ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ /
APPLIED BIOCHEMISTRY AND MICROBIOLOGY. 2026. Т. 62. № 5. С. 729–740

DOI: 10.7868/S3034574X26050052 Оригинальная статья

УДК 577.217:663.1

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ НИЗКОЭНДОТОКСИНОВОГО ПРЕПАРАТА НУКЛЕАЗЫ SpCas9 И МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЕЕ АКТИВНОСТИ IN VITRO

Ю. А. Ходак[1], П. И. Воробьев[1], Н. А. Орлова[1], И. И. Воробьев[1,*]

[1]*Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация*

**E-mail: ptichman@gmail.com*

Аннотация. Нуклеаза Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) является одним из основных инструментов редактирования генома и широко используется в составе рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9. При получении рекомбинантной SpCas9 в *Escherichia coli* существенной проблемой является загрязнение препарата бактериальными белками, нуклеиновыми кислотами и липополисахаридами, которые могут снижать эффективность трансфекции и вызывать нежелательные клеточные ответы. Целью работы была разработка воспроизводимого метода получения препарата SpCas9 с пониженным содержанием эндотоксина и создание количественного теста для оценки активности нуклеазы *in vitro*. SpCas9 (NLS-6His) экспрессировали в клетках *E. coli* Rosetta2[DE3] и очищали двумя стадиями хроматографии: металлохелатной на Ni-Sepharose и катионообменной на сорбенте Capto S ImpRes. В протокол была введена высокосолевая промывка колонки в присутствии Triton X-100, обеспечивающая диссоциацию комплексов белка с бактериальными нуклеиновыми кислотами и липополисахаридами. В результате содержание двуцепочечной ДНК в препарате снизилось с 5,1 до 0,72 мкг/мг белка, а уровень эндотоксина составил 11 ЕЭ/мг, что примерно на три порядка ниже по сравнению с коммерческим препаратом сравнения (9400 ЕЭ/мг). Выход очищенного белка составил 16 мг с 1 л культуры. Активность SpCas9 оценивали по расщеплению ПЦР-фрагмента ДНК-мишени в присутствии направляющей РНК с количественной денситометрией продуктов электрофореза. Удельная активность полученного препарата была сопоставима с коммерческим контролем. Разработанный протокол позволяет получать функционально активный препарат SpCas9 с пониженным содержанием эндотоксина и может быть использован для подготовки рибонуклеопротеиновых комплексов для редактирования генома клеток млекопитающих.

Ключевые слова: SpCas9; эндотоксин; Escherichia coli; металлохелатная хроматография; катионообменная хроматография; рибонуклеопротеиновый комплекс; тест активности in vitro

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках дополнительного государственного задания (номер темы 125052006274-4).

© Ю. А. Ходак, П. И. Воробьев, Н. А. Орлова, И. И. Воробьев, 2026

Сокращения: SpCas9 — нуклеаза Cas9 из *Streptococcus pyogenes*; CRISPR — clustered regularly interspaced short palindromic repeats; РНП (RNP) — рибонуклеопротеиновый комплекс; ЛПС — липополисахарид; ЛАЛ (LAL) — Limulus amebocyte lysate; гРНК (gRNA) — направляющая РНК; дцДНК — двуцепочечная ДНК; ОРС — открытая рамка считывания; NLS — сигнал ядерной локализации; MBP — мальтозо-связывающий белок; GFP — зеленый флуоресцентный белок; DUBs — деубиквитинирующие ферменты; SUMO — малый убиквитин-подобный модификатор; ИПТГ — изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид; ДСН-ПААГ — электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия; ПЦР — полимеразная цепная реакция; TBE — трис-боратный буфер с ЭДТА; IMAC — металлохелатная аффинная хроматография; ОП — оптическая плотность.

PRIKLADNAYA BIOKHIMIYA I MIKROBIOLOGIYA /
APPLIED BIOCHEMISTRY AND MICROBIOLOGY, 2026, vol. 62, no. 5, pp. 729–740

Соблюдение этических стандартов. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи.

Благодарность. Авторы выражают благодарность М. Шелепову (Институт биологии гена РАН) за предоставление плазмиды и за ценное обсуждение подходов к очистке рекомбинантной нуклеазы Cas9.

Ссылка цитирования: Ходак Ю.А., Воробьев П.И., Орлова Н.А., Воробьев И.И. Разработка метода получения низкоэндотоксинового препарата нуклеазы SpCas9 и метода количественного определения ее активности in vitro. *Прикладная биохимия и микробиология / Applied biochemistry and microbiology.* 2026. Т. 62. № 5. С. 729–740. https://doi.org/10.7868/S3034574X26050052

DOI: 10.7868/S3034574X26050052 Original Article

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR PRODUCING A LOW-ENDOTOXIN SPCAS9 NUCLEASE PREPARATION AND A METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ITS ACTIVITY IN VITRO

Yu. A. Khodak[1], P. I. Vorobiev[1], N. A. Orlova[1], I. I. Vorobiev[1,*]

[1]Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**E-mail: ptichman@gmail.com*

Abstract. Cas9 nuclease from *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) is a principal genome-editing tool widely used in CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. During recombinant production of SpCas9 in *Escherichia coli*, contamination of the preparation with bacterial proteins, nucleic acids, and lipopolysaccharides is a major problem because these impurities may reduce transfection efficiency and induce undesirable cellular responses. The aim of this study was to develop a reproducible method for obtaining an SpCas9 preparation with reduced endotoxin content and to establish a quantitative assay for evaluating nuclease activity *in vitro*. SpCas9 (NLS-6His) was expressed in *E. coli* Rosetta2[DE3] cells and purified by two chromatographic steps: immobilized-metal affinity chromatography on Ni-Sepharose and cation-exchange chromatography on Capto S ImpRes. The protocol included a high-salt column wash in the presence of Triton X-100, which dissociated protein complexes with bacterial nucleic acids and lipopolysaccharides. The double-stranded DNA content decreased from 5.1 to 0.72 μg per mg of protein, and the endotoxin level was 11 EU per mg, approximately three orders of magnitude lower than in the commercial reference preparation (9400 EU per mg). The yield of purified protein was 16 mg per liter of culture. SpCas9 activity was evaluated by cleavage of a PCR-generated target DNA fragment in the presence of guide RNA followed by quantitative densitometry of electrophoretic products. The specific activity of the preparation was comparable to that of the commercial control. The developed protocol makes it possible to obtain a functionally active SpCas9 preparation with a reduced endotoxin content and can be used to prepare ribonucleoprotein complexes for genome editing in mammalian cells.

Keywords: SpCas9; endotoxin; Escherichia coli; immobilized-metal affinity chromatography; cation-exchange chromatography; ribonucleoprotein complex; in vitro activity assay

© Yu. A. Khodak, P. I. Vorobiev, N. A. Orlova, I. I. Vorobiev, 2026

Funding. The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of an additional state assignment (research topic no. 125052006274-4).

Ethics declarations. This article does not contain descriptions of any studies involving humans or animals as research subjects.

Conflict of interests. Authors declare that they have no conflict of interest.

