13

Хемилюминесцентная ДНК-наномашина с пероксидазоподобной активностью для детекции бактериальных нуклеиновых кислот

© П.В. Филатов[1], Д.А. Горбенко[1,2], Д.Р. Дададжанов[1], Т.А. Вартанян[1,¶]

[1] Университет ИТМО,
Санкт-Петербург, Россия
[2] МолБиоТех, Университет ИТМО,
Санкт-Петербург, Россия

¶ e-mail: tavartanyan@itmo.ru

Поступила в редакцию 20.10.2025 г.
В окончательной редакции 20.10.2025 г.
Принята к публикации 05.11.2025 г.

Представлена новая хемилюминесцентная система на основе ДНК-наномашины с пероксидазоподобной активностью (PxDm), интегрированная в компактное закрытое устройство, обеспечивающее полный рабочий процесс — от введения изучаемого образца до получения результата. Система была разработана для детекции 16S рРНК *Escherichia coli*. PxDm продемонстрировала высокую универсальность и способность успешно детектировать с высокой специфичностью целевые последовательности в разных типах образцов: синтетических одноцепочечных ДНК, выделенной РНК и неочищенных бактериальных лизатах. Это свидетельствует о перспективности системы для применения в реальных условиях, где образцы часто содержат сложные матричные компоненты и этап предварительной очистки является затруднительным. Система показала высокую селективность, различая целевой микроорганизм и не реагируя на нецелевые микроорганизмы. Возможность работы с неочищенными образцами и без ферментативных стадий сокращает время анализа и позволяет интегрировать систему в форматы экспресс-диагностики (point-of-care). Использование PxDm в таких условиях открывает новые перспективы для быстрого и точного мониторинга бактериальных инфекций и контроля безопасности пищевых продуктов.

Ключевые слова: обнаружение нуклеиновых кислот, хемилюминесценция, G-квадруплекс, ДНК-наномашина, бактериальные патогены.

DOI: 10.61011/OS.2025.11.62169.8675-25

1. Введение

Рынок диагностики бактериальных и вирусных инфекций, особенно значимый на фоне недавних пандемий, ежегодно оценивается в десятки миллиардов долларов [1]. Рост спроса на такие технологии объясняется необходимостью оперативного выявления инфекционных агентов и предотвращения распространения опасных заболеваний [2].

Традиционные культуральные методы остаются „золотым стандартом“ за счет сочетания простоты и дешевизны [3], однако требуют до недели на получение результата, что делает невозможным быстрое реагирование на вспышки инфекций [4,5]. Иммунохроматографические тесты обеспечивают мобильность и простоту применения, но уступают по чувствительности и не подходят для выявления патогенных мутаций, что ограничивает их диагностическую эффективность [6–8]. Методы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот — такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и изотермическая амплификация [9–11] — обеспечивают высокую специфичность, однако требуют дорогостоящего оборудования, контроля контаминации и квалифицированного персонала, что затрудняет их внедрение в формат *point-of-care* (POC) диагностики [12,13].

В связи с этим возрастает потребность в быстрых, точных и высокочувствительных методах обнаружения бактерий и вирусов для защиты общественного здоровья [14]. Одним из перспективных направлений развития является применение нанотехнологий [15–17], использующих уникальные физико-химические свойства наноматериалов для повышения эффективности биосенсорных систем [18].

Особое внимание привлекают ДНК-наноматериалы [19–21], включая структуры, основанные на G-квадруплексах (G4) — стабильных, гуанин−богатых мотивах, отличающихся высокой аффинностью связывания и уникальными каталитическими свойствами [22–26], что делает их перспективными в качестве сенсорных и репортерных элементов [27,28]. Недавние достижения в ДНК-нанотехнологии позволили создать ДНК-наномашины с пероксидазной активностью (PxDm) [29,30], способные высокочувствительно обнаруживать бактериальные нуклеиновые кислоты.

Благодаря каталитическим свойствам G4-структур в реакции окисления люминола перекисью водорода [31–33], такие системы способны генерировать регистри-

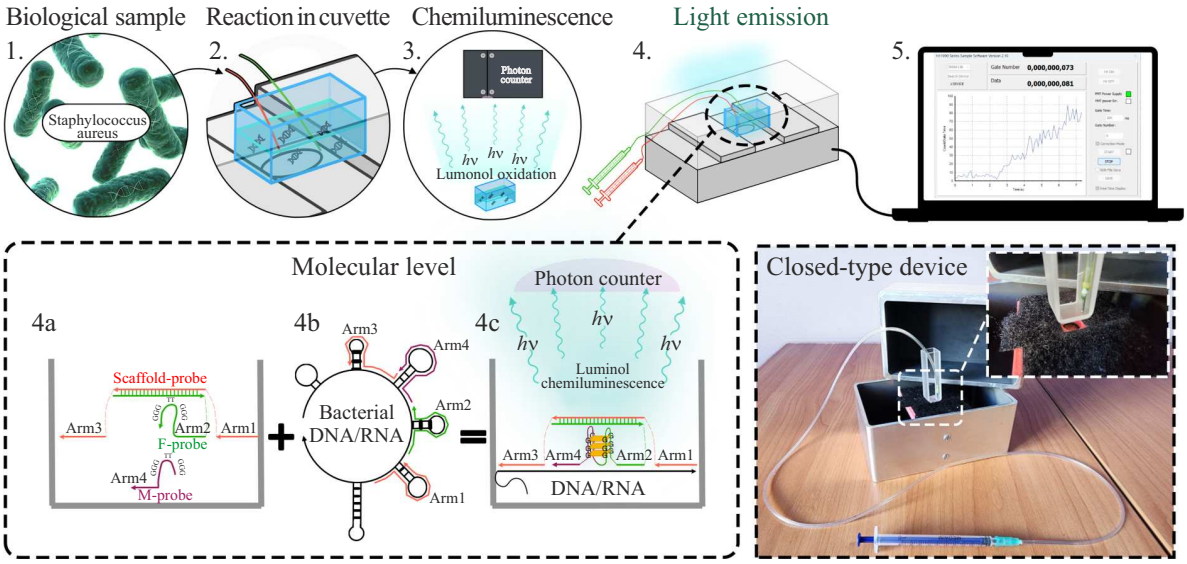


Рис. 1. Схематическое изображение метода обнаружения целевых нуклеиновых кислот, основанного на регистрации хемилюминесценции люминола. Процесс включает в себя введение биологического образца в кювету (1) с последующим инициированием реакции (2), которая завершается испусканием фотонов посредством окисления люминола (3). На молекулярном уровне (4) система использует фрагменты PxDm, которые изначально находятся в диссоциированном состоянии (4*a*). После введения целевой нуклеиновой кислоты (аналита) фрагменты PxDm объединяются с аналитом, что приводит к образованию структур G-квадруплекса (G4) (4*b*). Эти комплексы G4 действуют как катализаторы окисления люминола, что приводит к быстрому хемилюминесцентному сигналу (4c). Мониторинг кинетики реакции в реальном времени (5) обеспечивает непрерывный сбор и анализ данных через подключенный компьютер, способствуя быстрому и чувствительному обнаружению нуклеиновых кислот.

