



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**OPTIMIZACIÓN DE LA DETECCIÓN GENÉTICA DE
SARS-CoV-2 CON EL SISTEMA CRISPR-Cas12a**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

JESSICA ZACARIAS FLORES

Asesor: Armando Hernández García



CDMX

2024



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: MARTINEZ BARAJAS J. ELEAZAR**

VOCAL: **Profesor: PEDRAZA CHAVERRI JOSE**

SECRETARIO: **Profesor: HERNÁNDEZ GARCÍA ARMANDO**

1er. SUPLENTE: **Profesor: DIMITROVA DINKOVA TZVETANKA**

2° SUPLENTE: **Profesor: RAMIREZ LOPEZ ELENA GUADALUPE**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA:

DR. ARMADO HERNÁNDEZ GARCÍA



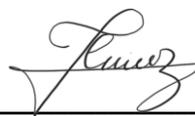
SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):

Q.F.B MELISSA DANIELA MORALES MORENO



SUSTENTANTE (S):

JESSICA ZACARIAS FLORES



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Titulación o Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado Optimización de la detección genética de SARS-CoV-2 con el sistema CRISPR-Cas12a que presenté para obtener el título/grado de Química Farmacéutica Biológica, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi Entidad Académica, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

Atentamente



(Jessica Zacarias Flores, 315142437)

ÍNDICE

1	RESUMEN.....	5
2	INTRODUCCIÓN.....	6
3	ANTECEDENTES.....	8
	3.1 El virus del SARS-CoV-2	8
	3.2 El sistema CRISPR-Cas como método de detección del SARS-CoV-2.....	9
	3.3 Sistema CRISPR-Cas12a.....	11
	3.3.1 Temperatura de detección	15
	3.3.2 Relación AsCas12a: gRNA.....	16
	3.3.3 Amortiguador de reacción.....	17
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
5	HIPÓTESIS	19
6	OBJETIVO GENERAL	19
	6.1 Objetivos particulares	19
7	METODOLOGÍA.....	20
	7.1 Materiales.....	20
	7.1.1 Proteína AsCas12a.....	20
	7.1.2 Producción y purificación del DNA plasmídico del gen N del SARS-CoV-2.....	20
	7.1.3 Obtención del gRNAs y sonda reportera.....	21
	7.2 Reacción de detección	21
	7.3 Optimización de la temperatura de detección	22
	7.4 Relación Cas12a:gRNA.....	22
	7.5 Amortiguador de reacción.....	23
	7.5.1 Aditivos.....	24
	7.6 Límite de detección (LoD).....	24
	7.7 Análisis estadístico	25
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
	8.1 Optimización de la temperatura de detección	26
	8.2 Optimización de la relación estequiométrica de gRNA:Cas12a.....	28

8.3 Optimización del amortiguador de reacción de detección.	29
8.4 Límite de detección (LoD).....	39
9 CONCLUSIÓN.....	42
10 BIBLIOGRAFÍA.....	43
11 ANEXO	48
12 LISTA DE ABREVIATURAS	51

1 RESUMEN

La pandemia por la enfermedad del coronavirus (COVID-19) ha impulsado el desarrollo de nuevos métodos de detección para el beta coronavirus tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) entre ellos destaca el sistema CRISPR-Cas, que gracias a su actividad de endonucleasa se puede detectar ácidos nucleicos. Particularmente, el sistema CRISPR-Cas12a, debido a su actividad colateral *trans*, que consta en cortar DNA monocatenario de manera indiscriminada una vez que reconoce y corta el DNA objetivo. Esta actividad puede ser aprovechada para detectar el DNA objetivo mediante fluorescencia, empleando DNA monocatenario unido a un fluoróforo y *quencher*. Esta característica lo convierte en una herramienta prometedora para el diagnóstico del SARS-CoV-2, ya que, debido también a su alta sensibilidad, especificidad y rapidez podría incluso competir con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa reversa (RT-qPCR) para la detección temprana del virus. No obstante, para mejorar su sensibilidad y velocidad, se requiere optimizar este sistema.

En este proyecto, se optimizaron parámetros como la temperatura, relación estequiométrica gRNA: Cas12a, además de probar diferentes tipos de amortiguadores y aditivos, estableciendo así las condiciones optimizadas. Dichas condiciones incluyeron una temperatura de detección de 65°C, en amortiguador 2 de acetatos con polietilenglicol 8000 (PEG 8000), manteniendo la relación 1:1 del gRNA:Cas12a. Esto permitió mejorar la señal de detección y sensibilidad del sistema CRISPR-Cas12a para el gen N del SARS-CoV-2, aumentando la velocidad de reacción de detección (fluorescencia/min) hasta diez veces más en comparación con las condiciones originales, logrando así mejorar la eficiencia del sistema.

2 INTRODUCCIÓN

En diciembre del 2019 un brote de beta coronavirus tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) el agente causal de la enfermedad del coronavirus (COVID-19) que fue descrito por primera vez en Wuhan China¹, el cual desató una pandemia a nivel mundial dejando cerca de 7 millones de muertes junto con más de 767 millones de casos confirmados reportados hasta la fecha del 7 de junio del 2023 de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS).²

El 5 de mayo del 2023 la OMS declaró que la COVID-19 dejó de ser considerado “una emergencia de salud pública de preocupación internacional”, esto debido al incremento de la inmunización en la población por las vacunas y a una disminución de la tasa de mortalidad.³ Sin embargo la OMS recomienda no disminuir las medidas de contención, entre ellos los métodos de diagnóstico, los cuales siguen siendo necesarios para la detección temprana, junto con un tratamiento oportuno, así como un control de la propagación de la enfermedad.^{4,5}

Hasta ahora, la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa reversa (RT-qPCR, del inglés *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), es el método estándar recomendado por el centro para el control y prevención de enfermedades (CDC, del inglés *Center for Disease Control and Prevention*) para detectar el virus del SARS-CoV-2 causante de la COVID-19, sin embargo, requiere un equipo costoso, personal altamente capacitado, procesos de detección de varias horas (aprox 2.5 h), entre otros, por lo que se han empezado a desarrollar otros métodos, como el sistema de proteínas asociadas a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente Inter espaciadas (CRISPR-Cas), del inglés *Clustered Regularly Interspaced*

Short Palindromic Repeats-CRISPR-associated proteins, para la detección de COVID-19.^{6,7} Los sistemas CRISPR-Cas, por su función de endonucleasa inespecífica activada por reconocimiento de secuencias específicas, son actualmente utilizados para la detección de ácidos nucleicos, entre ellos para la detección de SARS-CoV-2.⁵

Actualmente el sistema CRISPR asociado a proteína Cas12a (CRISPR-Cas12a) está bien establecido como método de detección⁸, sin embargo, aún es necesario optimizar los parámetros del sistema CRISPR-Cas, tales como concentración de reactivos, amortiguador y temperatura de reacción para mejorar su sensibilidad y velocidad.^{9,10}

Es por ello que el proyecto tiene como objetivo optimizar parámetros tales como temperatura de reacción de detección, tipo de amortiguador de reacción, y la relación estequiométrica entre la proteína asociada a CRISPR (Cas) y el RNA guía (gRNA) también llamado RNA CRISPR (crRNA), con el fin de mejorar la sensibilidad, así como la señal, el tiempo y la velocidad de detección del sistema CRISPR-Cas12a, en particular para el gen que codifica a la nucleocápside (gen N) del virus SARS-CoV-2.⁸

3 ANTECEDENTES

3.1 El virus del SARS-CoV-2

El virus causante de la COVID-19, el SARS-CoV-2 pertenece a la subfamilia de *Coronaviridae* y su genoma consta de una cadena positiva de RNA (+ssRNA) de 29.9 kb, que comprenden de 14 marcos abiertos de lectura (ORFs) que codifican, entre otras, a 16 proteínas no estructurales (ns) encargadas de la formación de la replicasa, y a cuatro proteínas estructurales que son responsables del ensamblaje del virión y también participan en la supresión del sistema inmune del huésped,^{11,12} por ejemplo nucleocápside (N), espiga (S), membrana (M) y la de envoltura (E) (Figura 1).

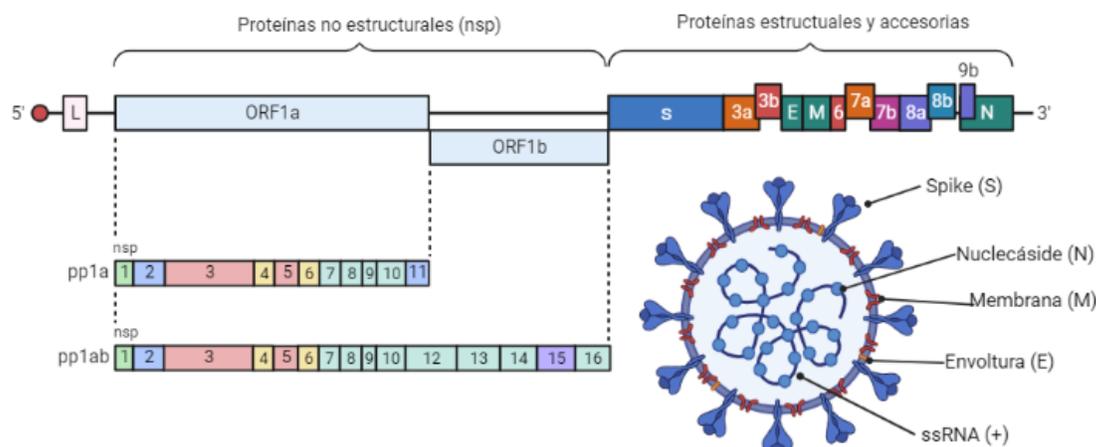


Figura 1. Estructura y genoma del SARS-CoV-2. El genoma del virus (ssRNA+) codifica a proteínas no estructurales (pp1a y pp1ab) y estructurales (S,N,M, y E) y accesorias. Obtenido y modificado en Biorender 2023.

Entre los coronavirus, el gen N se conserva altamente y es una de las proteínas estructurales más abundantes en las células infectadas por el virus,¹³ además de ser el gen recomendado por la CDC para la detección del SARS-CoV-2.¹⁴ La principal función de la proteína N es empaquetar el RNA del genoma viral y participar en el ensamblaje del

virión a través de sus interacciones con el genoma y la proteína de membrana. Adicionalmente está demostrado que la proteína N está involucrada en la inhibición del interferón, la interferencia del RNA y la apoptosis del huésped y desempeña un papel regulador en los ciclos de vida virales. Además de ser también un antígeno inmunodominante en las respuestas inmunes del huésped que puede usarse como antígeno e inmunógeno de diagnóstico.¹³

3.2 El sistema CRISPR-Cas como método de detección del SARS-CoV-2

Los sistemas CRISPR-Cas son mecanismos de defensa presentes en bacterias y arqueas que evitan la invasión de ácidos nucleicos extraños (p. ej. fagos) y funcionan reconociendo y cortando estos ácidos nucleicos a través de una ribonucleoproteína (RNP), compuesto por una proteína Cas con actividad de endonucleasa guiada por un gRNA (crRNA o gRNA) hoy en día son una herramienta bien establecida para la edición genética, sin embargo también se han empleado para la detección de ácidos nucleicos.⁵ Particularmente los sistemas CRISPR-Cas de clase 2, como CRISPR-Cas9, Cas12, Cas13 y Cas14 son los más utilizados en el diagnóstico ya que solo necesitan de una única proteína Cas para el reconocimiento y la escisión de la secuencia objetivo, especialmente Cas12, Cas13 y Cas 14 se utilizan para este fin, ya que a diferencia de Cas9, además de cortar la secuencia objetivo de manera específica (corte *cis*), también cortan DNA de cadena sencilla (ssDNA) próximo (Cas12a y Cas14) o RNA de cadena sencilla ssRNA (Cas13) a través de una actividad de corte *trans*.⁵

Actualmente, la RT-qPCR secuenciación, y las pruebas serológicas, son las que se emplean para la detección del SARS-CoV-2,⁵ sin embargo presentan algunas limitaciones como la baja especificidad y sensibilidad para las pruebas serológicas,^{15,16}

así como el requerimiento de equipos costosos, personal capacitado y prolongado tiempo de respuesta, el cual puede extenderse a más de 24 h (debido a la recolección, transporte, procesamiento y análisis de la muestra) para la RT-qPCR.¹⁵ Es aquí donde entran los sistemas CRISPR, ya que abren una gran variedad de oportunidades para el desarrollo de métodos de diagnóstico rápidos, baratos, accesibles confiables y específicos.^{15,17}

La pandemia de la COVID-19 impulsó la investigación para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico basadas en CRISPR-Cas para detectar el SARS-CoV-2, los cuales junto al trabajo sinérgico de un método de amplificación del RNA isotérmica, como RT-LAMP (*Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification*) puede competir con el estándar de oro RT-qPCR en cuanto a sensibilidad y especificidad.⁷

Hasta la fecha, se han desarrollado varios métodos de detección para el SARS-CoV-2 basados en CRISPR-Cas, entre las que se encuentran SHERLOCK (*Specific High-Sensitive Enzymatic Reporter Unlocking*), DETECTR (*DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter*) y VaNGuard (*Variant Nucleotide Guard*).⁵ En donde, el primero emplea la proteína Cas13 que usa RNA como blanco, mientras que las últimas dos utilizan Cas12 y DNA de doble cadena (dsDNA) como sustrato.^{16,18} Cabe destacar que la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) aprobó el sistema SHERLOCK para su uso de emergencia durante la pandemia de la COVID-19.¹⁹

Los métodos más exitosos de CRISPR-Cas pueden detectar hasta 2.5 copias virales por reacción en muestras clínicas con 100% de sensibilidad y especificidad y pueden dar resultados en 30-40 minutos (incluyendo la preparación del RNA).⁷

3.3 Sistema CRISPR-Cas12a

Los sistemas CRISPR-Cas se componen de un complejo de ribonucleoproteínas (RNP) que consta de una proteína Cas (Figura 2 y 3) y un RNA CRISPR (crRNA), también llamado RNA guía (gRNA) el cual contiene información para hibridar con una secuencia específica del DNA de interés, para ello la proteína Cas necesita reconocer previamente un motivo adyacente al protoespaciador (PAM, del inglés *Protospacer Adyacent Motif*) el cual es adyacente a la secuencia objetivo para abrir la doble cadena de DNA (Figura 2).²⁰ Para Cas12a la secuencia PAM es 5' TTTV 3', donde V es cualquier nucleótido diferente a timina como adenina, citosina o guanina.²⁰