Authors contributions. All authors made substantial contributions to the study conception and design, conduct of the research, and preparation of the manuscript.

Acknowledgements. The authors thank M. Shelepov (Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences) for providing the plasmid and for discussing approaches to purification of recombinant Cas9 nuclease.

For Citation: Khodak Yu.A., Vorobiev P.I., Orlova N.A., Vorobiev I.I. Development of a Method for Producing a Low-Endotoxin SpCas9 Nuclease Preparation and a Method for Quantitative Determination of Its Activity in vitro. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology.* 2026;62(5):729–740. (In Russ.) https://doi.org/10.7868/S3034574X26050052

ВВЕДЕНИЕ

Принципиальная возможность программируемого разрезания ДНК комплексом Cas9 с направляющей РНК была продемонстрирована в работе Дженнифер Дудны и Эммануэль Шарпантье, что положило начало широкому внедрению CRISPR/Cas9 в биологические исследования и биомедицинские разработки. [9] В наши дни нуклеаза Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) является ключевым компонентом системы CRISPR/Cas и одним из наиболее востребованных инструментов направленного редактирования генома.

Для доставки компонентов CRISPR/Cas9 в клетки применяют различные подходы, включая плазмидные конструкции, мРНК и рибонуклеопротеиновые комплексы (**РНП**). По сравнению с использованием плазмид, кодирующих Cas9 и направляющие РНК, формат РНП обеспечивает быстрый старт редактирования, ограниченное по времени присутствие активной нуклеазы в клетке и, как следствие, более низкий риск событий нецелевого редактирования (off-target), а также исключает риск нежелательной интеграции ДНК-конструктов в геном редактируемых клеток. Ранее при проведении экспериментов по мультиплексному редактированию генов в клетках CHO, выполняемых при помощи плазмид, кодирующих направляющие РНК (гРНК) и нуклеазу SpCas9, мы столкнулись с интеграцией фрагментов плазмидных последовательностей в геном клональных линий [12, 13], поэтому предположили, что для мультиплексного редактирования предпочтительно использовать РНП.

Широкое применение РНП при редактировании генома предполагает устойчивый доступ к препаратам SpCas9, получаемым, как правило, в *Escherichia coli*. Однако бактериальное происхождение продукта неизбежно сопряжено с загрязнением липополисахаридами (ЛАЛ-эндотоксинами, ЛПС), нуклеиновыми кислотами штамма-продуцента и сопутствующими белками. Удаление эндотоксинов из белковых растворов является одной из наиболее сложных задач при выделении и очистке белков из-за химической устойчивости ЛПС и их способности образовывать стабильные комплексы с белками. Обзор ключевых подходов к удалению эндотоксинов и факторов, влияющих на эффективность де-пирогенизации, приведен в обзорах [11, 14]. В контексте SpCas9 проблема усугубляется тем, что белок имеет высокую изоэлектрическую точку порядка 9,0 и, следовательно, при физиологическом pH имеет выраженный положительный заряд, что способствует формированию комплексов как с бактериальными нуклеиновыми кислотами, так и с липополисахаридами, и их отделение требует специальных технических решений.

Мы предположили, что удаление ЛАЛ-эндотоксина, а также удаление ДНК *E. coli* из препаратов SpCas9 может проводиться при помощи лизиса бактерий в присутствии неионного детергента Triton X-100 и однократной промывки колонки с металлохелатным сорбентом раствором, содержащим высокую концентрацию хлорида натрия и Triton X-100 с последующим удалением остатков детергента промывкой колонки растворами без Triton X-100 и окончательной очистки белка катионообменной хроматографией. Целью настоящей работы было разработать простой двухстадийный протокол очистки SpCas9, обеспечивающий снижение уровня эндотоксина без введения дополнительных стадий депирогенизации.

ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ И ОЧИСТКЕ SpCas9

Большинство методов экспрессии гена и очистки SpCas9 ориентированы на легкое получение белка заведомо низкой чистоты и не задают воспроизводимых критериев отделения нуклеиновых кислот, посторонних белков и эндотоксинов. Так, в лабораторном протоколе Hirsh (protocols.io) [8] описаны общие шаги экспрессии и очистки Cas9, в первую очередь – методом металлохелатной хроматографии, но отсутствует жесткая регламентация условий промывок и количественный контроль примесей, включая эндотоксин. Поскольку SpCas9 связывает и РНК (специфически) и дцДНК (неспецифически), и обладает дополнительно введенными щелочными сигналами ядерной локализации, то она обладает достаточно высоким положительным зарядом поверхности при нейтральном pH и может быть отделена от многих примесей катионообменной хроматографией, такой метод описан, в частности, в работе [15]. При необходимости Cas9 можно выделять из *E. coli* уже в форме готового РНП, однако в этом случае белок будет сильно загрязнен посторонней ДНК и белками, поскольку выделение полного РНП было бы невозможным при диссоциации комплексов SpCas9 с неспецифическими примесями, можно предположить, что такой препарат SpCas9 был бы непригоден для введения в культивируемые клетки млекопитающих [10]. Многие авторы при экспрессии гена SpCas9 вводят в состав ОРС целевого белка дополнительные белковые домены, предположительно увеличивающие растворимость целевого белка и облегчающие его очистку. В частности, в работе Fleitas и соавт. SpCas9 получают как слитый белок MBP-SpCas9-GFP для *in vitro* применений, что изменяет физико-химические свойства продукта; его использование для трансфекции клеток возможно только после отделения MBP (мальтозо-связывающего белка) при помощи протеазы TEV, при этом в работе предлагается использовать протеазу в массовом соотношении 1:1 с субстратом [7]. Процедура удаления примененной протеазы из получаемого препарата SpCas9-GFP в работе не описана, предположительно, высокие количества активной протеазы TEV могут быть токсичными для клеток в культуре. Аналогичные слитные белки MBP-Cas9 описаны в ряде патентов и патентных заявок, также предлагающих отделять домен MBP при помощи сайт-специфических протеаз и затем разделять продукты расщепления повторной хроматографией [19, 20].

Ряд современных работ стремится упростить получение Cas9. Duan и соавт. предложили одностадийную схему очистки целевого белка, сводящуюся к получению слитного белка с убиквитином [4, 5]. Этот небольшой белок потенциально увеличивает уровень экспрессии гетерологичных белков в *E. coli* [2], может способствовать их растворимости, и, возможно, отделяется от белка-партнера под действием деубиквитинирующих ферментов (DUBs), т. е. не требует ферментативного отделения от Cas9 при ее очистке. Данный метод получения Cas9 позволил успешно проводить редактирование генома в оплодотворенных икринках рыбы *Danio rerio* с доставкой в них РНП микроинъекцией, однако применимость такого препарата для электропорации клеток млекопитающих представляется затруднительной из-за возможного присутствия в Cas9 посторонней ДНК, примесных белков и эндотоксина из *E. coli*. Функционально схожий с убиквитином домен SUMO также был применен для получения SpCas9 в *E. coli* [6], в этом случае отделение домена проводилось *in vitro* при помощи высокоспецифичной SUMO-протеазы, а протокол очистки целевого белка включал три стадии хроматографии.