руемый люминесцентный сигнал (рис. 1), обеспечивая обнаружение аналита без использования меток с высокой чувствительностью и воспроизводимостью. PxDm, собранные из коротких олигонуклеотидов (рис. S1), функционируют при температуре окружающей среды без использования ферментов и длительных стадий инкубации, обеспечивая улучшенные параметры отношения сигнал/фон (S/B) и предела обнаружения (LOD) по сравнению с линейными или расщепленными ДНК-зондами.

Данное исследование посвящено разработке наноструктурированных многофункциональных зондов для быстрого анализа последовательностей нуклеиновых кислот при комнатной температуре. Наша конечная цель — адаптировать эти зонды для проведения диагностических тестов POC, особенно для использования в кабинетах врачей или в условиях ограниченных ресурсов и отсутствия современных лабораторий. Для достижения этой цели мы использовали хемилюминесцентную (ХЛ) систему обнаружения, имеющую портативную конструкцию закрытого типа с высокочувствительным счетчиком фотонов.

В предыдущих исследованиях изучалось детектирование нуклеиновых кислот на основе ХЛ с использованием пероксидазоподобных ДНК-зимов и расщепленных ДНК-зондов на основе G4, что позволило достичь наномолярной чувствительности и успешной дискриминации однонуклеотидных замен (ОНЗ) [34–38]. Однако на чувствительность этих систем могут влиять такие факторы, как поверхностная плотность олигонуклеотидов и этапы предварительной обработки. Для устранения этих ограничений мы стремились минимизировать подготовку образцов и биоконъюгацию, одновременно снижая влияние диффузии за счет дизайна зонда. Кроме того, мы интегрировали всю реакцию от введения образца до чтения сигнала, исключая риск неполного захвата процесса окисления люминола.

Зонды PxDm показали себя многообещающими в обнаружении продуктов амплификации сложных РНК (на основе изотермической амплификации на основе нуклеиновых кислот (NASBA), двухцепочечной ДНК (полимерной-цепной реакции ((ПЦР) и дифференциации ложноположительных результатов амплификации в изотермических методах (LAMP (Loop mediated isothermal Amplification, петлевой изотермической амплификации) и SPA (Stem-loop Primer Amplification, вариации петлевой изотермической амплификации)) [29,30]. Существующие исследования, использующие ДНК-биосенсоры на основе G4 для обнаружения бактерий, дали обнадеживающие результаты. Например, Ду и соавторы разработали сенсор на основе G4 для детекции *Salmonella enterica* с пределом обнаружения 10 CFU/mL [39]. Однако зависимость от специфических антител к мишени ограничивает её более широкое применение. Аналогичным образом Ли и соавторы сообщили о хемилюминесцентном биосенсоре на основе G4 для детекции *E. coli* с пределом обнаружения 100 CFU/mL [40], но он требовал сложной подготовки образцов и не обладал возможностями различения ОНЗ.

В нашем исследовании в качестве модельного организма была выбрана *E. coli*, хорошо изученная грамотрицательная бактерия, которая подходит для обнаружения РНК благодаря своему быстрому росту, характерной экспрессии генов и высокому содержанию РНК. Примечательно, что её грамотрицательная природа позволяет обнаруживать 16S рРНК без лизоцима, что повышает универсальность метода для применения в условиях оказания медицинской помощи. Выбранный микроорганизм является распространённым патогеном человека, что делает метод непосредственно применимым в клинических или полевых диагностических целях.

2. Материалы и методы

2.1. Олигонуклеотиды

Олигонуклеотиды, использованные в данном исследовании, были получены по прямому заказу от компании „Евроген“, Россия. Последовательности этих олигонуклеотидов представлены в табл. S1.

2.2. Бактериальные штаммы

В качестве целевой бактерии для данного исследования был выбран штамм *E. coli* K12. *E. coli* является одним из основных санитарно-показательных микроорганизмов группы колиформных бактерий, и ее выявление имеет решающее значение для оценки фекального загрязнения пищевых продуктов. В качестве нецелевых бактерий были использованы штаммы *Listeria monocytogenes*, любезно предоставленные из коллекции НИИ детских инфекций, Санкт-Петербург, Россия. Все манипуляции с живыми бактериями проводились в специально отведенных местах обученными специалистами в соответствии с правилами Российской Федерации.

2.3. Реагенты и оборудование

Все химические реагенты и оборудование, использованные в данном исследовании, перечислены в табл. S2.

2.4. Методы исследования

2.4.1. Дизайн PxDm При разработке PxDm использовались ресурсы базы данных NCBI. Целевые участки бактериального генома были идентифицированы с помощью инструмента UGENE, а молекулярная структура этих участков была проанализирована с помощью UNAFold и NUPACK. Этот анализ способствовал последующему созданию PxDm, адаптированных к комплементарным последовательностям этих участков. Процедура дизайна описана в [29,30].

2.4.2. Электрофорез в полиакриламидном геле Для демонстрации успешной сборки PxDm использовался электрофорез в 8% нативном полиакриламидном геле (PAGE). Для сравнения молекулярной массы олигонуклеотидов и структур ДНК использовался ДНК-маркер длиной 50 bp и более. После этого проводили электрофорез в течение 60 min при 60 V, а затем в течение 30 min при 90 V. Гель окрашивали бромистым этидием. Для визуализации геля использовали систему визуализации ChemiDoc (Bio Rad).

2.4.3. Электрофорез в агарозном геле В данном исследовании для визуализации качества РНК проводили электрофорез в 2% геле. Для окрашивания геля использовали бромистый этидий. Для контроля молекулярной массы ампликонов добавляли ДНК-маркер длиной 100 bp и более. Электрофорез проводили при напряжении 100 V в течение 30 min. Визуализацию в гелях проводили с помощью системы визуализации ChemiDoc (Bio Rad).

2.4.4. Выделение РНК Выделение РНК из *E. coli* и *L. monocytogenes* проводили с использованием раствора Extract RNA по стандартному протоколу [41].

2.4.5. Хемилюминесцентная реакция Реакционная смесь состояла из двух частей. В первой части собирали PxDm и формировали G-квадруплексный комплекс. Во второй части содержался окислитель. Подготовка началась с первой части. Сначала в COX буфер (35 mM KCl, 60 mM NaCl, 25 mM $MgCl_2$, 25 mM HEPES pH = 7.4, 1% DMSO, 0.03% Тритон X-100) добавляли по 1 μM каждого зонда, несущего каркас PxDm (Scaffold-Probe и F-Probe). После этого добавляли аналит (*E. coli*). Затем добавляли M-Probe до концентрации 250 nM. Реакционную смесь инкубировали в течение 10 min при комнатной температуре. Люминол и гемин добавляли до конечных концентраций 10 μM и 1 μM соответственно. Параллельно готовили окислительную смесь, состоящую из 1 μM перекиси водорода и 5 mM гидроксида натрия, растворенных в COX буфере. Первую часть переносили в кварцевую кювету для детектирования с помощью счётчика фотонов H11890 (Hamamatsu, Япония). Окислительную смесь добавляли перед началом детектирования. После начала реакции подсчитывали общее количество фотонов, испущенных за 60 s.

