

Дезоксирибозим 10-23 как универсальная метка для количественного определения олигонуклеотидов на поверхности наночастиц

Научный руководитель – Кошель Елена Ивановна

Кононова У.Е.¹, Горбенко Д.А.²

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

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: daryarogova7@gmail.com*

Биосенсорные технологии являются перспективным направлением в разработке эффективных, быстрых и экономически выгодных методов анализа нуклеиновых кислот. Особый интерес представляют наночастицы с уникальными оптическими и электрохимическими свойствами, которые могут быть использованы для создания высокочувствительных биосенсоров. Например, магнитные наночастицы (МНЧ) обладают большим количеством преимуществ перед современными методами обнаружения нуклеиновых кислот, такими как ПЦР, поэтому использование МНЧ для детекции нуклеиновых кислот является развивающейся областью биотехнологии.

В данном исследовании фокусируется внимание на количественном определении олигонуклеотидов, иммобилизованных на поверхности МНЧ.

В работе проведено определение линейного участка зависимости флуоресценции от концентрации биотинилированного Dz (biotin-Dz) в диапазоне от 0 до 1000 пМ с целью дальнейшего подсчета Dz на стрептавидин-покрытых МНЧ. Для эксперимента Dz был разведён в 1x Col буфере (0.2 М MgCl₂, 0.15 М KCl, 15 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.4) в концентрациях 0-1000 пМ. В каждую пробирку добавляли 200 нМ специализированного флуоресцентного субстрата (F-sub), который расщеплялся активным Dz. Важно отметить, что F-sub при гибридизации с Dz отщепляется в раствор, что позволяет однозначно сопоставлять флуоресценцию в гомогенном и гетерогенном форматах. Инкубация проходила 1 и 3 часа в водяной бане при 55 °С. Измерение флуоресценции выполнялось на спектрофлуориметре Тесла при длинах волн 480 нм (возбуждение) и 525 нм (эмиссия). Полученные данные были обработаны с использованием Prism для построения калибровочных кривых.

По результатам исследования линейная область зависимости флуоресценции от концентрации biotin-Dz обнаружена в диапазоне концентраций от 0 пМ до 50 пМ в течение 1 часа и от 0 пМ до 100 пМ в течение 3 часов. На основе этих данных составлены уравнения калибровочных кривых, что позволяет использовать полученные зависимости для количественного анализа иммобилизованного Dz с поверхности МНЧ.

Для дальнейшего количественного определения Dz на МНЧ, к стрептавидин-покрытым МНЧ пришивались 20 нМ Dz, Dz и ТТТ-олигонуклеотидов. Биоконъюгация олигонуклеотидов к МНЧ проводилась 1 час на шейкере при 23 °С, с последующей трёхкратной отмывкой. Для дальнейшего эксперимента добавляли 200 нМ (F-sub), инкубировали 1 и 3 часа в водяной бане при 55 °С и измеряли флуоресценцию. По полученных данным флуоресценции с помощью линейных участков калибровочных кривых вычисляли концентрацию Dz. Эффективность биоконъюгации предварительно составила 0.32 % через 1 час, и 0.02 % через 3 часа.