**Разработка эффективных ДНК-зондов для детекции транс-нуклеазной активности эндонуклеазы Cas12a в гетерогенном формате**

***Буркин К.М.1,2, Сафенкова И.В.1, Иванов А.В.1, Жердев А.В. 1, Дзантиев Б.Б. 1***

*Студент, 6 курс специалитета*

*1Институт биохимии им. А.Н. Баха,
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

*2Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,*

*химический факультет, Москва, Россия*

*E-mail:* *burkin-kost@yandex.ru*

Биосенсорные системы для высокочувствительной детекции ДНК/РНК-содержащих аналитов востребованы во многих сферах, включая медицину, сельское хозяйство, пищевое производство. Одним из перспективных инструментов, позволяющих реализовать высокочувствительную диагностику в изотермических условиях, является эндонуклеаза Cas12а. В комплексе с гидовой РНК (гРНК) Cas12а приобретает способность к распознаванию ДНК-мишени, строго соответствующей последовательности гРНК. Образование комплекса Cas12а-гРНК-ДНК-мишень приводит к активации нуклеазной активности Cas12а по отношению к любым одноцепочечным фрагментам ДНК (ДНК-зондам). Цель данной работы – определить эффективные ДНК-зонды для детекции транс-нуклеазной активности Cas12a и создать на их основе гетерогенную аналитическую систему.

В работе рассмотрены ДНК-зонды, содержащие на одном конце флуоресцеиновую метку для детекции после гидролиза в реакции с активированным Cas12a, а на противоположном – биотиновую для иммобилизации на поверхности микропланшета: 1) одноцепочечные (оц) поли-dT ДНК (10-145 нуклеотидов (нт)), 2) комбинированные зонды, включающие двуцепочечную (дц) ДНК (20-1000 п.о.), ПЭГ-спейсер и поли-dT 15 нт, полученные с помощью ПЦР. Эффективность расщепления дцДНК-зондов имела колоколообразную зависимость от их длины; максимум (50%) достигался для зонда длиной 160 нт. Сигнал, генерируемый в результате расщепления оцДНК-зондов, возрастал пропорционально их длине; наибольшая эффективность расщепления (70%) наблюдалась для зонда длиной 145 нт. На основании полученных данных оцДНК-зонды были выбраны как более эффективные. Для оцДНК-зондов было рассмотрено использование различных сигнальных реагентов: антител против флуоресцеина (иммунохроматографическая детекция), конъюгата антимышиных антител с пероксидазой и конъюгата полипероксидазы со стрептавидином (хемилюминесцентная детекция). Длинные оцДНК-зонды (50-145 нт) подходили для выявления активности нуклеазы Cas12a во всех изученных вариантах.

Эффективность использования оцДНК-зонда с длиной 145 нт показана в гетерогенной аналитической системе c Сas12a на примере детекции фрагмента гена нуклеокапсида (N-ген) SARS-CoV-2. Предел обнаружения N-гена при флуоресцентной детекции высвобождаемого зонда составил 0,86 нМ. Для увеличения чувствительности системы, основанной на транс-нуклеазной активности Сas12a, проводили рекомбиназную полимеразную амплификацию (РПА) ДНК-мишени в течение 20 мин при 39 °C с использованием одной пары праймеров. РПА увеличивает количество копий ДНК-мишени благодаря гибридизации праймеров при участии рекомбиназы и удлинения цепи при участии полимеразы. Комбинированная система, включающая последовательно амплификацию ДНК-мишени с помощью РПА, селективное распознавание мишени комплексом c Сas12a-гРНК и детекцию флуоресценции в результате гидролиза ДНК-зонда, закрепленного на поверхности микропланшета, позволила снизить предел обнаружения до ~10 копий на реакцию. Таким образом, сочетание РПА, Cas12a и предложенного оцДНК-зонда обеспечивает высокочувствительную детекцию N-гена SARS-CoV-2. Данный подход может быть использован в тест-системах для детекции различных РНК/ДНК-содержащих патогенов.