DNA (-). El DNA (+) en presencia del RNP presentó cambios en la migración electroforética, mientras que el DNA (-) que se incubó con el RNP no presentó tal cambio (**Figura 19a**). Esto indicó que el RNP es capaz de discriminar secuencias y unirse de manera específica a los amplicones del DNA (+). Posteriormente, evaluamos los complejos RNPs formados por dCas9-Atto550:crRNA1 y dCas9-Cy5:crRNA2 (**Figura 19b-c**), y encontramos el mismo comportamiento que en el ensayo control. Con esto se demostró que los puntajes de especificidad de los crRNAs son confiables, y además se verificó que el proceso de etiquetado no modificó la capacidad de los complejos RNPs para reconocer secuencias específicas de DNA, cumpliendo así con uno de los parámetros más importantes para la detección de genes proveniente de agentes infecciosos como SARS-CoV-2

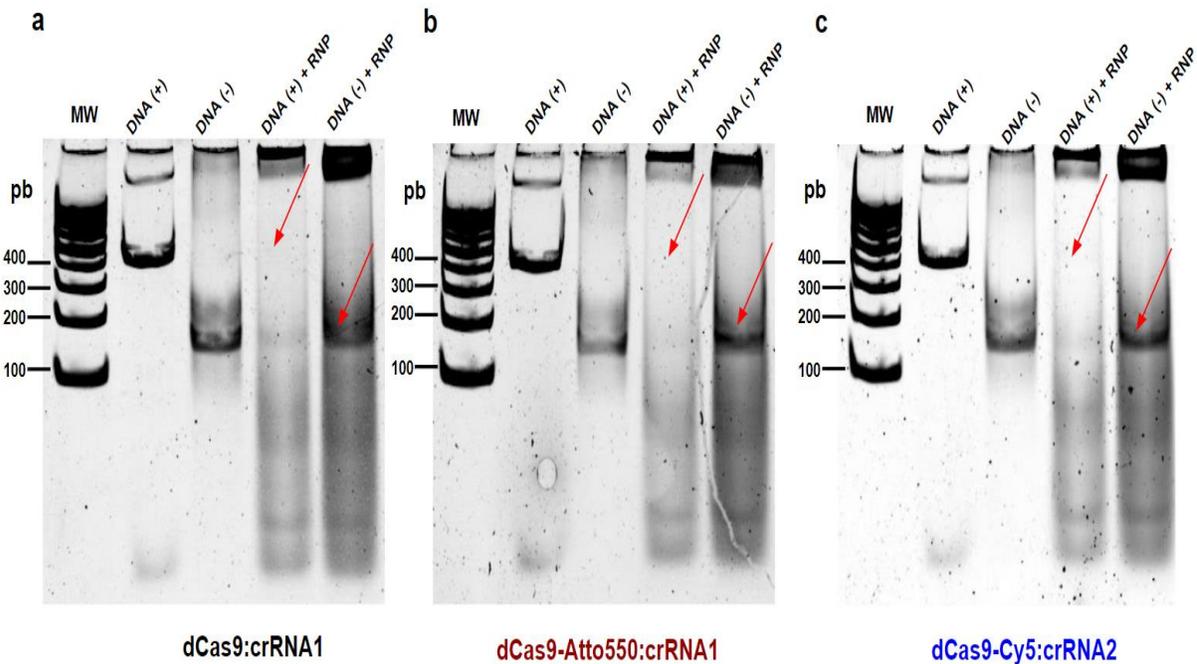


Figura 19. Validación experimental de los crRNAs. Geles de poliacrilamida al 8%. Las flechas rojas indican dónde debería estar ubicado el DNA en ausencia de RNP. **(a)** En el experimento control no se observa que el amplicón del DNA (+) esté a la altura correspondiente de 359 pb ya que está interactuando con el RNP-dCas9, mientras que el DNA (-) no presentó cambios en su movilidad electroforética, lo que indica que el RNP no lo está uniendo. **(b)** Se observó que el amplicón del DNA (+) es reconocido de manera específica por el RNP de dCas9-Att0550:crRNA1 ya que hay cambios en la movilidad electroforética a diferencia del DNA (-). **(c)** El RNP de dCas9-Cy5:crRNA2 también fue capaz de unirse específicamente al amplicón del DNA (+) y no al DNA (-).

Caracterización del efecto FRET para la detección del gen N

Después de mejorar la pureza de las proteínas, obtener los amplicones del gen N a partir de una concentración aM en un tiempo óptimo, y validar la especificidad de los crRNAs para dCas9, se procedió a caracterizar la detección del gen N mediante el fenómeno de FRET. Para caracterizar la detección enfocada en fluorescencia, se utilizó una concentración de 100 nM del amplicón del DNA (+) y el DNA (-), ambos purificados mediante precipitación por etanol. La concentración de RNP- Cy5 (Aceptor) se mantuvo constante a 100 nM, mientras que la concentración de RNP-Atto550 (Donador) fue de 0, 50, 100 y 200 nM, obteniendo estequiometrias de Aceptor + Donador (A+D) de 1:0, 1:0.5, 1:1 y 1:2. La razón por la que usamos productos de PCR purificados, fue para analizar los espectros

de emisión en condiciones experimentales más controladas, y evaluamos diferentes estequiometrías para encontrar en qué punto la detección es confiable. Después de establecer estas condiciones se generaron los espectros de emisión para cada una de las muestras al excitarse con una longitud de onda de 555 nm (**Figura 20a**), y partir de estos datos se obtuvo el índice de FRET (también llamado FRET radiométrico). El índice de FRET se calculó como un cociente entre la fluorescencia del pico de emisión máxima del aceptor RNP-Cy5 (666 nm) respecto a la del donador RNP-Atto550 (555 nm), $\lambda I_{666nm} / \lambda I_{555nm}$. Dicho cociente de las intensidades de fluorescencia se puede ver como una medida relativa de la transferencia de energía de Atto550 a Cy5 cuando el primero es excitado. El cociente calculado mostró que al aumentar la relación estequiometría entre RNP-Cy5 y RNP-Atto550 se detectan “menos diferencias” entre el índice de FRET de una muestra positiva y negativa (**Figura 20b**), lo cual no es óptimo para la detección de genes, por lo que se seleccionó la estequiometría de 1:0.5 como la más adecuada.

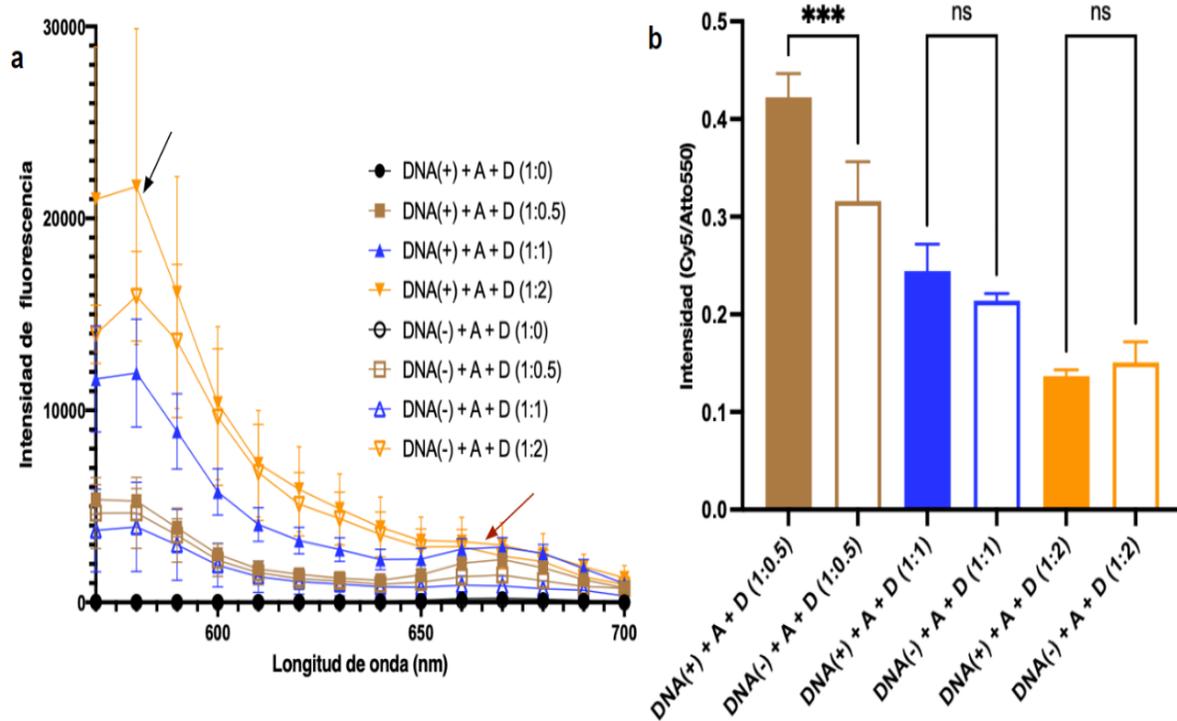


Figura 20. Caracterización de FRET a diferentes relaciones estequiometrías de RNPs. (a) Espectro de emisión de las muestras de DNA incubadas con los RNPs a distintas concentraciones, después de la excitación a 555 nm. En flecha negra se muestra el pico máximo de emisión de Atto550 y en flecha roja el de Cy5. **(b)**

Intensidad de FRET determinada por el cociente entre los picos de emisión de RNP-Cy5 y RNP-Atto550 (I_{666nm}/I_{555nm}). Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos. 0.12 (ns), 0.033 (*), 0.002 (**), < 0.001 (***)).

Para demostrar que podemos detectar el gen N con la estequiometría seleccionada, se realizó un ensayo con producto de PCR purificado correspondiente al DNA (+) y DNA (-). Se obtuvieron los espectros de emisión (**Figura 21a**) y cualitativamente se observó que el amplicón del DNA (+) presenta una disminución de fluorescencia en el pico de 575 nm y un aumento en el pico de 666 nm, lo que indicó una transferencia de energía entre los fluoróforos, pero esto también se observó en la muestra con DNA (-), aunque con un menor aumento en fluorescencia correspondiente al pico de 666 nm, lo que indicaría FRET residual e inespecífico. Para determinar qué producto de PCR presenta una mayor transferencia de energía, se calculó el índice de FRET (**Figura 21b**) y se confirmó que la muestra con DNA (+) presenta un valor de intensidad mayor.