Помимо дизайна структуры белка SpCas9 в некоторых работах были изучены и другие факторы, влияющие на уровень экспрессии гена Cas9 в *E. coli*, в частности, было установлено, что в ряду штаммов BL21(DE3)-pLysS, BL21(DE3)-Star, BL21[DE3], Rosetta2 уровень общего биосинтеза SpCas9 падает в десятки раз при проведении индукции при +30 °C [1].

Процедура лизиса бактерий также может повлиять на свойства получаемой SpCas9, например, применение неспецифической эндонуклеазы бензоназы для снижения вязкости лизата позволяет не подвергать целевой белок воздействию ультразвука (т. е. тепла и силы сдвига в жидкости), но может приводить к загрязнению целевого белка посторонней нуклеазой, способной к быстрому расщеплению гРНК [18].

Получение препаратов SpCas9 с низким содержанием ЛАЛ-эндотоксина, т. е. не вызывающим активации системы врожденного иммунитета у клеток млекопитающих, также было исследовано в ряде работ. Очевидным, хотя и не бесспорным, способом получения такой SpCas9 является применение штаммов с нарушением путей биосинтеза пирогенного липополисахарида, в частности, штамма ClearColi [17]. В теории такой штамм позволяет полностью избавиться от ЛАЛ-эндотоксина, однако на практике наблюдается как значительное падение уровня биосинтеза целевого белка, так и невозможность контроля уровня эндотоксина в препаратах целевых белков, вызванная тем, что непирогенный липополисахарид ClearColi в стандартном ЛАЛ-тесте определяется как активный ЛАЛ-эндотоксин.

Выделение гомогенного по электрофорезу SpCas9 из *E. coli* обычно может быть проведено при помощи одной или двух стадий колоночной хроматографии, поэтому эффективный метод получения безэндотоксиновой SpCas9 не должен включать в себя дополнительные стадии хроматографии, применяемые для специфического

удаления ЛАЛ-эндотоксина, таких как адсорбция на иммобилизованном полимиксине B. Одним из простых методов понижения уровня эндотоксина в растворах белков является фазовое разделение с детергентом Triton X-114, т. е. добавление в холодный водный раствор белка Triton X-114 до 1–4%, нагрев раствора до температуры выше облачной точки, обычно до +37 °C и отделение нижней фазы концентрированного детергента с липополисахаридами центрифугированием. Такую процедуру можно проводить многократно, добиваясь почти полного удаления ЛАЛ-эндотоксинов, однако получаемый раствор белка содержит существенные количества детергента Triton X-114 и нуждается в дальнейшей очистке перед применением с культивируемыми клетками млекопитающих или *in vivo*. В применении к получению свободной от эндотоксинов Cas9 данный метод был применен в работе [16], проводили 9 циклов добавления Triton X-114 и сепарации фаз, содержание ЛАЛ-эндотоксина было уменьшено до 0,3–1,5 ЕЭ/мл, что примерно соответствует требованиям для парентеральных лекарственных препаратов, т. е. не вызывает активации провоспалительного ответа даже у специализированных клеток иммунной системы человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и материалы, использованные в настоящей работе, приобретались у компаний «Хеликон» (Россия) и «Диа-М» (Россия), если не указано иное.

Экспрессия SpCas9. Клетки *E. coli* штамма Rosetta2[DE3] («Novagen», США) трансформировали плазмидой pET15-NLS-SpCas9-6×His (Addgene #62934; конструкция описана в публикации [21]), любезно предоставленной М. Шелеповым (ИБГ РАН) по методике TSS Chung et al. [3]. Трансформанты выращивали на агаризованной среде LB с ампициллином, из отдельной колонии получали предкультуру в LB с ампициллином и 1% глюкозы. Предкультурой инокулировали 1 л LB, содержащего ампициллин 50 мкг/мл, и выращивали до оптической плотности OD_{600} 0,6–0,8. Экспрессию индуцировали добавлением ИПТГ до 0,5 мМ и продолжали культивирование в течение 18 ч при 15 °C или 32 °C при перемешивании.

Получение фракции растворимых белков E. coli. Клетки осаждали центрифугированием при 5 °C, после чего осадок ресуспендировали в 20 мл буфера A (30 мМ HEPES, pH 7,4; 10 мМ имидазол; 1 мМ PMSF; ингибиторы протеаз 1× («Bioinlabs», Россия); 5 мМ β-меркаптоэтанол). В суспензию добавляли лизоцим до 50 мкг/мл и детергент Nonidet P-40 либо Triton X-100 до 0,1%, перемешивали и инкубировали на льду 30 мин. Разрушение клеток выполняли ультразвуковым диспергатором Sonoplus («Bandelin», Германия) на льду импульсами по 30 с до исчезновения выраженной вязкости. Затем вносили NaCl до 500 мМ и глицерин до 5% и повторяли ультразвуковую обработку до исчезновения вязкости. Осветление лизата выполняли центрифугированием при 4 °C (18000 об/мин, 20 мин), после чего супернатант фильтровали через мембранный фильтр из полиэфирсульфона 0,22 мкм и использовали для хроматографической очистки.

Металлохелатная хроматография на сорбенте Ni-Sepharose. Фильтрованный супернатант наносили со скоростью 1 мл/мин на колонку с сорбентом Ni-Sepharose («Cytiva», США) объемом 1 мл, предварительно регенерированную и заряженную ионами никеля и уравновешенную буфером B (20 мМ HEPES pH 7,5, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, 5 мМ β-меркаптоэтанол). Нанесение образца проводили со скоростью 1 мл/мин и сохраняли проскок для повторного нанесения. После промывки буфером B до стабилизации базовой линии промывали колонку 10 мл раствора B, дополнительно содержащего 20 мМ имидазола (конечная концентрация – 30 мМ), либо 10 мл раствора 20 мМ HEPES pH 7,5, 1,3 M NaCl, 30 мМ имидазол, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 0,1% Triton X-100. После указанной промывки колонку вновь промывали буфером B до стабилизации базовой линии, но не менее 10 мл, затем элюировали SpCas9 буфером C (20 мМ HEPES pH 7,5, 300 мМ NaCl, 250 мМ имидазол, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 5% глицерин). Удаляли остатки связавшихся белков и ионы никеля элюцией раствором 100 мМ ЭДТА-Na, 5 мМ β-меркаптоэтанол либо повторно наносили проскок и повторяли промывки и элюцию раствором C.

