

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-240

ИЗОТЕРМИЧЕСКИЙ СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ РНК ЭНТЕРОВИРУСОВ НА ОСНОВЕ ДЕЗОКСИРИБОЗИМА

ISOTHERMAL METHOD FOR DETECTING ENTEROVIRUS RNA BASED ON DETECTION

Ш. Бегюм, М. Капитонова, В. Дедков, А. Долгова

Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Ş. Begüm, M. Kapitonova, V. Dedkov, A. Dolgova

Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg

✉ begum.sas99@gmail.com

Аннотация

В работе представлен способ детекции консервативного участка РНК энтеровируса на основе бинарного дезоксирибозима 10–23, активирующего каталитическое расщепление флуоресцентного субстрата при гибридизации с целевой РНК. Анализ — изотермический, 20 мин, лимит — 0,5 нМ. Сенсор показал высокую специфичность и воспроизводимость при работе с синтетической, транскрибированной и NASBA-амплифицированной РНК.

Abstract

This study describes a method for detecting a conserved region of enterovirus RNA using a binary 10–23 deoxyribozyme that catalyzes the cleavage of a fluorescent substrate upon hybridization with the target RNA. The assay is isothermal (20 min) with a detection limit of 0.5 nM, and the sensor demonstrated high specificity and reproducibility with synthetic, transcribed, and NASBA-amplified RNA.

Введение

Энтеровирусы — РНК-содержащие вирусы, обладающие высокой устойчивостью в окружающей среде. Их передача осуществляется фекально-оральным путем, преимущественно через воду и пищу, что обуславливает широкий спектр вызываемых заболеваний [1, 2]. Стандартные ПЦР-тесты требуют дорогостоящих амплификаторов и ферментных смесей, в то время как дезоксирибозимы 10–23 являются фермент-независимыми катализаторами, способными обеспечить высокоспецифичное выявление РНК-мишеней в изотермических условиях [3, 4].

Цель работы — разработка сенсора на основе дезоксирибозима для специфического обнаружения энтеровирусной РНК в изотермических условиях.

Материалы и методы

Все олигонуклеотиды синтезированы компанией «ДНК-Синтез» (Москва, Россия). Реактивы KCl, CaCl₂ и Tris-HCl приобретены у PanReach Applichem (США). РНК была транскрибирована при помощи T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (Promega, США).

Реакции проводились при 41 °C. Были оптимизированы состав реакционного буфера и концентрации Ca²⁺ (5–100 мМ). Система протестирована с использованием кДНК, полученной из клинических изолятов и амплифицированной методом NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification).

Основные результаты

Схематически механизм работы разработанного биосенсора представлен на рис. 1. Дезоксирибозим 10–23 разделен на 2 части: Dz1 и Dz2, которые при связывании с целевой РНК формируют каталитическое ядро, способное расщеплять флуорогенный субстрат. Такая система обеспечивает минимальный фоновый сигнал и возрастание оптического сигнала в присутствии мишени.

Выбран оптимальный буфер: 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 50 мМ HEPES, 0,06 % Triton X-100, 0,05 % DMSO, с pH 7,4. Оптимальная концентрация кофактора Ca²⁺ 50 мМ.

Система сенсора протестирована на различных концентрациях синтетической РНК (рис. 2, а) и транскрибированной РНК (см. рис. 2, б). Наблюдается четкая зависимость величины флуоресцентного сигнала от концентрации РНК. Лимит детекции определен как 0,5 нМ. Использование транскрибированной РНК подтвердило высокую чувствительность и работоспособность сенсора, даже при наличии вторичной структуры мишени.

