

Aplicación de Caspr Cas 13 para la detección del coronavirus Covid -19

Un protocolo para la detección de COVID-19 utilizando diagnósticos CRISPR (v.20200321)

Feng Zhang ^{1,2,3,4,5}, Omar O. Abudayyeh ³, Jonathan S. Gootenberg ³

*** A medida que continuamos optimizando este protocolo, iremos subiendo versiones actualizadas.

*** Las preguntas y comentarios deben dirigirse a FZ (zhang@broadinstitute.org), OOA (Omarabu@mit.edu) y JSG (jgoot@mit.edu)

*** Los grupos interesados en probar este protocolo utilizando muestras de pacientes pueden solicitar orientación enviando un correo electrónico sherlock@broadinstitute.org, y un número limitado de muestras iniciales de Cas13 la enzima, el ARNr y el indicador de flujo lateral están disponibles bajo pedido

*** **NOTA IMPORTANTE: Este protocolo no debe usarse con fines clínicos** . Nosotros hacemos no tiene acceso a muestras de pacientes y, como resultado, no ha podido validar este ensayo utilizando muestras de pacientes reales. Damos la bienvenida a los investigadores que trabajan con muestras de COVID-19 para contactarnos y podemos proporcionar un kit de inicio para probar este sistema. Esperamos que este protocolo proporcione algunos puntos de referencia para investigadores interesados en seguir avanzando en este sistema de diagnóstico y también invitamos a los investigadores a contactarnos para asistencia u orientación.

Afiliaciones: (1) Instituto Médico Howard Hughes, Cambridge, MA 02139, Estados Unidos; (2) Amplio

Instituto del MIT y Harvard, Cambridge, MA 02142, Estados Unidos; (3) Instituto McGovern para el cerebro; (4) Departamento de Ciencias Cerebrales y Cognitivas, (5) Investigación en el MIT Departamento de Biología Ingeniería, Instituto de Tecnología de Massachusetts, Cambridge, MA 02139, EE. UU

A. Descripción general

El reciente brote del coronavirus COVID-19 se puede diagnosticar usando qPCR, pero el acceso inadecuado a reactivos y equipos ha retrasado la detección de enfermedades. Para ayudar a avanzar el diagnóstico de COVID-19, describimos aquí un protocolo para usar el **SHERLOCK** basado en CRISPR (Desbloqueo de reportero enzimático de alta sensibilidad específica) para la detección de COVID-19. Usando fragmentos sintéticos de ARN del virus COVID-19, hemos podido consistentemente detectar secuencias objetivo de COVID-19 en un rango entre 20 y 200 aM (10-100 copias por microlitro de entrada). La prueba puede llevarse a cabo comenzando con ARN purificado de muestras de pacientes, como se usa para los ensayos de qRT-PCR, y se puede leer con una varilla de medición en menos de una hora, sin que requiere instrumentación elaborada.

El protocolo de detección SHERLOCK COVID-19 funciona en tres pasos y se puede completar en una hora, a partir de la extracción de ácido nucleico como se usa para las pruebas de qRT-PCR.

Paso (1) - 25 minutos de incubación - amplificación isotérmica del ácido nucleico extraído de la muestra usando un kit de amplificación de recombinasa polimerasa (RPA) disponible comercialmente;

Paso (2) - 30 minutos de incubación - detección de la secuencia de ARN viral preamplificada usando Cas13;

Paso (3) - 2 minutos de incubación - lectura visual del resultado de la detección por ojo usando una varilla de medición de papel disponible comercialmente.