Катионообменная хроматография на сорбенте Capto S ImpRes и получение готового препарата. Элюат металлохелатной хроматографии разбавляли деионизованной водой в 1,3 раза до конечной концентрации NaCl 200 мМ, вносили глицерин до конечной концентрации 10% и наносили образец на 1 мл колонку с сорбентом Capto S ImpRes («Cytiva», США), уравновешенную буфером D (20 мМ HEPES pH 7,5, 200 мМ KCl, 0,5 мМ ЭДТА-Na, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 10% глицерин). Колонку промывали буфером D и элюировали белок линейным градиентом от 0 до 100% буфера E за 20 мл (20 мМ HEPES pH 7,5, 1 M KCl, 0,5 мМ ЭДТА-Na, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 10% глицерин), собирая фракцию основного пика элюции. Определяли концентрацию белка по оптической плотности раствора, 280 нм (1 мг/мл SpCas9 соответствует 0,75 ОЕ) и переводили препарат в условия хранения путем ультрафильтрации на мембранном концентраторе 10 кДа (полиэфирсульфон, «Servicebio», Китай), добавления глицерина до 50% и TCEP до 1 мМ в составе буфера хранения F (20 мМ HEPES pH 7,5, 300 мМ KCl, 0,5 мМ ЭДТА-Na, 1 мМ TCEP, 50% глицерин) с доведением конечной концентрации SpCas9 до 8 мг/мл. Препарат стерильно фильтровали через гидрофильный PVDF-фильтр 0,22 мкм

в асептических условиях, разделяли на аликвоты и хранили при −18 °C.

Анализ содержания примесей. Посторонние белки выявляли при помощи ДСН-ПААГ 8%, восстанавливающие условия, окрашивание коллоидным Кумасси. Концентрацию остаточной ДНК измеряли флуориметрически на флуориметре Qubit («ThermoFisher Scientific», США) с помощью набора QuDye® dsDNA BR («Lumiprobe», РФ). Уровень эндотоксина определяли хромогенным кинетическим методом. Использовали набор Bioendo KC Endotoxin Test Kit (Xiamen Bioendo Technology Co., Ltd., Китай) по методике производителя набора с применением термостатированного микропланшетного ридера Feyond-A300 (Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd., Китай). Реакцию вели 100 мин при +37 °C, измерения оптической плотности 1 раз в минуту, n = 2.

Определение активности SpCas9 *in vitro* по расщеплению ДНК-мишени. Активность SpCas9 определяли в реакции расщепления ДНК-мишени в присутствии направляющей РНК с последующей визуализацией продуктов электрофорезом в 2% агарозном геле и количественной оценкой по денситометрии. В качестве ДНК-мишени использовали ПЦР-продукт, амплифицированный из геномной ДНК клеток CHO-K1 (ВКМ Н-188, Россия) с праймерами TA-DHFR-1v7-F и TA-DHFR-1v7-R (Таблица 1), как описано ранее [13]. Длина ПЦР-фрагмента — 545 п. о., что соответствует позициям 488230–488774 в сборке генома CHO NW_003614442.1, ожидаемые длины продуктов расщепления 363 и 182 п. о.

Использовали наборы «ExtractDNA Blood&Cells» — для выделения геномной ДНК, «Cleanup Standard» — для очистки ПЦР-продукта и смесь для ПЦР ScreenMix-HS производства «Евроген» (Россия). Концентрацию ДНК измеряли флуориметрически (QuDye® dsDNA BR, «Lumiprobe», Россия). ПЦР ставили в объеме 50 мкл, в реакцию вносили 20–30 нг геномной ДНК. Режим амплификации включал предварительную денатурацию 95 °C 3 мин, затем 38 циклов 95 °C 15 с / 67 °C 15 с / 72 °C 40 с, завершающую элонгацию 72 °C 2 мин. Очищенный ампликон разводили до 0,2 мкМ (71 нг/мкл).

Матрицу для *in vitro* транскрипции гРНК D1 получали методом ПЦР с использованием плазмиды pKS-D1 [12] и праймеров D1-g-F и D1_3-g-R (Таблица 1), режим амплификации включал предварительную денатурацию 95 °C 2 мин, 5 циклов 95 °C 15 с / 72 °C 40 с, 5 циклов 95 °C 15 с / 66 °C 10 с / 72 °C 20 с, затем 25 циклов 95 °C 15 с / 63 °C 10 с / 72 °C 20 с, завершающую элонгацию 72 °C 10 мин. Продукт ПЦР очищали набором Cleanup Standard. Транскрипцию гРНК D1 проводили набором mRNA-20 («Biolabmix», Россия) при инкубации 16 ч. Концентрацию гРНК определяли флуориметрически (флуориметр Feyond A-300; набором Ribo488 RNA BR, «Lumiprobe», Россия) и доводили до 40 мкМ свободной от рибонуклеаз водой («Биоинлабс», Россия).

Реакцию расщепления ставили параллельно для исследуемого препарата SpCas9 и коммерческого контроля Cas9 (#GE5050, «Biolabmix», Россия) в 1× буфере Cas9, приготовленном из 5× буфера (100 мМ HEPES, pH 7,5; 625 мМ KCl; 5 мМ EDTA; 5 мМ DTT; 30 мМ $MgCl_2$; 35% глицерин).

Коммерческий Cas9 («Biolabmix») с исходной концентрацией 20 мкМ разводили до 8 мкМ (путем смешивания 6 мкл Cas9, 3 мкл 5× буфера и 6 мкл воды). Исследуемый SpCas9 имел концентрацию 8 мг/мл, что соответствует 50 мкМ, исходя из молекулярной массы белка 163 кДа; его приводили к той же рабочей концентрации 8 мкМ (то есть разводили в 6,25 раз, смешивая 2 мкл раствора белка, 2,5 мкл 5× буфера и 10,5 мкл воды).

РНП комплекс Cas9–гРНК готовили в 1× буфере, делая серию двукратных разведений, поддерживая постоянное количество ДНК-мишени. Исходную смесь для сборки РНП готовили из 5× буфера (9 мкл), гРНК 40 пмоль/мкл (6 мкл), рабочего раствора Cas9 8 мкМ (6 мкл) и безнуклеазной воды (15 мкл), после чего выполняли последовательные двукратные разведения в 1× буфере, получая ряд концентраций Cas9 8–0,5 мкМ. Из каждой точки ряда отбирали по 12 мкл и инкубировали 15 мин при комнатной температуре для формирования РНП, затем добавляли 3 мкл ПЦР-фрагмента мишени (0,2 пмоль/мкл; 0,6 пмоль на реакцию) и инкубировали 30 мин при 37 °C. Для завершения реакции вносили РНКазу А до 0,3 мг/мл и инкубировали 10 мин при 37 °C, затем добавляли протеиназу К до 0,6 мг/мл и инкубировали 10 мин при 56 °C (оба фермента производства «Biolabmix», Россия).

Продукты разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле в трис-боратном буфере (TBE). Денситометрический анализ проводили в программе TotalLab (Великобритания), выполняя вычитание фона методом Rolling Ball и построение калибровочной кривой по полосам калибратора (100, 75, 50, 25, 12,5 нг исходного ПЦР-фрагмента на дорожку). Уровень распада субстрата рассчитывали по формуле:

$$V = 1 - \frac{m_r}{m_0}$$

где m_r — количество нерасщепленной ДНК-мишени после реакции, m_0 — исходное количество субстрата до реакции, определяемое по калибровке.

