

**ВИЗУАЛЬНОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ПАТОГЕНОВ
ПРИ ПОСТОЯННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ С ПОМОЩЬЮ ДНК-НАНОСЕНСОРОВ****Автор - Мальцева Ю.И.** (Национальный исследовательский университет ИТМО)**Соавторы - Горбенко Д.А., Мударисова Р.С., Шкоденко Л.А.** (Национальный исследовательский университет ИТМО)**Научный руководитель – к.х.н., проф. Колпащиков Д.М.** (Национальный исследовательский университет ИТМО, Университет Центральной Флориды)

Показано, что использование гибридных ДНК-наносенсоров с пероксидазной активностью в сочетании с изотермической амплификацией позволяет визуально выявить 10–100 клеток. Метод позволяет определить однонуклеотидные замены, проявляет селективность в отношении других мишеней и не обнаруживает неспецифических продуктов амплификации. Метод не требует отжига ДНК-наносенсоров с мишенью при повышенных температурах, что может упростить его использование в тестировании на месте оказания помощи.

Введение. Своевременное выявление возбудителей инфекционных заболеваний на ранних стадиях развития болезни позволяет вовремя начать соответствующую терапию во избежание развития осложнений. Современные технологии диагностики, как полимеразная цепная реакция (ПЦР), имеют ограничения в виде высокой стоимости реагентов, необходимости сложного, дорогостоящего оборудования и обслуживающего его персонала. Технологии же изотермической амплификации нуклеиновых кислот позволяют накапливать целевые фрагменты при фиксированной температуре, что предоставляет удобство для создания тест-систем для детекции на месте оказания помощи (point-of-care testing, ПОСТ). Однако, они имеют свои недостатки. Например, петлевая изотермическая амплификация (loop mediated isothermal amplification, LAMP) часто сопровождается накоплением неспецифического продукта и ложноположительными результатами. Предлагаются различные способы повышения специфичности реакции. Так, была разработана изотермическая амплификация с использованием упрощенного стержне-петлевого праймера (stem-loop-primer assisted amplification, SPA), которая обеспечивает сниженный риск ложноположительных результатов. Существуют различные методики считывания сигнала. Неспецифичные методики анализа накопления продукта LAMP (электрофорез, оценка мутности раствора, флуоресцентные и колориметрические красители) часто дают ложноположительные результаты из-за неспецифической амплификации. Флуоресцентные зонды специфично связываются с продуктом, но требуют устройств считывания флуоресценции. Тем не менее, более широко применимая технология должна иметь легко считываемый сигнал, а также сочетать диагностическую точность ПЦР с простотой использования и экономичностью изотермической амплификации. Кроме того, такие диагностические технологии должны быть способны идентифицировать замены одиночных нуклеотидов для выявления мутаций. Таким образом, сочетание удобства изотермической амплификации, селективности зондов и их специфичности к одному нуклеотиду, а также детекции, не требующей дополнительных приборов, должно стать конкурентоспособным кандидатом при разработке тест-систем ПОСТ.

Основная часть. В данной работе представлена комбинация амплификации и комплементарных целевой последовательности ДНК-наносенсоров (T1, T2 и F7), которые формируют структуру G-квадруплекса (G-4) при гибридизации с аналитом. Комплекс G-4/гемин, действующий как активированная пероксидаза хрена, в присутствии перекиси водорода может катализировать окисление 3-3'-диаминобензидаина тетрагидрохлорида (DAV) с получением колориметрического сигнала.

Детекцию проводили в реакционном буфере (50 мМ HEPES, pH 7,4, 50 мМ MgCl₂, 70 мМ KCl, 120 мМ NaCl, 0,03% Тритон X-100, 1% ДМСО, 1 мМ DAV, 1 мМ H₂O₂, 1 мкМ гемина, 1 мкМ каждого из сенсоров, аналит) с последующим колориметрическим анализом с помощью

нанофотометра N50, Implen, Германия, и анализом отношения сигнал/фон (S/B) при сравнении с отрицательным контролем.