2.4.6. Реакция с клеточным лизатом *E. coli* K12 дикого типа культивировали в среде LB при 250 rpm и температуре 37°C в течение 16 h. Ночную культуру дважды промывали 0.9% NaCl. Количество бактерий рассчитывали на основе стандартного определения оптической концентрации клеток на длине волны 600 nm (OD_{600}) для *E. coli* ($2 \cdot 10^8$ cells/mL). Для подсчета количества клеток проводили тест на CFU. После приготовления культуры лизат готовили к реакции следующим образом. Отбирали образец, содержащий 10^6 клеток, и центрифугировали при 900 g в течение 5 min. Затем супернатант аккуратно собирали и в пробирку добавляли COX буфер в таком количестве, чтобы количество

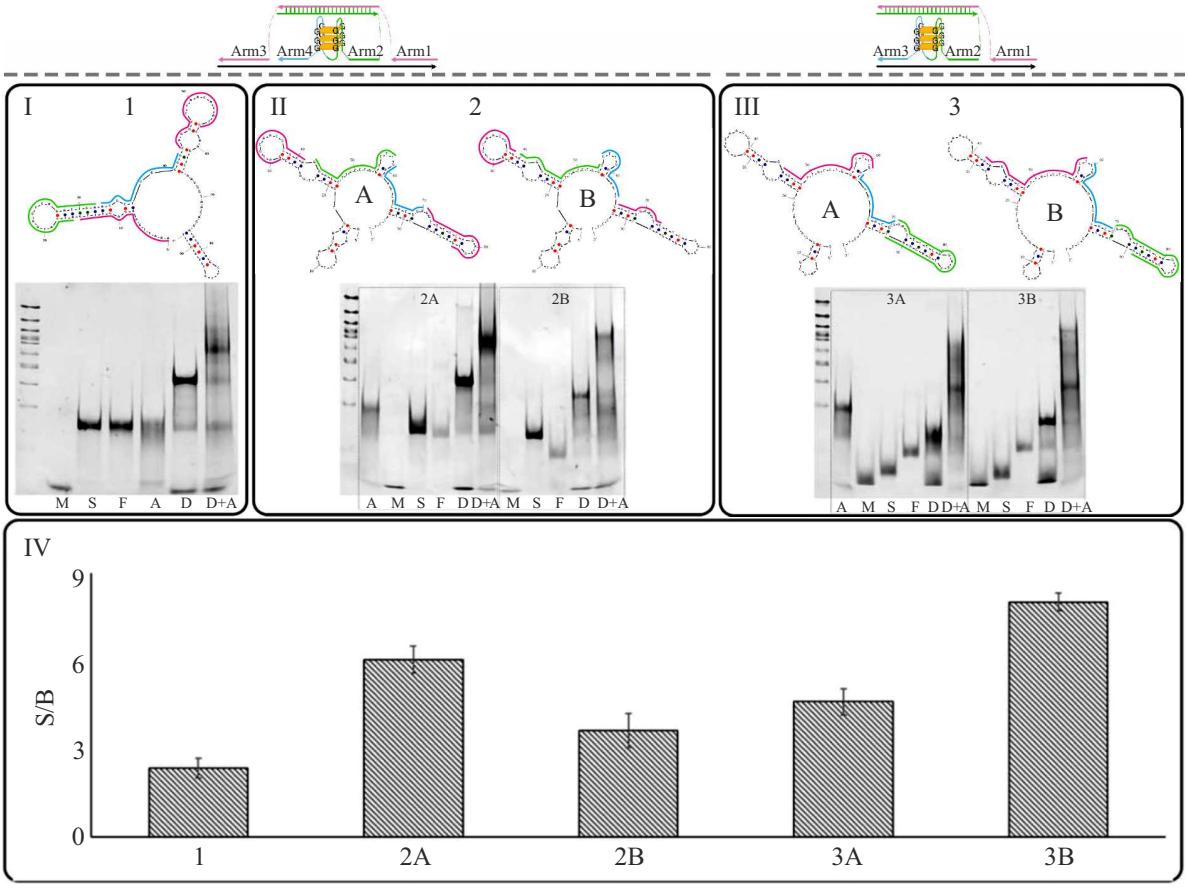


Рис. 2. Разработка и выбор оптимальной конструкции PxDm: (I) Демонстрация сайтов связывания четырёхплечевой PxDm с участком 1 (верхняя панель) и подтверждение сборки конструкции методом электрофореза в 8% ПААГ (нижняя панель). (II) Аналогичный анализ четырёхплечевых PxDm вариантов A и B с участком 2 (верхняя и нижняя панели). (III) Демонстрация сайтов связывания трёхплечевых PxDm вариантов A и B с участком 3 (верхний и нижний блоки). Позиции зондов на геле: M−M-probe, F−F-probe, S — Scaffold-probe; целевой участок связывания (A), PxDm без аналита (D) и PxDm с аналитом (D+A). (IV) Расчёт S/B для каждой PxDm.

клеток составляло 10^4. Также добавляли части PxDm в конечной концентрации 1 μM. Эту смесь подвергали отжигу, включающему нагревание до 95°C в течение 5 min, а затем охлаждение до 23°C в течение 5 min. Затем смесь снова центрифугировали при 900 g в течение 5 min. Полученный супернатант после вторичного центрифугирования собирали и готовили для хемилюминесцентной реакции.

2.4.7. Определение предела обнаружения Для расчета LOD пробирка, содержащая только фрагменты PxDm (Scaffold-Probe 1 mM, F-Probe 1 mM и M-Probe 250 nM или 1 mM), служила для оценки фонового сигнала от нецелевого образования G4. Остальные пробирки содержали фрагменты ДНК-наномашины в различных концентрациях.

Затем проводилась линейная аппроксимация результатов измерений и предел обнаружения определялся по формуле

$$\mathrm{LOD} = \frac{3 \times \sigma b}{m}, \qquad (1)$$

где σb — стандартное отклонение образцов отрицательного контроля; m — угол наклона линейного участка зависимости сигнала от концентрации.

2.4.8. Определение фактора селективности Фактор селективности был выбран в качестве меры определения селективности диагностической системы, показывающей вероятность отличить целевой аналит от нецелевого. Для определения фактора селективности (SF) использовалась приведенная ниже формула

$$SF = \left(1 - \frac{F_{ns} - F_0}{F_s - F_0}\right) \times 100\%, \qquad (2)$$

где F_0, F_s и F_{ns} — средние интегральные интенсивности, рассчитанные на основе трех независимых экспериментов фонового сигнала специфического аналита и сигнала неспецифического аналита соответственно. После начала реакции рассчитывалось общее количество фотонов за 60 s.

2.4.9. Статистический анализ Все эксперименты повторялись не менее трех раз. Для определения значений P использовался U-критерий Манна–Уитни, что обеспечивает непараметрический подход к оценке статистической значимости. На рисунках данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего, что обеспечивает четкую визуализацию вариабельности вокруг средних значений. Значение P менее 0.05 считалось показателем статистически значимых различий.

3. Результаты

3.1. Разработка и выбор оптимальной PxDm

Для обнаружения 16S рРНК *E. coli* были спроектированы пять конструкций PxDm, направленных на три различных участка последовательности. Три конструкции имели четыре участка связывания с целевым фрагментом (четырёхплечевые, рис. 2: I и II), а две–три участка связывания (трёхплечевые, рис. 2, III). Для участка 1 16S рРНК *E. coli* была разработана одна конструкция (рис. 2, I), для участков 2 и 3 по две конструкции (рис. 2: II и III).

