

УДК 543.92

**ВИЗУАЛЬНАЯ ДЕТЕКЦИЯ *malB*-ГЕНА С ПОМОЩЬЮ МАГНИТНЫХ
НАНОЧАСТИЦ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ 4WJ-СЕНСОРОМ**

**Быковская М.А. (ИТМО), Березовская М.Ю. (ИТМО), Козаренко А.-М.А, Горбенко Д.А.
(ИТМО)**

**Научный руководитель – кандидат химических наук, профессор Колпащиков Д.М.
(ИТМО, UCSF)**

Введение. Некоторые штаммы кишечной палочки, например, 0157:H7, могут представлять серьезную угрозу для пищевой промышленности, поскольку способны вызывать эшерихиоз. Для надзора и контроля за распространением бактерий пищевого происхождения в продуктах питания и окружающей среде разработаны разнообразные методы. Традиционные методы, основанные на культивировании, надежны, но требуют много времени, трудоемки и не подходят для обнаружения бактерий в режиме реального времени. В свою очередь, методы амплификации нуклеиновых кислот, такие как ПЦР, трудозатратны, а также неспособны отличить живые бактерии от мертвых. Широко входит в практику ИФА на основе антител, но нестабильность, плохая специфичность к точечным мутациям, которые могут быть ассоциированы с антибиотикорезистентностью, высокая стоимость и сложный метод синтеза ограничивают его применение [1].

Поскольку предприятия пищевой промышленности заинтересованы в ранней и качественной диагностике-на-месте (ДМОП), современные разработки направлены на создание безынструментальных тест-систем, позволяющих проводить быструю и специфичную детекцию патогенов на разных этапах производственного процесса.

Основная часть. В представленной работе для детекции гена *malB* (аналита), кодирующего мальтозный оперон у кишечной палочки, был использован бинарный разделенный гибридизационный ДНК-зонд. Разделенные зонды обладают повышенной специфичностью за счет "длинного" аналит-связывающего плеча и повышенной селективностью за счет "короткого" плеча. ДНК-зонд, разработанный в данной работе, основан на конструкции 4-way-junction (4WJ), состоящей из молекулярной шпильки, разворачивающей свою структуру в присутствии аналита (UMB), функционализированный на конце наночастицей магнетита (UMB-NP) и двух нитей ДНК, каждая из которых имеет участки, комплементарные аналиту и UMB [2].

Целью данной работы являлось достижение визуально различимой агрегации ДНК-модифицированных наночастиц магнетита в присутствии аналита. Визуально обнаруживаемая агрегация происходила на стрептавидиновой подложке после добавления аналита. Лимит детекции для полученной тест-системы составлял 1 мкМ, однако комплекс не обладал достаточной селективностью к однонуклеотидным заменам (ОНЗ).

Для повышения селективности "короткое" аналит-связывающее плечо было разделено на 2 составляющие, одна из которых была связана с помощью стрептавидин-биотиновых взаимодействий со стрептавидиновой подложкой, а другая позволяла распознать ОНЗ [3]. Расчет и визуализация процессов сборки комплекса были осуществлены в программе NuPack. В присутствии аналита с ОНЗ, ДНК-зонд собирается отдельно от подложки, и агрегация с магнитными наночастицами не происходит.

Оптимизация концентраций аналит-связывающих плеч ДНК-зонда была предварительно проведена на спектрофлуориметре Тесан в режиме регистрации флуоресценции UMB (480 нм возб./525 нм эм.). Так, молекулярная шпилька (UMB) имела флуорофор и гаситель на концах, и разворачивалась при обнаружении комплементарных олигонуклеотидов и аналита / аналита с ОНЗ. Это соотношение было использовано для агрегационного теста на стрептавидиновой подложке, в результате чего была достигнута визуально различимая агрегация для аналита дикого типа и аналитов с ОНЗ с заменами нуклеотидов Т -> С и С -> Т в разных участках. Агрегация происходила в течении нескольких минут после добавления аналитов.

Выводы. Для 4WJ ДНК-зонда, разработанного на обнаружение гена *malB E.Coli*, обладающего чувствительностью до 1 мкМ аналита, было произведено изменение дизайна с целью повышения визуально регистрируемой селективности к ОНЗ. ДНК-зонд показал выраженную чувствительность к ОНЗ с заменой С -> Т. Полученную тест-систему можно в дальнейшем использовать как *in vitro*, так и для изготовления тест-полосок для детекции ДНК кишечной палочки. Также работа тест-системы будет проверена на продуктах LAMP или SPA-амплификации.

Список использованных источников:

1. Pebdeni A.B. et. Al. Recent advances in optical biosensors for specific detection of E. coli bacteria in food and water // Food control. – 2022. – V. 135. – P. 108822.
2. Gerasimova Y. V., Kolpashchikov D. M. Detection of bacterial 16S rRNA using a molecular beacon-based X sensor // Biosensors and Bioelectronics. – 2013. – Т. 41. – С. 386-390.
3. Kolpashchikov D. M., Gerasimova Y. V., Khan M. S. DNA Nanotechnology for Nucleic Acid Analysis: DX Motif-Based Sensor // ChemBioChem. – 2011. – Т. 12. – №. 17. – С. 2564-2567.