Таблица 1. Олигонуклеотиды для получения ДНК-матрицы и гРНК

Table 1. Oligonucleotides for obtaining the DNA template and gRNA

Название	Последовательность 5'–3'
TA-DHFR-1v7-F	GGGACCCTGTCACGTGTGCT
TA-DHFR-1v7-R	GCCTGGTGGAGGCGGAGTCT
D1-g-F	ACTCTTGTAATACGACTCACTATAGGGGTGATCGCTGCTGCTGTCA
D1_3-g-R	AAAAGCACCGACTCGGTGCC

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что экспрессия SpCas9 в *E. coli* описана во множестве работ, остается неизвестным, как температура культивации клеток после начала индукции влияет на уровень биосинтеза SpCas9 и ее удельную активность. В настоящей работе в одном штамме на основе Rosetta2 и среды LB была проведена индукция SpCas9 при температуре +32 °C и при температуре +15 °C в течение 18 ч. Фермент выделяли при помощи двух стадий хроматографии без дополнительных промывок сорбентов, как описано в разделе «Материалы и методы», и измерили удельную активность белка *in vitro*. Лизис клеток проводили в присутствии 0,1% детергента Nonidet P-40 вместо Triton X-100. Было обнаружено, что после первой стадии очистки металлохелатной хроматографией выход целевого белка составил 30 мг/л культуры для индукции при температуре +15 °C и 17 мг для индукции при температуре +32 °C. При последующей очистке SpCas9 катионообменной хроматографией было обнаружено, что большая часть целевого белка не связывается с сорбентом, выход полностью очищенного белка составил только 1,7 мг/л для индукции при +15 °C и 14 мг/л для индукции при +32 °C. При измерении относительной ферментативной активности SpCas9 было обнаружено, что удельная активность SpCas9, полученного при температуре культивации +15 °C, приблизительно в 2 раза выше, чем у препарата, полученного при культивации при температуре +32 °C.

Метод определения активности SpCas9 *in vitro* обычно предполагает смешивание апофермента и гРНК в молярном соотношении 1:1, однако весьма вероятно, что при синтезе гРНК при помощи T7 РНК-полимеразы часть образующихся молекул гРНК будет иметь дополнительные остатки G на 5'-конце и будет гетерогенна в области 3'-конца. Такие молекулы могут не образовывать комплекс с белком с достаточной аффинностью и могут стать лимитирующим компонентом ферментативной реакции. Для использованных в настоящей работе гРНК и ДНК-матрицы было установлено, что степень гидролиза матрицы возрастает при повышении концентрации гРНК в реакции до молярного соотношения гРНК:SpCas9 2:1, а дальнейшее увеличение концентрации гРНК уже не влияет на видимую степень гидролиза субстрата. В дальнейших опытах было использовано соотношение гРНК:SpCas9 4:1 моль/моль (рис. 1).

Поскольку большая часть целевого белка не связывалась с сорбентом Capto S ImpRes при нейтральном pH (разновидность SP сефарозы), было предположено, что SpCas9 находится в комплексе с нуклеиновыми кислотами *E. coli*, нейтрализующими ее положительный заряд поверхности. Наиболее простой метод для диссоциации таких комплексов – повышение ионной силы раствора, что, в нашем случае, может быть выполнено при проведении промывки металлохелатного сорбента с адсорбированной на нем SpCas9.

Для улучшения метода очистки SpCas9 в него были внесены три изменения – лизис клеток был проведен с применением детергента Triton X-100, более эффективно диспергирующего мембраны бактерий, чем Nonidet P-40; после адсорбции целевого белка на металлохелатный сорбент Ni-Sepharose (привитые группы NTA) была проведена промывка раствором с концентрацией NaCl 1,3 M и, в целях удаления связанного с целевым белком и сорбентом ЛАЛ-эндотоксина, в раствор для промывки был добавлен детергент Triton X-100. Остатки детергента удаляли промывкой колонки уравновешивающим раствором до стабилизации базовой линии.

Для более полного извлечения SpCas9 из лизата клеток, полученных при индукции на +15 °C, фракцию проскока собирали и повторно наносили на металлохелатную колонку после элюции целевого белка, а затем повторяли промывки и элюцию, что позволило увеличить выход целевого белка и практически полностью извлечь его из лизата клеток при помощи колонки объемом 1 мл. Для фракций промывки колонки и элюата измерили концентрацию ДНК при помощи специфического флуоресцентного красителя QuDye® dsDNA BR.

Во фракции промывки колонки высокосолевым раствором было обнаружено в 10 раз больше двуцепочечной ДНК, чем во фракции элюата целевого белка. В элюате металлохелатной хроматографии, проведенной без дополнительной промывки колонки раствором с 1,3 M NaCl, содержание ДНК составило 5,1 мкг/мг против 0,72 мкг/мг, таким образом, было подтверждено, что промывка колонки высокосолевым раствором действительно удаляет около 90% примеси ДНК. Ионообменную хроматографию для SpCas9 проводили раздельно для двух фракций элюата металлохелатной хроматографии с разбавлением образцов водой в 1,3 раза, при этом в проскоке колонки целевой белок практически не присутствовал.

После второй стадии очистки был получен гомогенный по электрофорезу препарат целевого белка, который при помощи ультрафильтрации был переведен в раствор для хранения, содержащий 50% глицерина, и стерильно фильтрован для использования при редактировании генома культивируемых клеток млекопитающих. Общий выход целевого белка составил около 50%; 16 мг из одного литра бактериальной суспензии (4,5 г влажной биомассы бактерий) (рис. 2; табл. 2).

