

Аптамерные ДНК-сенсоры как альтернативный способ обнаружения фрагментов нуклеиновых кислот на примере мРНК андрогенового рецептора

Научный руководитель – Колпащиков Дмитрий Михайлович

Гандалипов Э.Р.¹, Нужина Ю.В.², Брюшкова Е.А.³

1 - Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: gandalipov@scamt-itmo.ru*; 2 -

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: julia.nuzhina@gmail.com*; 3 -

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биохимии, Москва, Россия, *E-mail: kate-msu2008@yandex.ru*

Сегодня установление диагнозов, связанных с нарушениями в геноме или транскриптом человека, наиболее широко проводится с применением полимеразной цепной реакции. Однако все основанные на ПЦР методы требуют дорогостоящего оборудования и реактивов, времени. В нашей работе на примере мРНК гена андрогенового рецептора (AR) представлен альтернативный способ обнаружения специфических участков последовательностей в молекуле РНК на базе ДНК-наноконструкций (далее — конструкций), несущих в своём составе аптамерную последовательность. Работа данных конструкций основана на отжиге друг на друге нескольких цепей ДНК и РНК с образованием структур Холлидея [1] (рис. 1).

Ключевым звеном представленных конструкций является модифицированная последовательность широко известного малахитового зелёного аптамера (MGA) [2], флуоресцирующая (610/648 нм) в присутствии молекул соответствующего индикатора. Для достижения высокой специфичности метода мы использовали бинарную модификацию MGA [3], каждая цепь которого была продолжена несколькими нуклеотидами, комплементарными целевой последовательности мРНК AR. Таким образом, интенсивный флуоресцентный сигнал наблюдается только при наличии в образце индикатора и целевой мРНК.

Для облегчения взаимодействия сенсора со вторичной структурой мРНК, конструкции были дополнены двумя дезоксирибозимами 10-23, способными катализировать расщепление РНК [4] по специфичным участкам. Комплементарно связываясь с мРНК AR по обе стороны от целевого для сенсора участка, дезоксирибозимы высвобождают 27-нуклеотидный фрагмент РНК, легкодоступный для MGA. Благодаря этому гибридизация MGA происходит в 10 раз лучше, чем в случае работы только лишь двух составных цепей MGA, и метод обладает высокой степенью чувствительности (100 нМ мРНК на 100 нМ сенсора).

Предложенная нами конструкция демонстрирует большой потенциал для обнаружения целевых фрагментов нуклеиновых кислот. При этом простота используемых компонентов делает её потенциально способной конкурировать с ПЦР в области экспресс-диагностики.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта No 18-34-00898 мол_а.

Источники и литература

- 1) Cox A.J., Bengtson H.N., Rohde K.H., Kolpashchikov D.M. DNA Nanotechnology for Nucleic Acid Analysis: Multifunctional Molecular DNA Machine for RNA Detection // Chemical Communications. 2016. No. 52. С. 14318-14321.
- 2) Stojanovic M.N., Kolpashchikov D.M. Modular aptameric sensors // Journal of American Chemical Society. 2004. No. 126 (30). С. 9266-9270.

- 3) Kolpashchikov D.M. Binary Malachite Green Aptamer for Fluorescent Detection of Nucleic Acids // Journal of American Chemical Society. 2005. No. 127 (36). С. 12442–12443.
- 4) Santoro S.W., Joyce G.F. Mechanism and Utility of an RNA-Cleaving DNA Enzyme // Biochemistry. 1998. No. 37 (38). С. 13330-13342.

Иллюстрации

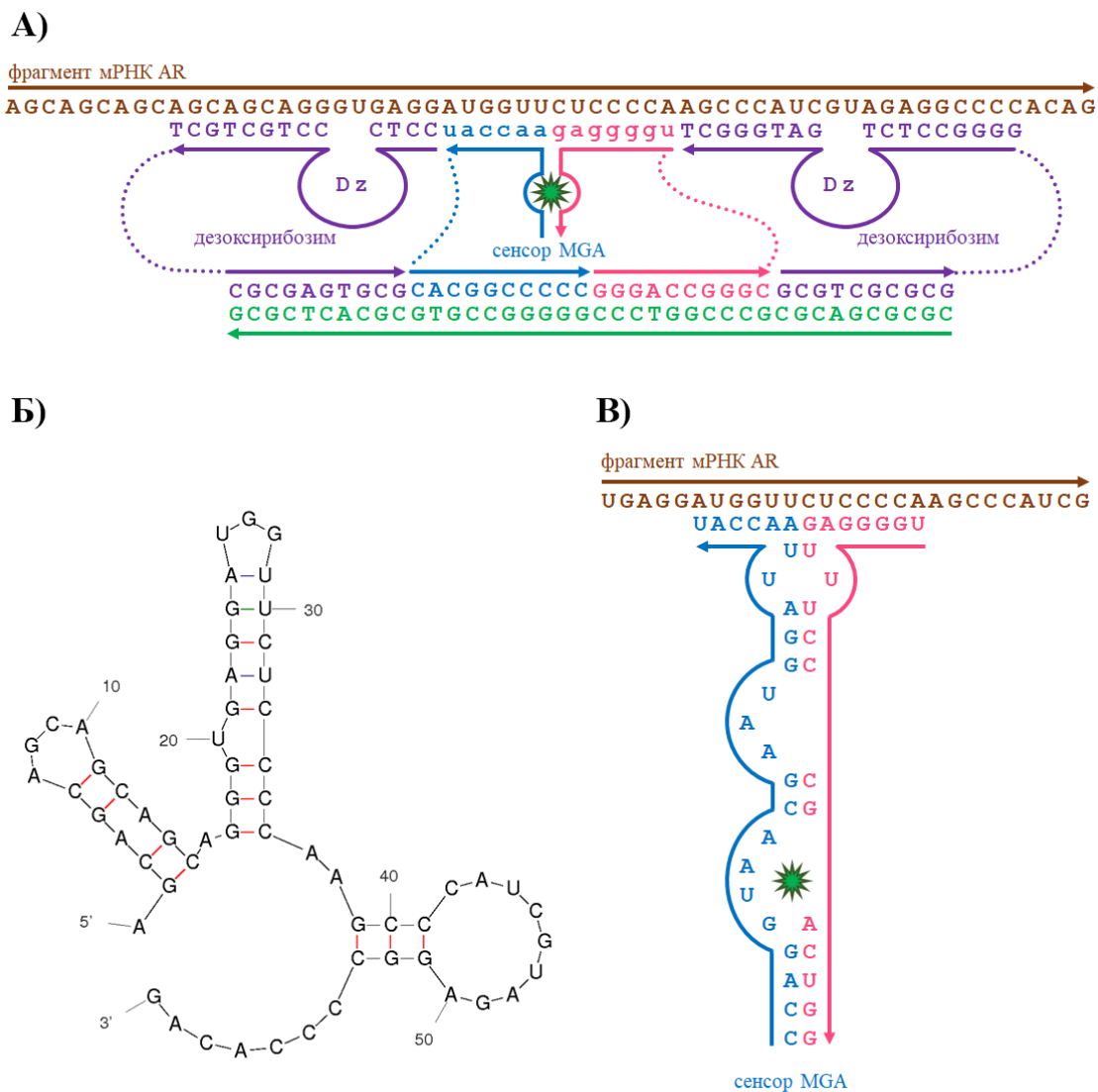


Рис. 1. Структура ДНК-наноконструкции. А: Гибридизация конструкции с фрагментом мРНК AR. Б: Вторичная структура фрагмента мРНК AR, предсказанная MFold. В: Подробное строение MGA-сенсора в составе конструкции