

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 °С. 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.

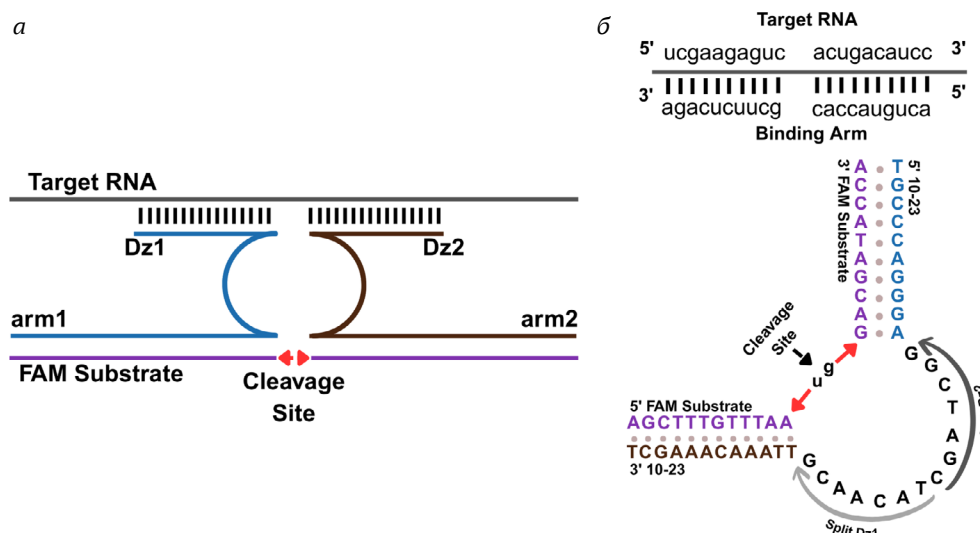


Рис. 1. Схематическое изображение структуры бинарного биосенсора на основе дезоксирибозима (а)
Молекулярная репрезентация расщепления FAM-субстрата (б)

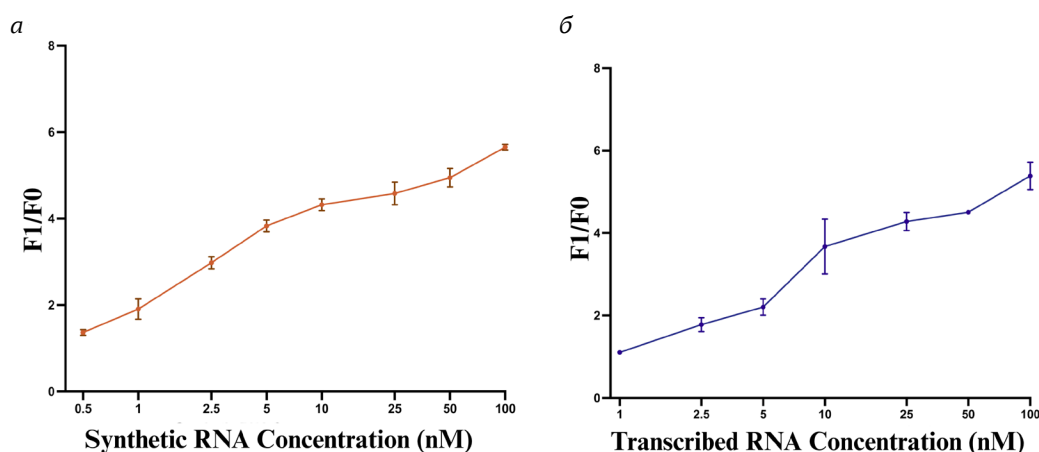


Рис. 2. Значение соотношения флуоресцентного сигнала к фоновому F1/F0 в зависимости от концентрации добавленной синтетической (а) и транскрибированной (б) РНК

Специфичность системы проверена на синтетических фрагментах РНК шести вирусов (гепатит А, астро-вирус, норовирус, саповирус, аденовирус, 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

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.