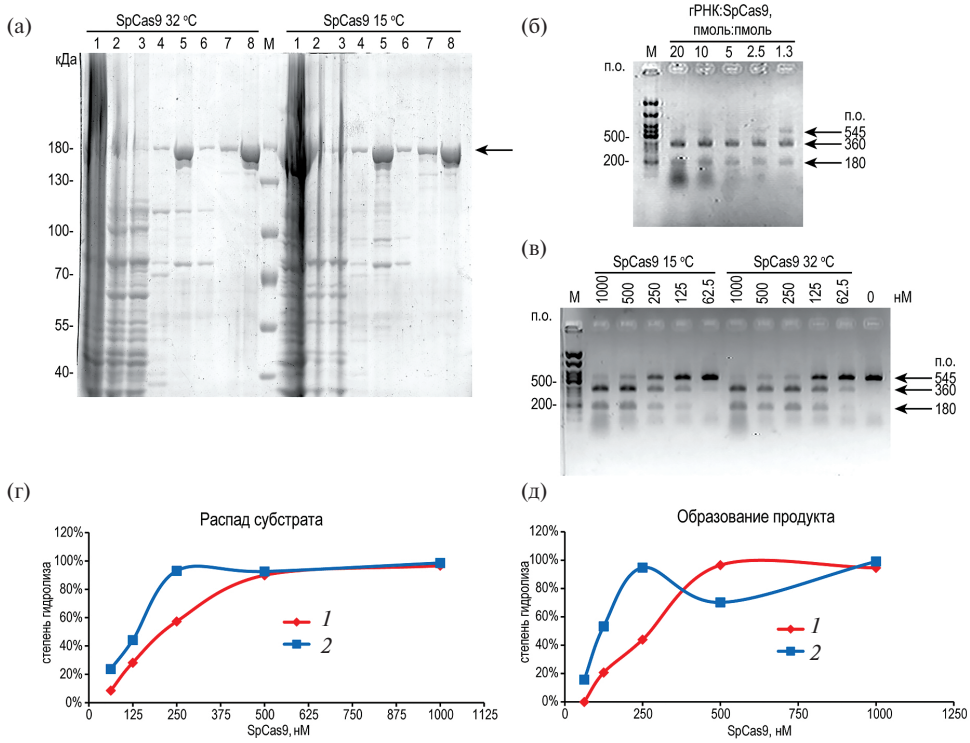


Рис. 1. Исходный процесс очистки Cas9 и тестирование активности нуклеазы. а — ДСН-ПААГ белков: 1 — тотальный белок после индукции; 2 — растворимые белки; 3 — проскок Ni-Sepharose; 4 — фракция промывки 30 мМ имидазолом; 5 — элюат Ni-Sepharose (250 мМ имидазол); 6 — элюат Ni-Sepharose (100 мМ ЭДТА-Na); 7 — проскок Capto S ImpRes; 8 — основной пик градиентной элюции Capto S ImpRes; M — маркер молекулярных масс. Температуры индукции указаны над дорожками; условия восстанавливающие; массы маркера — в кДа; SpCas9 отмечена стрелкой. б — электрофореграмма продуктов гидролиза ДНК при разных соотношениях гРНК и SpCas9 (2% агароза, бромистый этидий, негатив; контраст повышен для визуализации слабых полос); стрелками обозначены субстрат 545 п. о. и продукты 360 и 180 п. о. в — продукты гидролиза ДНК препаратами SpCas9, полученными при разных температурах индукции; здесь и далее гРНК:SpCas9 = 4:1 пмоль:пмоль. г, д — зависимость гидролиза ДНК от концентрации SpCas9 по денситометрии: исчезновение полосы субстрата (г) и образование продукта 360 п. о. (д), кривая 1 – индукция при +32оС, кривая 2 – индукция при +15 оС.

Fig. 1. Initial Cas9 purification process and nuclease activity testing. a — SDS-PAGE: 1, total protein after induction; 2, soluble proteins; 3, Ni-Sepharose flow-through; 4, fraction washed with 30 mM imidazole; 5, Ni-Sepharose eluate (250 mM imidazole); 6, Ni-Sepharose eluate (100 mM EDTA-Na); 7, Capto S ImpRes flow-through; 8, main peak of Capto S ImpRes gradient elution; M, molecular-mass marker. Induction temperatures are shown above the lanes; reducing conditions were used; marker masses are given in kDa; SpCas9 is indicated by an arrow. б — electropherogram of DNA hydrolysis products at different gRNA:SpCas9 ratios (2% agarose, ethidium bromide, negative image; contrast increased to visualize weak bands); arrows indicate the 545-bp substrate and the 360- and 180-bp products. в — DNA hydrolysis products obtained with SpCas9 preparations produced at different induction temperatures; here and below, gRNA:SpCas9 = 4:1 pmol:pmol. г, д — dependence of DNA hydrolysis on SpCas9 concentration by densitometry: disappearance of the substrate band (г) and formation of the 360-bp product (д)

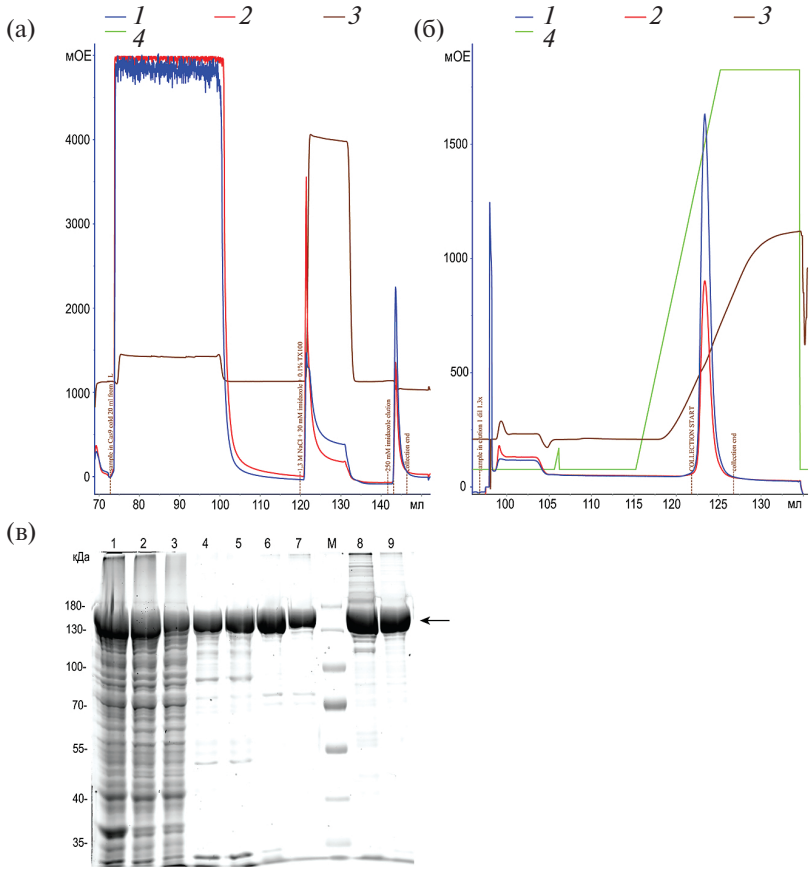


Рис. 2. Хроматограммы и электрофореграмма оптимизированной очистки Cas9. а — Ni-Sepharose; б — Capto S ImpRes; в — ДСН-ПААГ: 1 — тотальный белок после индукции; 2 — растворимые белки; 3 — проскок Ni-Sepharose; 4 — элюат Ni-Sepharose; 5 — элюат после повторного нанесения проскока на Ni-Sepharose; 6 и 7 — первая и вторая порции элюата Capto S ImpRes; M — маркер молекулярных масс; 8 — коммерческий препарат Cas9; 9 — очищенный SpCas9 после ультрафильтрации. Условия восстанавливающие; во все дорожки нанесены образцы, соответствующие приблизительно 130 мкл бактериальной культуры

Fig. 2. Chromatograms and electropherogram of the optimized Cas9 purification process. a — Ni-Sepharose; б — Capto S ImpRes; в — SDS-PAGE: 1, total protein after induction; 2, soluble proteins; 3, Ni-Sepharose flow-through; 4, Ni-Sepharose eluate; 5, eluate after repeated loading of the flow-through onto Ni-Sepharose; 6 and 7, first and second portions of the Capto S ImpRes eluate; M, molecular-mass marker; 8, commercial Cas9 preparation; 9, purified SpCas9 after ultrafiltration. Reducing conditions were used; each lane contained material corresponding to approximately 130 μL of bacterial culture

