

Детекция двухцепочечной ДНК *Mycobacterium tuberculosis* с помощью ДНК-наномашин

Старкова, П.С (Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, г. Санкт-Петербург)

Научный руководитель: Д.М. Колпашиков, к.х.н., профессор (Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, г. Санкт-Петербург)

Современные гибридизационные зонды, использующиеся для распознавания специфических последовательностей бактериальных и вирусных штаммов, часто не обладают соответствующим уровнем чувствительности, что необходимо для постановки правильного диагноза и дальнейшего надлежащего лечения [1]. В данной работе мы применили альтернативу традиционным гибридизационным зондам, дезоксирибозимы, которые будучи каталитической ДНК, составляют структуру ДНК-наномашин [2]. Однако, только лишь дезоксирибозимы не способны раскручивать и распознавать стабильную двухцепочечную структуру ДНК. Данное исследование продемонстрировало преимущества использования ДНК-наномашин заключающиеся в точном выявлении специфических последовательностей *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), где определенный однонуклеотидный полиморфизм свидетельствует об идентификации штамма [3], а также в усиленной доставке генерирующего сигнал флуоресцирующего субстрата на каталитический сенсор, активируемый мишенью.

Мы разработали дизайн трех сенсоров и одного ДНК-наноробота специфичных для трех штаммов Mtb с последующей их оптимизацией на синтетических одноцепочечных ДНК-аналитах. За отжигом олигонуклеотидов на таргетной последовательности с образованием каталитического кора следует их самоорганизация, что в конечном итоге составляет структуру ДНК-нанороботов. Праймеры были разработаны для получения ампликонов, содержащих области, связанные с однонуклеотидным полиморфизмом обозначающим специфичность к штамму Mtb. ДНК Mtb была получена от колабораторов. Сборку ДНК-нанороботов анализировали в 1,5% агарозном геле с использованием системы электрофореза BioRad. Флуоресценцию измеряли после инкубации образцов при 50 ° С в течение 60 и 180 минут. Для определения эффективности ДНК-наномашин мы рассчитываем предел обнаружения (ПО) в зависимости от концентрации сенсора, аналита и продолжительности инкубации.

В настоящем исследовании мы сравнили эффективность работы дезоксирибозимных сенсоров и, основанной на них, ДНК-наномашин. Исследование показало, что бинарные дезоксирибозимы распознают минимальную концентрацию одноцепочечной синтезированной ДНК Mtb, которая составляет 30 pM, в то время как у ДНК-наноробота ПО равен 50 pM, не говоря уже о способности последнего обнаруживать двухцепочечную ДНК. Кроме того, мы обнаружили, что после 1 часа инкубации ДНК-наномашин способна обнаружить двухцепочечную последовательность Mtb (5 nM) с флуоресцентным сигналом в 3 раза выше, чем биосенсор, а после 3 часов инкубации – в 14 раз.

Полученные результаты, указывают на трехкратное улучшение ПО ДНК-наномашин по сравнению с сенсором в отношении одноцепочечной ДНК благодаря трем коротким ДНК-рукам, связывающим каркас робота и улучшающим гибридизацию с аналитом. Данные наработки наметили пространство для дальнейшего развития ДНК-наномашин для обеспечения надежного обнаружения Mtb аналитов и дальнейшей дифференциации их штаммов.

Список использованной литературы

1. Bengtson H. Multiplex Detection of Extensively Drug Resistant Tuberculosis Using Binary Deoxyribozyme Sensors // Biosensors and Bioelectronics, 2017. 176–83.
2. Fokina A. DNA Enzymes as Potential Therapeutics: Towards Clinical Application of 10-23 DNAzymes // Expert Opinion on Biological Therapy, 2015. 689–711
3. Global tuberculosis report [Электронный ресурс]. - 2018. - Режим доступа: <https://apps.who.int/>, свободный.