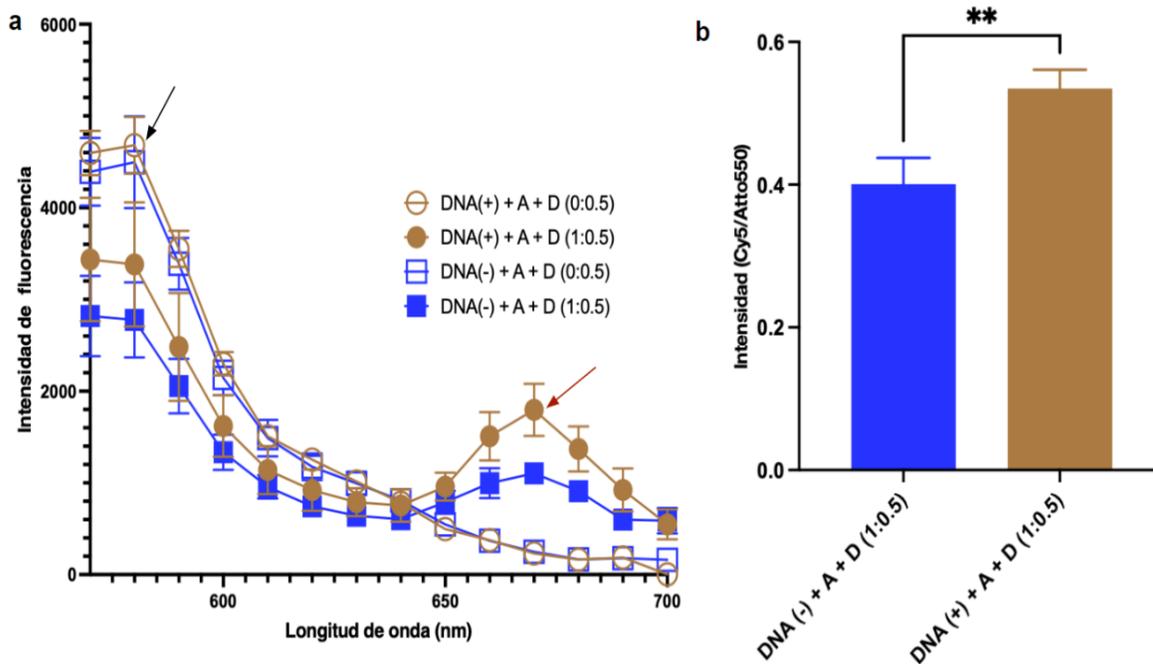


Figura 21. Detección de productos de PCR purificados mediante FRET. (a) Espectro de emisión de las muestras de DNA incubadas con los RNPs a una estequiometría de 1:0.5, después de la excitación a 555 nm. En flecha negra se muestra el pico máximo de emisión de Atto550 y en flecha roja el de Cy5. **(b)** Intensidad de FRET que confirma que en la muestra con el DNA (+) hay una mayor transferencia de energía entre los

fluoróforos. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos. 0.12 (ns), 0.033 (*), 0.002 (**), < 0.001 (***).

Hasta este punto, la detección mediante fluorescencia se ha realizado con producto de PCR purificado, sin embargo, esto no es lo óptimo, ya que implica una hora adicional para el proceso de detección. Por consiguiente, se realizó el ensayo con 5 μ L del producto de PCR sin purificar y se evidenció que en las muestras con el DNA (+) sigue existiendo una mayor transferencia de energía (**Figura 22 a-b**). Esto es ideal ya que si suman los tiempos de procesamiento de la muestra (30 minutos de PCR, 30 minutos de incubación con los RNPs y 10 minutos de la lectura mediante fluorescencia) se obtiene un total de 70 minutos, estando por debajo del tiempo de métodos como la qPCR, que suele ser de hasta 4 horas o como la NGS que genera resultados en un total de 24 horas. Aunque es necesario hacer más experimentos para determinar la sensibilidad y especificidad en un número amplio de muestras distintas, además observamos que existe una menor significancia en los resultados obtenidos, por lo que las evidencias estadísticas de que existan diferencias se ven reducidas.

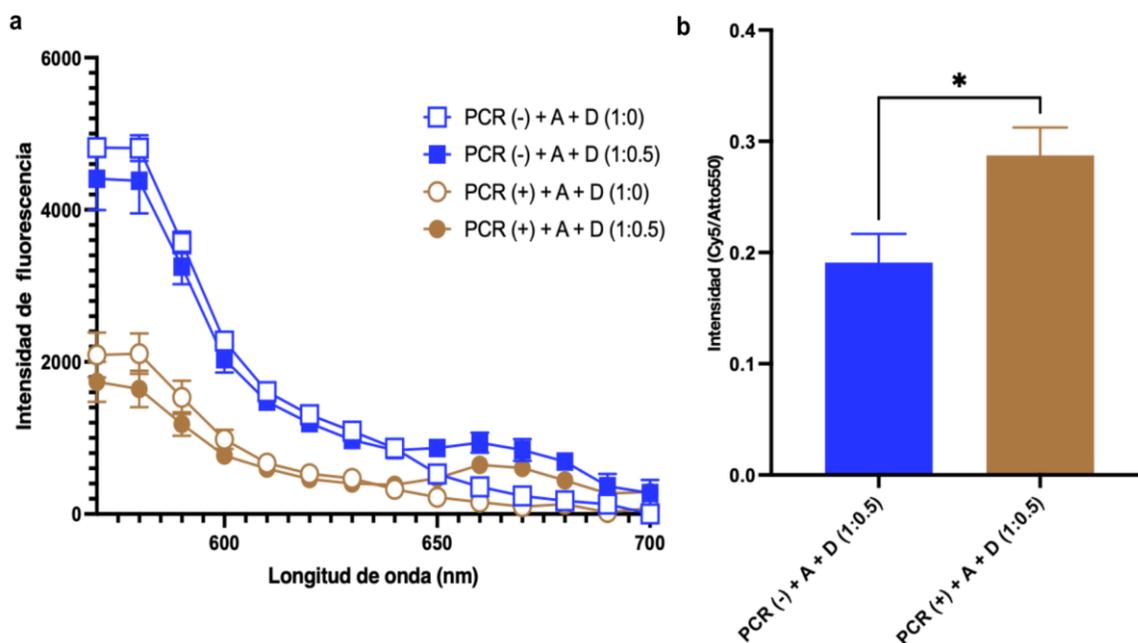


Figura 22. Detección mediante FRET de productos de PCR sin purificar. (a) Espectro de emisión de las muestras de PCR sin purificar. **(b)** Intensidad de FRET para muestras de PCR sin purificar. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos. 0.12 (ns), 0.033 (*), 0.002 (**), < 0.001 (***).

Para la detección de la región del gen N se calculó el índice de FRET, cuyo valor es útil para el análisis semicuantitativo dentro de un mismo experimento. En cambio, la eficiencia de transferencia (E) es un valor cuantitativo directamente relacionado a la distancia entre los fluoróforos, que indica la fracción de energía fotónica absorbida por el donador y que es transferida al aceptor, por ello, determinar su valor sería lo más adecuado (Berney C & Danuser G, 2003), pero para este sistema su cálculo es casi imposible, ya que las proteínas presentan más de un fluoróforo, una porción de fluoróforo no unido, y además no se tiene la seguridad de que todos los fluoróforos participen en el proceso de FRET. Asimismo, se ha reportado que los valores de E son mucho menos confiables cuando la proporción molar de donador a aceptor es menor de 1:1 (Shrestha D et al., 2015), por lo que nuestra estequiometría de 1:0.5 sería un problema.

Se demostró que este sistema de fluorescencia acoplado a PCR punto final puede detectar ácidos nucleicos de forma sencilla y en un tiempo relativamente corto (70 min), aunque con ciertas limitaciones, principalmente relacionado al cálculo del índice de FRET, cuyo valor es dependiente del instrumento de medición, por lo que una comparación directa entre diferentes índices de FRET será complicado (Berney C. & Danuser G., 2003). Para mejorar el sistema es necesario asegurar que cada proteína esté etiquetada con un solo fluoróforo, y que además presenten la suficiente flexibilidad que les permita una interacción más certera entre el fluoróforo donador y aceptor, de hecho esto ya se ha evaluado con dCas9 fusionado a proteínas fluorescentes como mCerulean3 (Donador) y mVenus (Aceptor) y obtuvieron valores de eficiencia de transferencia que coinciden con la distancia estimada entre las dos regiones de DNA reconocidas por los RNP-mCerulean3 y RNP-mVenus (Lim S. et al., 2020). Estas dCas9 fusionadas presentan un linker de aminoácidos que brinda flexibilidad a mCerulean3 y mVenus, por lo que para nuestro sistema proponemos etiquetar a dCas9 con Atto550 y Cy5 unidas a maleimida mediante linkers como polietilenglicol (PEG), esto permitiría acercar ambos fluoróforos para que FRET sea más eficiente.

Método de detección basado en flujo lateral

Al igual que la detección basada en fluorescencia, el enfoque de flujo lateral está acoplado al desarrollo previo de una PCR punto final, con la diferencia de que en este método los amplicones están biotinilados. Además, para la formación del complejo RNP-FAM utilizamos el crRNA-LFIA y la proteína dCas12a-FAM, cuya especificidad es similar a dCas9 (Wang Y et al., 2020) pero cuenta con una afinidad mayor; en el orden de fM, lo que podría mejorar el límite de detección.

Para nuestro ensayo preliminar de detección, utilizamos producto de PCR purificado a una concentración de 100 nM, el cual se incubó con RNP-FAM a una concentración de 1 μ M (estequiometría 1:10). Durante la incubación de las muestras, se formó el complejo RNP-FAM:DNA (+)-biotina, el cual se detectó mediante tiras de flujo lateral. Estas tiras presentan dos líneas de detección (Control y Test) que se hacen visibles durante la detección dependiendo si la muestra es positiva o negativa. La línea control (C) está recubierta con anticuerpos que capturan el anticuerpo anti-FAM conjugado a nanopartículas de oro (Au-NP), y verifica que la tira reactiva funcionó adecuadamente durante el ensayo experimental. La otra corresponde a la línea test (T), la cual está recubierta con estreptavidina, y que es capaz de capturar moléculas biotiniladas (**Figura 9**). La detección ocurre cuando la molécula capturada por la estreptavidina es reconocida por anticuerpos antiFAM-AuNP. En ambas muestras, DNA (-) o DNA (+) se visualizó claramente la banda de la línea control, en cambio solo para la muestra de DNA (+) se observó una banda en la línea T, aunque con baja intensidad. Esto indica que el complejo RNP-FAM:DNA (+)-biotina se unió a la estreptavidina presente en la línea T y que los anticuerpos antiFAM-AuNP lo reconocieron (**Figura 23a**). Posteriormente calculamos un cociente entre la intensidad de la señal colorimétrica de la línea T respecto a la C, confirmando que la intensidad de la banda para la muestra con DNA (+) es claramente mucho mayor que para la muestra con DNA (-) (**Figura 23b**).

