

УДК 577.29

**УВЕЛИЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ДЕТЕКЦИИ МУЛЬТИПЛЕКСНЫХ ПАТОГЕНОВ, ОСНОВАННОЙ НА РЕАКЦИИ NASBA И ПЕРОКСИДАЗОПОДОБНОМ АПТАМЕРЕ**

**Автор - Мальцева Ю.И. («Университет ИТМО»)**

**Соавторы - Горбенко Д.А., Шкоденко Л.А. («Университет ИТМО»)**

**Научный руководитель – к.х.н., проф. Колпащиков Д.М. («Университет ИТМО»)**

**Аннотация.** Разделение мультиплексной группы одновременно амплифицированных последовательностей патогенов на подгруппы увеличило чувствительность ДНК-сенсоров, основанных на пероксидазоподобном аптамере.

**Введение.** Детекция нуклеиновых кислот - базовый принцип диагностики патогенных инфекций. Быстрая и своевременная диагностика является решающим фактором в определении эпидемиологических мероприятий и обеспечении контроля за лечением больных. Кроме того, необходимы избирательные системы, на сегодняшний момент недоступные в условиях без специального оборудования и обученного персонала, такие как полимеразная цепная реакция. РОСТ (point-of-care testing) системы с такими полезными характеристиками, как простота в использовании, портативность и чувствительность - новое слово в современной диагностике. Она особенно важна в условиях нехватки времени или когда отсутствует инфраструктура здравоохранения.

Использование новой концепции биосенсоров может быть разумным решением из-за их чувствительности, простоты, низкой стоимости, возможной миниатюризации и автоматизации - все эти качества являются определяющими для РОСТ. Так, специальные ДНК-сенсоры на основе аптамера пероксидазы (Dz) используются для визуального обнаружения амплифицированных последовательностей.

**Основная часть.** Бинарный гуаниновый квадруплекс (G-4) использовали для обнаружения патогенов. G-4 строится из G-квартетов, состоящих из четырех оснований гуанина, которые связываются друг с другом посредством водородных Хугстиновских связей, а два или более G-квартетов могут накладываться друг на друга с образованием G-4 структур.

G-4 в составе сенсора образуется из двух цепей ДНК. Каждая содержит половину последовательности G-4. Другая часть этих последовательностей комплементарна целевой РНК аналита и отвечает за селективное связывание. Структура G-4 образуется только при полной комплиментарности рук, и соответственно возможна только при появлении целевого аналита.

G-4 могут образовывать функциональные наноструктуры при ассоциации с молекулами посредством кооперативных электростатических и / или  $\pi$ - $\pi$  взаимодействий. Так, G-4 связывает гемин и катализирует  $H_2O_2$ -зависимое окисление бесцветного субстрата (диаминобензидина - ДАБ) до окрашенного продукта.

Чтобы создать быструю, селективную и недорогую диагностическую систему для анализа генов, не требующую клинических условий, было решено улучшить ранее полученную в нашей лаборатории систему детекции мультиплексных пробы, состоящей из 6 патогенов одновременно. Для этого было решено разделить эту группу на подгруппы, чтобы определить наиболее подходящую комбинацию для амплификации.

Тотальную РНК экстрагировали из бактериальных и вирусных клеток с помощью реактива Extract RNA (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Для накопления целевой последовательности РНК проводили NASBA амплификацию при температурах 65 °C и 41 °C в течение 15 и 90 мин соответственно.

Продукты реакции NASBA анализировали электрофорезом в 2 % агарозном геле в 1x TBE буфере. Образцы аналита с сенсорами, геминном, ДАБом и  $H_2O_2$  инкубировали при комнатной

температуре (23 - 25 °C) в течение 20 минут с последующим визуальным анализом и измерением оптической плотности ( $\lambda = 500$  нм) на спектрофотометре NP50, Implen, Германия. Оптическая плотность образцов с продуктами синглексной реакции для *N. meningitides* составляла  $0,96 \pm 0,13$ , а мультиплексной –  $0,65 \pm 0,11$ . Аналогично для патогенов Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus, *S. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *E. coli*: оптическая плотность отличалась в 1,2 – 1,7 раз.

Группа из вышеуказанных шести патогенов была случайным образом разделена на несколько меньших подгрупп, пока не были получены результаты с наиболее ярким средним сигналом. Наибольшая средняя оптическая плотность растворов наблюдалась при проведении детекции в таких группах возбудителей, как:

- Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus, *S. pneumoniae*;
- Cytomegalovirus, *S. pneumoniae*, *N. meningitides*;
- Epstein-Barr virus, *L. monocytogenes*, *E. coli*;
- *N. meningitides*, *L. monocytogenes*, *E. coli*.

**Выводы.** Разделение группы патогенов на подгруппы с меньшим количеством амплифицируемых фрагментов увеличивает чувствительность реакции обнаружения.