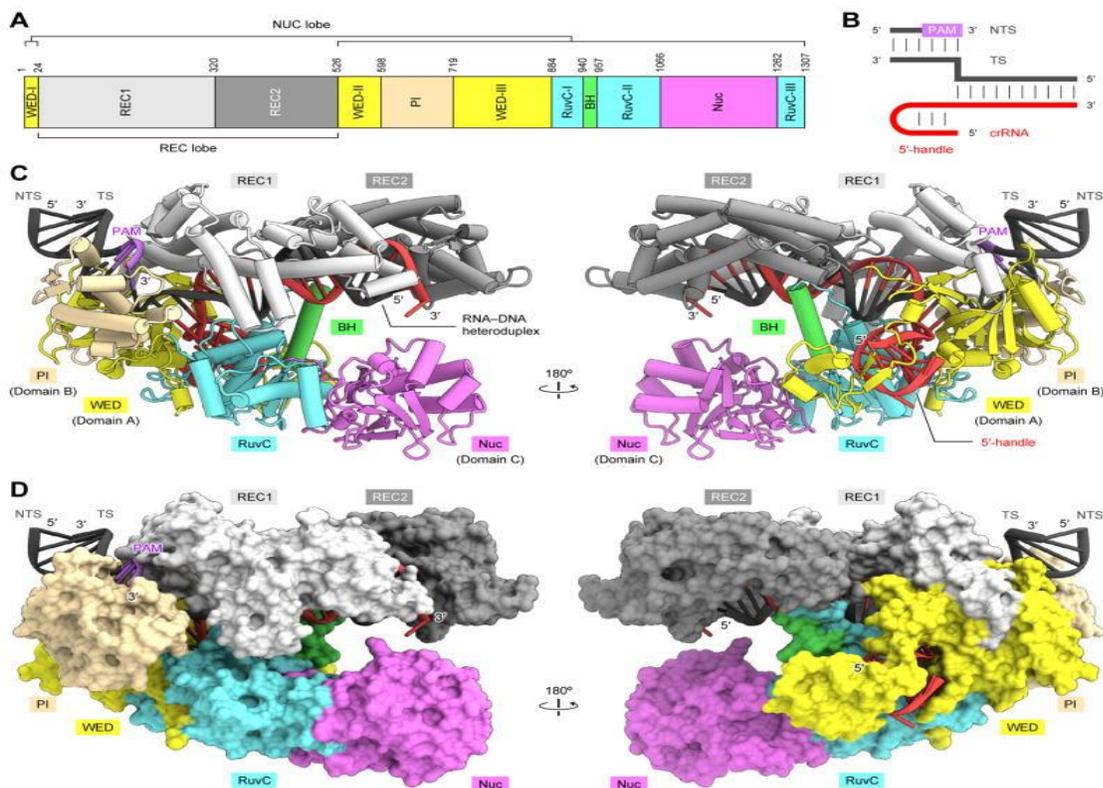


Figura 2. Estructura general de la proteína cas12a de *Acidaminococcus* (AsCas12a-crRNA-DNA objetivo). A) Organización de los dominios de la proteína. B) interacción del RNA CRISPR o RNA guía (crRNA o RNA) con el DNA blanco, en donde la hebra objetivo (TS) y la hebra no objetivo (NTS) del DNA objetivo. C) y D) son representaciones del complejo AsCas12a-crRNA-DNA objetivo. Obtenido de Yamano T, et al.²¹

Una vez que la proteína Cas12a ha sido activada por la previa hibridación del gRNA con el DNA blanco de doble cadena y su consecuente corte (actividad *cis*), la proteína Cas12a comienza a cortar indiscriminadamente DNA de cadena sencilla (ssDNA) (actividad *trans*) como se muestra en la Figura 3. Esta actividad colateral *trans* hace a la Cas12a una herramienta molecular útil para la detección genética.⁴ Se aprovecha la actividad colateral *trans* de la proteína cas12a al emplear una secuencia de DNA monocatenario unido a un fluoróforo y *quencher* para detectar al DNA objetivo de doble cadena vía fluorescencia⁴ (Figura 4). La cual puede ser leída por lectores de placa de fluorescencia, termocicladores de tiempo real, fluorimetría, o por medio de transiluminadores portátiles UV/azul para la detección a simple vista o con la luz de los teléfonos celulares⁷ o por medio de tiras de flujo lateral si la sonda se conjuga a un antígeno (fluoresceína o FAM) y biotina, en el que se visualiza con la aparición de una línea en la tira.⁷

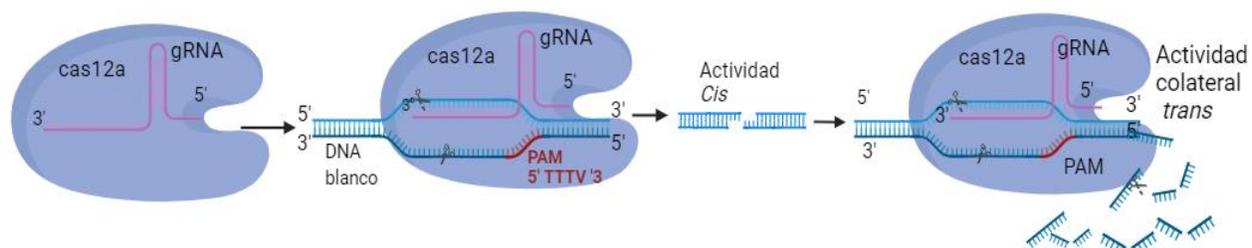


Figura 3. Sistema CRISPR-Cas12a. El complejo ribonucleoproteico (RNP) que consta de un RNA guía (gRNA) unido a la proteína asociada a CRISPR 12a (Cas12a), se une al DNA blanco para activarse y ejercer su actividad de corte *cis* y *trans*. Para ello, Cas12a reconoce previamente un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) que se compone de tres timinas (T) y cualquier otro nucleótido diferente a timina (V), el cual es adyacente a la secuencia objetivo para poder abrir la doble cadena de DNA. Creado en Biorender 2023

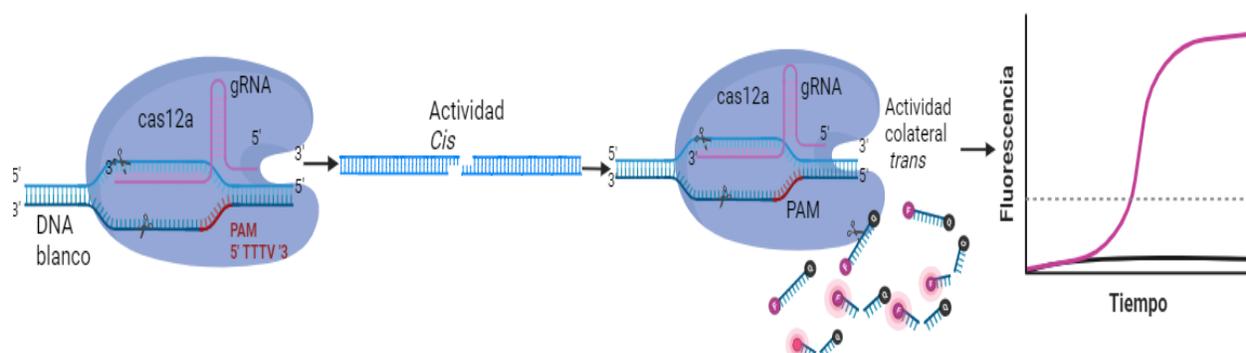


Figura 4. Detección con el sistema CRISPR asociado a proteína Cas12a (CRISPR-Cas12a). Mediante fluorescencia se puede visualizar la actividad colateral *trans*, señal que se produce por el reconocimiento y corte del DNA blanco. El complejo ribonucleoproteico (RNP) que consta de un RNA guía (gRNA) unida a la proteína Cas12a, se une al DNA blanco para activarse y ejercer su actividad de corte *cis* y *trans*. Para ello, previamente la proteína cas12a reconoce la secuencia PAM, que consta de tres timinas (T) y cualquier otro nucleótido diferente a timina (V), para poder abrir la doble cadena de DNA. Creado en Biorender 2023

El método para detectar el virus del SARS-CoV-2 consta generalmente de 5 pasos; 1) recolección de la muestra, 2) purificación del RNA viral, 3) amplificación isotérmica de la secuencia de interés, 4) reconocimiento del DNA blanco y generación de la señal por el sistema CRISPR-Cas12a y 5) lectura de la señal.^{7,8} Actualmente el sistema CRISPR-Cas12a está bien establecido, sin embargo para su aplicación clínica adecuada se necesitan mejorar factores importantes involucrados en el proceso de detección.⁷ Con sólo optimizar los parámetros de detección del sistema CRISPR como concentración de reactivos, amortiguador y temperatura de reacción, se podría mejorar la sensibilidad del método y reducir el tiempo necesario para detectar una señal.^{9,10}

Adicionalmente, el empleo de gRNA múltiples que hibridan en diferentes regiones del DNA blanco, conlleva a la activación de múltiples complejos RNP (gRNA-Cas12a) al mismo tiempo y con ello el aumento de la actividad colateral *trans*, lo que se traduce a un aumento en la señal de la fluorescencia mejorando la especificidad así como la

sensibilidad del sistema.²² Es por ello que para la optimización del sistema de detección se empleará el sistema CRISPR-DUAL (Figura 5) en el que se usan dos gRNAs diferentes denominados N1 y N3 para detectar la del gen N del SARS-Cov-2, el cual ha demostrado mejorar la actividad colateral *trans* hasta 4.5 veces junto con la sensibilidad, en comparación del uso de un solo gRNA (N3), logrando detectar hasta menos de 10 copias virales del gen N del SARS-CoV-2 después de una pre-amplificación con RT-LAMP.⁸

Por todo lo anterior, el proyecto tiene como objetivo optimizar parámetros como la temperatura de reacción de detección, tipo de amortiguador de reacción y la concentración de reactivos (proteína y gRNA) con el fin de mejorar la sensibilidad, así como la señal, el tiempo y la velocidad de detección del sistema CRISPR-Cas12a para el gen N del virus del SARS-CoV-2 con los gRNA múltiples.

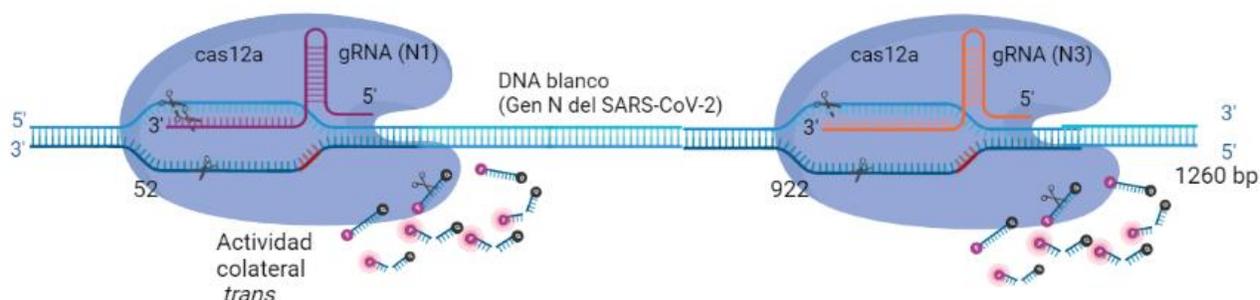


Figura 5. CRISPR-DUAL. El empleo de gRNA múltiples (N1 y N3) en dos regiones diferentes del DNA blanco (Gen N del SARS-CoV-2) activa múltiples complejos ribonucleoproteicos (RNP) que consta de un RNA guía (gRNA) unida a la proteína Cas12a, aumentando así la actividad colateral *trans*. Creado en Biorender 2023.

3.3.1 Temperatura de detección

La proteína Cas12a se emplea usualmente a 37°C, ya que es la temperatura óptima de la actividad catalítica de la mayoría de las proteínas Cas12a. En un estudio con LbCas12a (*Lachnospiraceae bacterium*) se encontró que la temperatura de reacción tiene efecto sobre la eficiencia de esta, en donde a altas temperaturas se incrementa la velocidad de reacción y también se mejora la actividad colateral *trans*, siendo a 45°C donde mejor se desempeña.²³

Estudios previos de estabilidad térmica de la proteína Cas12a, particularmente la procedente de *Acidaminococcus sp.* (AsCas12a), han demostrado que en su forma *apo* (sin gRNA) tiene una temperatura de fusión (T_m) de 40°C, mientras que al formar el RNP con el gRNA, su estabilidad térmica aumenta, llegando a presentar una T_m aproximada de 49 y 54°C, según dos estudios diferentes en el que emplearon distintas secuencias de gRNA,^{24,25} (Figura 6).

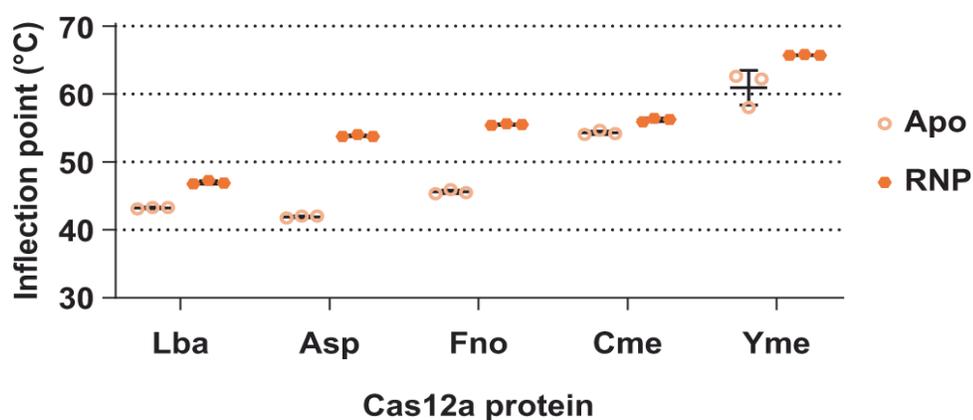


Figura 6. Estudios de estabilidad de la proteína Cas12a. Estabilidad de la proteína Cas12a sin gRNA (Apo) y con gRNA (RNP). El despliegue de la proteína de ambos experimentos fue medido mediante nanofluorometría de barrido diferencial NanoDSD. La grafica muestra diferentes ortólogos de la proteína Cas12a; provenientes de la bacteria *Lachnospiraceae* (*Lba*), *Francisella tularensis* (*Fno*) y *Acidaminococcus sp* (*Asp*) metagenoma de compost (*Cme*), y de Yellowstone (*Yme*) En donde el punto de inflexión o T_m de la curva de fluorescente se interpreta como el punto de despliegue de la proteína. En el que se observa que la AsCas12a en forma *apo* se despliega a 40 °C mientras que RNP a ~ 54° C. Obtenido de Fuchs RT, 2022.²⁴

Por otro lado, la AsCas12a presentó mayor actividad de corte *cis* entre 41-46°C después de haberse formado el complejo RNP a 25°C (Figura 7) y todavía muestra actividad de corte *trans* a 50°C después de haber incubado previamente el RNP a esa misma temperatura por 2 minutos.²⁴ Es por ello por lo que para la optimización se planea hacerlo a temperaturas mayores a 37°C.