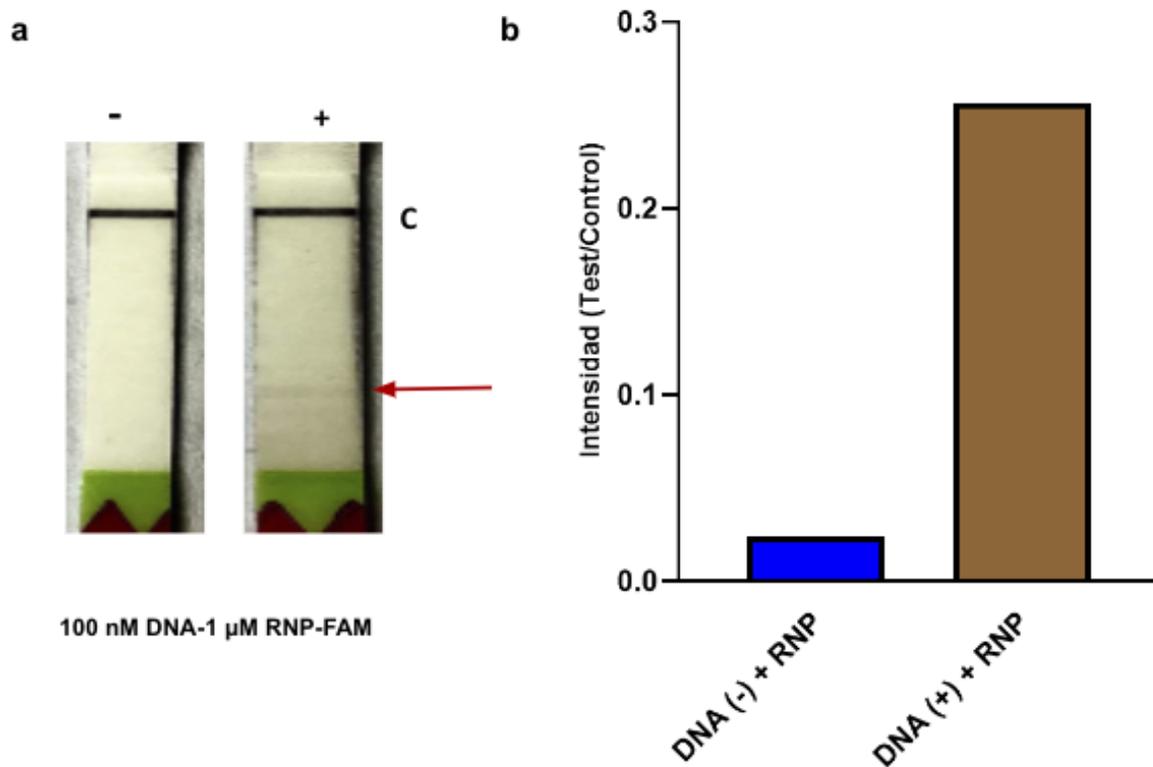


Figura 23. Ensayo inicial de flujo lateral para la detección del gen N. (a) Ensayo de flujo lateral con producto de PCR purificado. La línea control (C) indicada con flecha negra está recubierta con anticuerpos que reconocen anticuerpos antiFAM-AuNP, en consecuencia, funciona como control experimental. La línea test (T), indicada con flecha roja, está recubierta con estreptavidina y captura los amplicones etiquetados con biotina. La muestra con DNA (-) presenta una sola banda correspondiente a la línea C, mientras que la muestra con el DNA (+) presenta dos bandas correspondientes a la línea T y C. **(b)** Análisis de intensidad colorimétrica (Test/Control) mediante el software ImageJ. Se calcula el número de píxeles para la región de interés (Test y control) y posteriormente se obtiene un cociente para determinar valores relacionados a la intensidad colorimétrica de la banda. La muestra con DNA (+) presenta una intensidad colorimétrica mayor que el DNA (-)

Posteriormente, evaluamos diferentes concentraciones de producto de PCR purificado (DNA (+) o DNA (-)) y RNP-FAM, pero manteniendo constante la estequiometría molar en 1:1 (**Figura 24a**). Esto se hizo para determinar si la intensidad de la línea T era dependiente de la concentración de DNA. Nos percatamos que la intensidad de la línea T correspondiente a la concentración de 1 μM de DNA (+) y 1 μM de RNP-FAM (Estequiometría 1:1) tiene un valor similar al de la señal generada por la concentración de 100 nM de DNA (+) y 1 μM de RNP-FAM (Estequiometría 1:10), esto nos

indicó que la intensidad de la banda es dependiente de la concentración de DNA y de una relación estequiométrica >1 y <10 respecto al RNP-FAM (**Figura 24b**).

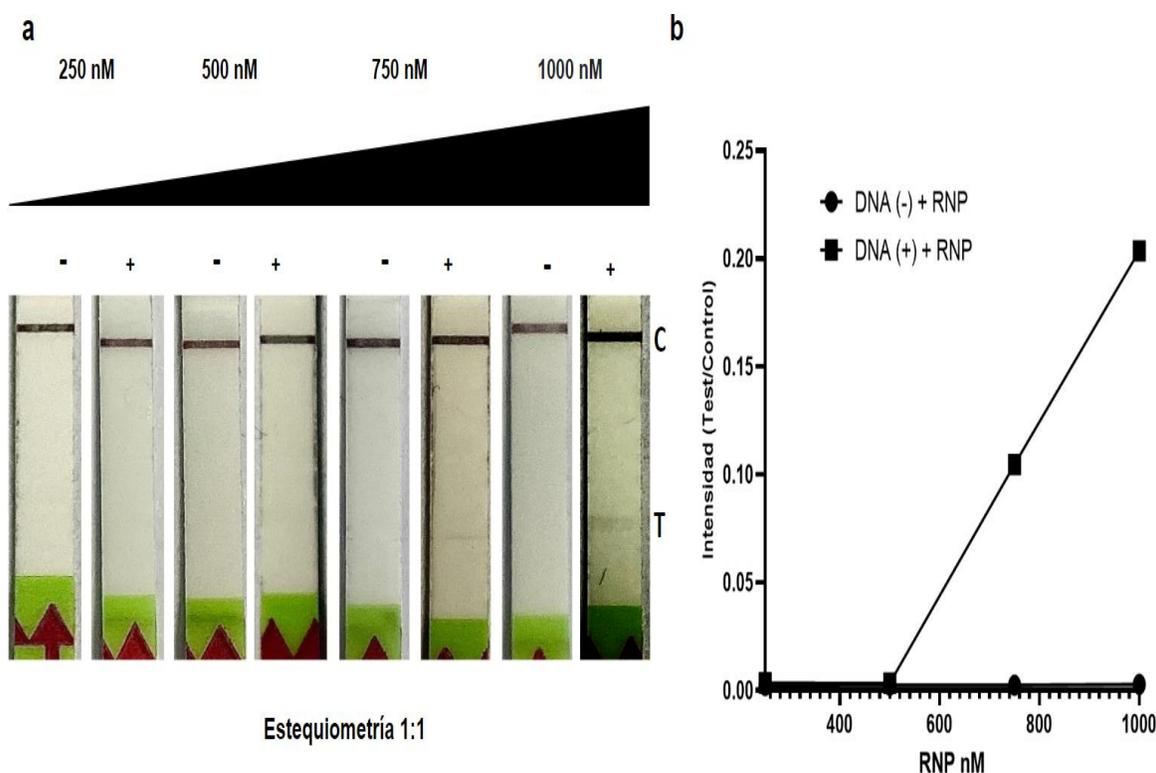


Figura 24. Caracterización de flujo lateral para diferentes concentraciones de DNA:RNP-FAM y estequiometría constante. (a) Ensayo de flujo lateral con producto de PCR purificado a diferentes concentraciones, pero con una estequiometría de 1:1 entre el DNA ya sea positivo o negativo, y el complejo RNP-FAM. **(b)** Análisis de intensidad colorimétrica (Test/Control) mediante el software ImageJ. Obsérvese que el DNA (+) a partir de la concentración de 750 nM de RNP-FAM se comienza a hacer visible la línea T, pero tiene una menor intensidad que la línea T correspondiente a la concentración 1 μ M. En las muestras con DNA (-) solo se observó la línea C.

En seguida, se realizó un ensayo en el que se aumentó la estequiometría, es decir manteniendo constante la concentración de DNA (+) a 100 nM y aumentando la concentración de RNP-FAM desde 1 hasta 5 μ M (las estequiometrías evaluadas fueron 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 y 1:50). Se esperaba que la señal de la línea T aumentara, pero sucedió todo lo contrario, ya que se observó una disminución de la señal conforme se aumentaba la estequiometría (**Figura 25a-b**). Esta disminución en la señal posiblemente se deba a la agregación de los RNPs ocasionada por su alta

concentración, lo que impide su interacción con el DNA. Por lo que se determinó que la concentración adecuada de RNP-FAM para nuestros ensayos debe ser de 1 μM , ya que se observó que la intensidad de la línea Tes más elevada independientemente de si hay 100 nM o 1 μM de DNA.

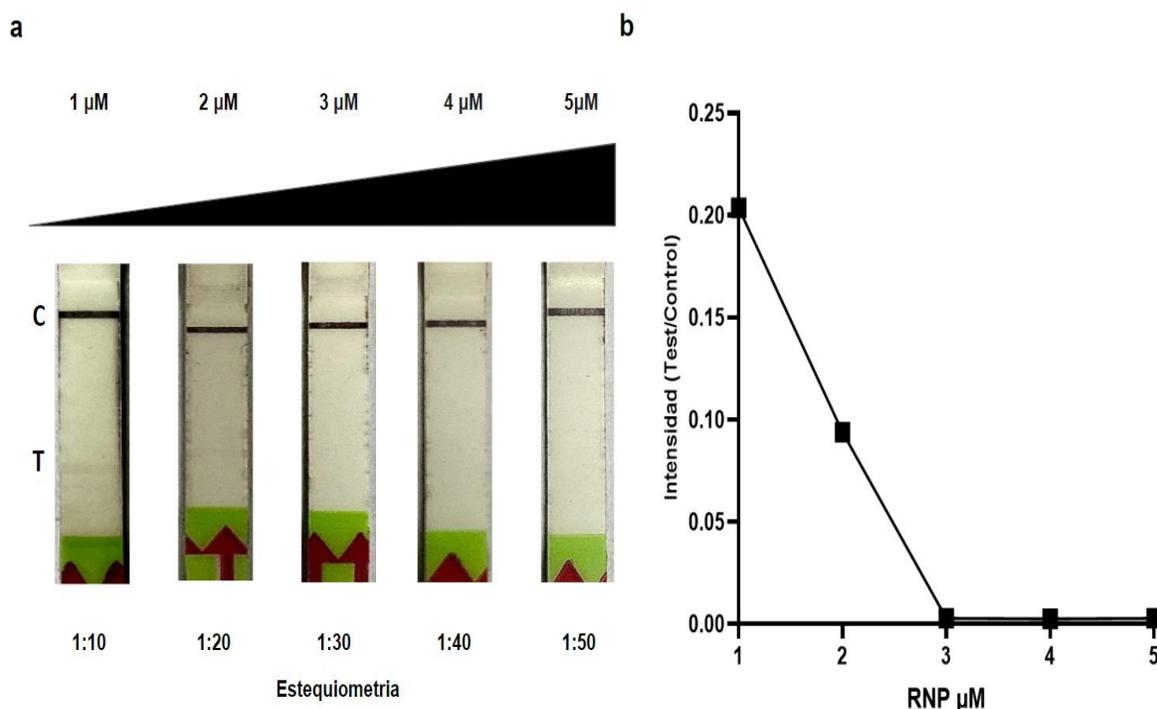


Figura 25. Caracterización de flujo lateral para diferentes estequiometrias de RNP-FAM y DNA (+) dejando la concentración de DNA constante. (a) Ensayo de flujo lateral con producto de PCR purificado correspondiente a DNA (+) con concentraciones crecientes de RNP-FAM. **(b)** Análisis de intensidad colorimétrica (Test/Control) mediante el software ImageJ.

