

**Разработка многокомпонентных зондов для визуального обнаружения структурированных РНК и одноцепочечных ДНК.**

**Научный руководитель – Колпащиков Дмитрий Михайлович**

**Горбенко Дарья Александровна**

*Студент (магистр)*

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: daryarogova7@gmail.com*

Эффективный метод молекулярной диагностики в месте оказания медицинской помощи (ДМОП) крайне важен для России с учетом больших территорий. Использование приборов, соответствующих концепции ДМОП, поможет быстрее выявлять возбудителей инфекций и диагностировать заболевания на ранней стадии, без перемещения пациента или образцов в другие населенные пункты.

Такой прибор может быть разработан с использованием высокоселективных многокомпонентных гибридационных зондов, предоставляющих визуальный выходной сигнал: считывание такого сигнала не требует вовлечения дополнительного оборудования, а многокомпонентные гибридационные зонды имеют преимущества в точности детекции полиморфизмов по сравнению с пробами ПЦР в реальном времени и другими вариантами однокомпонентных проб. Более того, распознавание сложно-свернутых одноцепочечных (оц) РНК или ДНК аналитов предпочтительнее осуществлять при температуре окружающей среды, чтобы избежать необходимости использования термостата или другого оборудования. Мы предлагаем решить проблему распознавания свернутых аналитов путем создания многокомпонентных ДНК-зондов, способных разворачивать вторичные структуры нуклеиновых кислот. В этом исследовании представлены общие принципы создания таких зондов.

*Listeria monocytogenes* и *Cytomegalovirus* являются патогенами, вызывающими ряд заболеваний человека, таких как листериоз, острые респираторные вирусные инфекции, воспаление различных внутренних органов, пневмония и бронхит. Два возбудителя, бактериальной и вирусной природы, были выбраны для наилучшей демонстрации применимости концепции. Для идентификации этих организмов мы выбрали специфические для организма гены, которые конститутивно экспрессируются. В результате реакции первичного накопления на основе последовательностей нуклеиновых кислот (NASBA) были получены ампликоны оцРНК длиной 88-87 нуклеотидов. Эти ампликоны детектировали с помощью многокомпонентных пероксидазоподобных дезоксирибозимных (mPxD) зондов. В этом подходе зонды содержат 1-3 связывающих участка, предназначенных для точного распознавания и расплетения аналитов оцРНК, в то время как еще один РНК-связывающий участок избирательно распознает интересующую последовательность и формирует структуру G-квадруплекса (G-4). Структура G-4 меняет цвет в присутствии гемина, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и бесцветного органического субстрата, например, диаминобензидина. В этом исследовании мы определили длину и фрагменты ампликона оцРНК для связывания плечами зондов mPxD, чтобы гарантировать высокую селективность и значимое соотношение сигнал/фон (S/B). Ампликоны и *Listeria monocytogenes*, и *Cytomegalovirus* распознавались с высокой селективностью и отношением S/B ~5,36 без необходимости выделения РНК из реакционной смеси NASBA.