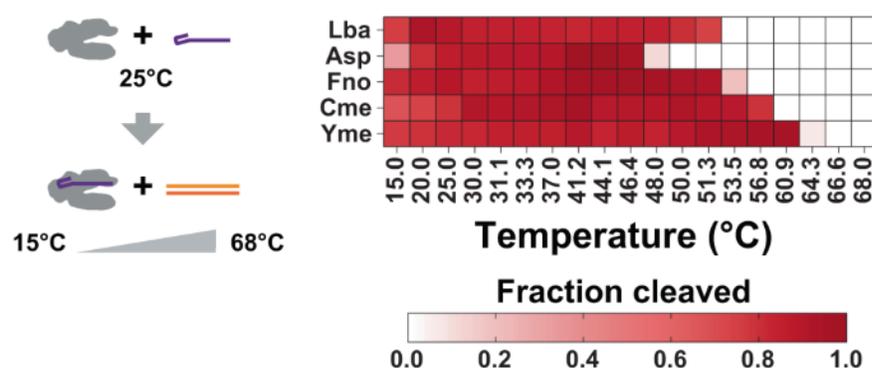


Figura 7. Se muestra la actividad *cis* por diferentes ortólogos de la proteína Cas12a (Lba, Asp, Fno, Cme y Yme), mediante la fracción de corte del DNA objetivo de doble cadena (dsDNA) a distintas temperaturas de reacción de 15-68°C, tras la formación del RNP (Cas12a-gRNA) a 25°C. La intensidad del color rojo en el mapa de calor muestra el grado de escisión del dsDNA objetivo por diferentes ortólogos de la proteína Cas12a, incluyendo la procedente de *Acidaminococcus sp.* (Asp) a diferentes temperaturas de reacción. Estos niveles se evaluaron mediante ensayos *in vitro* que contenían dsDNA marcados con fluoresceína en 5'. Se observa que la “Asp” presenta mayor corte de escisión *cis* entre 41.2-46.4°C. Obtenido de Fuchs RT, 2022.²⁴

3.3.2 Relación AsCas12a: gRNA

La relación estequiométrica de la proteína Cas12a:gRNA para formar el complejo de RNP es de 0.07-17.5, siendo de 1:1 la más frecuentemente utilizada.⁷ Estudios han observado que el exceso en la concentración de gRNA y el DNA blanco puede inhibir ligeramente la actividad de corte de la proteína Cas12a.²⁶

Por otra parte, y de acuerdo con Li et al. (2021),²⁷ la AsCas12a presenta actividad de saturación cuando la relación de Cas12a: gRNA es entre 1:0.5-1:10, y no hay una

diferencia en el aumento en la señal de fluorescencia al incrementar la concentración de gRNA, sin embargo, se planea optimizar la relación Cas12a:gRNA en nuestro sistema que emplea el CRISPR-DUAL para ver si existe una relación de AsCas12a:gRNA en el que presente mejor señal en la detección.

3.3.3 Amortiguador de reacción

Un amortiguador de reacción puede mejorar la sensibilidad del sistema CRISPR-Cas12a debido a variables como el catión divalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}), así como el empleo de aditivos como Polietilenglicol (PEG), glicerina y tritón X-100, y el pH de la reacción. ²⁸

Se ha visto que amortiguadores comerciales de *New England Biolabs* como el NEB 2.1, NEB 3.1 y especialmente el CutSmart mejoran la detección mediante fluorescencia del sistema CRISPR-AsCas12a para el gen N, esto debido a que contienen 100 μ g/mL de Albumina Sérica Bovina (BSA) y un pH de 7.9. ²⁷ Adicionalmente se ha encontrado que la BSA mejora la sensibilidad del sistema CRISPR-Cas12a junto con la L-prolina (0.2-1 M), la cual tiene un efecto protector sobre la proteína cas12a y la BSA contra condiciones desfavorables como cambios abruptos de temperatura (calentamiento, ciclos de congelación y descongelación). ²⁹

Actualmente se emplea el amortiguador NEB 2.1 para la detección, por lo que se probará el amortiguador CutSmart, y otros amortiguadores que resumió Miao Qiu⁹ citados en la Tabla 1, para determinar si funcionan mejor que el que se usa actualmente, así como el empleo de aditivos anteriormente mencionados.

Tabla 1. Amortiguadores no comerciales reportados para la reacción de detección con *LbCas12a* Obtenido de Miao Qiu, 2022.⁹

Amortiguador 1 ³⁰	50mM Tris(hidroximetil)aminometano clorhidrato (Tris-HCl), 100mM NaCl, 10 mM MnSO ₄ , 100 µg/mL Albumina sérica bovina (BSA), pH 7.9
Amortiguador 2 ²³	10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 15 mM MgCl ₂ , 1 mM Ditioneitol (DTT), 5% Polietilenglicol 200 (PEG-200), pH 9.0
Amortiguador 3 ²⁶	40 mM Tris-HCl, 6 mM MgCl ₂ , 1 mM Ditioneitol (DTT), 2 mM Espermidina, 40 mM Glicina 4% Polietilenglicol 20000 (PEG-20000), 0.001% Triton® X-100, pH 8.5

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema CRISPR-Cas12a presenta un enorme potencial como método de diagnóstico del SARS-CoV-2. Su alta sensibilidad, especificidad y rapidez lo convierten en una herramienta invaluable para la detección temprana del virus, permitiendo un control más efectivo de la pandemia. Sin embargo, para que este método pueda ser utilizado de forma eficaz en el diagnóstico masivo de pacientes, es crucial optimizar las condiciones de reacción en cuanto a concentración de gRNA-Cas12a, temperaturas de incubación y tipos de amortiguadores .

5 HIPÓTESIS

Si se optimizan las condiciones del sistema como concentración, temperatura de incubación y amortiguador de reacción, entonces se podrá mejorar la eficiencia y sensibilidad del método, así como el tiempo de análisis.

6 OBJETIVO GENERAL

Optimizar las condiciones de detección del virus del SARS-CoV-2 con el sistema CRISPR-Cas12a.

6.1 Objetivos particulares

- Optimizar la temperatura de detección de la reacción con CRISPR-Cas12a.
- Optimizar las concentraciones de los componentes que participan en la detección con CRISPR-Cas12a (gRNA:Cas12a).
- Optimizar el amortiguador de reacción para la detección con CRISPR-Cas12a.
- Determinar el LoD (*Limit of Detection*) del sistema optimizado con pDNA (DNA plasmídico) del gen N del SARS-CoV-2.

7 METODOLOGÍA

7.1 Materiales

7.1.1 *Proteína AsCas12a*

La proteína Ascas12a ya se encontraba purificada y lista para usar. El primer y segundo lote de proteína fue producido por Morales-Moreno(2023).⁸ Con una concentración final de 3.467 mg/mL y 4.544 mg/mL respectivamente. A grandes rasgos, la AsCas12a fue expresada y producida en *Escherichia coli* BL21(DE3) a partir del plásmido pMBP-AsCas12a, y purificado mediante cromatografía de afinidad por Ni²⁺, intercambio iónico con columna de heparina y exclusión molecular.

7.1.2 *Producción y purificación del DNA plasmídico del gen N del SARS-CoV-2.*

El plásmido pET-28a-SARS-CoV-2 (Figura 21) que contiene el gen N fue donado por el laboratorio LANGEBIO, Cinvestav, Irapuato. Se transformaron bacterias competentes de *Escherichia coli* DH5 α por choque térmico, para ello se mezclaron 200 μ L de las células competentes con 1 μ L del plásmido y se incubó en hielo por 5 minutos, y posteriormente a 42°C por 30 segundos e inmediatamente se incubó otra vez en hielo por 3 minutos. Se agregaron 200 μ L de medio Luria-Bertani (LB) y se incubó por 1 hora a 37°C y 200 rpm. Se esparció las bacterias transformadas en el medio solido LB-Kanamicina 1% y se incubó toda la noche a 37°C. Se seleccionó una colonia del cultivo de células transformantes y se sembró por estría en una placa de agar al 1% de LB+ Kanamicina y se incubó por 12 horas a 37°C. De la misma colonia seleccionada se inoculó en 5 mL de

medio LB+ Kanamicina y se dejó incubar con agitación a 37°C toda la noche. Finalmente se purificó el plásmido mediante el Kit ZymoPure plasmid Miniprep y se cuantificó su concentración con un Nanodrop.

7.1.3 Obtención del gRNAs y sonda reportera

Los gRNAs fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT) Estos se encontraban liofilizados y se disolvieron en agua Mili Q® (MQ) estéril para tener una concentración de 100 µM y fueron almacenados a -80°C. Las secuencias de los gRNAs fueron diseñadas por Melissa Morales (2022)⁸

Tabla 2. Secuencia de los RNA guía (gRNA) N1 y N3 empleados para la detección del gen N que codifica a la nucleocápside del SARS-CoV-2.⁸ Donde G=Guanina, U=uracilo, A= adenina y C=Citosina

gRNA	Secuencia (5'→3')
N1	GUGGACCCUCAGAUUCAACU
N3	CCCCAGCGCUUCAGCGUUC

La sonda 5' - / 56-FAM / TTATTATT / 3BHQ_1/-3' /, fue sintetizada por IDT

7.2 Reacción de detección

Para la formación del RNP se pre-incubó 200 nM de AsCas12a con 200 nM de crRNA (gen N1 y N3) en amortiguador 1x de NEB 2.1 y un volumen de reacción de 25 µL por 20 minutos a 37°C. Posteriormente se añadieron 250 nM de sonda 56-FAM, seguido de 5 nM de DNA plasmídico. La reacción se colocó en una microplaca de 384 pocitos para fluorescencia y se leyó durante 1 hora a 37°C en el lector Multi-Modal con captura de imágenes celulares (Cytation 5), (Figura 8).

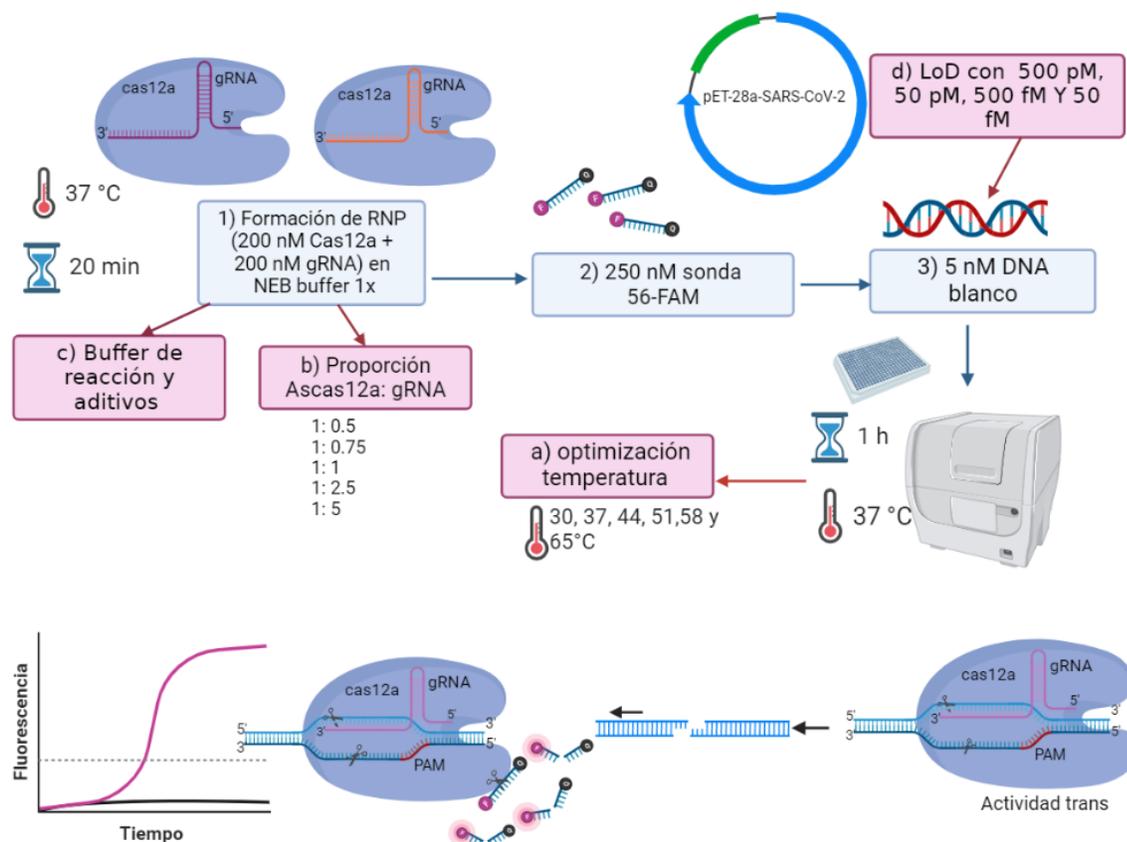


Figura 8. Metodología de la detección del DNA plasmídico (pDNA) del gen N del SARS-CoV-2 mediante detección con CRISPR-CAS12a. En los recuadros azules se indican las condiciones originales del protocolo y en los recuadros rosas se indican las variaciones para realizar la optimización. Creado en Biorender 2023.

7.3 Optimización de la temperatura de detección

La formación del RNP y la reacción se realizó como se describió con anterioridad a diferentes temperaturas de detección en el Cytation de 30-65°C con variaciones de 7°C y en cada temperatura de estudio se corrió control positivo, negativo y plásmido y se realizó por triplicado. Para ello, se pre-incubó la placa a la temperatura de estudio antes de agregar la reacción, esto con el fin de evitar variaciones en la temperatura.

7.4 Relación Cas12a:gRNA

Para la formación del RNP se pre-incubaron 200 nM de AsCas12a con diferentes concentraciones de crRNA del gen N1 +N3 (50, 100, 150, 200, 500 y 1000 nM) en 1x de amortiguador NEB 2.1 y un volumen de reacción de 25 µL por 20 minutos a 37°C.

Posteriormente, se añadieron 250 nM de sonda 56-FAM, seguido de 5 nM de DNA plasmídico. La reacción se colocó en una microplaca de 384 pocitos para fluorescencia y se leyó durante 1 hora a 55 °C en el lector multi-modal con captura de imágenes celulares (Cytation 5)

7.5 Amortiguador de reacción

Para preparar los amortiguadores se tomaron como referencia los resumidos por Miao Qiu,⁹ con una la diferencia de que al amortiguador 2 no se le agregó PEG y se ajustó el pH a 8.8 por error y de que al amortiguador 3 se le añadió PEG-8000 en vez de PEG 20000. La Tabla 3 presenta los amortiguadores que se prepararon a 10x en agua Milli Q (MQ) estéril y que se probaron como punto de partida a los siguientes experimentos. Dichos amortiguadores se esterilizaron con filtros de 0.22 µm.

