

Разработка и оптимизация диагностического набора для выявления инфекций центральной нервной системы на основе амплификации SPA и детекции продукта с помощью ДНК-наносенсоров на основе G-квадруплекса для использования в автоматизированном диагностическом устройстве

Колесникова М.А.¹, Шкоденко Л.А.², Шуб А.С.³

1 - Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия, E-mail: kolesnikova@scamt-itmo.ru; 2 - Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия, E-mail: shkodenko@scamt-itmo.ru; 3 - Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия, E-mail: arinasersh@yandex.ru

Долгие годы перед людьми стоит проблема быстрого и точного определения инфекционных патогенов. В данной работе была предложена методика флуоресцентной детекции патогенов центральной нервной системы с помощью реакции SPA[1] и ДНК-наносенсоров на основе G-квадруплекса. Ранее была опробована колориметрическая детекция (ДАВ, гемин и H₂O₂) с теми же сенсорами, однако детекция с Тиофлавином-Т оказалась более стабильной.

Цель настоящего исследования состояла в оптимизации изотермической амплификации с праймерами со стволными петлями (SPA) и последующей специфичной детекции продукта с помощью флуоресцентного красителя и ДНК-наносенсоров, образующих G-квадруплекс для инфекции ЦНС.

В работе использовались образцы ДНК бактерий *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus agalactiae*, гриба *Candida albicans*. Геномную ДНК извлекали методом фенол-хлороформной экстракции. Для амплификации использовали 10x буфер для bst полимеразы (SibEnzyme), 4mM MgSO₄ (SibEnzyme), 0,01% этиленгликоль, dNTP (Evrogen), bst полимеразу, пару специфичных для последовательности праймеров и пару праймеров со стволными петлями с той же специфической последовательностью. Условия постановки SPA: 65°C в течение 60 минут. Результат амплификации оценивали при помощи электрофореза в 2% агарозном геле. Конструирование сенсоров осуществлялось с помощью программ NUPACK и Mfold. Детекцию продуктов проводили путем инкубации ампликонов с ДНК-наносенсорами и тиофлавином в течение 5 минут при комнатной температуре, сигнал флуоресценции регистрировали на флуориметре Тесла при длинах волн возбуждения и излучения флуоресценции 442-487 нм.

Амплификация проходила успешно для всех патогенов с чувствительностью 50 копий ДНК. Контроль детекции ДНК-наносенсорами проводили на синтетическом фрагменте ДНК(соотношение сигнал/шум (ОСШ) не менее 2). Результаты детекции некоторых ампликонов оказались ниже контроля, что говорит о необходимости дальнейшей оптимизации конструкции сенсоров.

Реакция изотермической амплификации SPA показала себя многообещающим методом для использования в системах Point-of-care диагностики. Однако для специфичной детекции продуктов необходимо повысить чувствительность используемых ДНК-наносенсоров путем редизайна сенсоров, оптимизации реакционного буфера. По завершении процесса оптимизации методику планируется использовать в автоматическом диагностическом устройстве.

Источники и литература

- 1) Luo G et al. Stem-loop-primer assisted isothermal amplification enabling high-specific and ultrasensitive nucleic acid detection. Biosens Bioelectron. 2021 Jul 15;184:113239.