

УДК 573.6

ДНК-НАНОМАШИНА ДЛЯ ВИЗУАЛЬНОГО ОБНАРУЖЕНИЯ СТРУКТУРИРОВАННОЙ РНК И ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК

Горбенко Д.А. (Университет ИТМО), Рубель М.С. (Университет ИТМО), Шкоденко Л.А. (Университет ИТМО)

Научный руководитель – к.х.н., профессор Колпашиков Д.М.
(Университет ИТМО, Университет Центральной Флориды)

Современная медицинская диагностика основывается на идентификации специфических нуклеиновых кислот с использованием гибридизационных зондов, которые часто не могут обнаружить одноцепочечную (оц) РНК, свернутую в стабильные вторичные структуры, или двухцепочечную (дц) ДНК. В этом исследовании мы добились визуального обнаружения ампликонов оцРНК и дцДНК при комнатной температуре без необходимости стадии отжига или обработки экзонуклеазой. В этом подходе используются преимущества пероксидазоподобных ДНК-машин (PxDm), которые представляют собой наноструктуру ДНК с дц-платформой, оснащенной несколькими плечами, связывающими аналит.

Введение.

Текущая пандемия COVID-19 указала на высокую потребность в быстрых, доступных и удобных для пользователя диагностических тестах, применимых в пунктах оказания медицинской помощи или дома. Такая диагностика должна требовать минимального количества шагов и оборудования. Диагностика, основанная на амплификации нуклеиновых кислот, включая методы ПЦР или изотермической амплификации, является золотым стандартом молекулярной диагностики. Хорошо известно, что зачастую для выявления присутствия определенных нуклеиновых кислот требуются гибридизационные зонды. Однако образование комплекса между зондом и длинной (> 50 нуклеотидов (нт)) оцДНК или РНК анализируемого вещества осложняется вторичной и третичной структурой аналита. Традиционный подход к решению этой проблемы заключается в нацеливании зонда на открытые фрагменты РНК или оцДНК, которые предсказываются с помощью программного обеспечения. Будучи распространенным, этот путь осложняется неточностью вычислительных предсказаний вторичных и третичных структур нуклеиновых кислот, таким образом, требуя альтернативных подходов. Эффективный метод молекулярной диагностики может быть разработан с использованием высокоселективных гибридизационных зондов, дающих визуальные результаты. Кроме того, актуальной задачей является распознавание длинной свернутой оцРНК или дцДНК. В настоящее время распознавание этих аналитов стремятся проводить при температуре окружающей среды, чтобы избежать необходимости в термостате.

Основная часть. Мы предлагаем решить проблему распознавания сложносвернутых и двухцепочечных нуклеиновых кислот путем создания многокомпонентных зондов, способных раскручивать вторичные структуры нуклеиновых кислот. В данной работе мы разрабатываем общие принципы построения таких зондов.

Listeria monocytogenes и *Citomegalovirus* являются возбудителями ряда заболеваний человека, таких как листериоз, острые респираторные вирусные инфекции, воспаление различных внутренних органов, пневмония и бронхит. Для идентификации этих организмов мы выбрали специфические гены, которые конститутивно экспрессируются. Организм-специфические ампликоны оцРНК длиной 88-87 нуклеотидов были получены в реакции амплификации на основе последовательности нуклеиновых кислот (НАСБА), которая продуцирует ампликоны оцРНК. В свою очередь фрагменты дцДНК были получены в реакции ПЦР с обратной транскрипцией (от-ПЦР). Ампликоны НАСБА и от-ПЦР анализировали с помощью многокомпонентных пероксидазоподобных дезоксирибозимных зондов (PxDm). В этом

подходе зонды используют 1–3 аналит-связывающих плеча, предназначенных для прочного связывания и раскручивания оцРНК и дцДНК аналитов, в то время как другое связывающее аналит плечо избирательно распознает специфическую последовательность аналита и образует структуру G-квадруплекса (G-4). Структура G-4 меняет цвет в присутствии гемина, H₂O₂ и бесцветного органического субстрата, например, диаминобензидаина.

Выводы. Нами разработаны многокомпонентные пероксидазоподобные дезоксирибозимные (PxDm) зонды для детекции ампликонов оцРНК и дцДНК патогенов человека *Listeria monocytogenes* и Cytomegalovirus. Показано, что при использовании конструкции PxDm нет необходимости отжига гибридизационного зонда со свернутой РНК для эффективного обнаружения. О присутствии ампликонов НАСБА сообщалось с отношением сигнал/фон ≥ 3 без необходимости выделения РНК из реакционной смеси. Удивительно, но тот же PxDm в некоторых случаях может обнаруживать ампликоны дцДНК при комнатной температуре (показано для *Listeria monocytogenes*). Это открытие обеспечивает основу для разработки нового класса гибридизационных зондов, которые анализируют одноцепочечную или двуцепочечную ДНК при температуре окружающей среды без отжига и, таким образом, закладывают основу для быстрой и удобной визуальной диагностики инфекционных заболеваний в местах оказания медицинской помощи. Метод универсален, так как потенциально применим для анализа любой последовательности нуклеиновых кислот.

Горбенко Д.А. (автор)

Колпашиков Д.М. (научный руководитель)