Tabla 3. Composición de los amortiguadores probados a 1x en la reacción de detección.

Componentes	Amortiguador 1	Amortiguador 2	Amortiguador 2 de acetatos	Amortiguador 3	Amortiguador LAMP	NEB 2.1	CutSmart
pH	7.89	8.8	8.8	8.6	8.8	7.9	7.9
Tris-HCl	50mM	10 mM		40 mM	20 mM	10 mM	
Tris-acetato				10 Mm			20 mM
NaCl	100 mM	10 mM				50 mM	
Acetato de sodio			10 mM				
Acetato de potasio							50 mM
MgCl ₂		15 mM		6 mM		10 mM	
Acetato de magnesio			15 mM				10 mM
MgSO ₄					2 mM		
MnSO ₄	10 mM						
Albumina Sérica Bovina(BSA)	100 µg/mL					100 µg/mL	100 µg/mL
Ditiotreitol (DTT)		1 mM	1 mM	1 mM			
Otros				<ul style="list-style-type: none"> • 2 mM Espermidina, • 40 mM Glicina, • 4% PEG-8000, 0.001% Tritón® X-100 	<ul style="list-style-type: none"> • 10mM (NH₄)₂SO₄ • 50 mM KCl, • 0.1% Tween 20 		

A fin de optimizar el amortiguador de reacción, se formó del RNP se pre-incubando 200nM de AsCas12a con 200 nM de crRNA (gen N1 y N3) en cada uno de los diferentes amortiguadores mencionados en la tabla, en un volumen de reacción de 25 μ L por 20 minutos a 37°C. Luego, se añadieron 250 nM de sonda 56-FAM, y posteriormente 5 nM de DNA plasmídico. La reacción se colocó en una microplaca de 384 pocitos para fluorescencia y se leyó durante 1 hora a 37°C y 65°C en el lector multi-modal con captura de imágenes celulares (Cytation 5).

7.5.1 Aditivos

Se prepararon los siguientes aditivos en agua MQ estéril a concentración 10x respecto a la reacción de detección, y se esterilizaron con filtros de 0.22 μ m.

Tabla 4. Concentración de aditivos probados en la detección con CRISPR-Cas12a

Concentración	Aditivo
2 mM	Espermidina
2 mM	MgSO ₄
40 mM	Glicina
0.5 M	Betaina
4%	Polietilenglicol 8000 (PEG 8000)
0.001%	Tritón x100
1 mM	MnCl ₂

7.6 Límite de detección (LoD)

Se formó el RNP pre-incubando 200 nM de AsCas12a con 200 nM de crRNA (gen N1 y N3) en 1x de amortiguador 2 de acetatos, 4 % PEG 8000 y en un volumen de reacción de 25 μ L por 20 minutos a 37°C. A la par, se realizaron diluciones seriadas 1/10 del DNA plasmídico de 5 nM hasta 50 fM. Al finalizar la incubación del RNP se añadieron 250 nM de sonda 56-FAM, y posteriormente se añadió el DNA plasmídico y se colocó la reacción en una microplaca de 384 pocitos para fluorescencia y se leyó durante 1 hora a 37°C en el lector multi-modal con captura de imágenes celulares (Cytation 5).

7.7 Análisis estadístico

Los ensayos de detección se realizaron por triplicado y se representan con su media y desviación estándar. La significancia estadística entre las medias se analizó con el software GraphPad Prism 9.4.1 empleando ANOVA de una vía, y para las pruebas Post Hoc se empleó comparación múltiple con Tukey y Dunnett con $\alpha=0.05$.

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1 Optimización de la temperatura de detección

Para que la proteína Cas12a realice su actividad colateral primero debe formar el RNP (gRNA-Cas12a). Después, la proteína experimenta cambios conformacionales que le permiten buscar y reconocer la secuencia PAM en el DNA blanco. Una vez reconocida, la proteína separa las cadenas del DNA y facilita la hibridación con el gRNA, activando el sitio catalítico de endonucleasa y ejerciendo su actividad *cis* cortando las hebras del DNA blanco. Seguidamente, el sitio catalítico de la proteína Cas12a permanece activo y corta DNA inespecífico de cadena sencilla.³¹ Para medir la actividad *trans* de la proteína Cas12a mediante fluorescencia, se utiliza DNA de cadena sencilla unida a un fluoróforo y un *quencher*, siempre y cuando la proteína Cas12a haya reconocido y cortado previamente al DNA blanco.

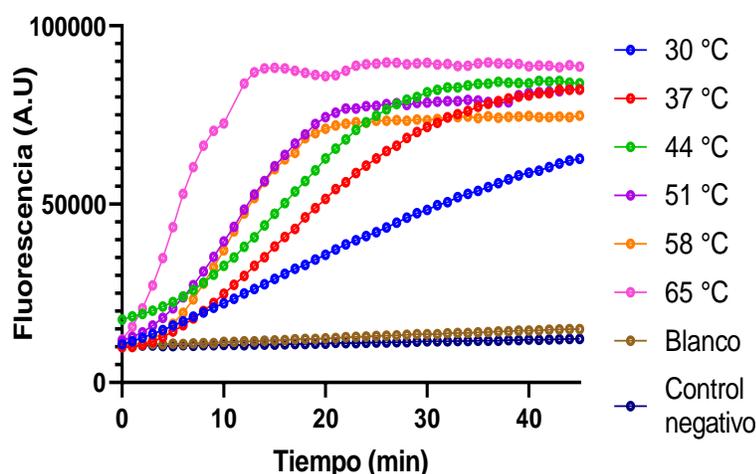
Para la optimización de la temperatura se preparó suficiente RNP para realizar la detección a diferentes temperaturas de incubación, desde 30° hasta 65°C con incrementos de 7°C (Figura 9A). En la gráfica se puede observar una mejora en la señal de fluorescencia y una reducción en el tiempo de detección, dependiente del incremento de la temperatura.

De acuerdo con lo reportado por Fuchs R.T.,²⁴ la proteína AsCas12a tiene mayor actividad de escisión al DNA objetivo (corte *cis*) entre 41 y 44°C y pierde su actividad de corte *cis* a partir de 48°C. Sin embargo, en nuestros experimentos (Figura 9A) se puede observar que la proteína muestra actividad *trans* sin haberse desnaturalizado aún a 65°C y que alcanza la señal máxima de detección (meseta) en aprox. 13 minutos en comparación con la temperatura original de detección que es de 37°C, la cual alcanza la

meseta a los 40 min aprox. Por otro lado, el control negativo y el blanco permanecieron constantes en todas las temperaturas de estudio, lo que quiere decir que la sonda FAM no se desintegra por las altas temperaturas y que la actividad colateral *trans* sigue siendo específica a 65°C ya que no se emite un falso positivo en ausencia del DNA objetivo (Ver anexo Figura 22).

Al graficar las pendientes de la reacción, que representan la velocidad con la que la proteína Cas12a corta la sonda, se observa un aumento en la actividad *trans* a medida que incrementa la temperatura de detección (Figura 9B). A 65°C se logró aumentar hasta 3 veces más (8,100 fluorescencia A.U. (*Aribtrary Units*) /minuto) la velocidad de reacción con respecto al control de 37°C (2,600 fluorescencia A.U./minuto). Esto se puede justificar con la teoría de las colisiones de Arrhenius, la cual explica que la velocidad de reacción aumenta, al incrementar la temperatura ya que eleva la frecuencia de las colisiones efectivas de las moléculas.

A) Optimización de temperatura de detección



B)

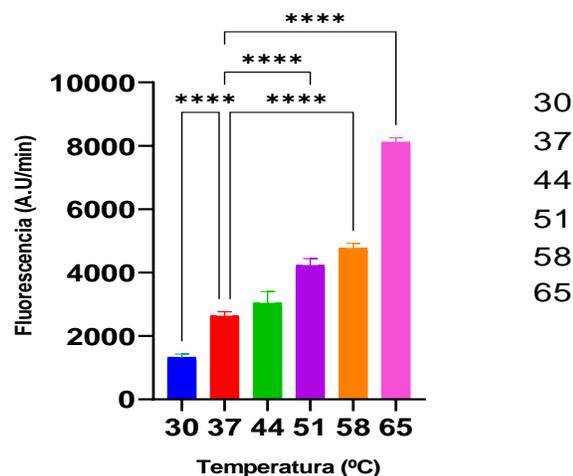


Figura 9. Optimización de la temperatura de detección. (A) Se muestra la detección del plásmido PET28a SARS-CoV-2 con CRISPR-Cas12a a diferentes temperaturas de incubación entre 30°-65°C. (B) Pendientes de la reacción de detección a diferentes temperaturas. Se determinó si hay diferencia estadísticamente significativa de la velocidad de reacción de detección mediante un análisis múltiple con Tukey (**** $p < 0.0001$) con $\alpha = 0.05$. Las barras de error representan el promedio \pm d.e (n = 3).

Está documentado que la proteína AsCas12a en su forma *apo* (sin gRNA) tiene una T_m de 40°C. Sin embargo, en dos artículos diferentes se han observado que al formar el RNP con el gRNA, la proteína AsCas12a aumenta su estabilidad térmica, alcanzando aproximadamente una T_m de 49 y 54°C, respectivamente ^{24,25}. Cabe resaltar que en dichos estudios se emplearon diferentes gRNA, lo que sugiere que la estabilidad térmica esta influenciada por las secuencias de gRNA utilizadas. En base a nuestros experimentos y a lo anterior, se puede inferir que el uso del CRISPR-DUAL amplia el rango de estabilidad térmica promedio de la AsCas12a, permitiendo su actividad incluso a 65°C.

Por otro lado, en el laboratorio se observó que la proteína pierde actividad de corte *trans* a partir de los 15 minutos a 65°C. Sin embargo, la proteína Cas12a permanece activa el tiempo suficiente para cortar el DNA blanco y la sonda, lo que permite la emisión de la señal de fluorescencia antes desnaturalizarse (Ver anexo Figura 23).

8.2 Optimización de la relación estequiométrica de gRNA:Cas12a

De acuerdo con los previos experimentos por Li, et al.,³² al variar la proporción de gRNA mientras se mantiene constante la de la proteína Cas12a, no se observó una diferencia estadísticamente significativa al emplear una relación estequiométrica de Cas12a:gRNA entre 1:0.5 y 1:10 para la detección del gen N. El resultado en nuestro experimento fue el mismo (Figura 10) a pesar de que la reacción se llevó a cabo a una temperatura más alta (55°C) y a que se emplearon dos gRNAs, en donde ninguno de los gRNAs utilizados tiene la misma secuencia que en dicho artículo. Esto sugiere que la AsCas12a puede comenzar a saturarse a partir de una proporción de gRNA de 0.25 respecto a la Cas12a,

ya que no se observa un cambio en la velocidad de reacción al aumentar aún más la proporción de gRNA.

Por estos resultados, se continuó manejando una estequiometria de 1:1 (gRNA: Cas12a) como originalmente se empleaba. Sin embargo, estos resultados nos abren la posibilidad de poder reducir las concentraciones del gRNA en relación de la proteína Cas12a a 0.25:1, hasta una concentración de 50 nM y con ello reducir costos ya que a esta concentración se puede obtener la misma señal de detección.

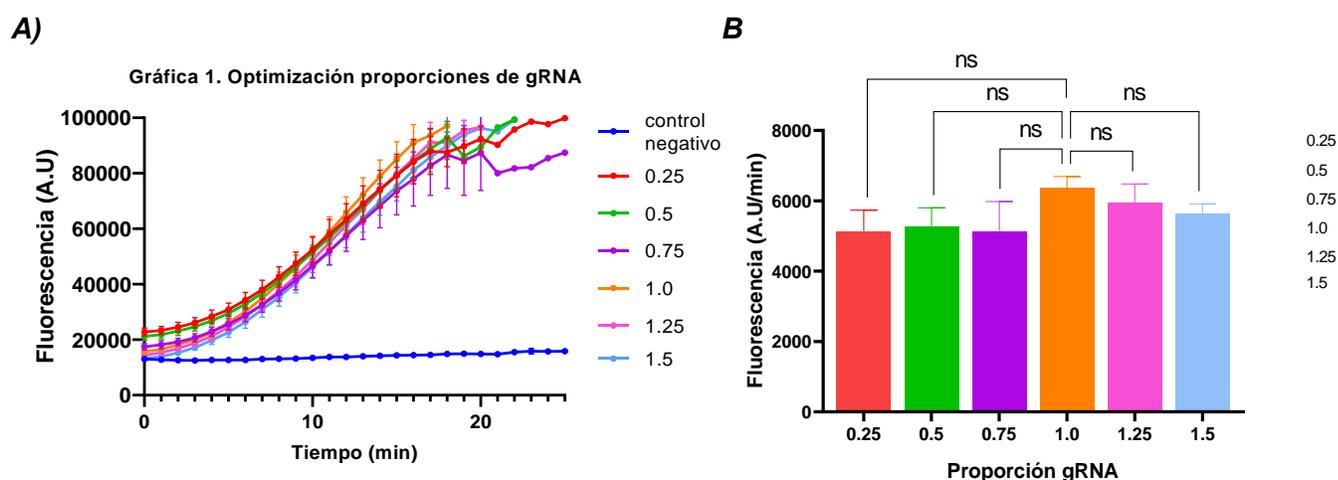


Figura 10. Optimización de las proporciones de RNA guía (gRNA). (A) Se muestra variaciones estequiométricas del gRNA de 0.25-1.5, manteniendo constante el de la proteína Cas12a para la detección del plásmido PET28a SARS-CoV-2 con CRISPR-Cas12a a 55°C. (B) Pendientes de la reacción de detección con diferentes proporciones de gRNA. Se muestra que no hay diferencia estadísticamente significativa (ns) mediante una ANOVA de una vía con $\alpha=0.05$ y $n=3$.

8.3 Optimización del amortiguador de reacción de detección.

Con el fin de encontrar el mejor amortiguador para la reacción de detección se probaron los que se encuentran en la Tabla 3. Como se muestra en Figura 11 y Figura 12, los amortiguadores 2, 3 y CutSmart presentan una mayor pendiente respecto al amortiguador que se utiliza originalmente (NEB 2.1) tanto a 37°C como a 65°C. Lo que indica que la

velocidad con la que corta la proteína Cas12a la sonda (ssDNA), ocurre más rápido en presencia de estos amortiguadores, sin embargo con el que existe diferencia estadísticamente significativa a la temperatura optimizada (65°C) es con el amortiguador 2, logrando así mejorar hasta 2 veces la reacción de detección con respecto al amortiguador NEB 2.1, a su vez hay una reducción en el tiempo en el que alcanza la señal máxima de fluorescencia de 15 minutos a 10 minutos aproximadamente (Figura 11B). Sin la influencia de la alta temperatura, a 37°C el amortiguador 2 aumenta la reacción de detección 1.7 veces respecto al amortiguador NEB 2.1 y también se reduce a la mitad el tiempo de la señal máxima de 40 minutos a 20 minutos (Figura 12B).