Таблица 2. Выход стадий процесса очистки SpCas9

Table 2. Yields at the stages of the SpCas9 purification process

Стадия	Объем, мл	Концентрация по $ОП_{280}$, мг/мл	Масса, мг	Выход стадии, %	Выход общий, %	ДНК, мкг/мг
Ni-Sepharose I	5,0	4,27	21,4	-	-	
Ni-Sepharose II*	5,0	2,4	12,0	-	-	
Ni-Sepharose, суммарно			33,4	-	-	0,72
Capto S ImpRes I	5,5	2,67	14,7			
Capto S ImpRes II	4,0	1,33	5,3			
Capto S ImpRes, суммарно			20,0	60%	60%	0,75
Формулирование	2,0	8	16	80%	48%	0,75

Примечание: * — повторное нанесение проскока со стадии Ni-Sepharose I
Note: * — repeated loading of the flow-through from the Ni-Sepharose I stage

При сравнении уровней примесей и удельной активности полученного настоящим методом препарата SpCas9 и коммерчески доступного препарата SpCas9 было установлено, что содержание ДНК в обоих случаях сходно – 0,86 мкг/мг для препарата сравнения, но уровень ЛАЛ-эндотоксина сильно различается. Его содержание, измеренное хромогенным кинетическим методом, составило 11 ЕЭ/мг для полученной SpCas9 и 9400 ЕЭ/мг для коммерческого препарата. Удельная активность обоих препаратов, измеренная по скорости специфического расщепления фрагмента ДНК *in vitro*, практически не различалась (рис. 3).

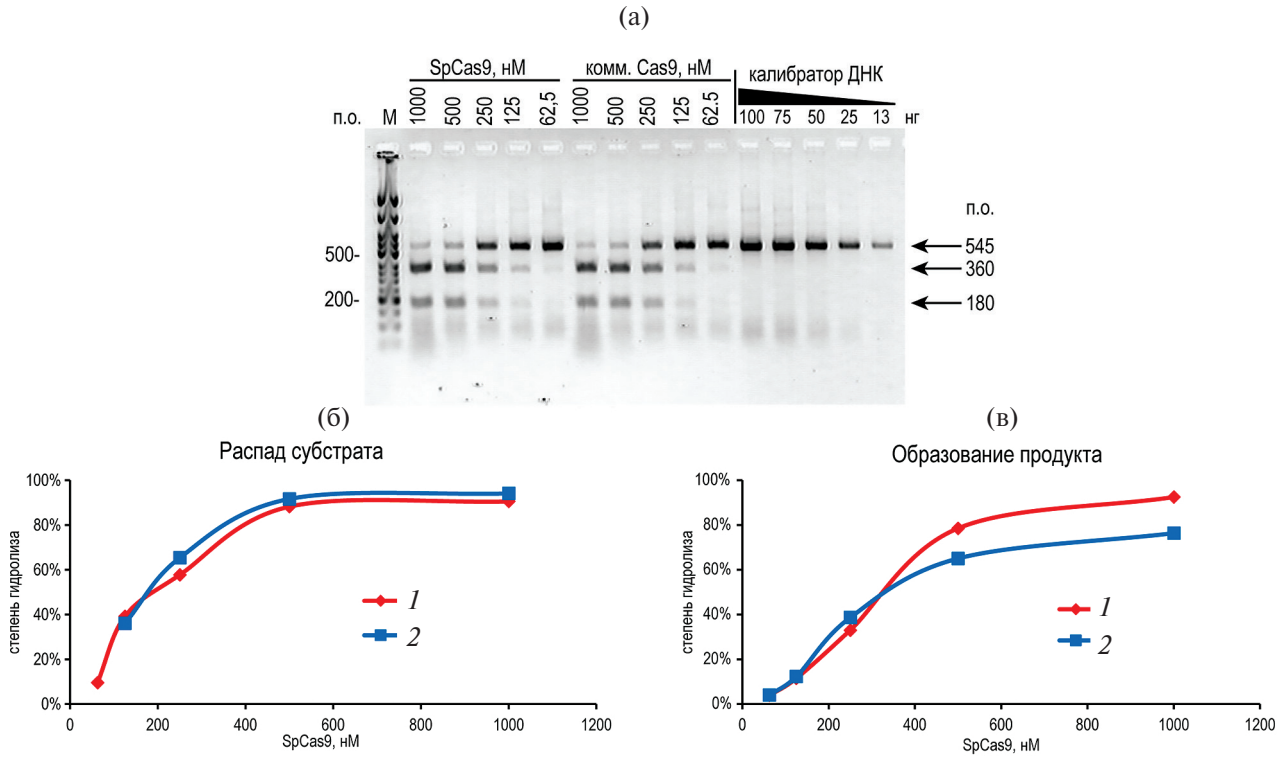


Рис. 3. Тестирование активности SpCas9 *in vitro* для препарата, полученного по оптимизированному протоколу. а — электрофореграмма продуктов гидролиза ДНК препаратами SpCas9; б, в — зависимость степени гидролиза ДНК от концентрации SpCas9; кривая 1 — коммерческая Cas9, кривая 2 — исследуемый препарат. обозначения — как на рис. 1

Fig. 3. *In vitro* activity testing of the SpCas9 preparation obtained using the optimized protocol. a — electropherogram of DNA hydrolysis products obtained with SpCas9 preparations; б, в — dependence of DNA hydrolysis on SpCas9 concentration; designations are as in Fig. 1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе предложен технологически воспроизводимый метод получения низкоэндотоксинового препарата рекомбинантной нуклеазы SpCas9 из *E. coli*, ориентированный на дальнейшее применение белка в составе рибонуклеопротеиновых комплексов. Показано, что при стандартной экспрессии и двухстадийной очистке без специальных промывок значительная часть SpCas9 не связывается с катионообменным сорбентом, что согласуется с образованием комплексов белка с бактериальными нуклеиновыми кислотами. Внесение в протокол трех изменений — лизис в присутствии Triton X-100, высокосолевая промывка металлохелатной колонки и добавление Triton X-100 в промывочный раствор — позволило эффективно диссоциировать комплексы SpCas9 с бактериальной ДНК и снизить уровень сопутствующих примесей. Экспериментально показано, что высокосолевая промывка на стадии IMAC удаляет основную часть двуцепочечной ДНК, снижая ее содержание в элюате примерно на порядок (с 5,1 до 0,72 мкг/мг), и обеспечивает последующую эффективную очистку белка катионообменной хроматографией без потерь целевого продукта.