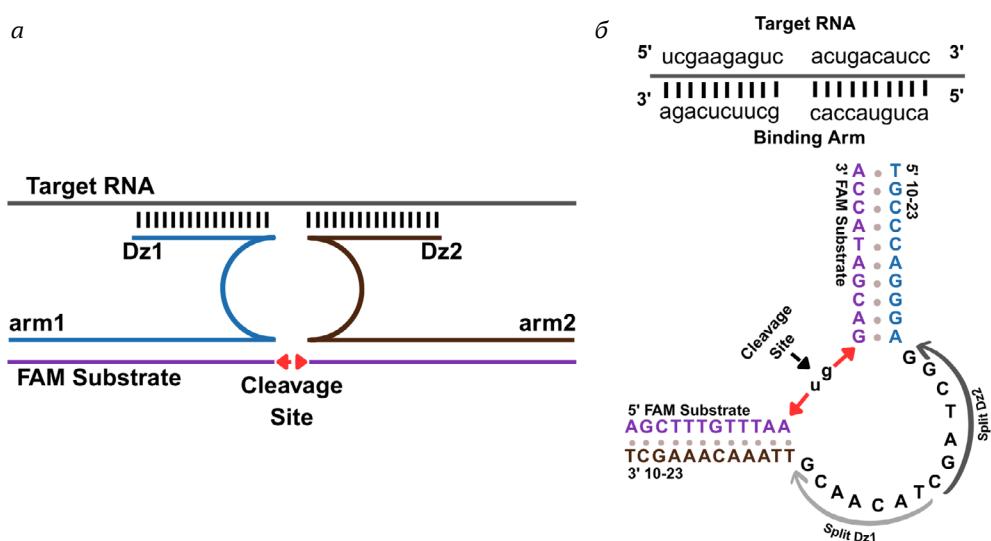


Рис. 1. Схематическое изображение структуры бинарного биосенсора на основе дезоксирибозима (а)
Молекулярная презентация расщепления FAM-субстрата (б)

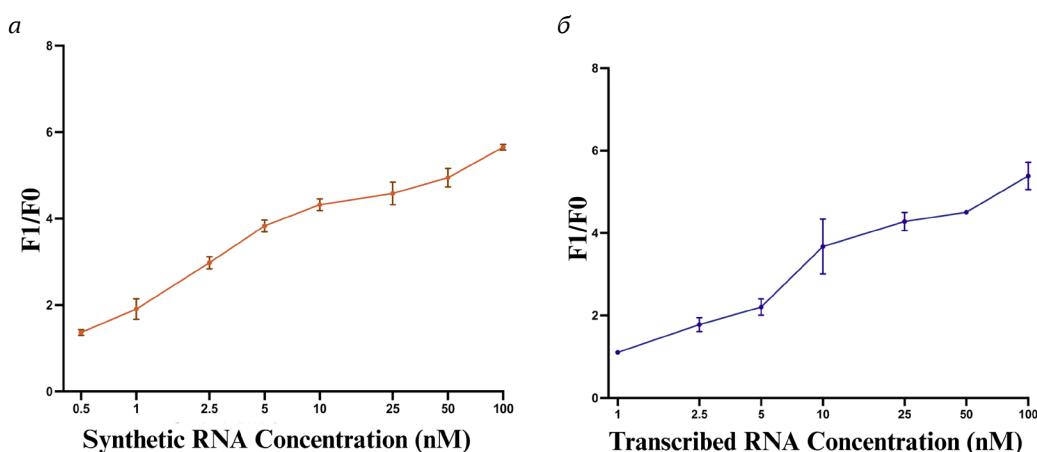


Рис. 2. Значение соотношения флуоресцентного сигнала к фоновому F_1/F_0 в зависимости от концентрации добавленной синтетической (а) и транскрибированной (б) РНК

Специфичность системы проверена на синтетических фрагментах РНК шести вирусов (гепатит А, астровирус, норовирус, саповирус, адено-вирус, ротавирус). Флуоресценция возрастала только при наличии энтеровирусной РНК, без перекрестной реакции с другими вирусами.

Система проверена на кДНК, полученной от пяти энтеровирусов (вирус Коксаки В4, В5, эховирусы серотипов 3, 11, 13), выделенных из сточных вод и клинических материалов. Нуклеиновые кислоты были амплифицированы изотермически при помощи модифицированного протокола NASBA.

Литература

- Upfold N. S., Luke G. A., Knox C. Occurrence of human enteric viruses in water sources and shellfish: a focus on Africa // Food Environ. Virol. 2021. Vol. 13 (1). P. 1–31.
- Lanrewaju A. A., Enitan-Folami A. M., Sabiu S. et al. Global public health implications of human exposure to viral contaminated water // Front. Microbiol. 2022. Vol. 13. P. 981896.
- Pilevar M., Kim K. T., Lee W. H. Recent advances in biosensors for detecting viruses in water and wastewater // J. Hazard. Mater. 2021. Vol. 410. P. 124656.
- Song X., Fredj Z., Zheng Y. et al. Biosensors for waterborne virus detection: challenges and strategies // J. Pharm. Anal. 2023. Vol. 13 (11). P. 1252–1268.