Очищенные продукты амплификаций ПЦР, LAMP и SPA (300 нг каждого) были выбраны для изучения эффективности ДНК-наносенсоров детектировать двуцепочечные ДНК фрагменты гена *malB* модельного организма *Escherichia coli* как с предварительной инкубацией раствора при 95° для денатурации вторичных структур, так и при комнатной температуре. Таким образом, в то время как продукты амплификации ПЦР и LAMP можно было обнаружить только с помощью денатурации ($S/B_{\text{ПЦР}} = 2,88$, $S/B_{\text{LAMP денатур}} = 2,70$), продукты амплификации SPA выявляли и с денатурацией, и при комнатной температуре ($S/B_{\text{SPA денатур}} = 2,39$, $S/B_{\text{SPA RT}} = 2,70$), что является более удобным методом амплификации для РОСТ. В связи с этим для дальнейшего развития технологии был выбран тип амплификации SPA.

Для определения наиболее подходящего времени проведения детекции 300 нг продукта SPA в течение реакции измеряли оптическую плотность реакционного раствора. Так, в ходе реакции увеличивается как уровень сигнала, так и уровень фона, что приводит к уменьшению S/B на 20-й минуте. Оптимальное время инкубации составило 15–20 минут ($S/B = 2,72$), однако, уже через 5 минут можно заметить разницу между сигналом и фоном.

Амплификация различных титров геномных эквивалентов *E. coli* с последующей детекцией 1 мкл амплификационной смеси показала возможность идентифицировать от 10–100 клеток ($S/B_{10} = 2,26$, $S/B_{100} = 2,49$).

Для оценки селективности разработанные для *E. coli* сенсоры использовали для анализа продуктов SPA 10000 ГЭ различных видов патогенов центральной нервной системы (вирус Эпштейна-Барр (ЕБВ), *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*). Обнаружение ЕБВ ($S/B = 1,08$), *L. monocytogenes* ($S/B = 1,02$) и *S. agalactiae* ($S/B = 1,13$) не было показано.

Чтобы оценить способность ДНК-наносенсоров обнаруживать точечные мутации, полностью комплементарный аналиту сенсор F7 и аналогичный ему F7-SNP с несоответствием по одному основанию были исследованы путем сравнения окрашивания реакционных смесей с каждым сенсором в составе. Уровень окрашивания был значительно ниже при использовании сенсора с одним измененным основанием ($S/B_{F7} = 2,92$, $S/B_{F7-SNP} = 1,35$).

Чтобы оценить возможную защиту системы от ложноположительных результатов, вызванных неспецифической амплификацией, положительную и отрицательную амплификационную смеси SPA выдерживали при +20 °C в течение ночи, а затем амплифицировали параллельно со свежесмешанной реакцией. Электрофорез показал неспецифическую амплификацию в отрицательной лунке. Тем не менее сенсоры смогли различить положительную реакцию без фонового сигнала ложноположительной амплификации.

Создатели SPA упоминали, что петлевые праймеры могут иметь динуклеотиды AA/TT или CC/GG на концах петель. Для анализа возможности использования различные динуклеотиды для создания дуплексной системы был разработан набор сенсоров на ЕБВ. Реакцию SPA проводили с наборами праймеров AA *E.coli*/AA ЕБВ и AA *E.coli*/CC ЕБВ а затем анализировали с помощью сенсоров. Было показано, что фоновый сигнал высокий, если оба набора праймеров содержат одну и ту же петлю. Но *E.coli* и ЕБВ можно различить в случае комбинации AA/CC.

Выводы. Изотермическая амплификация SPA позволяет обнаруживать различные мишени в сочетании с колориметрическими ДНК-наносенсорами без предварительного нагрева анализируемых нуклеиновых кислот. Он демонстрирует чувствительность от 10 клеток с исследуемым набором праймеров и селективность в отношении других накопленных мишеней и SNP. Сенсоры обеспечивают защиту от ложноположительных результатов, вызванных неспецифическим связыванием в наборе праймеров. Существует возможность создания мультиплексного обнаружения путем изменения внешних частей петель праймера. Использование предложенной технологии может позволить проводить РОСТ диагностику с визуальным считыванием сигнала и при постоянной температуре.