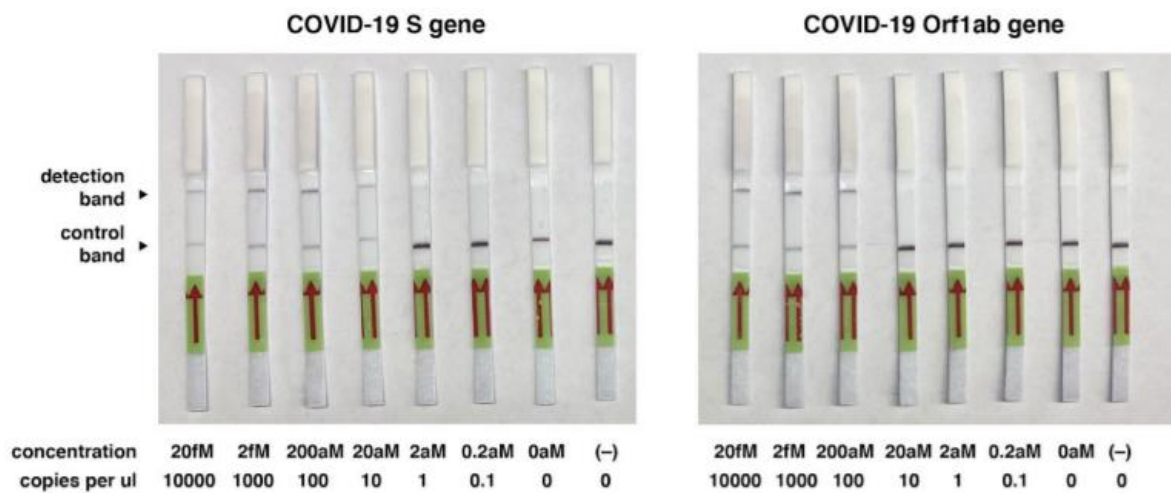
Las siguientes secciones detallan los reactivos necesarios, así como el procedimiento.

B. Especificaciones del ensayo

Para verificar la presencia de ARN de COVID-19 en las extracciones de muestras de ácido nucleico, dos los objetivos fueron elegidos en el genoma COVID-19 del gen S y el gen Orf1ab. RPA

Los cebadores de amplificación y los ARN guía CRISPR LwaCas13a se diseñaron para detección. Para maximizar la especificidad del ensayo, seleccionamos secuencias de guía que minimiza fuera de los objetivos a los genomas relacionados del virus respiratorio humano.

Mediante el uso de diluciones en serie del gen sintético COVID-19 S y fragmentos de ARN del gen Orf1ab, fuimos capaces de detectar la presencia de secuencia de ARN de COVID-19 sintética en un rango entre 10-100 copias por microlitro. A continuación se muestran imágenes de ejemplo de la lectura de flujo lateral para diferentes entradas concentraciones:



C. Materiales y reactivos

Extracción de muestras y ácido nucleico:

La muestra del paciente debe recogerse de acuerdo con los procedimientos de bioseguridad apropiados.

Consulte el protocolo de prueba 2020 CDC COVID-19 para obtener detalles sobre la muestra recogida y posterior extracción de ácido nucleico. La entrada para este

protocolo, comenzando con el Paso (1), puede ser el mismo ácido nucleico extraído que el utilizado en los ensayos de qRT-PCR.

Reactivos:

Para el paso (1) amplificación isotérmica:

- TwistAmp® Basic (TABAS03KIT), TwistDx Limited
- Transcriptasa inversa ProtoScript® II (M0368L), New England BioLabs
- Par de cebadores de amplificación RPA dirigido al gen S (S-RPA-Forward_v1: 5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGGTTTCAAACCTTACTTGCTT TACATAGA-3'; S-RPA-Reverse_v1: 5'-TCCTAGGTTGAAGATAACCCACATAATAAG-3'), se puede pedir a IDT
- Par de cebadores de amplificación RPA dirigido a Orf1ab (Orf1ab-RPA-Forward_v1: 5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGGCGAAGTTGTAGGAGACATTAT ACTTAAACC-3'; Orf1ab-RPA-Reverse_v1: 5'-TAGTAAGACTAGAATTGTCTACATAAGCAGC-3'), se puede pedir a

Para la detección del Paso (2) del ARN del virus usando Cas13:

