

Применение иммунохроматографических тест-полосок в системах на основе CRISPR/Cas амплификации для быстрой бесприборной детекции патогенных микроорганизмов

И.В. Сафенкова*, М.В. Камионская, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

* irina.safenkova@gmail.com

Ключевые слова: изотермическая амплификация; иммунохроматографический анализ; биосенсоры

Application of lateral flow test strips in CRISPR/Cas amplification-based systems for rapid equipment free detection of pathogenic microorganisms

I.V. Safenkova*, M.V. Kamionskaya, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

* irina.safenkova@gmail.com

Key words: isothermal amplification; lateral flow assay; biosensors

Интенсивное развитие диагностических систем на основе CRISPR/Cas реакций, проходящих при фиксированной температуре и обеспечивающих специфическое распознавание ДНК/РНК мишеней и, как следствие, неспецифическую нуклеазную активность Cas, требует простых быстрых инструментов для детекции продуктов нуклеазной амплификации. Иммунохроматографические тест-полоски (ИХТ), удовлетворяющие данным требованиям, способны занять эту нишу благодаря возможности настроить генерацию сигнала в ответ на нуклеазное разрезание олигонуклеотидного зонда. Цель исследования – разработка эффективных конфигураций ИХТ для аналитических систем на основе CRISPR/Cas амплификации.

В качестве мишеней для ИХТ детекции изучены несколько наиболее перспективных олигонуклеотидных зондов, применяемых в CRISPR/Cas12a реакциях: 1) [FAM]15dT[Bio], 2) ([FAM][HEg]₃)[TREBLER]15dT[Bio], 3) [IgG][FAM]15dT[Bio], где 15dT – тиминный олигонуклеотид, разрезаемый активированным Cas12a, FAM – флуоресцеин, Bio – биотин, HEg – гексаэтиленгликоль, TREBLER – фосфорамидит для тройного ветвления, IgG – иммуноглобулин G. Для каждого из зондов установлена оптимальная конфигурация ИХТ, включающая рецепторы (стрептавидин, антитела к FAM, антитела к IgG) для распознавания меток (Bio, FAM, IgG) на олигонуклеотидных зондах, формат ИХТ (сэндвич, конкуренция) и соотношения рецептор/зонд. Наиболее эффективная конфигурация ИХТ, полученная для зонда № 2 и сэндвич формата, обеспечивала достоверное дифференцирование положительных и отрицательных результатов CRISPR/Cas12a тестирования за 10 минут с чувствительностью, сопоставимой с приборной флуоресцентной детекцией карбоксиродамина. Эффективность ИХТ подтверждена для выявления специфических ДНК маркеров бактериальных фитопатогенов – *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter sepedonicus*.

Финансирование: Исследование поддержано Российским научным фондом, грант № 25-16-00246.