

Разработка тест-системы для детекции вируса Guanarito на основе дезоксирибозимов

Научный руководитель – Долгова Анна Сергеевна

Кириченко Анастасия Дмитриевна

E-mail: anastasiiakirichenko97@gmail.com

Вирус Guanarito (род Mammarenavirus, семейства Arenaviridae) является возбудителем IV группы патогенности и вызывает Венесуэльскую геморрагическую лихорадку (VHF), распространен в Венесуэле. Из-за происходящего в стране гуманитарного кризиса, клинические и полевые эпидемиологические исследования не проводились с 2006 года, хотя случаи VHF регистрируются постоянно. Впервые вирус был обнаружен в 1989 году, его природным резервуаром являются грызуны *Zygodontomys brevicauda*, а заражение происходит воздушно-капельным путем [n2]. Несмотря на регулярно происходящие вспышки заболевания, до сих пор существует потребность в разработке простых, быстрых и точных тест-систем для выявления вирусов в полевых условиях.

Разработанный нами биосенсор собран на базе дезоксирибозима (Dz), каталитический центр которого разделен на два фрагмента по принципу бинарной пробы, каждый состоит из участка связывания целевой РНК и флуоресцентного субстрата (Fsub), добавляемого в раствор в виде свободной молекулы с флуорофором FAM и тушителем BHQ1.

Дезоксирибозимы представляют собой короткие синтетические молекулы ДНК, катализирующие расщепление фосфодиэфирной связи между нуклеотидами в присутствии двухвалентных ионов металлов. Выбранный нами Dz 10-23 хорошо изучен и имеет высокую каталитическую активность [n1]. Сборка активного центра Dz 10-23 с последующим расщеплением Fsub и регистрацией флуоресцентного сигнала возможна только в случае присутствия в образце целевой РНК.

Для оценки диагностического потенциала биосенсора мы измеряли флуоресценцию FAM в растворе, содержащем фрагмент синтетической РНК вируса Guanarito, длиной 26 нуклеотидов (G26), Fsub и биосенсор, названный Dz_GTOV. В качестве контроля использовалась смесь Dz_GTOV и Fsub.

Мы определили оптимальную для реакции концентрацию катионов магния, которая составила 10 mM и оптимальный pH - 7.4. Предел обнаружения целевой РНК достигал 10 нМ, время развития сигнала составляло 20 минут при температуре 37 C°.

Специфичность Dz_GTOV оценивали в присутствии синтетических РНК шести других РНК-вирусов аналогичной длины: Hendra, Machupo, Sabia, Junin, Nipah и SARS-CoV. Флуоресцентный сигнал был зафиксирован только при наличии в реакционной смеси G26.

По итогам работы, мы предлагаем модель высокоспецифичного биосенсора Dz_GTOV для детекции РНК вируса Guanarito с пределом чувствительности 10 нМ при 37 C°. В будущем, мы планируем оптимизировать биосенсор Dz_GTOV для обнаружения РНК вируса Guanarito в клинических образцах.

Работа выполнена в рамках государственной программы «Обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации».

Источники и литература

- 1) Ma L. and Liu J. Catalytic Nucleic Acids: Biochemistry, Chemical Biology, Biosensors, and Nanotechnology // iScience. 2020. № 23(1). p. 100815.

- 2) Silva-Ramos, C. R., Montoya-Ruíz, C., Faccini-Martínez, Á. A., & Rodas, J. D. An updated review and current challenges of Guanarito virus infection, Venezuelan hemorrhagic fever // Archives of virology. 2022, № 167(9). P. 1727–1738.

Иллюстрации

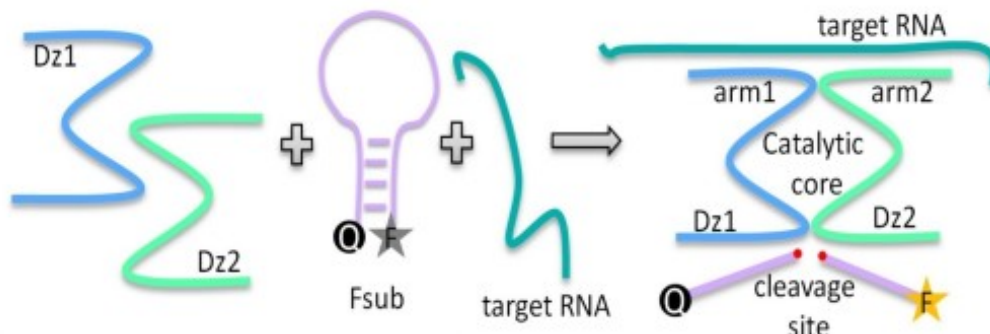


Рис. Схема детекции целевой РНК при помощи бинарной пробы.

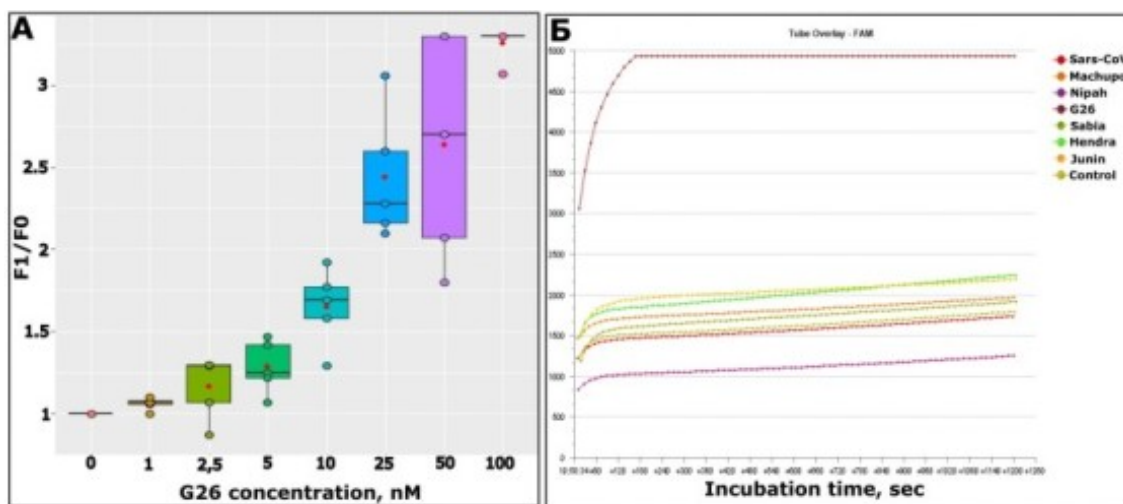


Рис. Анализ работоспособности Dz_GTOV. А – Чувствительность Dz_GTOV представлена в виде отношений F1/F0 серии образцов, где F0 означает сигнал флуоресценции от контрольных образцов, а F1 означает сигнал флуоресценции от образцов, в состав которых также входили целевые синтетические РНК G26 в разной концентрации. В случае если соотношение F1/F0 равно или больше 1.5, мы можем уверенно отделить положительные образцы от отрицательных, из чего следует предел обнаружение целевой РНК G26 10 нМ. Б - Оценка специфичности Dz_NiV, изображение с флуориметра T16-ISO Instrument Axxin.