- Tampón de escisión (Tris 400 mM, pH 7,4 en ddH2O). Preparado con 1M Tris pH 7.4 solución madre de Sigma Aldrich (T2194-100ML)
- Inhibidor de ARNasa SUPERase • In™ (AM2694), ThermoFisher Scientific
- NxGen® T7 RNA Polymerase (30223-1), Lucigen
- Conjunto de solución de ribonucleótidos (N0450S), New England BioLabs
- Solución de cloruro de magnesio (63069-100ML), Sigma Aldrich
- Tampón de almacenamiento para diluir el stock de proteínas Cas13 (combine 2.5 ml de Tris pH 1M 7.4, 6 ml de NaCl 5 M, 2.5 ml de glicerol y 100 µL de DTT 1 M, y 38.9 ml ddH2O)
- Proteína LwaCas13a purificada según Kellner et al., Nature Protocols 2019, almacenado como alícuotas de 4 ul a 2 mg / ml.
- LwaCas13a crRNA para detectar el gen S (S-crRNA_v1: 5'-GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACGCAGCACC AGCUGUCCAACCUGAAGAAG-3'), se puede pedir a Synthego
- LwaCas13a crRNA para detectar el gen Orf1ab (Orf1ab-crRNA_v1: 5'-GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACCCAACCUUCU UCUGUAAUUUUUAAACUAU-3'), se puede pedir a Synthego
- Reporter RNA para lectura de flujo lateral (Lateral-Flow-Reporter: 5'- / 56-FAM / mArArUrGrGrCmAmArArUrGrGrCmA / 3Bio / -3'), se pueden pedir de IDT

Para la lectura del Paso (3) usando la varilla medidora de flujo lateral:

- Varilla de medición HybriDetect (MGHD 1), Milenia Biotec GmbH
- Secuencias de control positivo (se pueden producir usando la transcripción T7 de sintetizado

Oligos de ADN):

- Fragmento del gen S: 5'-UAACAUCACUAGGUUUCAAACUUUACUUGCUUUACAUAGAAGUU AUUUGACUCCUGGUGAUUCUUCUUCAGGUUGGACAGCUGGUGCUGC AGCUUAAUUAUGUGGGUUAUCUUCACCUAGGACUUUUCUAUUAAAA UAUA AUGAAAAUGGAACCAUUACAGAUGCUGUAGACUGUGC-3'
- Fragmento del gen Orf1ab:

5'-UGAGUGUAAUGUGAAAACUACCGAAGUUGUAGGAGACAUUAUAC
UUAACCAGCAAUAAUAGUUUAAAAUUACAGAAGAGGUUGGCCA
CACAGAUCUAAUGGCUGCUUAUGUAGACAAUUCUAGUCUUAUAUU
AAGAAACCUAAUGAAUUAUCUAG-3'

Equipo:

- 37C baño de agua
- Baño de agua 42C
- Microcentrífuga para centrifugar tubos de ensayo de 1,5 ml

D. Protocolo experimental

*** NOTA IMPORTANTE: Para evitar la contaminación de la muestra por resultados de detección confusos,

Se deben utilizar dos áreas de trabajo diferentes para realizar los Pasos (1) y (2). El paso (1) debe ser realizado en un área de preamplificación y es especialmente sensible a la contaminación.

Amplificado

Las muestras no deben abrirse en el área de trabajo del Paso (1). Un área separada para las reacciones posteriores a la amplificación deben usarse para realizar el Paso (2) del protocolo. Después de la incubación, las reacciones del Paso (1) solo deben abrirse en el área posterior a la amplificación.

Además, solo realice las reacciones del Paso (3) en el área posterior a la amplificación.

*** NOTA IMPORTANTE: Todas las reacciones deben establecerse en hielo antes de la incubación en la temperatura designada

Paso (1) - Amplificación isotérmica, que se realizará en el área de trabajo de preamplificación:

Para analizar cada muestra, configure dos reacciones RPA, para la detección del objetivo del gen S y Orf1ab objetivo respectivamente. Además, se pueden establecer controles positivos para el gen S y Orf1ab usando un fragmento de virus sintético. Un control negativo sin muestras de prueba agregadas debería se debería establecer. Vuelva a poner en suspensión a cada gránulo RPA liofilizado usando 29.5 ul del tampón de rehidratación suministrado en el kit RPA.

