

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ БЕЗАМПЛИФИКАЦИОННОЙ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСОВ-ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Соляникова В.В. (Университет ИТМО)

Научный руководитель к.х.н. Колпашиков Д.М. (Университет ИТМО)

Введение.

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) – это инфекции верхних дыхательных путей, которые вызываются различными респираторными вирусами: риновирусами, коронавирусами, аденовирусами, а также вирусами гриппа и парагриппа [1].

Способность вирусов быстро мутировать и передаваться между хозяевами делает чрезвычайно актуальной разработку динамических методов обнаружения вирусных штаммов.

Основным методом, применяемым для диагностики, в настоящее время остается количественная ПЦР с обратной транскрипцией. Этот метод позволяет с высокой точностью провести диагностику вирусов, однако требует дорогостоящего оборудования, реагентов, необходимых для обратной транскрипции и полимеразной реакции, а также высококвалифицированного персонала. Одной из многообещающих альтернатив классическим методам диагностики являются ДНК-наносенсоры.

Основная часть.

В данной работе были разработаны и протестированы два варианта ДНК-наносенсоров, представляющих два разных диагностических подхода: бинарные ДНК-зонды с молекулярным маячком в качестве репортерной пробы и многокомпонентные ДНК-наномашинны с дезоксирибозимным кором.

ДНК-сенсор с молекулярным маячком не требует для диагностики долгого времени или специальных температурных условий инкубирования, однако имеет сниженную чувствительность по сравнению с многокомпонентными ДНК-наномашиннами. Ранее в исследованиях было показано, что сенсоры такого типа способны к эффективной безамплификационной детекции РНК бактериальных клеток, было выявлено, что предел чувствительности данных сенсоров находится в рамках значений 1 нМ [3, 4]. Для безамплификационной детекции бинарные зонды не будут достаточно эффективны и с высокой долей вероятности могут давать ложноотрицательный результат. Для преодоления проблемы чувствительности детекции были разработаны дизайны ДНК-наномашин, основной принцип работы которых заключается в каталитической активности дезоксирибозима 10-23. Он представляет собой ДНК олигонуклеотид, обладающий каталитической активностью для определенной последовательности благодаря формированию каталитического ядра, которое образуется после связывания с этой последовательностью [3]. Бинарные дезоксирибозимные сенсоры демонстрируют улучшенную селективность распознавания нуклеиновых кислот по сравнению с традиционными гибридационными зондами, однако они также имеют ограничения по пределу детекции из-за образования сложных вторичных структур РНК. В связи с этим, был разработан дизайн многокомпонентной наномашинны с дополнительными РНК-связывающими последовательностями и дополнительной двухцепочечной ДНК платформы, которые способны к более успешному распознаванию и раскручиванию детектируемых вторичных РНК структур. Также дизайн был улучшен с помощью добавления в конструкцию цепи Hook, связывающейся с ДНК-платформой и частично комплементарной флуоресцирующему субстрату [5]. Hook цепь, являясь частью ДНК-наномашинны, вследствие комплементарности флуоресцирующему субстрату привлекает его из раствора и повышает его локальную концентрацию вокруг дезоксирибозимного кора, что впоследствии увеличивает сигнал.

Выводы.

Было показано, что предел детекции для мультикомпонентной ДНК-наномашинны, разработанной для диагностики вируса парагриппа человека 3 типа составляет 27 пМ, что является многообещающим подходом для безамплификационной диагностики РНК вирусов в клинических образцах с минимальными затратами на оборудование, реактивы и персонал.

Список использованных источников:

1. Health system considerations: when influenza meets COVID-19. Revised Version December 2020. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2020. Licence: “<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo/>” CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Fozouni, P., Son, S., Díaz de León Derby, M., Knott, G. J., Gray, C. N., D'Ambrosio, M. V., Zhao, C., Switz, N. A., Kumar, G. R., Stephens, S. I., Boehm, D., Tsou, C. L., Shu, J., Bhuiya, A., Armstrong, M., Harris, A. R., Chen, P. Y., Osterloh, J. M., Meyer-Franke, A., Joehnk, B., ... Ott, M. (2021). Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell*, 184(2), 323–333.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.001>
3. Dmitry M. Kolpashchikov (2019) Evolution of Hybridization Probes to DNA Machines and Robots, *Acc. Chem. Res.* 52, 7, 1949–1956.
4. Gerasimova YV, Kolpashchikov DM. Detection of bacterial 16S rRNA using a molecular beacon-based X sensor. *Biosens Bioelectron.* 2013 Mar 15;41:386-90.
5. Cox AJ, Bengtson HN, Gerasimova YV, Rohde KH, Kolpashchikov DM. DNA Antenna Tile-Associated Deoxyribozyme Sensor with Improved Sensitivity. *Chembiochem.* 2016 Nov 3;17(21):2038-2041.