Корректность сборки всех вариантов PxDm была подтверждена электрофорезом в 8% нативном полиакриламидном геле (ПААГ). Полученные результаты показали успешное формирование каждой конструкции в присутствии целевой последовательности (рис. 2: I, II и III, нижняя панель).

Дальнейшие эксперименты проводились как в присутствии целевой последовательности (концентрация $1\,\mu$M), так и в её отсутствии. Для каждой конструкции рассчитывалось отношение целевого сигнала (в присутствии целевой последовательности) к сигналу отрицательного контроля (только PxDm), выраженное как S/B. Полученные значения представлены на рис. 2 IV.

Оптимальной оказалась трёхплечевая конструкция, нацеленная на участок 3 (версия B), продемонстрировавшая наибольшее значение $S/B = 8.0 \pm 0.3$. Эта конструкция PxDm была выбрана для последующих экспериментов.

Молекулярная конфигурация и вторичная структура участка связывания выбранной трёхплечевой конструкции PxDm с 16S рРНК *E. coli* представлены на рис. 3, *a, b*.

3.1.1. Определение оптимального соотношения компонентов PxDm После выбора оптимальной PxDm был проведён эксперимент по определению наилучшего соотношения компонентов конструкции. В процессе варьировалось отношение M-probe к Scaffold-содержащим зондам (F-Probe и Scaffold-Probe). Оптимальным оказалось соотношение $1\,\mu$M Scaffold-содержащих зондов к $0.25\,\mu$M M-Probe. Эта комбинация обеспечила S/B, равное 16.6 ± 0.6 (рис. S2, B). Данное соотношение использовалось во всех последующих экспериментах.

3.2. Определение специфичности и предела обнаружения

В качестве первичного теста PxDm для обнаружения 16S рРНК *E. coli* проводились эксперименты по оценке чувствительности и селективности системы с использованием одноцепочечных синтетических последовательностей ДНК. В первую очередь определяли LOD, который отражает минимальную концентрацию целевой последовательности, достоверно детектируемой системой. Для этого выполнялась серия экспериментов с разными концентрациями целевой последовательности и измерением хемилюминесцентного сигнала с последующим построением калибровочной прямой (рис. 4, *a*). Результаты показали, что LOD составил 12 nM.

Далее оценивалась селективность системы через SF. Для этого в реакцию с PxDm добавлялись различные последовательности: целевая, целевая с ОНЗ (ОНЗ 1.1, ОНЗ 1.2, ОНЗ 1.3), а также нецелевая последовательность из участка генома *L. monocytogenes* (рис. 4, *b*). Рассчитанные значения SF для нецелевых последовательностей составили 59%, 51%, 71% и 86% соответственно, что свидетельствует о достаточной специфичности системы для отличия целевой последовательности от близкородственных и нецелевых аналогов.

3.3. Обнаружение выделенной РНК и клеточного лизата

После демонстрации эффективности PxDm с синтетическими аналитами была подтверждена её применимость в условиях, приближённых к реальным. Для этого были проведены эксперименты с выделенной РНК *E. coli* и бактериальным лизатом без предварительной очистки.

На первом этапе обнаружение с использованием PxDm проводили с выделенной РНК *E. coli* в концентрации 300 ng/μL, полученную из жидкой бактериальной культуры с концентрацией 10 000 cell/mL. Экстракцию РНК выполняли стандартным методом, а её целостность и чистоту подтверждали электрофорезом в 2% агарозном геле (рис. S3). Для проверки специфичности системы использовали РНК нецелевой бактерии *L. monocytogenes* в той же концентрации (рис. 5, *a*). Результаты показали, что сборка PxDm не происходила в присутствии нецелевой РНК, о чём свидетельствовал хемилюминесцентный сигнал, сопоставимый с отрицательным контролем. Соотношение сигнала целевой реакции к отрицательному контролю составило 1.7 ± 0.1 ($p < 0.05$), тогда как для нецелевой последовательности — 0.7 ± 0.4 ($p < 0.01$).

После подтверждения эффективности в тестах с использованием РНК были проведены эксперименты по детекции лизата *E. coli* (рис. 5, *b*). Для анализа использовали лизат бактериальной культуры с концентрацией 10 000 cells/mL, аналогичной условиям эксперимента с РНК. Процедура анализа выполнялась в соответствии с разделами 2.4.6–2.4.9, и Приложения 4. Полученные данные показали, что сигнал целевой реакции с лизатом

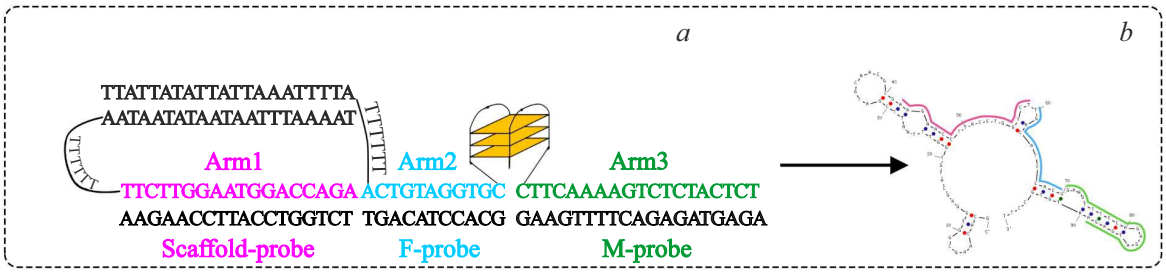


Рис. 3. Дизайн выбранной PxDm и вторичная структура выбранной целевой последовательностей: (*a*) PxDm для детекции участка 16S рРНК *E. coli*, (*b*) вторичная структура участка 16S рРНК *E. coli*.

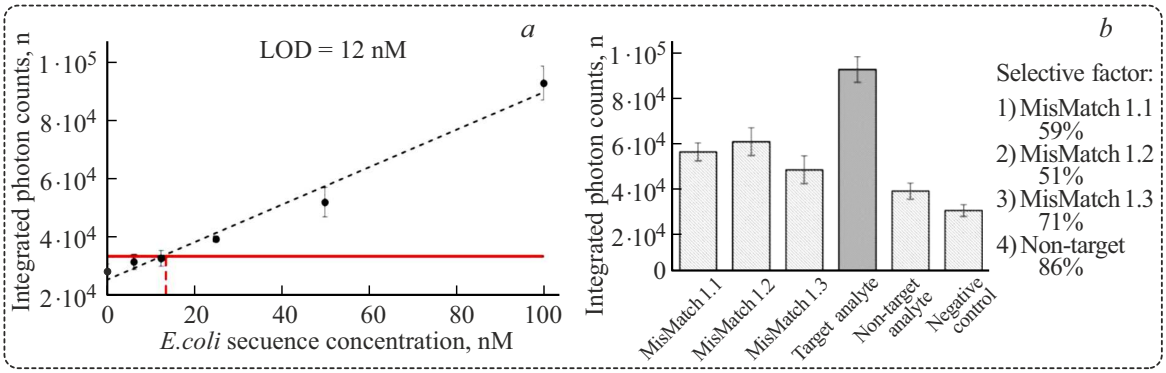


Рис. 4. Определение чувствительности и специфичности конструкции PxDm для синтетических одноцепочечных ДНК-аналитов. Значения интегрального количества фотонов использовались для построения калибровочных кривых и последующего определения LOD (*a*) и SF (*b*).