Para el objetivo del gen S, cada reacción se puede configurar de la siguiente manera:

1. Solución de RPA resuspendida	5.9 ul
2. S-RPA-Forward_v1 (10 uM)	0.5 ul
3. S-RPA-Reverse_v1 (10 uM)	0.5 ul
4. ProtoScript RT (100,000U / mL)	0,2 ul
5. ddH2O	1.4 u
6. Muestra	1ul

7. MgAc (suministrado en kit RPA)	0,5 ul
7. Total	10 ul

Mezclar bien e incubar cada reacción a 42 ° C durante 25 minutos en el precalentado baño de agua. Después de la incubación, coloque la reacción en hielo inmediatamente hasta que esté listo para añadir a la reacción en el paso (2)

Paso (2) - Detección de secuencia de ARN viral usando Cas13

Tome una alícuota de la proteína de reserva LwaCas13a (2 mg / ml, 4 ul), resuspenda usando 122.5 uL de búfer de almacenamiento.

Para cada reacción RPA del gen S, configure una reacción de detección Cas13 de la siguiente manera:

1. Tampón de escisión (Tris 400 mM pH 7,4)2 ul
2. ddH2O 9.6..... ul
3. Proteína LwaCas13a (resuspendida)2 ul
4. S-crRNA_v1 (10 ng / ul)..... 1 ul
5. Indicador de flujo lateral (20 uM)1 ul
6. SUPERase • In RNase Inhibitor1 ul
7. Lucigen T7 Polimerasa ,.....0.6 ul
8. Solución de ribonucleótidos..... 0.8 ul
9. MgCl2 (120 mM)1 ul
10. Reacción RPA del Paso (1).....1 ulTotal 20 ul

Para el objetivo del gen Orf1ab, cada reacción se puede configurar de la siguiente manera:

1.Solución de RPA resuspendida	5,9 ul
2. Orf1ab-RPA-Forward_v1 (10 uM) 0.5 ul	0,5 ul
3. Orf1ab-RPA-Reverse_v1 (10 uM)	0.5 ul
4. ProtoScript RT (100,000U / mL)	0.2 ul
5. ddH2O	1,4ul
6. Muestra	1 ul
7. MgAc (suministrado en el kit RPA) 0.5 ul	0,5 ul
Total 10 ul	10 ul

Para cada reacción RPA del gen Orf1ab, configure una reacción de detección Cas13 de la siguiente manera:

1. Tampón de escisión (Tris 400 mM pH 7,4) 2 ul
2. ddH2O 9.6 ul
3. Proteína LwaCas13a (resuspendida) 2 ul
4. Orf1ab-crRNA_v1 (10 ng / ul) 1 ul
5. Indicador de flujo lateral (20 uM) 1 ul

6. SUPERase • In RNase Inhibitor 1 ul
7. Lucigen T7 Polimerasa 0.6 ul
8. Solución de ribonucleótidos 0.8 ul
9. MgCl₂ (120 mM) 1 ul
10. Reacción RPA del Paso (1) 1 ul

Total 20 ul

Después de configurar todas las reacciones, agitar en vórtex para mezclar bien, centrifugar en una centrífuga e incubar a 37 ° C durante 30 minutos en un baño de agua precalentado. Después de la incubación, coloque los tubos de reacción en el congelador y procedan al Paso (3) para leer el flujo lateral.

Después del paso (2), agregue 80 ul de tampón de ensayo HybriDetect a cada reacción de 20 ul y mezcla fondo. Coloque la reacción diluida en una rejilla de tubos a temperatura ambiente.

Coloque una varilla de medición HybriDetect en cada tubo de reacción y espere a que la reacción fluya a través de la varilla medidora.

Las muestras de control positivo deben mostrar dos líneas y las muestras de control negativo solo deben mostrar el resultado final.

Para cada muestra de prueba, verifique si aparecen dos líneas para los genes S y Orf1ab, indicando un resultado positivo de COVID-19.

E. Información adicional

Puede encontrar un protocolo general detallado para configurar la detección basada en SHERLOCK en la siguiente referencia:

- SHERLOCK: detección de ácido nucleico con nucleasas CRISPR. Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, Abudayyeh OO y Zhang F. *Protocolos de la naturaleza*. 2019Oct; 14 (10): 2986-3012. doi: 10.1038 / s41596-019-0210-2.