

СОЗДАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ С ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИЕЙ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПАТОГЕНОВ ЦНС В КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

К.А. Иванова, Е.А. Ковтунов, Е. И. Кошель, Л.А. Шкоденко (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)

Инфекции центральной нервной системы (ЦНС) характеризуются высоким уровнем смертности, стремительным развитием жизнеугрожающих состояний и инвалидизирующими последствиями. По данным ВОЗ, точных оценок распространенности инфекций ЦНС среди населения нет в связи с низким уровнем диагностики. В то же время задержка назначения адекватной терапии на каждый час приводит к снижению выживаемости пациентов с сепсисом на 6-7% [1, 2]. Таким образом, быстрое выявление этиологии заболеваний центральной нервной системы является актуальной темой для эффективного здравоохранения.

Поскольку традиционные подходы к детекции патогенов требуют времени, многие современные исследования базируются на использовании молекулярных методов, таких как полимеразная цепная реакция. Однако, использование ПЦР до сих пор ограничивается временем извлечения нуклеиновых кислот (НК) из биологических образцов. Поэтому, целью настоящей работы является разработка инновационных молекулярно-диагностических подходов, требующих минимального оборудования для экстракции нуклеиновых кислот.

В настоящей работе было проведено исследование различных материалов на предмет их пригодности для адсорбции НК с последующим использованием их в реакции амплификации. В качестве твердофазного носителя были выбраны несколько типов бумаг: обычная фильтровальная бумага Whatman и ФТА-карты [3]. Сорбция ДНК на бумагу основана на простом физическом связывании молекулы ДНК с бумажным матриксом, при этом модификация бумаги с помощью положительно заряженного полимера способна усилить связь ДНК-бумага посредством дополнительных электростатических взаимодействий. Данный метод позволяет стандартизировать процесс амплификации, так как бумага одного диаметра способна адсорбировать на себя только определенное количество матрицы.

Для ПЦР в качестве матрицы использовали как очищенные препараты ДНК бактерий *E. coli*, так и лизаты клеток. Сравнение носителей показало, что фильтровальная бумага Whatman эффективно связывает ДНК и не ингибирует реакцию амплификации, в отличие от ФТА-карт. Результаты амплификации на фильтровальной бумаге были сопоставимы с результатами, когда идентичное количество матрицы ДНК было добавлено непосредственно в реакцию ПЦР.

Следующий этап работы предполагает использование изотермической амплификацией с обрывом цепи (SDA), так как она не требует денатурации ДНК и проходит при постоянной температуре 45 – 55°C [4, 5]. Совмещая метод адсорбции ДНК на бумагу с изотермической амплификацией “in situ”, данная методика позволит объединить эти необходимые, но разрозненные до сегодняшнего дня стадии в одну тест-систему.

Список использованной литературы

1. Manchanda, V., et al. (2006). "Meningococcal disease: history, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, antimicrobial susceptibility and prevention." *Indian J Med Microbiol* 24(1): 7-19.
2. Abio, A., et al. (2013). "An epidemiological review of changes in meningococcal biology during the last 100 years." *Pathog Glob Health* 107(7): 373-380.
3. Wupeng G., Yin G., Junping H., Jing S., Peng L. - Chitosan-Modified Filter Paper for Nucleic Acid Extraction and "in SituPCR" on a Thermoplastic Microchip. - *Anal. Chem.*, 2017, 89 (6), pp 3568–3575.
4. Lei Yan., et al. (2014). "Isothermal amplified detection of DNA and RNA." *Mol. BioSyst* 10: 970 – 1003
5. S. Ehses et al. (2005). "Optimization and design of oligonucleotide setup for strand displacement amplification." *J. Biochem. Biophys. Methods* 63: 170–186