Секция «3.14 Молекулярная биология»

Визуальное обнаружение тотальной РНК вируса RSVA с использованием шестиплечевой ДНК-наномашины с намеренно введенными однонуклеотидными заменами

Научный руководитель – Горбенко Дарья Александровна

Кононова Ульяна Егоровна

Студент (магистр)

Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: uliana.kononova@mail.ru

Нуклеиновые кислоты (НК) – ключевые биомаркеры вирусных инфекций, что делает их точное обнаружение центральной задачей диагностики. ПЦР, золотой стандарт, имеет ряд ограничений [1]. Поэтому необходимы безамплификационные системы, сочетающие высокую чувствительность, простоту эксплуатации и экономичность.

В данной работе мы разработали шестиплечевые РНК-расщепляющие ДНК-наномашины (ДНМ) с преднамеренно введёнными однонуклеотидными заменами (ОНЗ) и шестью элементами захвата флуорогенного субстрата для детекции РНК респираторно-синцитиального вируса (RSVA), который служит модельным организмом, склонным к случайным мутациям.

Для флуоресцентной детекции в пробирку помещали флуорогенный субстрат (F-sub) (200 нМ), ДНМ (20 нМ), свободное плечо, формирующую РНК-расщепляющий кор a3c (20 нМ), синтетический аналит (RSVA_an) (1-1000 пМ) или РНК RSVA (0-100 нг/мкл). Пробирки инкубировали при 55 °C в течение 3 ч в водяной бане. Флуоресцентный сигнал проявляли при УФ-свете и измеряли оптическую плотность образцов в программе Image J.

Визуальный отклик системы оценён на синтетическом аналите в диапазоне концентраций 1-1000 пМ: интенсивность флуоресценции растёт с концентрацией.

При распознавании тотальной вирусной РНК, выделенной из заражённых RSVA/HPIV3 клеток Vero, в диапазоне 5-100 нг/мкл, пробы с РНК RSVA дали статистически значимый визуальный сигнал по сравнению с вирусом HPIV3 и контролем, демонстрируя специфичность без ложноположительных результатов.

В диапазоне 0-50 нг/мкл зависимость сигнала от концентрации линейна. Предел обнаружения для тотальной РНК RSVA – 5 нг/мкл. Система демонстрирует низкий уровень фонового сигнала в отсутствие аналита. Время анализа – 3 ч, что приемлемо для диагностики.

Полученные результаты подтверждают потенциал шестиплечевых каталитических ДНК-наномашин в качестве универсальных высокоселективных сенсоров для диагностики и открывают перспективы их внедрения в практику быстрого скрининга инфекций.

Работа выполнена при поддержке гранта Государственного задания FSER-2025-0019.

Источники и литература

1) 1. Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. Nucleic acids research, 30(6), 1292-1305.