Finalmente, para validar este sistema realizamos un ensayo de detección con 5 μL de producto de PCR sin purificar y una concentración de RNP-FAM de 1 μM , en las cuales evaluamos tres condiciones: (1) DNA (-) (producto de PCR negativo) con RNP (+) (con un crRNA dirigido contra la secuencia del gen N), (2) DNA (+) (producto de PCR correspondiente a la región del gen N) con RNP (-) (con un crRNA dirigido contra una secuencia distinta) y (3) DNA (+) con RNP (+) (**Figura 26a**). Como se esperaba, la muestra de DNA (-) no presentó ninguna señal en la línea T, ya que en la PCR punto final no se observó amplificación del control negativo por parte de los oligos (Figura 18), por lo que una interacción entre el DNA y la RNP es inexistente. En la muestra con amplificación

del control negativo por parte de los oligos (**Figura 18**), por lo que una interacción entre el DNA y la RNP es inexistente. En la muestra con RNP (-) y la PCR con DNA (+) tampoco se observó ninguna señal en la línea T, esto indicaría que, aunque el DNA biotinilado se encuentre presente y esté unido a la estreptavidina no dará una señal colorimétrica por que el RNP no es capaz de reconocerlo. Esto confirma que efectivamente la banda de la línea T, correspondiente a las muestras con DNA (+) y RNP (+) es producto de una interacción específica entre la región del gen N y la RNP-FAM. Con estas condiciones se validó que se puede detectar de manera específica una región del gen N de SARS-CoV-2 al utilizar amplicones biotinilados y dCas12a etiquetado con FAM, aunque la intensidad de la señal observada en la tira es baja (**Figura 26b**).

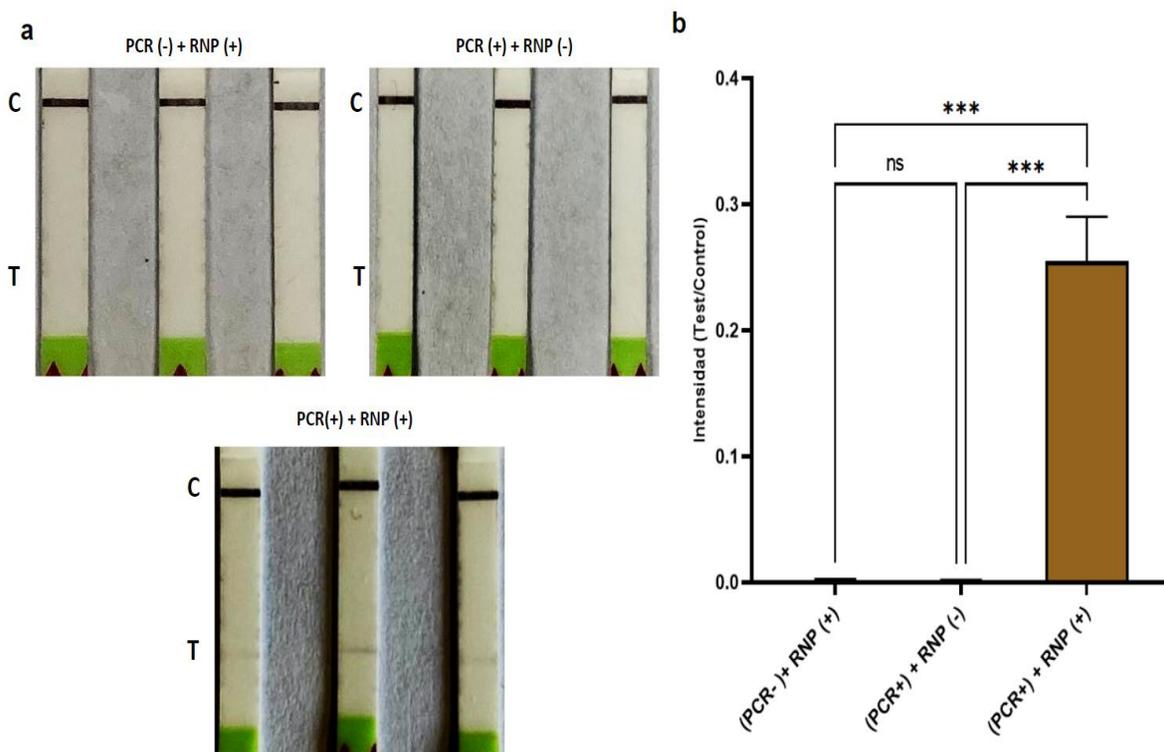


Figura 26. Validación de especificidad del sistema de flujo lateral. (a) Detección de productos de PCR sin purificar mediante flujo lateral. **(b)** Análisis de intensidad colorimétrica (Test/Control) mediante el software ImageJ. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos. 0.12 (ns), 0.033 (*), 0.002 (**), < 0.001 (***).

La principal desventaja de este sistema es que la intensidad de la señal en la línea T es baja comparada con las pruebas de antígeno y el sistema VIGILANT™. Este mismo comportamiento se observó en sistemas similares y lo asociaron a la composición del buffer de PCR (Marsic T et al., 2021). Aunque esto se podría descartar, ya que aun en nuestros ensayos con producto de PCR purificado se observó una intensidad de señal baja, por ello, se asoció al patrón de etiquetado y a cuán expuesto al solvente se encuentran las moléculas de FAM para ser reconocidos por los anticuerpos antiFAM-AuNP. La proteína dCas12a en realidad presenta Cys poco expuestas (**Figura 27**), y para demostrarlo obtuvimos los valores de ASA (del inglés, accessible surface area) que indican qué tan expuesto se encuentra un aminoácido al solvente. La Cys presenta un valor máximo de ASA (MaxASA) de 148-167 (Tien MZ. Et al., 2013), por ello, para que una Cys se considere expuesta deber tener un valor cercano a MaxASA. Dentro de dCas12a solo la Cys 334 presenta un valor de 62.09 que indica cierta exposición al solvente, mientras que las Cys restantes presentan valores que indican poca o nula exposición (**Tabla 5**). Esto explicaría la dificultad de los anticuerpos antiFAM-AuNP para reconocer los FAMs unidos a las Cys (suponiendo que estén etiquetadas), de ahí que la intensidad de la señal en la línea T se encuentre limitada.

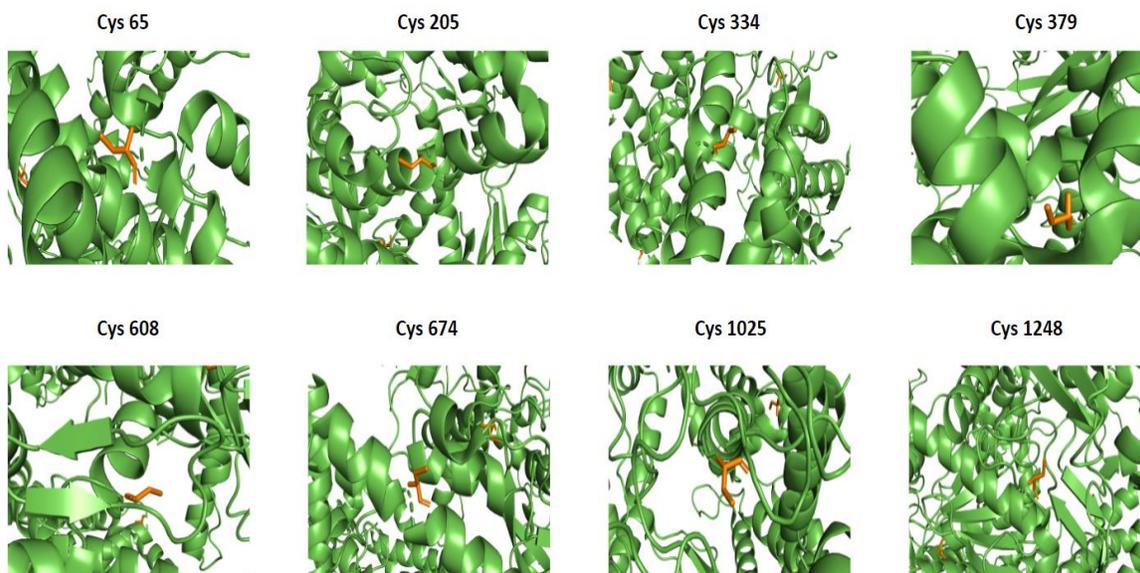


Figura 27. Cisteínas presentes en la proteína dCas12a (PDB 5B43). En naranja se observan las Cys y en verde los demás residuos de la proteína. Los residuos de Cys están rodeados o forman parte de estructuras secundarias tipo alfa-hélice.

Tabla 5. Valores de ASA de las Cisteínas presentes en dCas12a

Cys65	0
Cys205	13.05
Cys334	62.09
Cys379	38.42
Cys608	2.14
Cys674	34.56
Cys1025	1.07
Cys1248	9.36

Para mejorar este sistema sugerimos etiquetar a la proteína con FAM unida a maleimida mediante un linker largo, por ejemplo, de polietilenglicol (PEG), que están disponibles comercialmente. La molécula de PEG es un poliéter de cadena larga que daría una mayor libertad a FAM, por lo que se encontrará expuesto para ser reconocido por los anticuerpos antiFAM-AuNP. Fuera de este inconveniente, se demostró la prueba de concepto de que se puede desarrollar un sistema de flujo lateral acoplado a PCR punto final para detectar ácidos nucleicos de manera sencilla y además lo podemos programar para reconocer cualquier secuencia de DNA.

Conclusiones

- Las proteínas dCas9 y dCas12a se obtuvieron con un alto grado de pureza mediante la estrategia de Níquel-Heparina-SEC, demostrando que dicha estrategia reportada por Gao Y, Mohanraju P y colaboradores es más eficiente.
- Se logró exitosamente el proceso de etiquetado de las proteínas dCas9 y dCas12a sin afectar las propiedades de los fluoróforos.
- Se logró amplificar una región del gen N de SARS-CoV-2 de manera específica a partir de una concentración de 400 aM de DNA plasmídico y con un tiempo óptimo de aproximadamente 30 minutos.
- Los crRNAs para el enfoque de fluorescencia que se diseñaron manualmente y analizaron *in silico* demostraron un reconocimiento altamente específico sobre una secuencia correspondiente al gen N.
- Se demostró que se puede detectar una región del gen N mediante el fenómeno de FRET haciendo uso de CRISPR-dCas9 acoplado a PCR punto final en un tiempo aproximado de 70 minutos, pero es necesario caracterizar especificidad y sensibilidad del sistema.
- Se validó la prueba de concepto para detectar específicamente una región del gen N mediante un sistema de flujo lateral haciendo uso de CRISPR-dCas12a acoplado a PCR punto final en un tiempo aproximado de 75 minutos.

