

Детекция 5-МеС двухцепочечных ДНК при помощи 10-23 бинарных деоксирибозимов

Осипов А.Ю. (Университет ИТМО), Атие М. (Университет ИТМО)
Научный руководитель – Рубель М.С. (Университет ИТМО)

Введение. В настоящий момент перед наукой и клиникой остро стоит вопрос детекции различных эпигенетических модификаций, в частности, метилирования. Метилирование определяет характер доступности участков ДНК, а следовательно, и экспрессию генов как в норме, так и в патологии. Все используемые сегодня методы анализа метилирования далеки от идеала из-за их стоимости, сложности или длительных стадий пробоподготовки. Среди них секвенирование на Oxford Nanopore, бисульфитные методы секвенирования и различные методики, основанные на ПЦР.

Одновременно с этим стоит заметить, что в последние годы усилилось развитие технологий ферментов небелковой природы, в частности, бинарных деоксирибозимов (BiDz). Данные ДНК-конструкции способны детектировать специфические последовательности ДНК или РНК намного более селективно в сравнении со стандартными гибридационными зондами, включая выявление SNV (single nucleotide variation). После распознавания аналита, BiDz формирует каталитическое ядро, множественно расщепляющее флуоресцентный субстрат и усиливающее сигнал. Последние исследования также показывают возможность использования таких конструкций для детекции двухцепочечной ДНК (дцДНК) [1].

Основная часть. Модификация ДНК-зондов при помощи LNA (Locked Nucleic Acids) позволяет значительно увеличить селективность и снизить предел обнаружения. LNA - это аналоги нуклеиновых кислот, фиксирующие рибозу в 3'-эндоположении с помощью метиленового мостика между 2'О и 4'С. Олигонуклеотиды, преобразованные таким образом, проявляют более высокую аффинность и специфичность по сравнению с немодифицированными версиями [2]. Исходя из этого, мы считаем, что LNA-модифицированные BiDz сенсоры могут быть использованы для улавливания мельчайших изменений в аффинности, спровоцированных в том числе метилированием. Метилированный цитозин (5-МеС) в данном случае может рассматриваться как SNV, а цепь ДНК, имеющая такое изменение, будет образовывать намного более крепкую связь с распознающим участком BiDz, давая высокий уровень сигнала.

Целевым геном был выбран протоонкоген BRAF. Для проверки гипотезы мы спроектировали и протестировали 2 набора зондов на основе LNA-модифицированных деоксирибозимов. Ввиду специфики таргета, они имели самокомплементарные участки в аналит-распознающей части, что гипотетически могло вызвать самосборку машины и высокий уровень фона. В одном из вариантов использовалась исходная конструкция, во втором же - компенсаторная, с добавлением коротких одноцепочечных фрагментов, призванных препятствовать самосборке машины. На данный момент проведена оценка уровня фона нескольких вариантов ДНК-машины с LNA-вставкой через один нуклеотид и уровень сигнала на цепях ДНК без метилирования. Инкубация проводилась при 37°C в течение 1, 3, 6, и 24 часов.

Выводы. Результаты подтверждают факт внедрения LNA-модифицированных зондов в цепь ДНК и их активацию. Второй компенсирующий набор ДНК-машин демонстрирует лучшее соотношение сигнал/фон при тестировании на неметилированных аналитах, а следовательно, является более перспективным и подлежит дальнейшему исследованию.

Благодарности

Авторы исследования благодарны Министерству образования и науки Российской Федерации № FSER-2022-0009 и программе приоритет 2030.

Список литературы

1. Kolpashchikov D.M. Evolution of Hybridization Probes to DNA Machines and Robots // Acc. Chem. Res. American Chemical Society. 2019. Т. 52. № 7. С. 1949–1956.
2. Pabon-Martinez Y. V. et al. LNA effects on DNA binding and conformation: from single strand to duplex and triplex structures //Scientific Reports. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 11043.

Автор _____ Осипов А.Ю.

Научный руководитель _____ Рубель М.С.