

УДК 577.2.086

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ БИНАРНЫХ ДЕЗОКСИРИБОЗИМНЫХ ЗОНДОВ

Земерова Т.П. (Университет ИТМО), Рубель М.С. (Университет ИТМО)

Научный руководитель – к.х.н., проф. Колпашиков Д.М.

(Университет ИТМО)

В данной работе основной целью является разработать и оптимизировать систему ДНК-сенсоров на основе бинарных дезоксирибозимных зондов, которые будут дешевле и проще в использовании. Первой частью работы является создание мультиплексной системы, позволяющей анализировать до трех аналитов в одном реакционном растворе. Вторая часть – поиск условий для понижения температуры инкубации реакционного раствора.

Точное и селективное обнаружение специфических нуклеиновых кислот с помощью различных методов гибридизации ДНК играет большую роль в диагностике инфекционных заболеваний. Разработка и оптимизация сенсоров на основе бинарных дезоксирибозимных зондов является перспективным направлением в этой области. Такая каталитическая система не требует ферментов, используя только стабильные ДНК-олигонуклеотиды, которые можно без труда синтезировать под свои задачи. Система достаточно универсальна, не требует большого числа дорогостоящего оборудования, анализ занимает всего небольшое количество времени.

В основе используемой в работе тест-системы лежит дезоксирибозим 10-23. Дезоксирибозимы представляют собой каталитические молекулы ДНК, которые при связывании с целевыми РНК- или ДНК-молекулами (с помощью двух последовательностей ДНК) образуют дезоксирибозимный кор, который расщепляет флуорогенный субстрат (F-субстрат), что дает флуоресцентный сигнал. В качестве аналита был взят фрагмент синтетической одноцепочечной ДНК. Предел чувствительности для нашей системы составляет примерно 50 pM при 55°C. В качестве флуорофоров на данный момент мы брали FAM, Cy5.5, Quasar 670. С флуорофорами FAM и Quasar 670 реакция проходит успешно. Для флуорофора FAM были проведены эксперименты с понижением температуры инкубации и различными комбинациями укороченных Dza и Dzb. В результате были найдены те комбинации укороченных в разной степени Dza и Dzb, с использованием которых расщепление F-субстрата проходит достаточно эффективно при всех температурах, в том числе и при комнатной (23°C). Для комбинаций Dza/Dzb, с которыми реакция проходит наиболее успешно для каждой температуры, были найдены пределы обнаружения, которые составили примерно 50-100 pM (при понижении температуры инкубации предел обнаружения повышался). Для флуорофора Cy5.5 расщепления F-субстрата в присутствии аналита не происходило.

В результате проведенных экспериментов было показано, что при правильном подборе длины последовательностей ДНК у сенсора возможна его работа с высокой эффективностью при комнатной температуре. Также было подобрано два разных флуорофора для мультиплексной системы. В дальнейшем планируется провести эксперименты с понижением температуры инкубации для флуорофора Quasar 670 и найти третий флуорофор для F-субстрата. Успешная разработка мультиплексной системы позволит детектировать несколько разных аналитов в одном реакционном растворе. Всё это даст возможность гораздо упростить и удешевить процедуру проведения диагностики инфекционных заболеваний в будущем.