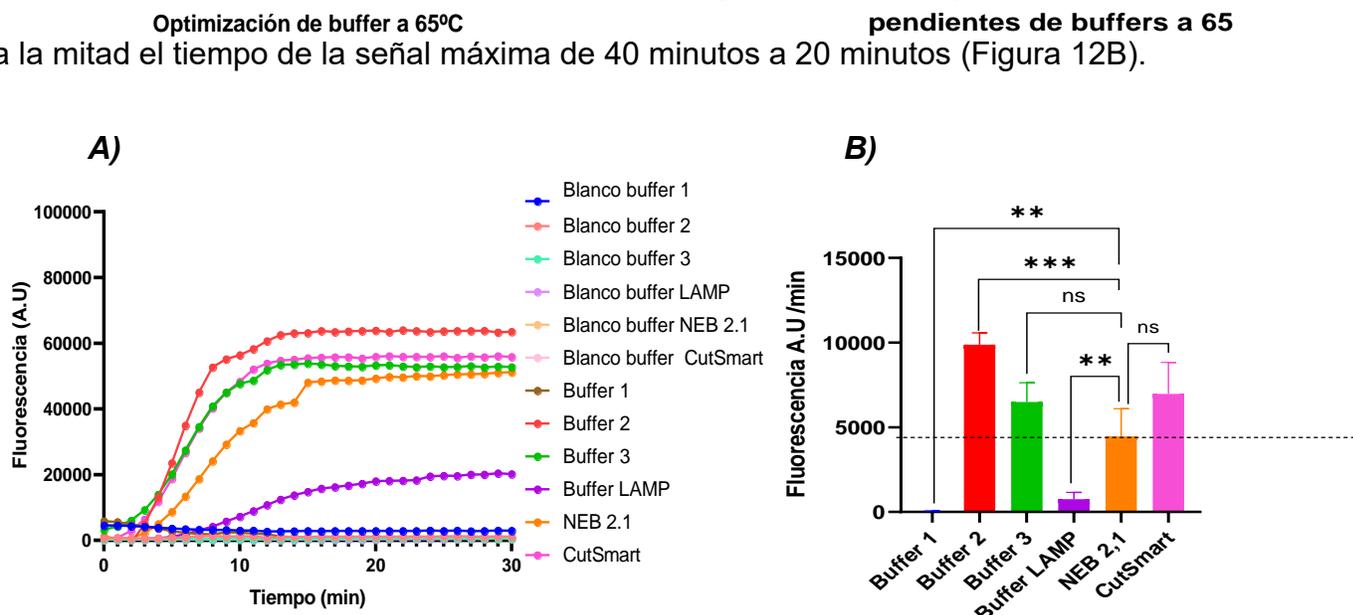


Figura 11. Optimización del amortiguador de reacción a 65°C. (A) Se muestran diferentes amortiguadores para la reacción de detección del plásmido PET28a SARS-CoV-2 con CRISPR-Cas12a. (B) Pendientes de reacción de detección con diferentes amortiguadores a 65°C. Se determinó si hay diferencia estadísticamente significativa en la velocidad de reacción de detección utilizando diferentes amortiguadores en comparación con el control (NEB 2.1) mediante un análisis múltiple con Dunnett ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.0001$, ns significa que no hay significancia estadística) con $\alpha=0.05$. Las barras de error representan el promedio \pm d.e (n = 3). La composición de los amortiguadores se encuentra en la Tabla 3.

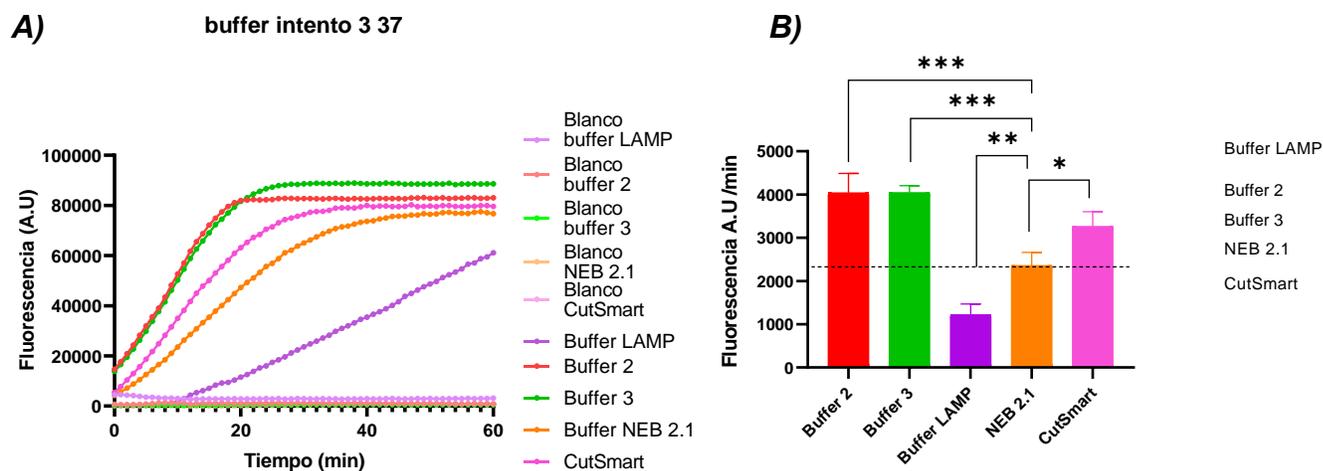


Figura 12. Optimización de amortiguador de reacción a 37°C. (A) Se muestran diferentes amortiguadores para la reacción de detección del plásmido pET28a SARS-CoV-2 con CRISPR-Cas12a. (B) Pendientes de reacción de detección con diferentes amortiguadores a 37°C. Se determinó si hay diferencia estadísticamente significativa de la velocidad de reacción de detección con diferentes amortiguadores mediante un análisis múltiple con Dunnett ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$; ns significa que no hay significancia estadística) con $\alpha = 0.05$. Las barras de error representan el promedio \pm d.e (n = 3). La composición de los amortiguadores se encuentra en la Tabla 3.

Ya está evidenciado que el amortiguador CutSmart mejora la reacción de detección respecto al NEB 2.1 debido a que contiene sales de acetatos en vez de clorohidratos.^{18,27} Por otro lado, se observa una mejora en la reacción de detección con el amortiguador 2 y 3 debido al pH (de 8.6 y 8.8 respectivamente), que se encuentra dentro del rango óptimo de actividad para la proteína Cas12a (pH 8.5-9.0).^{9,23} Además, ambos amortiguadores contienen ditiotreitól (DTT), un agente reductor de los grupos sulfhidrilo (restaura la actividad perdida de las proteínas por la oxidación de estos grupos), haciendo que mejore la actividad colateral *trans* al inducir un cambio conformacional del complejo RNP (gRNA-Cas12a).³³ Por último, se ha reportado que bajas concentraciones de NaCl mejoran la actividad de la Cas12a,^{18,23} siendo el amortiguador 2 el que tiene menor concentración de NaCl (10 mM).

Se probó el amortiguador LAMP para ver si hay compatibilidad con el sistema CRISPR-Cas12a, y si este se podría acoplar en un solo paso con la reacción isotérmica

de LAMP. Sin embargo, usando el amortiguador LAMP hubo una disminución de la actividad de la proteína Cas12a. Esto se puede deber a la presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y/o al tween 20, los cuales están ausentes en los otros amortiguadores probados.

El amortiguador 1 fue incorporado en el estudio de optimización, debido a que contiene Mn^{2+} , reconocido por aumentar significativamente la señal de fluorescencia para la LbCas12a, de 3.4-13.6 veces más que el ion Mg^{2+} , y mejorar la sensibilidad de detección hasta 13 veces más con la MeCas12a.³⁰ Sin embargo, con el amortiguador 1 no se observó ninguna señal, lo que indica una falta de actividad de la proteína Cas12a en la reacción de detección. Este resultado pudo deberse al cambio de color del amortiguador 1 a un tono café durante su preparación, que ocurrió como consecuencia de una reacción redox del MnSO_4 y Tris, en donde el MnSO_4 se oxidó, mientras que el Tris se redujo.

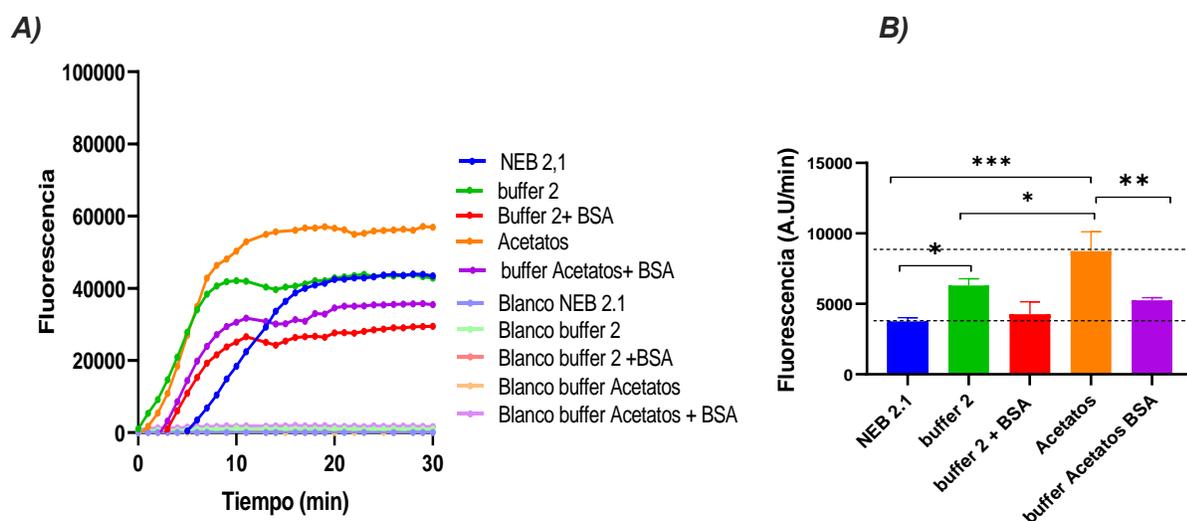


Figura 13. Amortiguador 2 y efecto de la Albumina Sérica Bovina (BSA) en la reacción de detección del gen N que codifica a la nucleocapside del virus del SARS-CoV-2 mediante CRISPR-Cas12a. (A) Se añadió BSA al amortiguador 2 hecho de sales de clorhidratos y acetatos en la reacción de detección a 65°C. (B) Pendientes de la reacción de detección del amortiguador 2 sin y con adición de BSA. Se comparan el amortiguador 2 hecho de sales de acetatos y de clorhidratos, así como el efecto al añadir 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA. La diferencia estadísticamente significativa de la velocidad de reacción de detección se determinó mediante un análisis múltiple con Tukey (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) con $\alpha=0.05$ y $n=3$. Los componentes de los amortiguadores se encuentran en la Tabla 3.

Se ha descrito que la proteína mejorada “*enhanced Acidaminococcus sp. Cas12a variant*” (enAsCas12a) funciona mejor en amortiguadores que contienen sales de acetatos, en comparación con los amortiguadores que contiene sales de clorhidratos.¹⁸ Como se puede ver en la Figura 13 hay una ligera mejora con el amortiguador 2 con sales de acetatos, comparado con el amortiguador 2 (preparado con sales de clorhidratos) con un aumento de 2,064 unidades de fluorescencia/min. Esto puede ser porque el impacto que ejerce la carga iónica de los cloruros es más fuerte comparada con la de los acetatos sobre las interacciones del DNA con el complejo RNP.²⁴

Por otra parte, se ha visto que la BSA mejora la reacción de detección del gen N del SARS-CoV-2 con CRISPR-AsCas12a en amortiguadores que no lo contienen.²⁷ Sin embargo no se encontró un aumento al agregarlo en el amortiguador 2. (Figura 13 y Figura 14). Al contrario, hubo una ligera reducción tanto en los amortiguadores de sales de clorhidrato como de acetatos. Se cree que esto se debió al efecto del pH del medio (8.8), ya que la BSA cambia su conformación estructural en pH mayor a 8.³⁴ Particularmente entre pH 8-9 está documentado que la BSA sufre una transición en la forma y un pequeño aumento de la superficie efectiva³⁵, además la BSA a pH alcalino tiene mayor carga neta negativa.³⁶ Se cree que la BSA interfirió en la interacción del RNP con el DNA, disminuyendo la velocidad de corte. Al preparar el amortiguador 2 de acetatos a pH 7.9 y agregar BSA, no se observó mejoría en la detección, como se evidencia en la Figura 14.

Esta falta de mejoría se contrasta con el control positivo (amortiguador 2 de acetatos pH 8.8 + 4% PEG 8000), que ha demostrado experimentalmente un mejor desempeño en la reacción de detección (Figura 17). Además, no se observó una mejora

al añadir BSA en el amortiguador 2 de acetatos a pH 7.9 + 4% PEG 8000. Asimismo, no se registró una mejora al agregar BSA en el amortiguador 2 de acetatos a pH 7.9 en ausencia de PEG 8000 y de DTT, componentes que no se encuentran en los amortiguadores donde se ha documentado una mejora por la adición de BSA.²⁷ Por lo tanto, se considera que la composición del amortiguador 2 (10 mM Tris–Acetato, 10 mM Acetato de Sodio, 15 mM Acetato de Magnesio, 1 mM DTT, pH 8.78) y/o la temperatura son los factores que impiden que la BSA mejore la reacción de detección.

La L-prolina en conjunto de la BSA se ha descrito que funciona como agente protector de la proteína Cas12a contra temperaturas altas,²⁷ por lo que inicialmente se pensó que evitaría la desnaturalización tanto de la BSA como de la proteína Cas12a a 65°C, sin embargo, al añadirlo en el amortiguador 2 de acetatos + PEG 8000 hubo una inhibición (Figura 15). Se piensa que esto se puede deber por impedimento estérico por parte del BSA, L-prolina y el PEG 8000 sobre la proteína Cas12a, al interactuar con el DNA blanco o el ssDNA (Sonda FAM). Esto reafirma que la composición del amortiguador 2 de acetatos en conjunto con la temperatura, no es la ideal para que la BSA produzca una mejora en la reacción. Además, se descarta la influencia de la temperatura en la posible desfuncionalización de la BSA y Cas12a, porque en el experimento de optimización de la temperatura se empleó amortiguador NEB 2.1, el cual contiene 100 µg/mL de BSA y no hubo un agravamiento en reacción de detección con CRISPR-Cas12a (Figura 9). Esto reafirma que la composición del amortiguador 2 de acetatos no es la ideal para que la BSA produzca una mejora en la reacción.