Итоговый выход препарата составил 16 мг SpCas9 с 1 л культуры при сохранении гомогенности по электрофорезу и пригодности к стерильной филь-

трации и хранению в растворе с 50% глицерином. Полученный препарат содержал 11 ЕЭ/мг ЛАЛ-эндотоксина, что на три порядка ниже по сравнению с коммерческим препаратом сравнения (9400 ЕЭ/мг). Для препаратов SpCas9 с сопоставимым уровнем эндотоксина (5–20 ЕЭ/мг) ранее было показано отсутствие токсичности для клеток при использовании рибонуклеопротеиновых комплексов [6]. Таким образом, предложенная схема позволяет получать SpCas9, пригодную для применения в клеточных системах млекопитающих без введения дополнительных стадий депирогенизации. Разработан воспроизводимый метод количественного определения активности SpCas9 *in vitro*, основанный на расщеплении ПЦР-фрагмента ДНК-мишени в присутствии гРНК с последующей денситометрией продуктов электрофореза. Показано, что удельная активность полученного препарата сопоставима с активностью коммерческой нуклеазы, а оптимизация соотношения гРНК:SpCas9 позволяет компенсировать возможную гетерогенность гРНК, синтезированной *in vitro*. Предложенный подход может быть использован для рутинного контроля качества препаратов SpCas9 и подготовки рибонуклеопротеиновых комплексов для редактирования генома клеток млекопитающих.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Agrawal S., Padmaswari M.H., Stokes A.L. et al. Optimizing Recombinant Cas9 Expression: Insights from E. coli BL21(DE3) Strains for Enhanced Protein Purification and Genome Editing. *Biomedicines*, 2024, vol. 12, 1226. https://doi.org/10.3390/biomedicines12061226
2. Catanzariti A.M., Soboleva T.A., Jans D.A., Board P.G., Baker R.T. An efficient system for high-level expression and easy purification of authentic recombinant proteins. *Protein Sci.*, 2004, vol. 13, no. 5, pp. 1331–1339. https://doi.org/10.1110/ps.04618904
3. Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, vol. 86, no. 7, pp. 2172–2175. https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2172
4. Duan X., Zhou Z., Mao A. A One-Step Method for Efficient Purification of Functional Cas9 Protein. *Bio Protoc.*, 2026, vol. 16, no. 3, e5594. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.5594
5. Duan X., Zhou Z., Zeng X., Chen J., Mao A. Single-step purification of functional Cas9 protein via the ubiquitin expression system. Int. J. Biol. Macromol., 2025, vol. 328, pt. 1, 147590. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.147590
6. Evmenov K., Pustogarov N., Panteleev D., Safin A., Alkalaeva E. An Efficient Expression and Purification Protocol for SpCas9 Nuclease and Evaluation of Different Delivery Methods of Ribonucleoprotein. *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, vol. 25, 1622. https://doi.org/10.3390/ijms25031622
7. Fleitas A.L., Señorale M., Vidal S. A Robust Expression and Purification Method for Production of SpCas9-GFP-MBP Fusion Protein for In Vitro Applications. *Methods Protoc.*, 2022, vol. 5, no. 3, 44. https://doi.org/10.3390/mps5030044
8. Hirsh A. Cas9 Expression and Purification Protocol. *protocols.io*, 2017. https://www.protocols.io/view/cas9-expression-and-purification-protocol-yxmvm9dol3pe/v1
9. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, vol. 337, no. 6096, pp. 816–821. https://doi.org/10.1126/science.1225829
10. Li W., Li S., Qiao J. et al. Direct preparation of Cas9 ribonucleoprotein from E. coli for PCR-free seamless DNA assembly. *bioRxiv*, 2018, 328468. https://doi.org/10.1101/328468
11. Magalhães P.O., Lopes A.M., Mazzola P.G. et al. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2007, vol. 10, no. 3, pp. 388–404.
12. Orlova N.A., Dayanova L.K., Gayamova E.A. et al. Targeted Knockout of the dhfr, glul, bak1, and bax Genes by the Multiplex Genome Editing in CHO Cells. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2022, vol. 502, no. 1, pp. 40–44. https://doi.org/10.1134/S1607672922010082
13. Orlova N.A., Sinegubova M.V., Kolesov D.E. et al. Genomic and Phenotypic Characterization of CHO 4BGD Cells with Quad Knockout and Overexpression of Two Housekeeping Genes That Allow for Metabolic Selection and Extended Fed-Batch Culturing. *Cells*, 2025, vol. 14, no. 10, 692. https://doi.org/10.3390/cells14100692
14. Petsch D., Anspach F.B. Endotoxin removal from protein solutions. *J. Biotechnol.*, 2000, vol. 76, no. 2–3, pp. 97–119. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00185-6
15. Rajagopalan N., Kagale S., Bhowmik P., Song H. A Two-Step Method for Obtaining Highly Pure Cas9 Nuclease for Genome Editing, Biophysical, and Structural Studies. *Methods Protoc.*, 2018, vol. 1, no. 2, 17. https://doi.org/10.3390/mps1020017

16. Akimkin V.G., Tyumentsev A.I., Tyumentseva M.A., Shagin D.A. Method for Producing a Preparation of Recombinant Cas Nuclease Essentially Free of Bacterial Endotoxins, the Preparation Obtained by This Method, and a Kit Containing the Preparation for Use in a CRISPR/Cas System. Russian Federation Patent RU2707542C1, 2019.
17. Singpant P., Tubsuwan A., Sakdee S. et al. Recombinant Cas9 protein production in an endotoxin-free system and evaluation with editing the BCL11A gene in human cells. Protein Expr. Purif., 2023, vol. 210, 106313. https://doi.org/10.1016/j.pep.2023.106313
18. Teng A.C.T., Tavassoli M., Shrestha S. et al. An efficient and cost-effective purification protocol for Staphylococcus aureus Cas9 nuclease. STAR Protoc., 2023, vol. 4, no. 1, 101933. https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101933
19. Liu D.R., Pattanayak V. Methods for Identifying a Target Site of a Cas9 Nuclease. United States Patent US9163284B2, 2015.
20. Doudna J.A., Jinek M., Charpentier E., Chylinski K., Cate J.H.D., Lim W., Qi L. Methods and Compositions for RNA-Directed Target DNA Modification and for RNA-Directed Modulation of Transcription. International Patent Application WO2013176772A1, 2013.
21. Zuris J.A., Thompson D.B., Shu Y. et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nat. Biotechnol.*, 2015, vol. 33, no. 1, pp. 73–80. https://doi.org/10.1038/nbt.3081

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ходак Юлия Александровна — кандидат биологических наук, научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: salix33@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-1303-5344

Воробьев Петр Иванович — студент, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: pvorobiev05@gmail.com
https://orcid.org/0009-0002-5901-1700

Орлова Надежда Александровна — кандидат биологических наук, заместитель заведующего лабораторией, научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: nobiol@gmail.com
https://orcid.org/0000-0001-9483-2892

Воробьев Иван Иванович — доктор биологических наук, заведующий лабораторией, ведущий научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: ptichman@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-0064-4458

Поступила в редакцию 07.03.2026
После доработки 11.05.2026
Принята к публикации 11.07.2026

AUTHOR INFORMATION

Khodak, Yulia A. — Cand. Sci. (Biology), Researcher, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: salix33@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-1303-5344

Vorobiev, Petr I. — student, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: pvorobiev05@gmail.com
https://orcid.org/0009-0002-5901-1700

Orlova, Nadezhda A. — Cand. Sci. (Biology), Deputy Head of Laboratory, Researcher, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: nobiol@gmail.com
https://orcid.org/0000-0001-9483-2892

Vorobiev, Ivan I. — Dr. Sci. (Biology), Head of Laboratory, Leading Researcher, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: ptichman@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-0064-4458

Received March 07, 2026
Revised May 11, 2026
Accepted July 11, 2026