Perspectivas

- Se plantea etiquetar a las proteínas con fluoróforos que presenten un linker flexible para determinar la eficiencia de FRET de manera confiable o facilitar el reconocimiento por parte de los anticuerpos antiFAM-AuNP en el sistema de flujo lateral.
- Realizar más experimentos para determinar la especificidad y sensibilidad en un amplio número de muestras distintas, incluidas clínicas.
- Diseñar crRNAs que permitan detectar las variantes predominantes de SARS-CoV-2 como Ómicron y sus subvariantes.

Referencias

- Abelson J. (1980). A revolution in biology. *Science (New York, N.Y.)*, 209(4463), 1319–1321. <https://doi.org/10.1126/science.6251541>
- Afzal A. (2020). Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *Journal of advanced research*, 26, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.08.002>.
- Arroyo, L. (2022). *Biosíntesis y purificación de proteínas CRISPR-dCas y su posicionamiento sobre templados de ADN con control nanométrico*. [Tesis licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM. <http://132.248.9.195/ptd2022/abril/0824802/Index.html>.
- Basing, L., Simpson, S. V., Adu-Sarkodie, Y., & Linnes, J. C. (2020). A Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Detection of *Treponema pallidum* subsp. *pertenue*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 103(1), 253–259. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0243>
- Berezin, M. Y., & Achilefu, S. (2010). Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chemical reviews*, 110(5), 2641–2684. <https://doi.org/10.1021/cr900343z>
- Berney, C., & Danuser, G. (2003). FRET or no FRET: a quantitative comparison. *Biophysical journal*, 84(6), 3992–4010. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75126-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75126-1)
- Bisoffi, Z., Pomari, E., Deiana, M., Piubelli, C., Ronzoni, N., Beltrame, A., Bertoli, G., Riccardi, N., Perandin, F., Formenti, F., Gobbi, F., Buonfrate, D., & Silva, R. (2020). Sensitivity, Specificity and Predictive Values of Molecular and Serological Tests for COVID-19: A Longitudinal Study in Emergency Room. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 10(9), 669. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10090669>
- Bourassa, L., Perchetti, G. A., Phung, Q., Lin, M. J., Mills, M. G., Roychoudhury, P., Harmon, K. G., Reed, J. C., & Greninger, A. L. (2021). A SARS-CoV-2 Nucleocapsid Variant that Affects Antigen Test Performance. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 141, 104900. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.104900>
- Brant, A. C., Tian, W., Majerciak, V., Yang, W., & Zheng, Z. M. (2021). SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell & bioscience*, 11(1), 136. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00643-z>
- Broughton, J. P., Deng, X., Yu, G., Fasching, C. L., Servellita, V., Singh, J., Miao, X., Streithorst, J. A., Granados, A., Sotomayor-Gonzalez, A., Zorn, K., Gopez, A., Hsu, E., Gu, W., Miller, S., Pan, C. Y., Guevara, H., Wadford, D. A., Chen, J. S., & Chiu, C. Y. (2020). CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature biotechnology*, 38(7), 870–874. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>
- Brown T. (2001). Southern blotting. *Current protocols in immunology*, Chapter 10. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1006as06>
- Cedro-Tanda, A., Gómez-Romero, L., de Anda-Jauregui, G., Garnica-López, D., Alfaro-Mora, Y., Sánchez-Xochipa, S., García-García, E. F., Mendoza-Vargas, A., Frías-Jiménez, E. J., Moreno, B., Campos-Romero, A., Moreno-Camacho, J. L., Alcantar-Fernández, J., Ortiz-Ramírez, J., Benitez-González, M., Trejo-González, R., Aguirre-Chavarría, D., Núñez-Martínez, M. E., Uribe-Figueroa, L., Angulo, O., ... Herrera, L. A. (2022). Early Genomic, Epidemiological, and Clinical Description of the SARS-CoV-2 Omicron Variant in Mexico City. *Viruses*, 14(3), 545. <https://doi.org/10.3390/v14030545>
- Centers for Disease Control (CDC) (1989). Interpretation and use of the western blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infections. *MMWR supplements*, 38(7), 1–7.

Chaimayo, C., Kaewnaphan, B., Tanlieng, N., Athipanyasilp, N., Sirijatuphat, R., Chayakulkeeree, M., Angkasekwinai, N., Sutthent, R., Puangpunngam, N., Tharmviboonsri, T., Pongraweevan, O., Chuthapisith, S., Sirivatanauksorn, Y., Kantakamalakul, W., & Horthongkham, N. (2020). Rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay in comparison with real-time RT-PCR assay for laboratory diagnosis of COVID-19 in Thailand. *Virology journal*, *17*(1), 177. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01452-5>

Chung, Y. S., Lee, N. J., Woo, S. H., Kim, J. M., Kim, H. M., Jo, H. J., Park, Y. E., & Han, M. G. (2021). Validation of real-time RT-PCR for detection of SARS-CoV-2 in the early stages of the COVID-19 outbreak in the Republic of Korea. *Scientific reports*, *11*(1), 14817. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94196-3>

Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G., Haagmans, B. L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J. L., Ellis, J., Zambon, M., Peiris, M., ... Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, *25*(3), 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

CRISPR-Cas9 AAV and Adenovirus. (2022). Recuperado 4 de octubre de 2022, de Vector Biolabs website: <https://www.vectorbiolabs.com/cas9-aav-adenovirus/>

Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H. W., Listgarten, J., & Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature biotechnology*, *34*(2), 184–191. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>

Edman, P., & Begg, G. (1967). A protein sequenator. *European journal of biochemistry*, *1*(1), 80–91. https://doi.org/10.1007/978-3-662-25813-2_14
Frew, E., Roberts, D., Barry, S., Holden, M., Restell Mand, A., Mitsock, E., Tan, E., Yu, W., & Skog, J. (2021). A SARS-CoV-2 antigen rapid diagnostic test for resource limited settings. *Scientific reports*, *11*(1), 23009. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02128-y>

Gao, Y., Cao, D., Pawnikar, S., Akhter, S., Miao, Y., & Liang, B. (2021). Efficient purification and assembly of ribonucleoprotein complex for interaction analysis by MST assay coupled with GaMD simulations. *STAR protocols*, *2*(1), 100315. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100315>

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. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science (New York, N.Y.)*, *356*(6336), 438–442. <https://doi.org/10.1126/science.aam9321>

Greenhalgh, T., Jimenez, J. L., Prather, K. A., Tufeki, Z., Fisman, D., & Schooley, R. (2022). Transmission of SARS-CoV-2: still up in the air - Authors' reply. *Lancet (London, England)*, *399*(10324), 519–520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02795-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02795-1)

Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., & Tripathy, B. C. (2016). Molecular Diagnostics. *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*, 191–205. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0875-7_9

Habibzadeh, P., & Stoneman, E. K. (2020). The Novel Coronavirus: A Bird's Eye View. *The international journal of occupational and environmental medicine*, *11*(2), 65–71. <https://doi.org/10.15171/ijoem.2020.1921>.

Habibzadeh, P., Mofatteh, M., Silawi, M., Ghavami, S., & Faghihi, M. A. (2021). Molecular diagnostic assays for COVID-19: an overview. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, *58*(6), 385–398.

<https://doi.org/10.1080/10408363.2021.1884640>

Habibzadeh, P., Sajadi, M. M., Emami, A., Karimi, M. H., Yadollahie, M., Kucheki, M., Akbarpoor, S., & Habibzadeh, F. (2020). Rate of re-positive RT-PCR test among patients recovered from COVID-19. *Biochemia medica*, *30*(3), 030401. <https://doi.org/10.11613/BM.2020.030401>

Hernandez-Garcia, A., Morales-Moreno, M. D., Valdés-Galindo, E. G., Jimenez-Nieto, E. P., & Quezada, A. (2022). Diagnostics of COVID-19 Based on CRISPR-Cas Coupled to Isothermal Amplification: A Comparative Analysis and Update. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, *12*(6), 1434. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061434>

Huang M, Zhou X, Wang H, Xing D. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 Triggered Isothermal Amplification for Site-Specific Nucleic Acid Detection. *Anal Chem*. 2018 Feb 6;90(3):2193-2200. doi: 10.1021/acs.analchem.7b04542. Epub 2018 Jan 5. PMID: 29260561.

Iqbal, B. N., Arunasalam, S., Divarathna, M., Jabeer, A., Sirisena, P., Senaratne, T., Muthugala, R., & Noordeen, F. (2022). Diagnostic utility and validation of a newly developed real time loop mediated isothermal amplification method for the detection of SARS CoV-2 infection. *Journal of clinical virology plus*, *2*(3), 100081. <https://doi.org/10.1016/j.jcvp.2022.100081>

Jia, F., Li, X., Zhang, C., & Tang, X. (2020). The expanded development and application of CRISPR system for sensitive nucleotide detection. *Protein & cell*, *11*(9), 624–629. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00708-8>

John, G., Sahajpal, N. S., Mondal, A. K., Ananth, S., Williams, C., Chaubey, A., Rojiani, A. M., & Kolhe, R. (2021). Next-Generation Sequencing (NGS) in COVID-19: A Tool for SARS-CoV-2 Diagnosis, Monitoring New Strains and Phylodynamic Modeling in Molecular Epidemiology. *Current issues in molecular biology*, *43*(2), 845–867. <https://doi.org/10.3390/cimb43020061>

Josephs, E. A., Kocak, D. D., Fitzgibbon, C. J., McMenemy, J., Gersbach, C. A., & Marszalek, P. E. (2015). Structure and specificity of the RNA-guided endonuclease Cas9 during DNA interrogation, target binding and cleavage. *Nucleic acids research*, *43*(18), 8924–8941. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv892>

Joung, J., Ladha, A., Saito, M., Segel, M., Bruneau, R., Huang, M. W., Kim, N. G., Yu, X., Li, J., Walker, B. D., Greninger, A. L., Jerome, K. R., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., & Zhang, F. (2020). Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics. *medRxiv : the preprint server for health sciences*, 2020.05.04.20091231. <https://doi.org/10.1101/2020.05.04.20091231>

Kan, Y. W., Golbus, M. S., & Dozy, A. M. (1976). Prenatal diagnosis of alpha-thalassemia. Clinical application of molecular hybridization. *The New England journal of medicine*, *295*(21), 1165–1167. <https://doi.org/10.1056/NEJM197611182952104>

Kim, D., Lee, J. Y., Yang, J. S., Kim, J. W., Kim, V. N., & Chang, H. (2020). The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*, *181*(4), 914–921.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>

Kostyusheva, A., Brezgin, S., Babin, Y., Vasilyeva, I., Glebe, D., Kostyushev, D., & Chulanov, V. (2022). CRISPR-Cas systems for diagnosing infectious diseases. *Methods (San Diego, Calif.)*, *203*, 431–446. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.04.007>