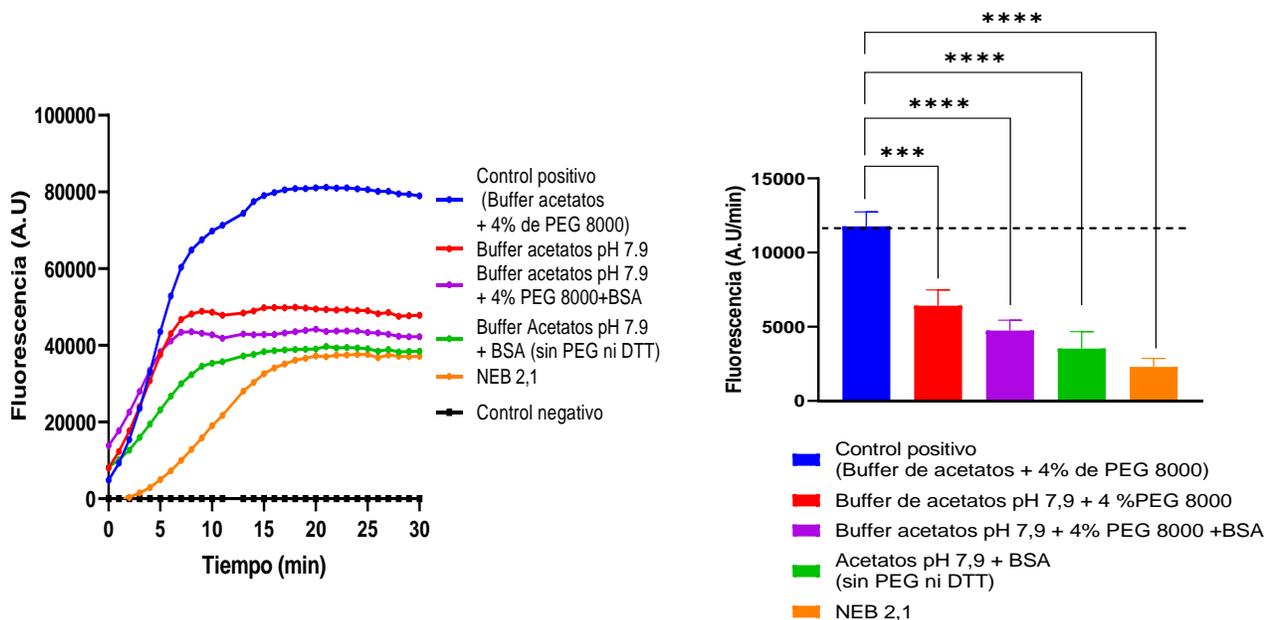


Figura 14. Efecto de la Albumina Sérica Bovina (BSA) sobre la reacción de detección del gen N que codifica a la nucleocápside del SARS-CoV-2 con CRISPR-Cas12a en amortiguador de acetatos pH 7.9. Reacción de detección con diferentes variaciones del amortiguador de acetatos con pH 7.9 al añadir 100 µg/mL de Albumina Sérica Bovina (BSA). Se graficaron las pendientes de la reacción de detección y se determinó si hay diferencia estadísticamente significativa en la velocidad de reacción de diferentes variaciones amortiguadores de acetatos a pH 7.9 al añadir 100 µg/mL BSA, con respecto al amortiguador optimizado (Control positivo), mediante un análisis múltiple con Dunnett (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; ns significa que no hay significancia estadística) con $\alpha=0.05$. Las barras de error representan el promedio \pm d.e (n = 3).

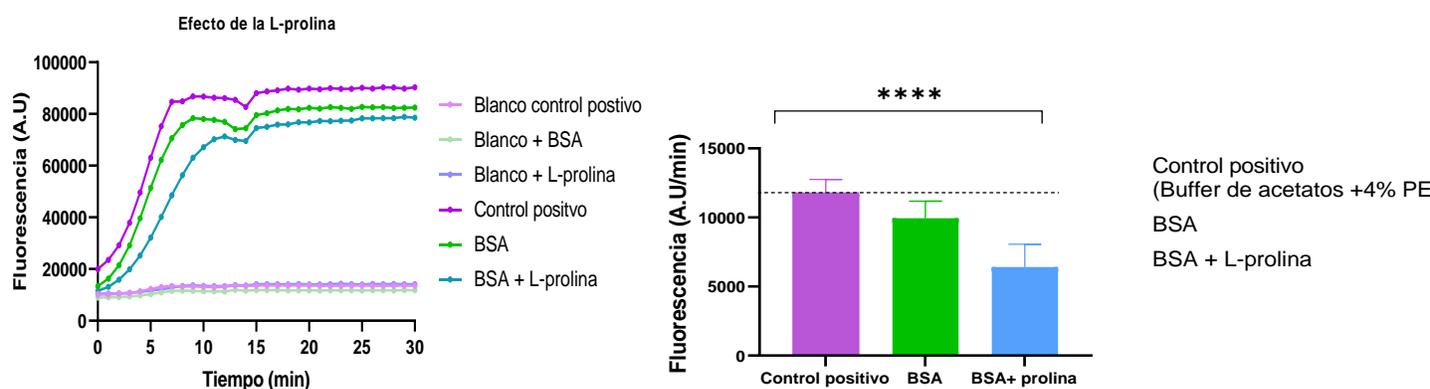


Figura 15. Efecto de la L-Prolina y la Albumina Sérica Bovina (BSA) en la reacción de detección con CRISPR-Cas12a del gen N que codifica a la nucleocápside del virus del SARS-CoV-2. Se determinó si hay diferencia estadísticamente significativa en la velocidad de reacción de detección, añadiendo 100 µg/mL Albumina sérica bovina (BSA) y 0.5 M L-prolina con respecto al amortiguador optimizado (control positivo) mediante un análisis múltiple con Dunnett (**** $p < 0.0001$) con $\alpha=0.05$. Las barras de error representan el promedio \pm d.e (n = 3).

En relación con los aditivos, se observó una mejora del doble al agregar un 4% de PEG 8000 al amortiguador 2 de acetatos para la reacción de detección (Figura 16). En este caso, la velocidad de reacción aumentó aproximadamente 7000 unidades de fluorescencia A.U/min con respecto al amortiguador de acetatos sin aditivos, siendo 2.4 veces más rápido (Figura 17). Lo destaca al PEG de los otros aditivos probados es su viscosidad.³⁷ El polietilenglicol (PEG) es un polímero sintético no iónico anfifílico en disolución que puede formar puentes de hidrogeno reteniendo las 100 moléculas de agua por una molécula de PEG, su peso molecular representa el número de moléculas individuales de óxido de etileno.^{37,38} Hay un antecedente de mejora por el uso PEG como aditivo en la reacción con CRISPR-Cas12a por parte de Lv et al. (2021)²⁶. Sin embargo, en su experimento la adición de PEG 20,000 al 4%, resulto en una mejora significativamente mayor para la detección comparada con el PEG 8000. Dichas sustancias se diferencian en peso molecular y se sabe que al incrementar el peso molecular del PEG su viscosidad aumenta³⁷. Por lo que se cree que la mejora de la actividad colateral *trans* se debe a que la viscosidad del PEG influye en la estabilidad de la proteína Cas12a. Adicionalmente, está documentado que el PEG de cadenas largas se une a los parches hidrofóbicos de proteínas a través de fuerzas de Van der Waals y que induce una estructura abierta de la proteína con más regiones hidrofóbicas expuestas a PEG en disolución.³⁸ Cabe destacar que la proteína Cas12a tiene residuos hidrofóbicos donde se lleva a cabo la desnaturalización del DNA blanco y que participan en hibridación del gRNA-DNA y el en sitio de la nucleasa.³⁹ Por lo que se cree que el PEG interacciona con la proteína Cas12a ayudando a que las regiones hidrofóbicas encargadas de la

hibridación del gRNA- DNA y de corte queden expuestas facilitando con ello su actividad de endonucleasa y el reconocimiento del DNA blanco.

Con 1 mM de MnSO_4 hubo una activación de corte inespecífico de la Cas12a sobre el fluoróforo FAM, esto se observa al ver una señal alta de fluorescencia en ausencia del pDNA de SARS-CoV-2 en el blanco (Figura 16). Esto se puede deber a que a esa concentración el Mn^{2+} desencadena su actividad de endonucleasa de ssDNA ya que está documentado que los iones de Mn^{2+} puede activar la función de endonucleasa de la AsCas12a y cortar el DNA en ausencia del gRNA.⁴⁰

Se ha descrito que los surfactantes no iónicos como el tritón X-100⁴¹ mejoran la actividad *trans* de la Cas12a y Cas13,⁴² sin embargo al emplear 0.001% de tritón x-100 y a la temperatura optimizada (65°C) hubo una inhibición en la reacción de detección, se piensa que esto fue debido a que esta sustancia forma muchas burbujas, lo cual en conjunto con la temperatura pudo causar la desnaturalización de la proteína.

Se ha observado que la Cas12a exhibe mayor actividad *trans* en presencia de glicina.²⁶ La adición de glicina aumentó de la velocidad de detección a aproximadamente 2000 unidades de fluorescencia A.U/min. Se plantea la posibilidad de que este efecto esté relacionado, al igual que con el PEG 8000, con la viscosidad. Además, se ha demostrado que la glicina mejora la detección en un solo paso (CRISPR-Cas12a + Reacción de LAMP en un solo tubo),⁴³ por lo que no se descarta para usos futuros.

Por otro lado, con la espermidina, la betaína y el MgSO_4 no se observó un impacto significativo en la detección con CRISPR-Cas12a. Sin embargo, no se descarta el uso de

la betaína para futuras investigaciones, ya que se ha demostrado que mejora la reacción del LAMP al romper estructuras secundarias.⁴⁴

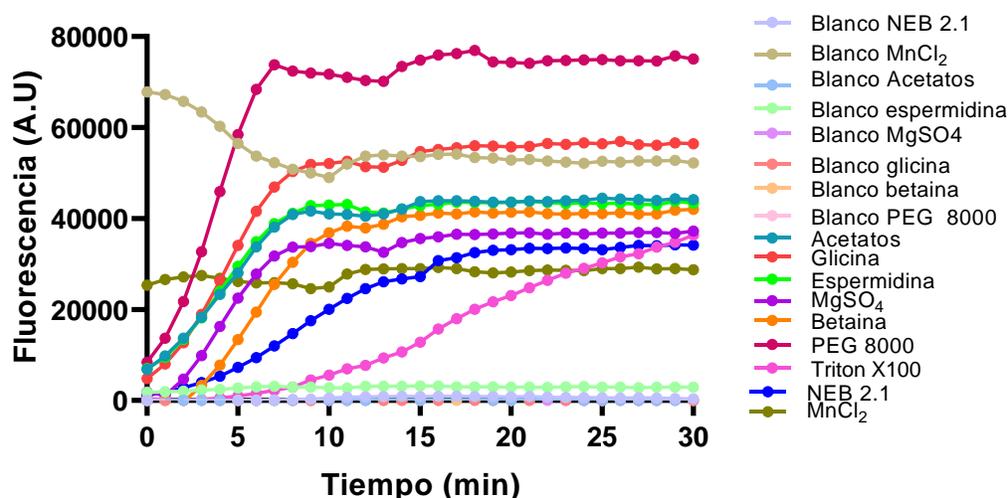


Figura 16. Efecto de diferentes aditivos en la reacción de detección del DNA plasmídico del gen N, que codifica a la nucleocápside del SARS-CoV-2 con CRISPR-Cas12a. Se evaluaron diferentes aditivos en el amortiguador 2 de acetatos a 65°C, tales como glicina, espermidina, MgSO₄, Betaína, Tritón X100, MnCl₂ y Polietilenglicol 8000 (PEG 8000), en concentraciones conforme a lo indicado en la Tabla 4, con el fin de observar su efecto en la reacción de detección.

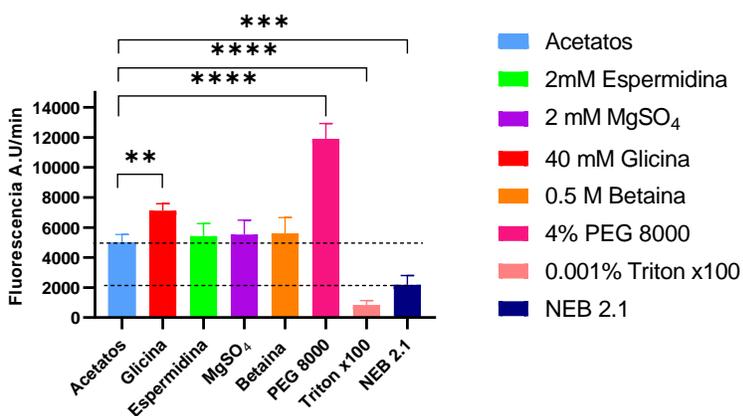


Figura 17. Pendientes de la reacción de detección del DNA plasmídico del gen N, que codifica a la nucleocápside del SARS-CoV-2 mediante CRISPR-Cas12a con diferentes aditivos en el amortiguador 2 de acetatos. Se determinó si hay diferencia estadísticamente significativa en la velocidad de reacción de detección con diferentes aditivos mediante un análisis múltiple con Dunnett (**p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001; ns significa que no hay significancia estadística) con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Las barras de error representan el promedio \pm d.e (n = 3).

8.4 Límite de detección (LoD)

Para determinar el límite de detección, se llevaron a cabo diluciones seriadas de 10 en 10 del DNA plasmídico del SARS-CoV-2, obteniendo concentraciones finales de 5 nM, 500 pM, 50 pM, 5 pM, 500 fM y 50 fM.

La Figura 18 y Figura 19 muestran que, tanto con las condiciones iniciales como con las optimizadas, se puede observar una señal de fluorescencia hasta una concentración de 50 pM de DNA plasmídico del gen N del SARS-CoV-2. Sin embargo, bajo las condiciones optimizadas, la señal de fluorescencia puede distinguirse visualmente del control negativo en un menor tiempo (a partir de 20 minutos), en contraste con las condiciones sin optimizar, donde la señal apenas se puede diferenciar del control negativo hasta los 90 minutos. No obstante, el análisis estadístico muestra que solo la concentración de 500 pM es distinguible de control negativo en ambas condiciones, mientras que a 50 pM no se permite una distinción estadísticamente significativa del control negativo.

Es importante destacar que, con las concentraciones de DNA plasmídico experimentadas, no se puede discernir si existe una diferencia en el LoD entre ambas condiciones. Por lo tanto, se sugiere realizar más experimentos para determinar la concentración mínima detectable entre 500 pM y 50 pM, lo cual proporcionaría una mejor comprensión del LoD del método con las condiciones optimizadas.

A pesar de lo anterior, al comparar las pendientes de reacción, que representan la velocidad de reacción, se observa que a las mismas concentraciones de sustrato (DNA) se obtiene una señal de fluorescencia/tiempo hasta 10 veces mayor con las condiciones

optimizadas en contraste con las condiciones originales. Esto se traduce en una mejora notable en la sensibilidad del sistema de detección (Figura 20).