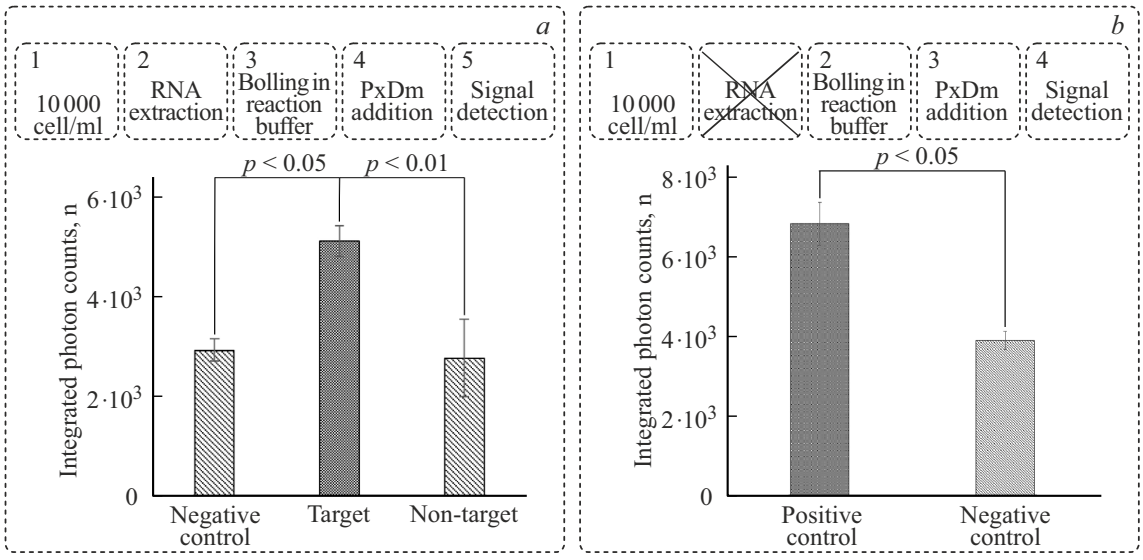


Рис. 5. Обнаружение с помощью PxDm выделенной РНК и клеточного лизата *E.coli*. (1) Показаны суммарные значения числа испущенных фотонов, полученные в реакциях с изолированной РНК из *E. coli* (целевой) и *L. monocytogenes* (нецелевой), обе в концентрации 300 ng/μL. Отрицательный контроль не содержит анализируемой последовательности. (2) Показаны суммарные значения числа испущенных фотонов, полученные в реакции с клеточным лизатом. Положительный контроль представляет собой реакцию PxDm с клеточным лизатом в COX буфере в концентрации 10 000 cells/mL. Отрицательный контроль представляет собой реакцию PxDm без аналита в буфере.

статистически достоверно превышал уровень отрицательного контроля в 1.8 ± 0.2 раза ($p < 0.05$).

Сравнение значений S/B показало их сопоставимость для обоих типов образцов: 1.7 для реакции с РНК и

1.8 для лизата. Таким образом, PxDm сохраняет стабильную специфичность и чувствительность при работе как с очищенными нуклеиновыми кислотами, так и в условиях анализа реальных биологических образцов.

4. Обсуждение

В данном исследовании представлены результаты по созданию, оптимизации и характеристике ХЛ PxDm для детекции бактериальных нуклеиновых кислот, нацеленных на обнаружение участка 16S рРНК *E. coli*. Разработано пять конструкций на три различных целевых участка, причём трёхплечевая конструкция сенсора обеспечила наибольшее значение $S/B = 8.0 \pm 0.3$. Показано, что увеличение числа сайтов связывания в конструкции не обязательно приводит к росту эффективности при работе с одноцепочечными последовательностями, даже с учётом их вторичных структур. Оптимизация соотношения компонентов PxDm позволила дополнительно повысить S/B до 16.6 ± 0.6.

PxDm для выявления *E. coli* продемонстрировала предел обнаружения (LOD) 12 nM и специфичность 86% по отношению к нецелевым микроорганизмам. Система выявляла однонуклеотидные замены с фактором селективности до 71%, что подтверждает её высокую специфичность. Успешная детекция как выделенной РНК *E. coli*, так и клеточного лизата демонстрирует применимость данной платформы в реальных аналитических задачах.

Однако пределы обнаружения системы PxDm остаются относительно высокими для некоторых категорий биологических образцов, в частности для полногеномной ДНК. Перспективным направлением для решения этой проблемы может стать модификация дизайна ДНК-конструкций путем введения дополнительных G4-последовательностей, способных усиливать сигнал детекции. Что касается специфичности системы, ее возможно повысить за счет оптимизации длины М-зонда — сокращение длины гибридизационного участка потенциально может увеличить селективность к целевым аналитам. Более короткие плечи зонда снижают вероятность образования стабильных внутримолекулярных структур и неспецифического связывания с посторонними нуклеиновыми кислотами, присутствующими в анализируемой пробе. Параллельно с этим для достижения детекции нуклеиновых кислот без предварительной амплификации необходимо дальнейшее увеличение отношения сигнал/фон (S/B) за счет снижения фонового сигнала, что и являлось одной из ключевых задач будущих исследований.

Примечательно, что концепция использования разделенных ХЛ сенсоров на основе G4 для детекции не нова, что было продемонстрировано коллегами в 2021 г. [42]. Хемилюминесцентный сенсор, основанный на комплексе G4/гемин, образованном в процессе амплификации β-актина, достиг высокой чувствительности (LOD = 3.8 fM), превосходя PxDm. Однако он основан на детекции продуктов амплификации ПЦР, что требует дорогостоящего термоциклера и ограничивает его применение для детекции ОНЗ. В отличие от этого система PxDm обладает такими преимуществами, как минимальная пробоподготовка, отсутствие предварительной амплификации и высокая специфичность к распознаванию ОНЗ. Эти особенности расширяют применимость PxDm по сравнению с методами, основанными на амплификации, делая его перспективным дополнением к существующим стратегиям обнаружения нуклеиновых кислот и расширяя потенциал хемилюминесцентных систем на основе G4. Более того, наше исследование представляет уникальную конструкцию замкнутой системы, которая делает применимым потенциальное устройство для POC целей.

5. Выводы

В данном исследовании были успешно разработаны и охарактеризованы ХЛ PxDm для быстрого и специфичного обнаружения 16S рРНК *E. coli*. Система PxDm продемонстрировала предел обнаружения одноцепочечной ДНК *E. coli* 12 nM при специфичности 86% в отношении нецелевых микроорганизмов. Система PxDm способна обнаруживать выделенную РНК даже в сложных биологических образцах. РНК *E. coli* была обнаружена в концентрации 300 ng/μL, а клеточный лизат проанализирован с помощью PxDm при содержании 10^4 cell/mL. Полученные результаты подтверждают перспективность применения метода PxDm в диагностических системах типа POC. Исследование демонстрирует значительный потенциал платформы PxDm как инновационного инструмента для разработки высокоэффективных диагностических систем обнаружения патогенов, способствующих совершенствованию клинической диагностики и методов мониторинга инфекционных заболеваний.