Lafontaine, D. A., Mercure, S., & Perreault, J. P. (1998). Identification of a Crohn's disease specific transcript with potential as a diagnostic marker. *Gut*, *42*(6), 878–882. <https://doi.org/10.1136/gut.42.6.878>

Larremore, D. B., Wilder, B., Lester, E., Shehata, S., Burke, J. M., Hay, J. A., Tambe, M., Mina, M. J., & Parker, R. (2021). Test sensitivity is secondary to frequency and turnaround time for COVID-19 screening. *Science advances*, 7(1), eabd5393. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd5393>

Li, S. Y., Cheng, Q. X., Liu, J. K., Nie, X. Q., Zhao, G. P., & Wang, J. (2018). CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA. *Cell research*, 28(4), 491–493. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0022-x>

Lim, B., Ratcliff, J., Nawrot, D. A., Yu, Y., Sanghani, H. R., Hsu, C. C., Peto, L., Evans, S., Hodgson, S. H., Skeva, A., Adam, M., Panopoulou, M., Zois, C. E., Poncin, K., Vasudevan, S. R., Dai, S., Ren, S., Chang, H., Cui, Z., Simmonds, P., ... Andersson, M. I. (2021). Clinical validation of optimised RT-LAMP for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Scientific reports*, 11(1), 16193. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95607-1>

Lim, S., Kim, J., Kim, Y., Xu, D., & Clark, D. S. (2020). CRISPR/Cas-directed programmable assembly of multi-enzyme complexes. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 56(36), 4950–4953. <https://doi.org/10.1039/d0cc01174f>

Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal*, 46(3), 258–268. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>

Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>

Marshall, J., & Johnsen, S. (2017). Fluorescence as a means of colour signal enhancement. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 372(1724), 20160335. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0335>

Marsic, T., Ali, Z., Tehseen, M., Mahas, A., Hamdan, S., & Mahfouz, M. (2021). Vigilant: An Engineered VirD2-Cas9 Complex for Lateral Flow Assay-Based Detection of SARS-CoV2. *Nano letters*, 21(8), 3596–3603. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.1c00612>

Mautner, L., Baillie, C. K., Herold, H. M., Volkwein, W., Guertler, P., Eberle, U., Ackermann, N., Sing, A., Pavlovic, M., Goerlich, O., Busch, U., Wassill, L., Huber, I., & Baiker, A. (2020). Rapid point-of-care detection of SARS-CoV-2 using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Virology journal*, 17(1), 160. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01435-6>

Medical Devices. (accessed on 08 September 2022). Tests Expected to Fail to Detect the SARS-CoV-2 Omicron Variant and Sub-Variants. U.S. Food and Drug Administration. Recuperado de <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/sars-cov-2-viral-mutations-impact-covid-19-tests>

Mohanraju, P., Van Der Oost, J., Jinek, M., & Swarts, D. C. (2018). Heterologous Expression and Purification of CRISPR-Cas12a/Cpf1. *Bio-protocol*, 8(9), e2842. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2842>

Mouliou, D. S., & Gourgoulianis, K. I. (2021). False-positive and false-negative COVID-19 cases: respiratory prevention and management strategies, vaccination, and further perspectives. *Expert review of respiratory medicine*, 15(8), 993–1002. <https://doi.org/10.1080/17476348.2021.1917389>

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1, 263–273. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>

National Laboratory of Enteric Pathogens, Bureau of Microbiology, Laboratory Centre for Disease Control (1991). The polymerase chain reaction: An overview and development of diagnostic PCR protocols at the LCDC. *The Canadian journal of infectious diseases = Journal canadien des maladies infectieuses*, 2(2), 89–91. <https://doi.org/10.1155/1991/580478>

Nguyen, H. L., Lan, P. D., Thai, N. Q., Nissley, D. A., O'Brien, E. P., & Li, M. S. (2020). Does SARS-CoV-2 Bind to Human ACE2 More Strongly Than Does SARS-CoV2. *The journal of physical chemistry. B*, 124(34), 7336–7347. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c04511>

Nooij, S., Schmitz, D., Vennema, H., Kroneman, A., & Koopmans, M. (2018). Overview of Virus Metagenomic Classification Methods and Their Biological Applications. *Frontiers in microbiology*, 9, 749. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00749>

Northrop, B. H., Frayne, S. H., & Choudhary, U. (2015). Thiol-maleimide “click” chemistry: evaluating the influence of solvent, initiator, and thiol on the reaction mechanism, kinetics, and selectivity. *Polymer Chemistry*, 18(6), 3415–3430. <https://doi.org/10.1039/C5PY00168D>

Pardee, K., Green, A. A., Takahashi, M. K., Braff, D., Lambert, G., Lee, J. W., Ferrante, T., Ma, D., Donghia, N., Fan, M., Daringer, N. M., Bosch, I., Dudley, D. M., O'Connor, D. H., Gehrke, L., & Collins, J. J. (2016). Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. *Cell*, 165(5), 1255–1266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.059>

Peeling, R. W., Olliaro, P. L., Boeras, D. I., & Fongwen, N. (2021). Scaling up COVID-19 rapid antigen tests: promises and challenges. *The Lancet. Infectious diseases*, 21(9), e290–e295. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00048-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00048-7)

Poste G. (2001). Molecular diagnostics: a powerful new component of the healthcare value chain. *Expert review of molecular diagnostics*, 1(1), 1–5. <https://doi.org/10.1586/14737159.1.1.1>

PubMed. (accessed on 21 Agosto 2022). National Library of Medicine. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Molecular%20Diagnostics&sort=date&ac=yes>

Qiu, X. Y., Zhu, L. Y., Zhu, C. S., Ma, J. X., Hou, T., Wu, X. M., Xie, S. S., Min, L., Tan, D. A., Zhang, D. Y., & Zhu, L. (2018). Highly Effective and Low-Cost MicroRNA Detection with CRISPR-Cas9. *ACS synthetic biology*, 7(3), 807–813. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00446>

Quanta Biodesign Limited. (accessed on 05 November 2022). Maleimide Reaction Chemistry. Recuperado de <https://www.quantabiodesign.com/maleimide-reaction-chemistry/>

Rabe, B. A., & Cepko, C. (2020). SARS-CoV-2 detection using isothermal amplification and a rapid, inexpensive protocol for sample inactivation and purification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(39), 24450–24458. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011221117>

Raper, A. T., Stephenson, A. A., & Suo, Z. (2018). Functional Insights Revealed by the Kinetic Mechanism of CRISPR/Cas9. *Journal of the American Chemical Society*, 140(8), 2971–2984. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b13047>

Sheridan C. (2020). Fast, portable tests come online to curb coronavirus pandemic. *Nature biotechnology*, 38(5), 515–518. <https://doi.org/10.1038/d41587-020-00010-2>

Shrestha, D., Jenei, A., Nagy, P., Vereb, G., & Szöllösi, J. (2015). Understanding FRET as a research tool for cellular studies. *International journal of molecular sciences*, 16(4), 6718–6756. <https://doi.org/10.3390/ijms16046718>

Smit, J. H., van der Velde, J. H. M., Huang, J., Trauschke, V., Henrikus, S. S., Chen, S., Eleftheriadis, N., Warszawik, E. M., Herrmann, A., & Cordes, T., (2019). On the impact of competing intra- and intermolecular triplet-state quenching on photobleaching and photoswitching kinetics of organic fluorophores. *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, 21(7), 3721–3733. <https://doi.org/10.1039/c8cp05063e>

Sorek, R., Lawrence, C. M., & Wiedenheft, B. (2013). CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annual review of biochemistry*, 82, 237–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072911-172315>

Southern E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*, 98(3), 503–517. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(75\)80083-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(75)80083-0)

Strasser B. J. (2002). Linus Pauling's "molecular diseases": between history and memory. *American journal of medical genetics*, 115(2), 83–93. <https://doi.org/10.1002/ajmg.10542>

Strohkendl, I., Saifuddin, F. A., Rybarski, J. R., Finkelstein, I. J., & Russell, R. (2018). Kinetic Basis for DNA Target Specificity of CRISPR-Cas12a. *Molecular cell*, 71(5), 816–824.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.043>

Tien, M. Z., Meyer, A. G., Sydykova, D. K., Spielman, S. J., & Wilke, C. O. (2013). Maximum allowed solvent accessibilities of residues in proteins. *PloS one*, 8(11), e80635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080635>

Thakur, S., Sasi, S., Pillai, S. G., Nag, A., Shukla, D., Singhal, R., Phalke, S., & Velu, G. (2022). SARS-CoV-2 Mutations and Their Impact on Diagnostics, Therapeutics and Vaccines. *Frontiers in medicine*, 9, 815389. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.815389>

Tom, M. R., & Mina, M. J. (2020). To Interpret the SARS-CoV-2 Test, Consider the Cycle Threshold Value. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(16), 2252–2254. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa619>

Van Oss, C. J., Good, R. J., & Chaudhury, M. K. (1987). Mechanism of DNA (Southern) and protein (Western) blotting on cellulose nitrate and other membranes. *Journal of chromatography*, 391(1), 53–65. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)94304-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)94304-3)

Vandamme A. M. (1994). Polymerase chain reaction (PCR) as a diagnostic tool in HIV infection. *Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België*, 56(3), 231–265.

Vijian, D., Wan Ab Rahman, W. S., Ponnuraj, K. T., Zulkafli, Z., & Mohd Noor, N. H. (2021). Molecular Detection of Alpha Thalassemia: A Review of Prevalent Techniques. *Medeniyet medical journal*, 36(3), 257–269. <https://doi.org/10.5222/MMJ.2021.14603>

Vindeirinho, J. M., Pinho, E., Azevedo, N. F., & Almeida, C. (2022). SARS-CoV-2 Diagnostics Based on Nucleic Acids Amplification: From Fundamental Concepts to Applications and Beyond. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 799678. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.799678>

Wang, Y., Wang, M., Zheng, T., Hou, Y., Zhang, P., Tang, T., Wei, J., & Du, Q. (2020). Specificity profiling of CRISPR system reveals greatly enhanced off-target gene editing. *Scientific reports*, 10(1), 2269. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58627-x>

Weitzel, T., Pérez, C., Tapia, D., Legarraga, P., & Porte, L. (2021). SARS-CoV-2 rapid antigen detection tests. *The Lancet. Infectious diseases*, 21(8), 1067–1068. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00249-8)

Westra, E. R., Semenova, E., Datsenko, K. A., Jackson, R. N., Wiedenheft, B., Severinov, K., & Brouns, S. J. (2013). Type I-E CRISPR-cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition. *PLoS genetics*, *9*(9), e1003742. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003742>

Yamano, T., Nishimasu, H., Zetsche, B., Hirano, H., Slaymaker, I. M., Li, Y., Fedorova, I., Nakane, T., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2016). Crystal Structure of Cpf1 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*, *165*(4), 949–962. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.003>

Yao, H., Song, Y., Chen, Y., Wu, N., Xu, J., Sun, C., Zhang, J., Weng, T., Zhang, Z., Wu, Z., Cheng, L., Shi, D., Lu, X., Lei, J., Crispin, M., Shi, Y., Li, L., & Li, S. (2020). Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. *Cell*, *183*(3), 730–738.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.018>

Zaim, S., Chong, J. H., Sankaranarayanan, V., & Harky, A. (2020). COVID-19 and Multiorgan Response. *Current problems in cardiology*, *45*(8), 100618. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2020.100618>

Zhang, Y., Qian, L., Wei, W., Wang, Y., Wang, B., Lin, P., Liu, W., Xu, L., Li, X., Liu, D., Cheng, S., Li, J., Ye, Y., Li, H., Zhang, X., Dong, Y., Zhao, X., Liu, C., Zhang, H. M., Ouyang, Q., ... Lou, C. (2017). Paired Design of dCas9 as a Systematic Platform for the Detection of Featured Nucleic Acid Sequences in Pathogenic Strains. *ACS synthetic biology*, *6*(2), 211–216. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00215>

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., Tan, W., & China Novel Coronavirus Investigating and Research Team (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England journal of medicine*, *382*(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.