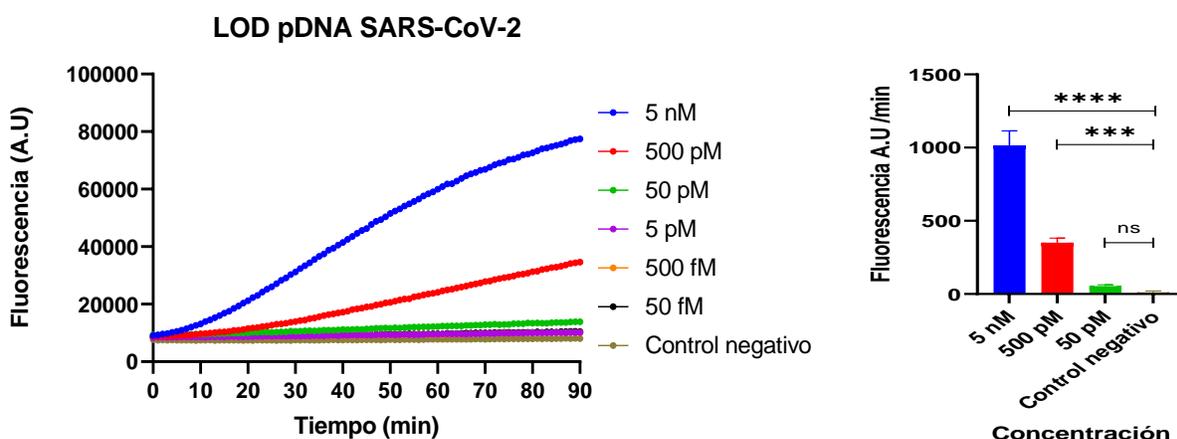


Figura 18. Límite de detección (LoD) con p-DNA-SARS-CoV-2 con las condiciones originales, es decir antes de la optimización (Amortiguador NEB 2.1 a 37°C). Se determinó si hay diferencia estadísticamente significativa de la velocidad de reacción de detección mediante un análisis múltiple con Dunnett (**p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001; ns significa que no hay significancia estadística) con $\alpha=0.05$ Las barras de error representan el promedio \pm d.e (n = 3).

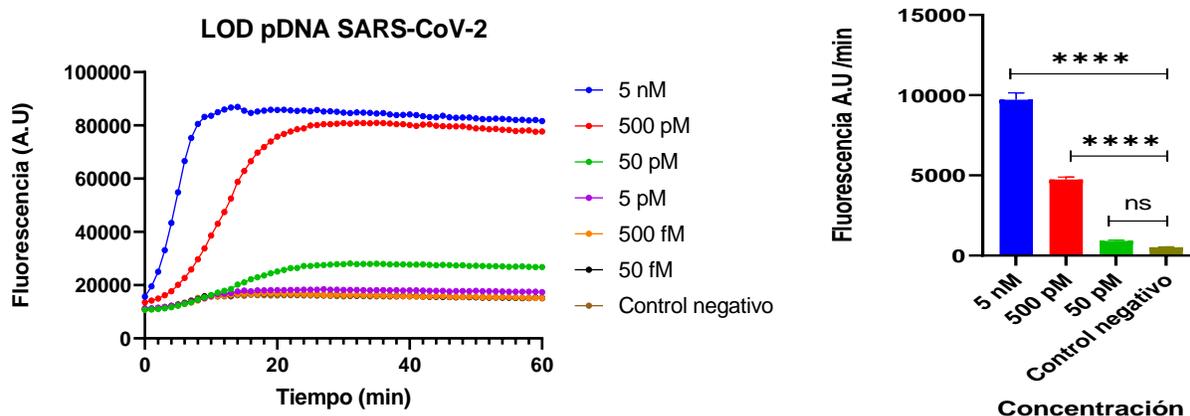


Figura 19. Límite de detección (LoD) con p-DNA-SARS-CoV-2 con las condiciones optimizadas . Se determinó si hay diferencia estadísticamente significativa de la velocidad de reacción de detección mediante un análisis múltiple con Dunnett (**p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001; ns significa que no hay significancia estadística) con $\alpha=0.05$ Las barras de error representan el promedio \pm d.e (n = 3).

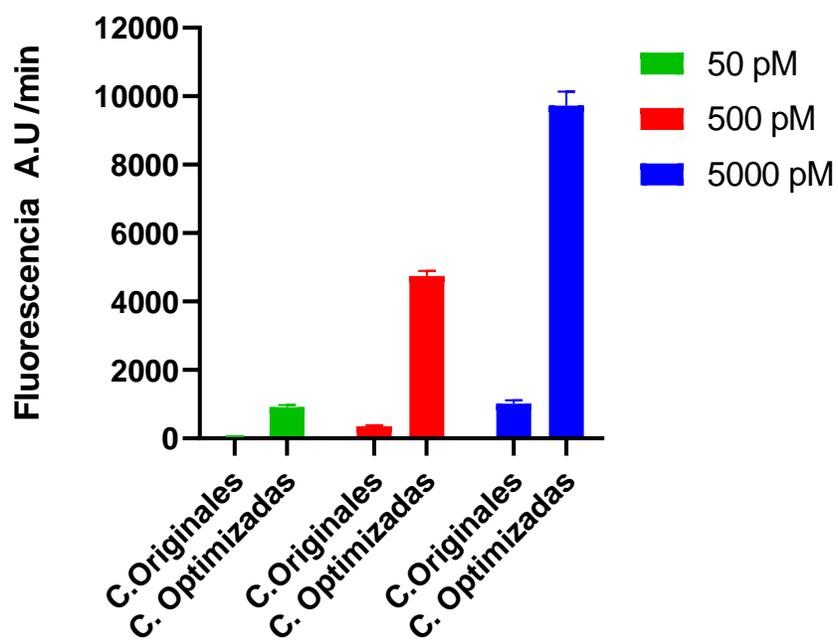


Figura 20. Comparación de las pendientes de la velocidad de reacción de detección de las condiciones originales y optimizadas con 50,500 y 5000 pM de DNA plasmídico del gen N que codifica a la nucleocápside del virus del SARS-CoV-2 . Las condiciones originales corresponden a temperatura de detección de 37°C, en amortiguador NEB 2.1, mientras que las condiciones optimizadas corresponden a temperatura de detección de 65°C, en amortiguador 2 de sales de acetato +4% Polietilenglicol 8000 (PEG-8000).

9 CONCLUSIÓN.

La optimización del sistema CRISPR-Cas12a para la detección del gen N del virus del SARS-CoV-2 mejoró significativamente tanto la velocidad de reacción como la sensibilidad, reduciendo el tiempo necesario para alcanzar la señal máxima de fluorescencia.

En conjunto, las condiciones optimizadas (temperatura de detección de 65°C, relación estequiométrica de gRNA:AsCas12a de 1:1, en amortiguador 2 de sales de acetatos+ PEG 8000) lograron incrementar hasta diez veces la velocidad de detección y, con ello, la sensibilidad del método en comparación con las condiciones originales. Estas optimizaciones redujeron el tiempo necesario para alcanzar la señal máxima de fluorescencia a un rango de 5-10 minutos.

A pesar de estas mejoras, el límite de detección (LoD) permaneció invariable, siendo 500 pM de pDNA la concentración mínima detectable y estadísticamente distinguible del control negativo en ambas condiciones. Podría haber una diferencia en el LoD entre ambas metodologías en el rango de 50 pM y 500 fM, lo cual requeriría una investigación adicional en este rango de concentraciones para confirmarse.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. Brief Report: A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382(8):727. doi:10.1056/NEJMORA2001017
2. WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data. Published 2023. Accessed June 9, 2023. <https://covid19.who.int/>
3. Declaración acerca de la decimoquinta reunión del Comité de Emergencias del Reglamento Sanitario Internacional (2005) sobre la pandemia de enfermedad por coronavirus (COVID-19). Accessed June 9, 2023. [https://www.who.int/es/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic](https://www.who.int/es/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic)
4. Nouri R, Tang Z, Dong M, Liu T, Kshirsagar A, Guan W. CRISPR-based detection of SARS-CoV-2: A review from sample to result. *Biosens Bioelectron.* 2021;178. doi:10.1016/j.bios.2021.113012
5. Ebrahimi S, Khanbabaei H, Abbasi S, et al. CRISPR-Cas System: A Promising Diagnostic Tool for Covid-19. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2022;14(1):3. doi:10.18502/AJMB.V14I1.8165
6. Dara M, Talebzadeh M. CRISPR/Cas as a Potential Diagnosis Technique for COVID-19. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2020;12(3):201. Accessed June 16, 2023. </pmc/articles/PMC7368118/>
7. Hernandez-Garcia A, Morales-Moreno MD, Valdés-Galindo EG, Quezada A, Jimenez-Nieto EP. Diagnostics of COVID-19 Based on CRISPR–Cas Coupled to Isothermal Amplification: A Comparative Analysis and Update. *Diagnostics.* 2022;12(6). doi:10.3390/DIAGNOSTICS12061434/S1

8. Morales-moreno, Melissa D, Reza MM, Fiordelasio T, Valdés EG. Multiplex gRNAs Synergically Enhance Detection of SARS-CoV-2 by CRISPR-Cas12a. *CRISPR J.* 2023;6(2):1-11. doi:10.1089/crispr.2022.0074
9. Qiu M, Ming X, Lei Z. Improved Strategies for CRISPR - Cas12 - based Nucleic Acids Detection. *J Anal Test.* 2022;6(1):44-52. doi:10.1007/s41664-022-00212-4
10. Hsieh K, Zhao G, Wang T huei. Applying biosensor development concepts to improve preamplification-free CRISPR/Cas12a-Dx. *Royal Society of Chemistry.* 2020;145:4880-4888. doi:10.1039/d0an00664e
11. Yang H, Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. doi:10.1038/s41579-021-00630-8
12. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. doi:10.3389/fcimb.2020.587269
13. He Y, Zhou Y, Wu H, Kou Z, Liu S, Jiang S. Mapping of Antigenic Sites on the Nucleocapsid Protein of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Clin Microbiol.* 2004;42(11):5309. doi:10.1128/JCM.42.11.5309-5314.2004
14. CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel For Emergency Use Only Instructions for Use.
15. Javalkote VS, Kancharla N, Bhadra B, et al. CRISPR-based assays for rapid detection of SARS-CoV-2. *Methods.* 2022;203:594-603. doi:10.1016/j.ymeth.2020.10.003
16. Broughton JP, Deng X, Yu G, et al. CRISPR – Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol.* 2020;38(July). doi:10.1038/s41587-020-0513-4
17. Bhardwaj P, Kant R, Behera SP, Dwivedi GR, Singh R. Next-Generation Diagnostic with CRISPR/Cas: Beyond Nucleic Acid Detection. *Int J Mol Sci.* 2022;23(11). doi:10.3390/IJMS23116052

18. Ooi KH, Liu MM, Tay JWD, et al. An engineered CRISPR-Cas12a variant and DNA-RNA hybrid guides enable robust and rapid COVID-19 testing. *Nature Communications* 2021 12:1. 2021;12(1):1-23. doi:10.1038/s41467-021-21996-6
19. INSTRUCTIONS FOR USE Sherlock™ CRISPR SARS-CoV-2 kit Rx Only For Emergency Use Authorization (EUA) only. Published online 2022.
20. Paul B, Montoya G. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. *Biomed J.* 2020;43(1):8-17. doi:10.1016/J.BJ.2019.10.005
21. Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, et al. Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell.* 2016;165(4):949. doi:10.1016/J.CELL.2016.04.003
22. Zeng M, Ke Y, Zhuang Z, et al. Harnessing Multiplex crRNA in the CRISPR/Cas12a System Enables an Amplification-Free DNA Diagnostic Platform for ASFV Detection. *Anal Chem.* 2022;94(30):10805-10812. doi:10.1021/acs.analchem.2c01588
23. Yue H, Shu B, Tian T, et al. Droplet Cas12a Assay Enables DNA Quantification from Unamplified Samples at the Single-Molecule Level. *Nano Lett.* 2021;21(11):4643-4653. doi:10.1021/acs.nanolett.1c00715
24. Fuchs RT, Curcuru JL, Mabuchi M, et al. Characterization of Cme and Yme thermostable Cas12a orthologs. *Commun Biol.* 2022;5(1). doi:10.1038/s42003-022-03275-2
25. Mohanraju P, Mougias I, Albers J, et al. Development of a Cas12a-Based Genome Editing Tool for Moderate Thermophiles. *CRISPR J.* 2021;4(1):82. doi:10.1089/CRISPR.2020.0086
26. Lv H, Wang J, Zhang J, et al. Definition of CRISPR Cas12a Trans-Cleavage Units to Facilitate CRISPR Diagnostics. *Front Microbiol.* 2021;12(November):1-8. doi:10.3389/fmicb.2021.766464

27. Li Z, Zhao W, Ma S, Li Z, Yao Y, Fei T. A chemical-enhanced system for CRISPR-Based nucleic acid detection. *Biosens Bioelectron.* 2021;192(April):113493. doi:10.1016/j.bios.2021.113493
28. Qiu M, Ming X, Lei Z. Improved Strategies for CRISPR - Cas12 - based Nucleic Acids Detection. *J Anal Test.* 2022;6(1):44-52. doi:10.1007/s41664-022-00212-4
29. Li Z, Zhao W, Ma S, Li Z, Yao Y, Fei T. A chemical-enhanced system for CRISPR-Based nucleic acid detection. *Biosens Bioelectron.* 2021;192(April):113493. doi:10.1016/j.bios.2021.113493
30. Peixiang Ma, Qingzhou Meng, Baoqing Sun, Bing Zhao, Lu Dang, Mingtian Zhong, Siyuan Liu, Hongtao Xu, Hong Mei, Jia Liu, Tian Chi, Guang Yang, Ming Liu,* Xingxu Huang and XW. MeCas12a a Highly Sensitive and Specific System for COVID-19 Detection.pdf. *Advanced Science.* 2020;7:9.
31. Nouri R, Tang Z, Dong M, Liu T, Kshirsagar A, Guan W. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . 2020;(January).
32. Li Z, Zhao W, Ma S, Li Z, Yao Y, Fei T. A chemical-enhanced system for CRISPR-Based nucleic acid detection (supplimentary). *Biosens Bioelectron.* 2021;192:1-28. doi:10.1016/j.bios.2021.113493
33. Deng F, Li Y, Li B, Goldys EM. Increasing trans-cleavage catalytic efficiency of Cas12a and Cas13a with chemical enhancers: Application to amplified nucleic acid detection. *Sens Actuators B Chem.* 2022;373:132767. doi:10.1016/J.SNB.2022.132767
34. Raghuwanshi VS, Yu B, Browne C, Garnier G. Reversible pH Responsive Bovine Serum Albumin Hydrogel Sponge Nanolayer. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:521797. doi:10.3389/FBIOE.2020.00573/BIBTEX

