

УДК 577.2

ОПТИМИЗАЦИЯ РЕАКЦИИ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ С ПРАЙМЕРАМИ СО СТВОЛОВЫМИ ПЕТЛЯМИ (SPA) ДЛЯ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В АВТОМАТИЗИРОВАННОМ ДИАГНОСТИЧЕСКОМ УСТРОЙСТВЕ

Колесникова М.А. (Университет ИТМО), Шитова А.С. (Университет ИТМО), Бобков Г.А. (Университет ИТМО), Шкоденко Л.А. (Университет ИТМО)

Научный руководитель – к.б.н., доцент Кошель Е.И.

(Университет ИТМО)

Введение. Такие широко известные и отработанные методы, как ПЦР и LAMP популярны для диагностики различных инфекций. Однако, ПЦР слишком сложна для диагностики в месте оказания первой помощи. Мы предлагаем использовать метод изотермической амплификации с праймерами со ствольными петлями (SPA) с более простым дизайном праймеров и меньшей вероятностью образования неспецифичного продукта в следствие амплификации димеров праймеров чем в реакции LAMP [1], а также колориметрически детектировать продукт амплификации с помощью чувствительного к магнию красителя HNB (гидроксинафтол-синий).

Целью настоящей работы является оптимизация реакции изотермической амплификации SPA для выявления патогенов центральной нервной системы и детекция с помощью HNB с целью дальнейшего использования в автоматизированном диагностическом устройстве.

Основная часть. В работе использовались образцы ДНК бактерий *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*. Геномную ДНК извлекали методом фенол-хлороформной экстракции.

Состав реакционно смеси SPA: 10x буфер для bst полимеразы (SibEnzyme), MgSO₄ (8 mM - 12 mM в зависимости от праймеров) (SibEnzyme), 0,01% этиленгликоль, dNTP (Evrogen), bst полимеразы, пара специфичных для последовательности праймеров (далее Frw и Rw праймеры) и пару праймеров со ствольной петлей с той же специфической последовательностью и добавлением петлевой последовательности ТТТАТАТААТАТААА (далее SL праймеры). Итоговые условия постановки SPA: 65°C в течение 30 минут.

Результат амплификации оценивали при помощи электрофореза в 2% агарозном геле с последующим окрашиваем бромистым этидием. Праймеры были подобраны для консервативных областей выбранных патогенов, конструирование осуществлялось с помощью Primer-blast.

Детекцию осуществляли с путём предварительного добавления в реакционную смесь 120 мкм HNB и наблюдали изменение окраски раствора с фиолетового на синий вследствие изменения концентрации свободного магния Mg²⁺. В ходе реакции SPA образуется большое количество пирофосфат ионов, которые взаимодействуют с ионами магния, образуя нерастворимый осадок - пирофосфат магния, на что и реагирует гидроксинафтол-синий [2].

Выводы. Были успешно оптимизированы реакции амплификации ДНК 6 патогенов, путём оптимизации температуры, времени реакции, концентрации магния, праймеров, этиленгликоля, а также определена чувствительность реакции. Все праймеры были подобраны и оптимизированы для температуры реакции 65°C. Также было обнаружено, что неспецифическая амплификация существенно снижается при соотношении классических праймеров (Frw,Rw) и петлевых SL как 2,5:1, где концентрация классических праймеров не

более 1 мкМ. Чувствительность реакции оказалась не выше 1 мкг/мкл ДНК для всех протестированных патогенов. Также реакция оказалась устойчива к загрязнениям и протекала в присутствии 1 мкл цельной крови в реакционной смеси. Были успешно детектированы образцы с ДНК целевого патогена в образце с помощью красителя HNB.

Реакция изотермической амплификации с праймерами со ствольными петлями SPA совместно с детекцией красителем HNB показала себя как многообещающий метод для использования в диагностике инфекций на месте оказания первой помощи благодаря её устойчивости к загрязнениям в реакционной смеси, протеканию при постоянной температуре и высокой чувствительности. Подобранный набор праймеров планируется использовать в автоматическом диагностическом устройстве.

Список использованных источников:

1. Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*. 2009 Mar;46(3):167-72. doi: 10.2144/000113072. PMID: 19317660.
2. Luo G, Yi T, Wang Q, Guo B, Fang L, Zhang G, Guo X. Stem-loop-primer assisted isothermal amplification enabling high-specific and ultrasensitive nucleic acid detection. *Biosens Bioelectron*. 2021 Jul 15;184:113239. doi: 10.1016/j.bios.2021.113239. Epub 2021 Apr 12. PMID: 33857727.