Благодарности

Особая благодарность д-ру Наталье Вирц, Марии Рубель и Марии Березовской за продуктивные идеи и плодотворные обсуждения. Авторы выражают благодарность Институту детских инфекций за работу с бактериальными штаммами. Авторы выражают благодарность д-ру Дмитрию Колпащикову за вдохновение и моральную поддержку.

Финансирование работы

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-72-00045, https://rscf.ru/project/23-72-00045/

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Приложение 1.

Олигонуклеотиды, реагенты и оборудование, использованные в данном исследовании, табл. S1, S2.

Таблица S1. Олигонуклеотиды, использованные в данном исследовании

Oligo	Sequence $5'-3'$
E. coli	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTT GACATCCACGGAAGTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTT
E. coli M-probe	TCTCATCTCTGAAAACTTCTTTTTTACCGGGTTGGG
E. coli	F-probe GGGTTGGGACCTTTTTTCGTGGATGTCATTTTTTATTTTAAATTATTATATTATT
E. coli Scaffold-probe	AGACCAGGTAAGGTTCTTTTTTTTAATAATATAATAATTTAAAAT
E. coli MisMatch	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT ACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTCAGAGAT**A**AGAATGTGCCTT
H. influenzae	AATTCTACCCCTCCCTAAAGTACTCTAGTTACCCAGTCTGAAATGCAATT CCTAGGTTAAGCCCAGGGCTTTCACACCTCACTTAAATAACC
L. monocytogenes	ATGAAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACC AATTGCGCAACAAACTGAAGCAAAGGATGCATCTGCATTCAATAAAGAAAATTCAATTTCATCCATGGCA CCACCAGCATCTCCGCCTGC

Таблица S2. Реагенты, использованные в данном исследовании

Реагент	Поставщик	Страна	Назначение
Олигонуклеотиды	Евроген	Россия	PxDm
Вода без нуклеаз	Cyagen	США	Разведение олигонуклеотидов
4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES)	Molecule	Германия	Приготовление буфера
Хлорид калия (KCl)	Carl Roth	Германия	Приготовление буфера
Хлорид магния ($MgCl_2$)	Геликон	Россия	Приготовление буфера
Хлорид натрия (NaCl)	Вектон	Россия	Приготовление буфера
Тритон X-100	Sigma-Aldrich	США	Приготовление буфера
ДМСО	AppliChem	Германия	Приготовление буфера
Трис (оксиметил) аминометан гидрохлорид	Amresco	США	Приготовление буфера TBEK
Борная кислота	Геликон	Россия	Приготовление буфера TBE
Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)	Геликон	Россия	Приготовление буфера TBE
Акриламид	AppliChem	Германия	Компоненты гель-электрофореза PAGE
N, N'-метиленбис -акриламид	Геликон	Россия	Компоненты гель-электрофореза PAGE
Пероксодисульфат аммония	Геликон	Россия	Компоненты гель-электрофореза PAGE
ТЕМЕД (N, N, N, N-тетраметилэтилендиамин	Molecule	Германия	Компоненты гель-электрофореза PAGE

Таблица S2. (Продолжение)

Реагент	Поставщик	Страна	Назначение
Агароза	ДиаМ	Россия	Компонент агарозного геля-электрофорез
Бромид этидия	Amresco	США	Окрашивание гель-электрофорезом
ДНК-маркер (лестница) длиной 100 п.н. и выше	Евроген	Россия	Определение длины нуклеиновых кислот методом гель-электрофореза
4хГелевая загрузка красителя	Евроген	Россия	Загрузка образца в гель для электрофореза
Фенол	Вектон	Россия	Экстракция РНК
Хлороформ	Acros Organic	Россия	Экстракция РНК
Изопропиловый спирт	Вектон	Россия	Экстракция РНК
ExtractRNA	Евроген	Россия	Экстракция РНК
Гемин	Sigma-Aldrich	США	Хемилюминесцентная реакция
Люминол	Sigma-Aldrich	США	Хемилюминесцентная реакция
H_2O_2 30%	AppliChem	Германия	Хемилюминесцентная реакция
NaOH	Sigma-Aldrich	США	Хемилюминесцентная реакция

Оборудование

В исследовании использовались следующие приборы: нанофотометр N50 (Implen, Германия), водяная баня LB-140 (LOIP, Россия), мини-центрифуга/вортекс FV-2400 (Biosan, Латвия). Дополнительное оборудование включает колбонагреватель LH-125 (LOIP, Россия), центрифугу 5418 R (Eppendorf, Германия), вертикальную электрофорезную ячейку Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США), систему визуализации гелей ChemiDoc? Touch Gel (Bio-Rad, США) и счетчик фотонов H11890 (Hamamatsu, Япония).

Приложение 2

Конструкция и сборка PxDm

Схема сборки трехплечевой PxDm показана на рис. S1. Система состоит из трёх олигонуклеотидов: Scaffold-Probe, F-Probe и M-Probe (табл. S1). Каждый из этих зондов включает в себя различные сегменты — плечо 1, плечо 2, плечо 3 и плечо 4, — которые комплементарны определённым участкам целевой последовательности (аналиту). Каждая часть выполняет свою функцию. Scaffold-Probe играет ключевую роль в стабилизации

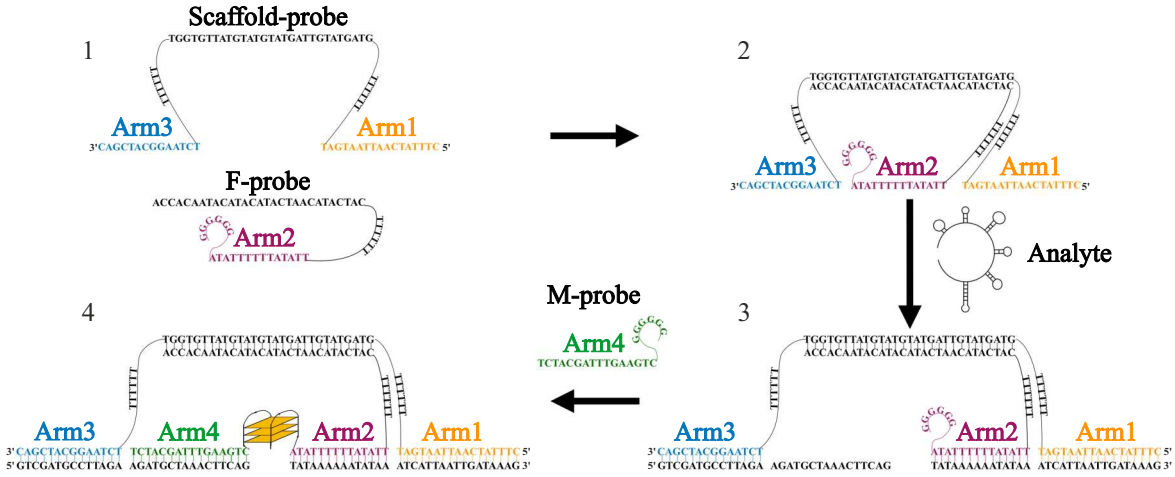


Рис. S1. Схематическое изображение сборки PxDm в качестве примера конструкции для обнаружения 16srRNA *E. coli*: *1* — сборка Scaffold-содержащих зондов, в реакционном буфере (Scaffold-Probe и F-Probe), *2* — добавление целевого аналита, *3* — добавление короткого зонда, несущего часть G4 (M-Probe), *4* — окончательно собранная конструкция.

