

ДНК-биосенсор для детекции двухцепочечной ДНК вируса папилломы человека 16 типа.

Гончарова Е.А., Лялина Т.А. (Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, химико-биологический кластер, Санкт-Петербург, Россия)

Научный руководитель: Колпащиков Д.М., к.х.н., профессор (Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, химико-биологический кластер, Санкт-Петербург, Россия)

В существующих на данный момент методах детекции ДНК с помощью гибридизационных зондов (ГЗ) используется в качестве аналита только одноцепочечная ДНК, получаемая либо с помощью асимметричной полимеразной цепной реакции (ПЦР), либо обработкой экзонуклеазами, либо денатурацией двухцепочечной (дц) ДНК [1,2]. Все эти подходы не позволяют проводить анализ в приближенных к физиологическим условиям. В данной работе был разработан ДНК-биосенсор, основанный на синтетических дезоксирибозимах [3], как новый метод детекции дцДНК при температуре 30°C. В качестве дц аналита в нашей работе использовалась дцДНК вируса папилломы человека (ВПЧ). ДНК-биосенсор, состоящий из нескольких цепей ДНК, может раскручивать дц аналит, образуя с ним стабильный комплекс [4], и специфически распознавать его, генерируя флуоресцентный сигнал при расщеплении субстрата, меченного флуорофором и гасителем.

Был сконструирован ДНК-биосенсор, способный комплементарно связывать амплифицированный синтетический фрагмент дцДНК (180 пар оснований (п.о.)) и полногеномную плазмиду (ПП) (9000 п.о.) ВПЧ 16 типа без предшествующей денатурации. Состоятельность амплифицированного синтетического фрагмента дцДНК ВПЧ 16 типа и ПП проверяли путем агарозного гель-электрофореза. Далее проводилась инкубация на водяной бане при 30°C ДНК-биосенсора и флуоресцеинового субстрата с дцДНК или ПП. Детекцию флуоресцентного сигнала проводили через 7 часов (ч), 24 ч и 48 ч инкубации с использованием спектрофлуориметра Agilent Cary Eclipse. ДцДНК типа HPV 16 была получена путем амплификации с использованием ПЦР, ПП была приобретена в коммерческой компании.

ДНК-биосенсор был способен детектировать дцДНК и ПП HPV 16 типа с сигналом в 6 раз (для дцДНК) и 2,5 раза (для ПП) превышающим сигнал фона. Минимально детектируемая концентрация для дцДНК и ПП составила 6 нМоль/л и 26 пМоль/л соответственно. Флуоресцентный сигнал увеличивался пропорционально времени инкубации.

Предложенный ДНК-биосенсор позволяет детектировать дцДНК в приближенных к физиологическим условиям без предшествующей модификации. Кроме того, ДНК-биосенсор распознает таргетный участок ДНК в ПП, что доказывает его высокую селективность и чувствительность. Данный метод можно использовать для анализа ампликонов ДНК, полученных методами изотермической амплификации (RPA, LAMP, SDA) без необходимости стадии денатурации или асимметричной амплификации.

Список литературы

1. Guo J, Ju J, Turro NJ. Fluorescent hybridization probes for nucleic acid detection. Anal Bioanal Chem. 2012 Apr;402(10):3115-25.

2. Faltin B, Zengerle R, von Stetten F. Current methods for fluorescence-based universal sequence-dependent detection of nucleic acids in homogenous assays and clinical applications. *Clin Chem.* 2013 Nov;59(11):1567-82.
3. Kolpashchikov D.M. A binary deoxyribozyme for nucleic acid analysis. *Chembiochem.* 2007. No. 8. C. 2039-2042.
4. Schwarz FP, Robinson S, Butler JM. Thermodynamic comparison of PNA/DNA and DNA/DNA hybridization reactions at ambient temperature. *Nucleic Acids Res.* 1999 Dec 15;27(24):4792-800.