

ЭКСПРЕСС-ДЕТЕКЦИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 4WJ ДНК-СЕНСОРА В ГЕТЕРОГЕННОЙ СИСТЕМЕ

Зеленин К. А.¹, Кадырова Д. А.¹

Научный руководитель – м.н.с. Бобкова М. Ю.¹

¹Университет ИТМО

zelenin@niuitmo.ru

Работа выполнена в рамках темы НИР №FSER-2025-0019 «Развитие фундаментальных основ молекулярной диагностики для разработки новых аналитических систем на основе ДНК-нанотехнологии».

Введение

Современная медицина все сильнее нуждается в ранней диагностике инфекционных заболеваний. Этим задачам в полной мере отвечают ДНК-сенсоры, чья актуальность определяется уникальными свойствами. ДНК-сенсоры способны обнаруживать малые концентрации биомаркеров, таких как бактериальный и вирусный генетический материал, что позволяет выявлять тяжелые заболевания, кардинально повышая шансы на успешное лечение. Важная роль отводится и быстрой диагностике инфекций. Сенсоры идентифицируют патогены за минуты, что критически важно во время пандемий. Более того, они способны с высокой точностью распознавать однонуклеотидные замены (SNP), позволяя оперативно выявлять и отслеживать распространение новых штаммов [1]. Существующие методы анализа часто характеризуются длительным временем проведения, необходимостью значительного количества биологического материала и недостаточной селективностью к однонуклеотидным заменам.

Целью работы являлась разработка быстрого и высокоселективного ДНК-сенсора для детекции SNP и сравнительная оценка его функционирования в растворе и на поверхности.

Основная часть

В данном исследовании был разработан бинарный 4-way-junction (4WJ) ДНК-сенсор, включающий длинную f-«руку», короткую SNP-специфичную m-«руку» и универсальный молекулярный маячок (UMB). F- и m-компоненты содержали аналит-связывающий и UMB-связывающий домены. UMB был модифицирован флуорофором на 5'-конце и гасителем на 3'-конце. В растворе UMB находится в конформации «шпильки», однако при добавлении анализируемой последовательности, сенсор собирается, UMB принимает линейную конформацию, отдаляя флуорофор от гасителя, тем самым увеличивая флуоресцентный сигнал.

Сенсор был адаптирован для работы как в растворе, так и при поверхностной иммобилизации на агарозных носителях посредством стрептавидин-биотинового взаимодействия. В качестве анализируемого объекта был выбран патоген *Mycoplasma genitalium* – возбудитель ИППП, способный приобретать антибиотикорезистентность. Была исследована однонуклеотидная замена (A – G) в позиции 2072 кодирующего гена 23S рРНК, связанная с устойчивостью к макролидам — антибиотикам, ингибирующим синтез бактериальных белков [2].

Была проведена оптимизация концентраций компонентов системы. Оценены предел обнаружения (LOD) ~ 0,5 нМ, фактор селективности (SF) ~ 95% и кинетические параметры гибридизации. Кинетический анализ включал определение времени достижения сигнала, превышающего пороговое значение в 1.5 раза ($\tau_{1,5}$ ~ 1,5 мин).

Выводы

В результате работы был разработан многокомпонентный 4WJ ДНК-сенсор, обеспечивающий быструю и селективную детекцию однонуклеотидных полиморфизмов в гетерогенной системе при концентрациях аналита от 0,5 нМ. Система демонстрирует сохранение чувствительности и специфичности при переходе от гомогенной к гетерогенной системы. Время детекции составляет менее 2 минут, что указывает на перспективность конструкции для применения в экспресс-диагностике инфекционных и генетических заболеваний.

Литература

1. Kolpashchikov D. M. Binary probes for nucleic acid analysis //Chemical reviews. – 2010. – Т. 110. – №. 8. – С. 4709-4723.
2. Shimada Y, Deguchi T, Nakane K, Yasuda M, Yokoi S, Ito S, Nakano M, Ito S, Ishiko H. Emerg Infect Dis. 2011, 17, 1148-50.