всей системы. Он включает сегмент, комплементарный аналиту, и другой сегмент, несущий последовательность, не комплементарную аналиту, таким образом образуя каркас с F-Probe. F-Probe необходим для аффинности всей системы. Помимо Scaffold и сайта, комплементарного аналиту, этот зонд также содержит половину выделенной структуры G4. M-Probe, с другой стороны, содержит другую половину G4 и играет ключевую роль в селективности системы. Следовательно, в присутствии целевого аналита две половинки G4 объединяются, образуя полноценный реактивный G4, который служит сигнальным компонентом PxDm.

Приложение 3

Оптимизация состава PxDm

Для оптимизации хемилюминесцентного сигнала была проведена серия реакций с использованием выбранных PxDm с различными молярными соотношениями M-Probe и Scaffold-содержащих зондов (Scaffold-Probe и F-Probe) в реакционной смеси. Были оценены следующие молярные соотношения зонда, несущего скаффолд, и M-Probe: 1) 1 : 1, 2) 1 : 0.25 и 3) 0.25 : 1 μM соответственно. Для PxDm, предназначенного для обнаружения области 16S рРНК *E. coli*, состав 2 продемонстрировал оптимальное соотношение S/B, равное 16.6 ± 0.6, и был выбран для дальнейших исследований. Сравнение полученных значений представлено на рис. S3.

Приложение 4

Обнаружение выделенной РНК

Сначала образец гомогенизировали в растворе Extract RNA (ночную культуру центрифугировали при 3000–5000 g в течение 2 min). Культуральную жидкость отбирали, осадок ресуспендировали в 1 mL Extract RNA. Лизат инкубировали при 50°C в течение 10 min, после чего центрифугировали при 12 000–15 000 g в течение

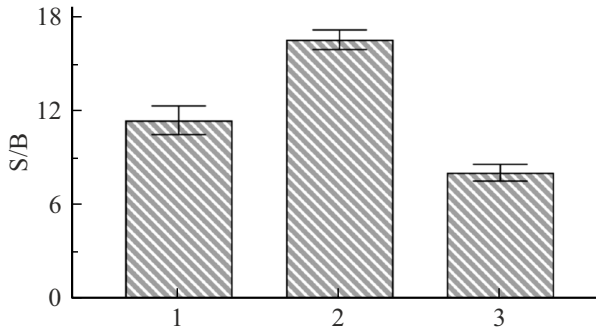


Рис. S2. Оптимизация соотношения компонентов PxDm для детекции 16S рРНК *E. coli*. Соотношение сигналов целевой реакции к отрицательному контролю для каждого из составов зондов для разработанных PxDm (*1–3*) со статистической погрешностью.

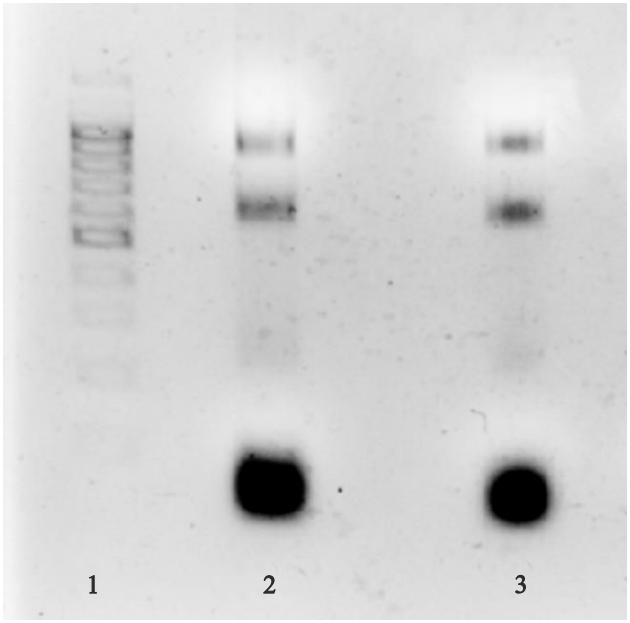


Рис. S3. Визуализация полученной РНК в 2% агарозном геле: *1* — ДНК длиной 100+ bp., *2* — изолированная РНК *E. coli*, *3* — изолированная РНК *L. monocytogenes*.

10 min для удаления нерастворившихся фрагментов. Надосадочную жидкость отбирали в новую пробирку. К надосадочной жидкости добавляли 200 μL смеси хлороформ : изоамиловый спирт (в соотношении 24 : 1). Содержимое пробирки активно перемешивали, встряхивая (вручную) в течение 15 s. Полученную смесь инкубировали в течение 3–5 min при комнатной температуре, периодически встряхивая. Образец затем центрифугировали при 12000 g в течение 15 min при 4°C. После этого водную фазу (верхнюю) отбирали в новую пробирку, избегая касания интерфазы. Затем добавляли 1/2 объема экстракта РНК и 1/5 объема хлороформа с изоамиловым спиртом. Образец центрифугировали при 12 000 g в течение 15 min при 4°C. Верхнюю фазу отбирали для нового Eppendorf. После этого добавляли 500 μL изопропанола для переосаждения РНК. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 10–15 min. По истечении времени образец центрифугировали при 12000 g в течение 10 min при комнатной температуре. После центрифугирования отбирали надосадочную жидкость, оставляя РНК на дне пробирки. Затем добавляли 1 mL 80% этанола. Образец центрифугировали на максимальной скорости в течение 5 min при комнатной температуре. Этанол удаляли. Затем осадок высушивали на воздухе в пробирке с открытой крышкой в течение 5–7 min. После этого РНК растворяли в необходимом количестве воды, свободной от РНКаз. Качество РНК подтверждали электрофорезом в 2% агарозном геле, как показано на рис. S3.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

[1] Bacterial and Viral Specimen Collection Market Size. Global Market Insights, 2024. [Электронный ресурс]. URL: https://www.gminsights.com/industry-analysis/bacterial-and-viral-specimen-collection-market (дата обращения: 19.10.2025).

[2] H. Harpaldas, S. Arumugam, C.C. Rodriguez, B.A. Kumar, V. Shi, S.K. Sia. Lab Chip, **21** (23), 4517 (2021). DOI: 10.1039/d1lc00627d

[3] A.M. Alizadeh, R.K. Movahed, M. Mohammadnia. Tanaffos, **15** (2), 112 (2016). https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27904544/

[4] P. Maffezzoli, M. Kestler, A. Burillo, S. Corcione, F.G. De Rosa, P. Muñoz, E. Bouza. Rev. Esp. Quimioter., **38** (1), 8 (2025). DOI: 10.37201/req/094.2024

[5] N. Navvabi, L. Pérez-Rodríguez, M. Del Villar-García, J. Ramírez-Salinas, F. Munöz-Valle. Rev. Gastroenterol. Mex. Engl. Ed., **87** (2), 176 (2022). DOI: 10.1016/j.rgmxen.2021.11.007

[6] S. Rodríguez de Córdoba, A. Reparaz, D. Sanchez, S. Pinto, L.J. Lopez, H.M. Merinero, I. Calvete, J. Perez-Perez, S.S. Jellison, Y. Zhang, R.J.H. Smith, I. Moreno, M. Dominguez. Front. Immunol., **15**, 1527016 (2025). DOI: 10.3389/fimmu.2024.1527016

[7] MyBioSource Editorial Team. Comparison of PCR with Other Nucleic Acid Amplification Techniques. MyBioSource [Электронный ресурс]. URL: https://www.mybiosource.com/learn/comparison-of-pcr-with-other-nucleic-acid-amplification-techniques/ (дата обращения: 19.10.2025).