Anexo

Mapas de los plásmidos de expresión de dCas9 y dCas12a

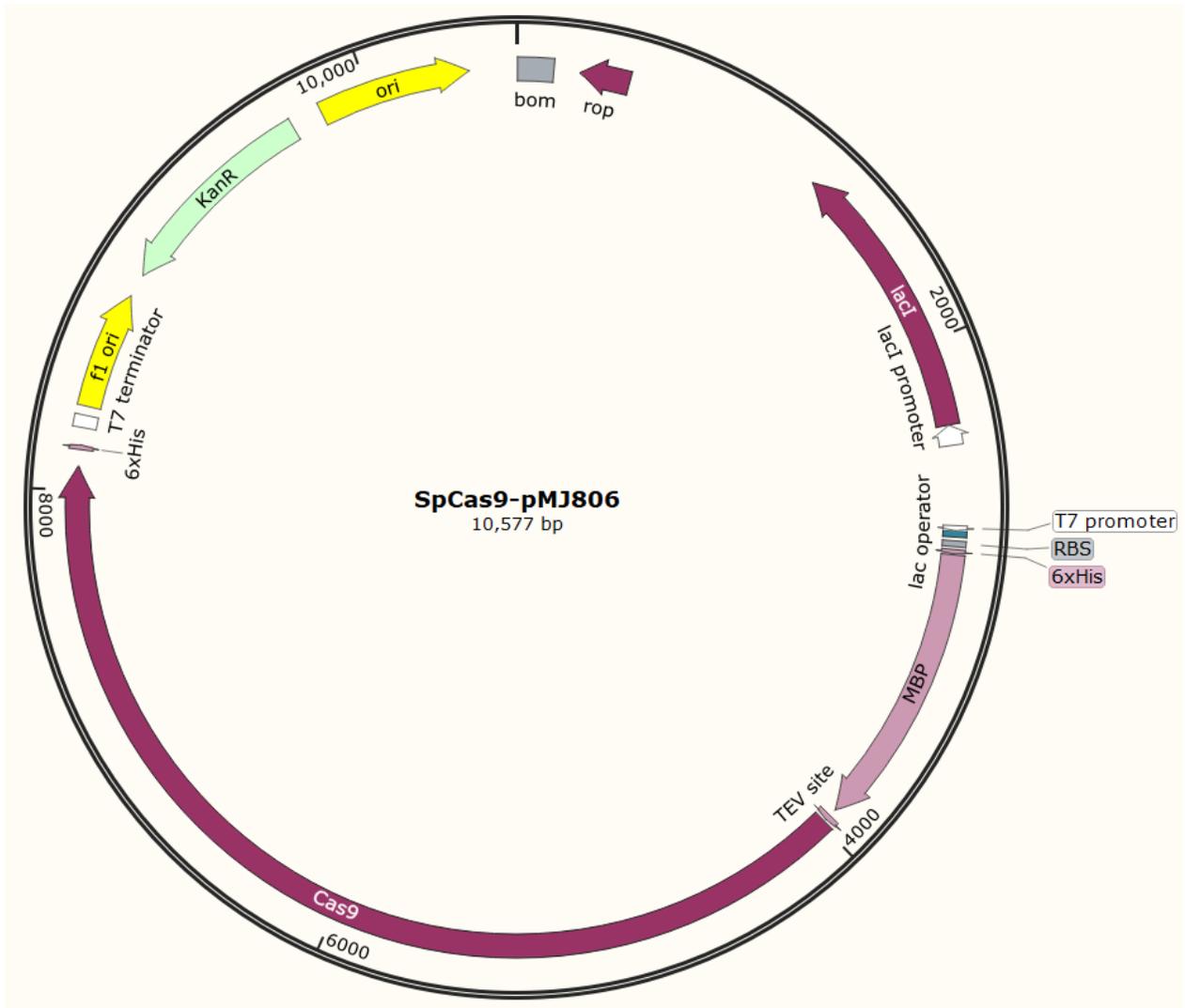


Figura 28. Plásmido de expresión de dCas9 (SpCas9-pMJ806). Se indican las secuencias más representativas del plásmido como el gen de resistencia a kanamicina (KanR), el origen de replicación (ori) y el promotor T7.

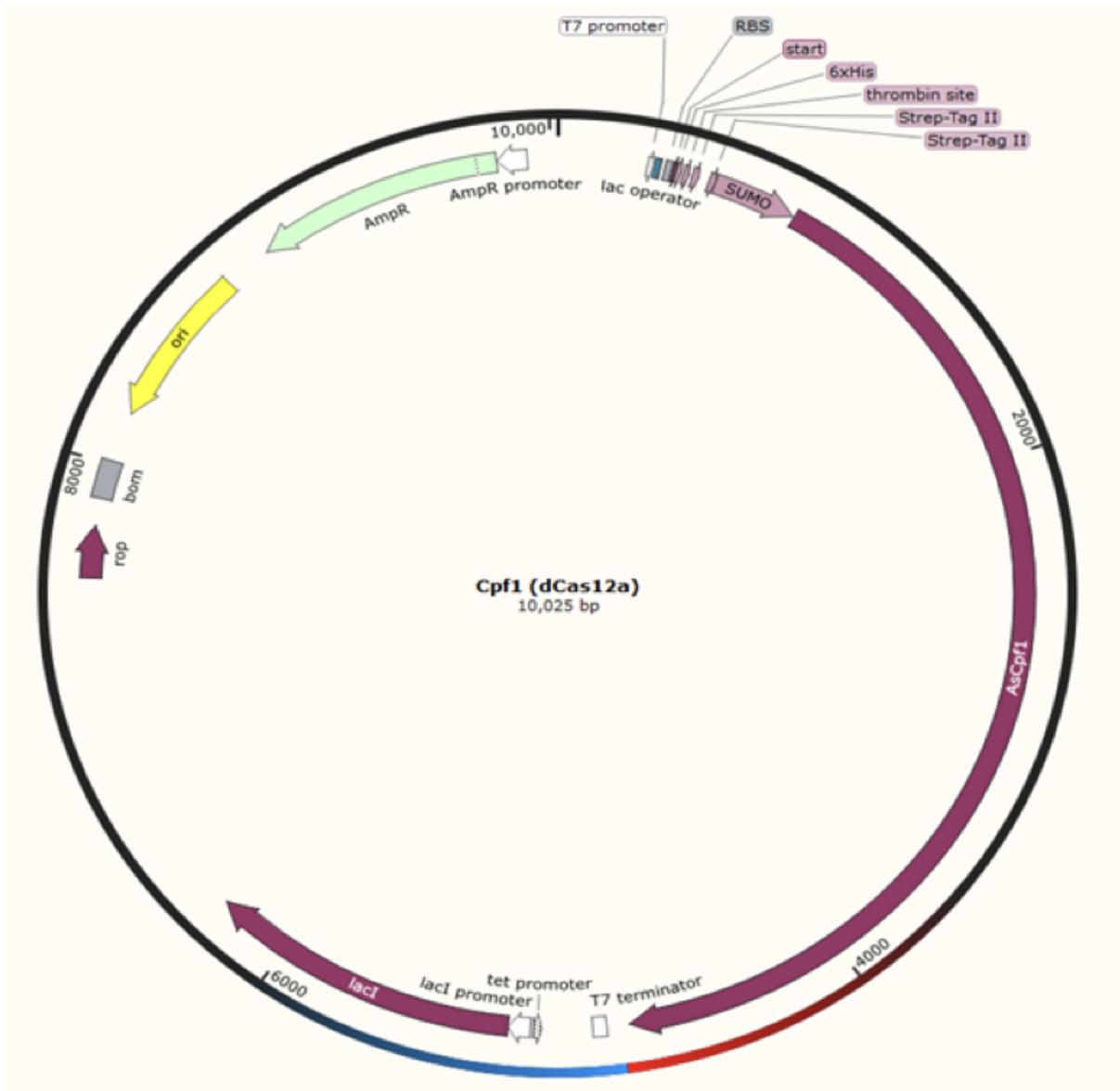


Figura 29. Plásmido de expresión de Cpf1 (dCas12a). Se indican las secuencias más representativas del plásmido como el gen de resistencia a ampicilina (AmpR), el origen de replicación (ori) y el promotor T7.

Secuencia de nucleótidos de la región del Gen N

5' GTGGGAATGTTTTGTATGCGTCAATATGCTTATTTCAGCAAAAATGACTTGATCTTTGAAATTTGGATC
TTTGTTCATCCAATTTGATGGCACCTGTGTAGGTCAA**CCA**CGTTCCCGAAGGTGTGACTTCCATGCCAAT
CGCGACATTCCGAAGAACGCTGAAGCGCTG**GGG****CAAA**TTGTGCAATTTGCGGCCAATGTTTGTAAATC
AGTTCCTTGTCTGATTAGTTCCTGGTCCCCAAAATTTCTTGGGTTTGTCTGGACCACGTCTGCCGAA
AGCTTGTGTTACATTGTATGCTTTAGTGGCAGTACGTTTTTGCCGAGGCTTCTTAGAAGCCTCAGCAGC
AGATTTCTTAGTG3'

Figura 30. Secuencia del gen N. Subrayado en azul se encuentra el sitio PAM para dCas9 mientras que subrayado en verde se encuentra el sitio PAM para dCas12a. Con flechas rojas inferiores se indica la región que es reconocida por los crRNAs de dCas9 y con flecha azul superior se indica la región que es reconocida por el crRNA de dCas12a.

Producción científica

Durante la maestría participé en la realización de tres artículos relacionados al sistema CRISPR-Cas.