35. Leonard WJ, Vijai KK, Foster JF. A Structural Transformation in Bovine and Human Plasma Albumins in Alkaline Solution as Revealed by Rotatory Dispersion Studies*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 1963;238(6). doi:10.1016/S0021-9258(18)67930-X
36. Barbosa LRS, Ortore MG, Spinozzi F, Mariani P, Bernstorff S, Itri R. The Importance of Protein-Protein Interactions on the pH-Induced Conformational Changes of Bovine Serum Albumin: A Small-Angle X-Ray Scattering Study. doi:10.1016/j.bpj.2009.09.056
37. Polyethylene Glycol - PubChem. Accessed September 1, 2023. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Polyethylene%20Glycol>
38. Wu J, Zhao C, Lin W, et al. Binding characteristics between polyethylene glycol (PEG) and proteins in aqueous solution. 2:2949-3150. doi:10.1039/c4tb00253a
39. Stella S, Alcón P, Montoya G. Structure of the Cpf1 endonuclease R-loop complex after target DNA cleavage. *Nature* 2017 546:7659. 2017;546(7659):559-563. doi:10.1038/NATURE22398
40. Li B, Yan J, Zhang Y, et al. CRISPR-Cas12a Possesses Unconventional DNase Activity that Can Be Inactivated by Synthetic Oligonucleotides. doi:10.1016/j.omtn.2019.12.038
41. Triton X-100 | C16H26O2 | CID 5590 - PubChem. Accessed September 1, 2023. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5590>
42. Deng F, Li Y, Li B, Goldys EM. Increasing trans-cleavage catalytic efficiency of Cas12a and Cas13a with chemical enhancers: Application to amplified nucleic acid detection. Published online 2022. doi:10.1016/j.snb.2022.132767
43. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing. Published online 2020.
44. Özay B, McCalla SE. A review of reaction enhancement strategies for isothermal nucleic acid amplification reactions. *Sensors and Actuators Reports*. 2021;3:100033. doi:10.1016/J.SNR.2021.100033

11 ANEXO

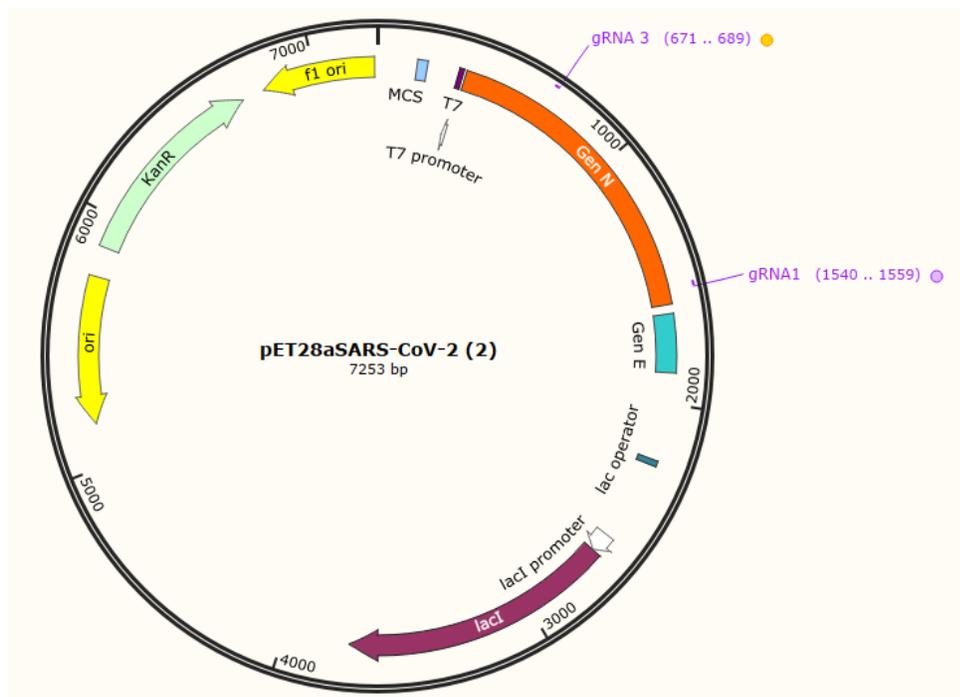


Figura 21. Plásmido pET28aSARS-CoV-2 del gen N del virus del SARS-CoV-2. Se muestra el plásmido de 7253 bp y en morado se señalan donde hibridan los gRNAs guías 1 y 3.

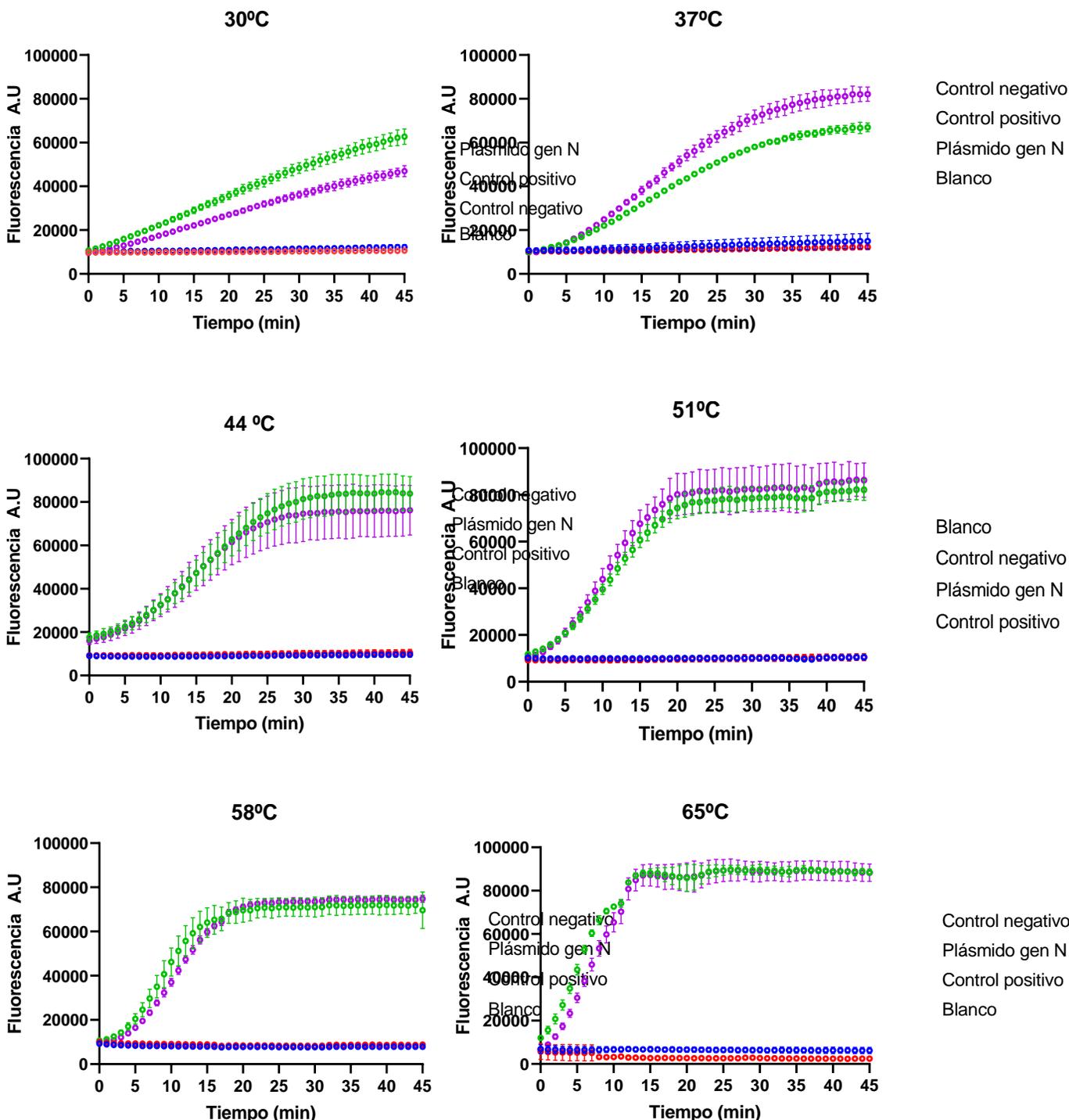


Figura 22. Detección del gen N del DNA plasmídico pET28aSARS-CoV-2 del virus del SARS-CoV-2 a diferentes temperaturas para la optimización de la temperatura. Se muestra la reacción de detección del plásmido (verde) a 30, 37, 44, 51, 58, y 65°C con el sistema CRISPR-Cas12a, junto con su control positivo (morado) que es un plásmido de pET28aSARS-CoV-2 previamente verificado por análisis de restricción, control negativo (rojo) y blanco de la reacción (azul) más su desviación estándar con n=3.

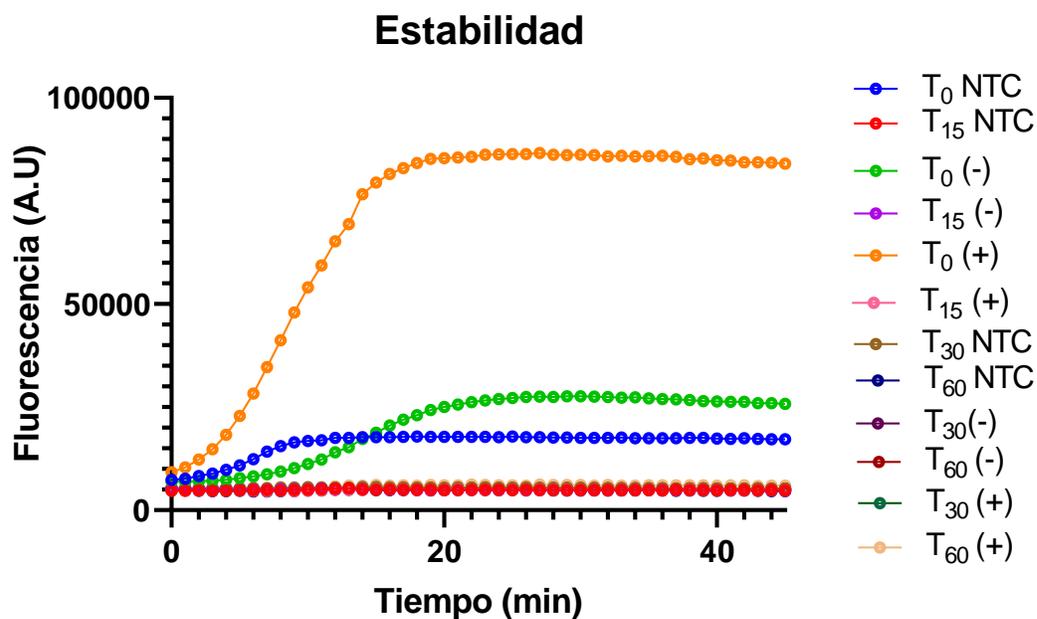


Figura 23. Estabilidad del RNP a 65°C a 0, 15, 30 y 60 minutos de incubación. Se pre-incubó previamente el complejo RNP a diferentes tiempos, a 0, 15, 30 y 60 minutos (T_0 , T_{15} , T_{30} y T_{60}) a 65°C, posteriormente se añadió el DNA objetivo y se leyó en el lector de placas de fluorescencia (cytation) a 65°C para determinar la actividad colateral *trans* de la proteína Cas12a. En donde, NTC es el blanco, (-) es el control negativo y (+) es el plásmido con el gen N del plásmido del SARS-CoV-2. Se observa que la proteína a partir de los 15 minutos a 65°C pierde su actividad colateral *trans*, lo que se traduce en una pérdida de la señal de fluorescencia. Realizado por Melissa M.

12 LISTA DE ABREVIATURAS

+

+ssRNA · cadena positiva de RNA

A

A.U · *Arbitrary Units (Unidades arbitrarias)*

Apo · *Cas12a sin gRNA*

AsCas12a · *Acidaminococcus sp. Cas12a*

Asp · *Accidaminococcus sp. Cas12a*

B

BSA · Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)

C

Cas · CRISPR-associated proteins (Proteínas asociadas a CRISPR), proteína asociada a CRISPR

CDC · Center for Disease Control and Prevention

Cme · metagenoma de compost Cas12a

COVID-19 · *enfermedad del coronavirus*

CRISPR · Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (Repeticiones Palindromicas Cortas agrupadas y Regularmente Interespaciadas)

CRISPR-Cas12a · CRISPR asociado a proteína Cas12a

crRNA · RNA CRISPR

Cytation 5 · lector Multi-Modal con Captura de imágenes Celulares

D

DETECTR · (DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter)

DTT · *Ditiotreitol*

E

E · *envoltura*

enAsCas12a · enhanced *Acidaminococcus sp.* Cas12a variant

F

FDA · Food and Drug Administration

Fno · *Francisella tularensis* Cas12a

G

gen N · *gen que codifica a la nucleocapside*

gRNA · RNA guía

I

IDT · Integrated DNA Technologies

L

LB · Luria-Bertani

Lba · Lachnospiraceae Cas12a

LbCas12a · Lachnospiraceae bacterium

LoD · Limit of Detection

M

M · *membrana*

MQ · Mili Q

N

N · nucleocápside

NEB · New England Biolabs

ns · proteínas no estructurales

NTC · *No Template Control* (Blanco)

NTS · *Non-Target Strand* (Hebra no objetivo)

O

OMS · Organización Mundial de la Salud

ORFs · marcos abiertos de lectura

P

PAM · Protospacer Adyacent Motif

pDNA · *Plasmid DNA* (*DNA plasmídico*)

PEG · Polietilenglicol

PEG-200 · Polietilenglicol 200

PEG-20000 · Polietilenglicol 20000

PEG8000 · polietilenglicol 8000

Q

qRT-PCR · Quantitative Reverse Transcription
Polymerase Chain Reaction

R

RNP · ribonucleoproteína

RT-LAMP · *Reverse Transcription Loop-Mediated
Isothermal Amplification*

S

S · *espiga*

SARS-CoV-2 · *Severe Acute Respiratory
Syndrome Coronavirus 2* (beta coronavirus
tipo 2 causante del síndrome respiratorio
agudo severo)

SHERLOCK · Specific High-Sensitive Enzymatic
Reporter Unlocking

ssDNA · single-stranded DNA (DNA de cadena
sencilla)

ssRNA · *single-stranded RNA* (*ARN de cadena sencilla*)

T

T_m · *melting Temperature* (*Temperatura de fusión*)

Tris · Tris(hidroximetil)aminometano

TS · *Target Strand* (Hebra objetivo)

V

VaNGuard · Variant Nucleotide Guard

Y

Yme · metagenoma Yellowstone Cas12a