[8] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase. Nucleic Acids Res., **28** (12), e63 (2000). DOI: 10.1093/nar/28.12.e63

[9] S. Rentschler, L. Kaiser, H.P. Deigner. Int. J. Mol. Sci., **22** (1), 456 (2021). DOI: 10.3390/ijms22010456

[10] V. Iyer, A. Smith, J. Doe, M. Lee, R. Kumar. J. Clin. Microbiol., **62** (3), e01498-23 (2024). DOI: 10.1128/JCM.01498-23

[11] G.V. Guedez-López, M. Alguacil-Guillén, P. González-Donapetry, A. et al. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **39** (10), 2289 (2020). DOI: 10.1007/s10096-020-04010-7

[12] M. Fakruddin, M. Zinnat, S. Hossain, A. Kamal, M. Islam. J. Pharm. Bioallied Sci., **5** (4), 245 (2013). DOI: 10.4103/0975-7406.120066

[13] M. Anahtar, G. McGrath, B. Rabe, N. Tanner, B. White, J. Lennerz, J. Branda, C. Cepko, E. Rosenberg. Open Forum Infectious Diseases, **8** (2), ofaa631 (2021). DOI: 10.1093/ofid/ofaa631

[14] H. Lahiri, K.S. Basu. Biosensors, **15** (3), 130 (2025). DOI: 10.3390/bios15030130

[15] K.Z. Chng, Y. Wu, X. Zhang, T. Li, Y. Yang, L. Zhang. Sens. Actuators B Chem., **339**, 129849 (2021). DOI: 10.1016/j.snb.2021.129849

[16] H.K. Choi, J. Yoon. Biosensors, **13** (2), 208 (2023). DOI: 10.3390/bios13020208

[17] B.D. Malhotra, M.A. Ali. Nanomaterials for Biosensors. In: Micro and Nano Technologies, William Andrew Publishing, 1–74 (2018). DOI: 10.1016/B978-0-323-44923-6.00001-7

[18] U. Gurkan, S. Moon, H. Geckil, F. Xu, S. Wang, T. Lu, U. Demirci. Biotechnol J., **6** (2), 138–149 (2011). DOI: 10.1002/biot.201000427

[19] E.E. Iwaniuk, T. Adebayo, S. Coleman, C.G. Villaros, I.V. Nesterova. Nucleic Acids Res., **51** (4), 1600 (2023). DOI: 10.1093/nar/gkad031

[20] J. Dong, M.P. O'Hagan, I. Willner. Chem. Soc. Rev., **51** (17), 7631 (2022). DOI: 10.1039/D2CS00317A

[21] C. Luo, X. Li, Y. Li. Int. J. Nanomedicine, **19**, 441 (2024). DOI: 10.2147/IJN.S442335

[22] D. Calabria, A. Pace, E. Lazzarini, I. Trozzi, M. Zangheri, M. Guardigli, S. Pieraccini, S. Masiero, M. Mirasoli. Biosensors, **13**, 650 (2023). DOI: 10.3390/bios13060650

[23] A. Sarwar, B. Chen, C. Li, D. Wang, E. Patel. Int. J. Biol. Macromol., **223**, 147825 (2025). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2025.147825

[24] H. Yang, Y. Zhou, J. Liu. Trends Anal. Chem., **132**, 116060 (2020). DOI: 10.1016/j.trac.2020.116060

[25] M. Marzano, M.G. Nolli, A.P. Falanga, G. D'Errico, S. Neri. RSC Adv., **15** (23), 17933 (2025). DOI: 10.1039/D5RA01033K

[26] L. Zhang, H. Wang, X. Qu. Adv. Mater., e2211147 (2023). DOI: 10.1002/adma.202211147

[27] Y. Wang, X. Li, Z. Zhang, W. Xu, H. Xiong. Sens. Actuators B Chem., **298**, 126867 (2019). DOI: 10.1016/j.snb.2019.126867

[28] S. Kido, N. Takahashi, H. Miyazaki, S. Kono, K. Saito, A. Kuzuya. ACS Omega, **10** (37), 43300 (2025). DOI: 10.1021/acsomega.5c08498

[29] D.A. Gorbenko, L.A. Shkodenko, M.S. Rubel, A.V. Slyta, E.V. Nikitina, E.A. Martens, D.M. Kolpashchikov. Chem. Commun., **58** (35), 5395 (2022). DOI: 10.1039/d2cc00325b

[30] Y.I. Maltzeva, D.A. Gorbenko, E.V. Nikitina, M.S. Rubel, D.M. Kolpashchikov. Int. J. Mol. Sci., **24** (9), 7812 (2023). DOI: 10.3390/ijms24097812

[31] Q. Zhu, D. Tian, W. Guo, J. He. Anal. Lett., **55**(8), 1179–1191 (2021). DOI: 10.1080/00032719.2021.1991365

[32] K. Tsukakoshi, H. Abe, H. Ikebukuro, K. Karube. Nucleic Acids Res., **49** (11), 6069 (2021). DOI: 10.1093/nar/gkab388

[33] P. Qi, Z. Sun, Y. Huang, X. Feng, L. Zhang. Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp., **655**, 130319 (2022). DOI: 10.1016/j.colsurfa.2022.130319

[34] P. Zou, J. Cao, Y. Xu, L. Du. Biosens. Bioelectron., **79**, 29 (2016). DOI: 10.1016/j.bios.2015.12.012

[35] Y. Gao, B. Li. Anal. Chem., **85** (23), 11494 (2013). DOI: 10.1021/ac402728d

[36] Y. Guan, X. Li, H. Wang, Z. Zhang, J. Li. Biosensors, **13** (1), 118 (2023). DOI: 10.3390/bios13010118

[37] V. Pavlov et al. Anal. Chem., **76** (7), 2152 (2004). DOI: 10.1021/ac035219l

[38] S. Bi, S. Yue, S. Zhang. Chem. Soc. Rev., **46** (14), 4281 (2017). DOI: 10.1039/C7CS00055C

[39] R. Du, X. Yang, P. Jin, Y. Guo, H. Cheng, H. Yu, Y. Xie, H. Qian, W. Yao. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., **63** (27), 8808 (2023). DOI: 10.1080/10408398.2022.2059753

[40] E.M. Gross, S.S. Maddipati, S.M. Snyder. Bioanalysis, **8** (19), 2071 (2016). DOI: 10.4155/bio-2016-0178

[41] Biosearch Technologies. QuickExtract RNA Extraction Kit Protocol [Электронный ресурс]. URL: https://www.biosearchtech.com/nucleic-acid-sample-preparation/rapid-nucleic-acid-extraction-kits/quickextract-rna-extraction-kit/p/QER090150 (дата обращения: 19.10.2025).

[42] H. Ying, S. Fengying, H. Feng, W. Yanhong, X. Xianru, X. Xiaolei. Transl. Oncol., **14** (1), 100928 (2021). DOI: 10.1016/j.tranon.2020.100928