- El primero (Hernandez-Garcia A et al., 2022) consiste en una revisión sistemática que analiza de manera crítica los métodos basados en CRISPR-Cas y amplificación isotérmica para detectar SARS-CoV-2.
- El segundo (Torres-García E et al., 2022) presenta un algoritmo que extiende la resolución hasta nanómetros (superresolución) mediante microscopia de fluorescencia convencional. Contribuí a la producción de los componentes (dCas12a, crRNAs, DNA objetivo) para una nanoregla de CRISPR/dCas12a que sirvió para validar el algoritmo. También obtuve las imágenes correspondientes a la microscopia de fuerza atómica (AFM) que muestran la distancia entre cada complejo dCas12a unido al DNA de manera específica.
- El tercero (Morales-Moreno Melissa D et al., 2023) demuestra que el efecto sinérgico de múltiples crRNAs acelera el proceso de detección de SARS-CoV-2 mediante CRISPR-Cas12a acoplado a LAMP. Contribuí a demostrar que la combinación de crRNAs escinde de manera más eficiente y rápida un DNA plasmídico que tiene el gen N de SARS-CoV-2.

Review

Diagnostics of COVID-19 Based on CRISPR–Cas Coupled to Isothermal Amplification: A Comparative Analysis and Update

Armando Hernandez-García * , Melissa D. Morales-Moreno, Erick G. Valdés-Galindo , Eric P. Jimenez-Nieto and Andrea Quezada 

Laboratory of Biomolecular Engineering and Bionanotechnology, Department of Chemistry of Biomacromolecules, Institute of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico; mel.morales0797@gmail.com (M.D.M.-M.); erickgvaldes@gmail.com (E.G.V.-G.); paveljn140@gmail.com (E.P.J.-N.); andreaqtz@gmail.com (A.Q.)

* Correspondence: armandohg@quimica.unam.mx; Tel.: +52-55-5622-4548

Abstract: The emergence of the COVID-19 pandemic prompted fast development of novel diagnostic methods of the etiologic virus SARS-CoV-2. Methods based on CRISPR–Cas systems have been particularly promising because they can achieve a similar sensitivity and specificity to the benchmark RT-qPCR, especially when coupled to an isothermal pre-amplification step. Furthermore, they have also solved inherent limitations of RT-qPCR that impede its decentralized use and deployment in the field, such as the need for expensive equipment, high cost per reaction, and delivery of results in hours, among others. In this review, we evaluate publicly available methods to detect SARS-CoV-2 that are based on CRISPR–Cas and isothermal amplification. We critically analyze the steps required to obtain a successful result from clinical samples and pinpoint key experimental conditions and parameters that could be optimized or modified to improve clinical and analytical outputs. The COVID outbreak has propelled intensive research in a short time, which is paving the way to develop effective and very promising CRISPR–Cas systems for the precise detection of SARS-CoV-2. This review could also serve as an introductory guide to new labs delving into this technology.

Keywords: CRISPR–Cas; SARS-CoV-2; molecular diagnostics; isothermal amplification; comparative analysis; nucleic acid detection



Citation: Hernandez-García, A.; Morales-Moreno, M.D.; Valdés-Galindo, E.G.; Jimenez-Nieto, E.P.; Quezada, A. Diagnostics of COVID-19 Based on CRISPR–Cas Coupled to Isothermal Amplification: A Comparative Analysis and Update. *Diagnostics* **2022**, *12*, 1434. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061434>

Academic Editor: Graham S. Jackson

Received: 24 February 2022

Accepted: 18 April 2022

Published: 10 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Coronaviruses have caused important outbreaks in recent years, for example, Severe Acute Respiratory Syndrome-related coronavirus (SARS-CoV) in 2002, Middle East Respiratory Syndrome-related coronavirus (MERS-CoV) in 2010, and, most recently, Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), the etiologic agent of the Corona Virus Disease 2019 (COVID-19). COVID-19 was first reported in December 2019 by the Chinese Center for Disease Control and Prevention attending Wuhan local health facilities [1]. By the time of writing this review, the World Health Organization has confirmed more than 508 million cases and 6.2 million deaths [2]. The betacoronavirus SARS-CoV-2 virions (60–140 nm in diameter) are composed of a single-stranded positive-sense RNA molecule packed in a coating protein and enveloped into lipids (Figure 1A) [3]. The virions characteristically display on their surface pendant “spike” proteins which play a key role in the binding and entry to the host human cells [4]. The ~29.9 kb SARS-CoV-2 genome encodes for 13–15 Open Reading Frames (ORFs) that express a total of 12 proteins, including the non-structural ORF1a and ORF1b and the structural envelope (E), membrane (M), nucleoprotein (N), and spike (S) proteins (Figure 1A) [5,6].

The fast propagation and global distribution of COVID-19 have spurred intensive research that aims to develop novel diagnostic methods that could assist in detecting new variants and stopping their propagation [7]. Diagnostic methods based on Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated proteins (CRISPR–Cas



Extending resolution within a single imaging frame

Received: 22 October 2021

Accepted: 27 October 2022

Published online: 02 December 2022

Check for updates

Esley Torres-García^{1,2}, Raúl Pinto-Cámara^{1,2}, Alejandro Linares^{2,3},
Damián Martínez², Víctor Abonza², Eduardo Brito-Alarcón²,
Carlos Calcines-Cruz⁴, Gustavo Valdés-Galindo⁵, David Torres²,
Martina Jabłoński⁶, Héctor H. Torres-Martínez⁷, José L. Martínez⁸,
Haydee O. Hernández⁹, José P. Ocelotl-Oviedo², Yasel Garcés^{2,8},
Marco Barchi¹⁰, Rocco D'Antuono¹¹, Ana Bošković¹², Joseph G. Dubrovsky⁷,
Alberto Darszon⁸, Mariano G. Buffone⁶, Roberto Rodríguez Morales¹³,
Juan Manuel Rendon-Mancha¹, Christopher D. Wood²,
Armando Hernández-García⁵, Diego Krapf¹⁴, Álvaro H. Crevenna¹² &
Adán Guerrero²

The resolution of fluorescence microscopy images is limited by the physical properties of light. In the last decade, numerous super-resolution microscopy (SRM) approaches have been proposed to deal with such hindrance. Here we present Mean-Shift Super Resolution (MSSR), a new SRM algorithm based on the Mean Shift theory, which extends spatial resolution of single fluorescence images beyond the diffraction limit of light. MSSR works on low and high fluorophore densities, is not limited by the architecture of the optical setup and is applicable to single images as well as temporal series. The theoretical limit of spatial resolution, based on optimized real-world imaging conditions and analysis of temporal image stacks, has been measured to be 40 nm. Furthermore, MSSR has denoising capabilities that outperform other SRM approaches. Along with its wide accessibility, MSSR is a powerful, flexible, and generic tool for multidimensional and live cell imaging applications.

Super-resolution Microscopy (SRM), which encompasses a collection of methods that circumvent Abbe's optical resolution limit, has dramatically increased our capability to visualize the architecture of cells and tissues at the molecular level. There are several approaches to SRM which vary in terms of the final attainable spatial and temporal resolution, photon efficiency, as well as in their capacity to image live or fixed samples at depth¹. Instrumentation-based techniques, such as SIM and STED, exceed the diffraction limit by engineering the illumination or the point spread function (PSF)^{2–7}. These techniques can be used for live imaging although they require specialized hardware and dedicated personnel for maintenance and operation. Single-molecule localization microscopy (SMLM) methods (e.g., STORM, PAINT, PALM)^{8–9} localize individual emitters with nanometer precision but require temporal analysis of several hundred-to-thousands of images

and are prone to error due to fast molecular dynamics within live specimens.

Some SRM computational methods have few or no demands on hardware or sample preparation and provide resolution improvements beyond the diffraction limit, i.e., fluorescence fluctuation based super-resolution microscopy (FF-SRM) approaches^{10–11}. Both, the quantity and performance of these methods have increased over the past decade given the advantages they present, such as their low barriers to entry and generic applicability to data acquired with a variety of microscopy modalities (widefield, confocal, or light-sheet). However, these methods also present some limitations, such as the possible introduction of artifacts¹², the requirement for high signal-to-noise ratio (SNR) data and the acquisition of tens to hundreds of frames^{11–12}, which limit their applicability to reconstruct fast dynamical processes.

A full list of affiliations appears at the end of the paper. e-mail: adan.guerrero@ibt.unam.mx



ORIGINAL ARTICLE

Multiplex gRNAs Synergically Enhance Detection of SARS-CoV-2 by CRISPR-Cas12a

Melissa D. Morales-Moreno,¹ Erick G. Valdes-Galindo,¹ Mariana M. Reza,² Tatiana Fiordeliso,³ Jorge Peon,³ and Armando Hernandez-Garcia^{1,4}

Abstract

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) diagnostic methods have a large potential to effectively detect SARS-CoV-2 with sensitivity and specificity nearing 100%, comparable to quantitative polymerase chain reaction. Yet, there is room for improvement. Commonly, one guide CRISPR RNA (gRNA) is used to detect the virus DNA and activate Cas collateral activity, which cleaves a reporter probe. In this study, we demonstrated that using 2–3 gRNAs in parallel can create a synergistic effect, resulting in a 4.5 × faster cleaving rate of the probe and increased sensitivity compared to using individual gRNAs. The synergy is due to the simultaneous activation of CRISPR-Cas12a and the improved performance of each gRNA. This approach was able to detect as few as 10 viral copies of the N-gene of SARS-CoV-2 RNA after a preamplification step using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. The method was able to accurately detect 100% of positive and negative clinical samples in ~25 min using a fluorescence plate reader and ~45 min with lateral flow strips.

Introduction

The Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-Cas systems have demonstrated a large potential for developing diagnostic methods for detecting pathogens (e.g., virus, bacteria, and parasites) and genetic biomarkers in plants, animals, and in human diseases.^{1,2} Some CRISPR-based methods have reported analytical and clinical sensitivity and turnaround times that rival or surpass polymerase chain reaction (PCR)-based methods.³ For example, some have reported the ability to detect <100 genomes per reaction in <1 h and a true positive sample detection rate over 90%. Furthermore, contrary to quantitative PCR (qPCR), CRISPR-based methods can be developed in portable formats. However, the challenge lies in optimizing CRISPR-based methods to meet the commercial needs and make them field deployable.

The appearance of SARS-CoV-2 has exhibited how CRISPR-Cas systems can be quickly adapted to develop novel and effective molecular diagnostic tests.^{3–9} The most common format of CRISPR-based diagnostic tests

relies on the collateral trans-activity of Cas12^{10,11} or Cas13.^{12,13} The collateral activity of Cas12a degrades short single-stranded DNA (ssDNA) oligonucleotides (Fig. 1A) upon activation by binding to the target DNA. Activation occurs once the ribonucleoprotein complex (RNP), formed between a guide CRISPR RNA (gRNA) and the Cas12a protein,¹⁴ binds and cuts the target DNA sequence. The ssDNA is conjugated with a fluorophore/quencher or an antigen/biotin pair to function as a probe for fluorescence or colorimetric readout, respectively (Fig. 1B). The latter uses paper-based lateral flow dipsticks, which are suitable for decentralized point-of-care diagnostics (POC).

Coupling CRISPR-based diagnostic methods to a previous step of isothermal DNA amplification, such as reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) or reverse transcription recombinase polymerase amplification, makes them a viable alternative to quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR)^{3,15,16} (Fig. 1C). For example, methods such as DETECTR¹¹ and SHERLOCK¹² are capable of detecting