

УДК 615.074+57.088.1+ 543.423.3
EDN: XXDBTW
<https://doi.org/10.15275/ssmj2104497>

Оригинальная статья

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ БЕЗЫНСТРУМЕНТАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ДНК-МИШЕНЕЙ НА ОСНОВЕ УЛЬТРАМОНОДИСПЕРСНЫХ НАНОСФЕР ЗОЛОТА

Т.Е. Пылаев, С.С. Веретенников

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России,
Саратов, Россия

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN INSTRUMENT-FREE SYSTEM FOR DNA TARGET DETECTION BASED ON THE ULTRA-MONODISPERSE GOLD NANOSPHERES

T.E. Pylaev, S.S. Veretennikov

V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov, Russia

Для цитирования: Пылаев Т.Е., Веретенников С.С. Разработка и валидация безыন্ত্রumentальной системы обнаружения ДНК-мишеней на основе ультрамонодисперсных наносфер золота. Саратовский научно-медицинский журнал. 2025; 21 (4): 497–503. EDN: XXDBTW. <https://doi.org/10.15275/ssmj2104497>.

Аннотация. Цель: разработать простую и удобную технологию выявления ДНК-мишеней для диагностики социально значимых заболеваний на основе колориметрического агрегационного теста с использованием наночастиц золота. **Материал и методы.** Синтез наносфер золота осуществлялся методами жидкофазной химии. Физико-химические параметры наночастиц контролировались методами спектроскопии поглощения, динамического светорассеяния, электронной микроскопии. Рациональный дизайн последовательностей специфических фрагментов геномных мишеней и олигонуклеотидов, входящих в состав тест-системы, осуществлялся с учетом термодинамических констант и с применением геномных баз. Аналитическую валидацию тест-системы проводили на модели выявления ДНК *Babesia* species – возбудителя пироплазмоза человека и животных, путем кросс-сравнения характеристик с полимеразной цепной реакцией с электрофоретическим учетом результатов и в формате реального времени. **Результаты.** Разработан пилотный вариант тест-системы для специфического обнаружения до 10 нг ДНК в образцах крови путем визуальной дискриминации цвета реакционной смеси при длительности анализа примерно 30 мин. Выявлен размерный эффект наночастиц в диапазоне от 15 до 60 нм на минимальный предел обнаружения ДНК-мишеней. **Заключение.** В настоящей работе представлены результаты разработки и аналитической валидации пилотной версии экспресс-тест-системы для ДНК-диагностики на основе меток наночастиц золота и визуальной дискриминации цвета реакционной смеси.

Ключевые слова: экспресс-тест-система, молекулярная диагностика, наночастица золота, колориметрический тест

For citation: Pylaev TE, Veretennikov SS. Development and validation of an instrument-free system for DNA target detection based on the ultra-monodisperse gold nanospheres. Saratov Journal of Medical Scientific Research. 2025; 21 (4): 497–503. (In Russ.) EDN: XXDBTW. <https://doi.org/10.15275/ssmj2104497>.

Abstract. *Objective:* to develop a simple and robust technology for DNA targets detection for the diagnosis of socially significant diseases, based on a colorimetric aggregation test using gold nanoparticles. *Material and methods.* Gold nanospheres were synthesized using liquid-phase chemistry methods. The physicochemical parameters of the nanoparticles were controlled by absorption spectroscopy, dynamic light scattering, and electron microscopy. The rational design of the specific sequences of target genomic fragments and oligonucleotides included in the test system, was carried out taking into account the thermodynamic constants and using genomic databases. The analytical validation of the test system was carried out using a model for detecting the DNA of *Babesia* species, the causative agent of human and animal pyroplasmiasis, by cross-comparing the characteristics with a polymerase chain reaction with electrophoretic results detection and in a “real-time” format. *Results.* A pilot test system has been developed for the specific detection of up to 10 ng of DNA in blood samples by visual discrimination of the color of the reaction mixture, within analysis duration about 30 min. The size effect of nanoparticles in the range from 15 to 60 nm on the minimum detection limit of DNA targets has been revealed. *Conclusion.* This paper presents the results of the development and analytical validation of a pilot version of an express test system for DNA diagnostics based on gold nanoparticle tags and visual color discrimination of the reaction mixture.

Keywords: rapid test system, molecular diagnostics, gold nanoparticle, colorimetric test

Введение. Необходимость оперативного и точного определения генетических мишеней социально значимых заболеваний [1], также как и прямой идентификации возбудителей инфекционных заболеваний [2], создает предпосылки для разработки простых и удобных генетических тестов, готовых к применению в повседневной врачебной практике. Развитие подходов современной лабораторной диагностики и биоинженерии сформировало отдельное направление по созданию и адаптации экспресс-тест-систем, предназначенных для само-тестирования, в англоязычной литературе именуемых как РОСТ (point-of-care test-systems) [3], вне специализированных медицинских учреждений, так называемое «тестирование у постели больного» [4]. Ключевую роль при создании ДНК-биосенсоров [5] и РОСТ-тест систем является разработка специфических маркеров, состоящих из 2 основных компонентов – зонда и метки. Под зондом подразумевается молекула, селективно и специфично связывающаяся с целевым фрагментом мишени по принципу комплементарного связывания, иммунохимического либо другого биоспецифического родства. В качестве меток традиционно выступают молекулярные либо корпускулярные носители специфического сигнала, срабатывающего во время реакции молекулярного узнавания «зонд – мишень». Таким образом, однозначное выявление мишеней в анализируемых средах достигается за счет высокоаффинных реакций молекулярного узнавания с характерным изменением цвета [6], хемилюминесцентного сигнала [7] и прочих распознаваемых невооруженным глазом либо с помощью простейших систем индикации. Помимо разработки маркеров, актуальной задачей является развитие новых подходов для систем детекции [8], которые должны одновременно удовлетворять целому ряду технических и социально-экономических требований. В частности, параметры РОСТ-систем должны соответствовать следующим критериям: выявление аналитов (в нашем случае – специфических фрагментов нуклеиновых кислот) в диагностически значимых диапазонах; конкурентоспособность и экономическая выгода в сравнении с традиционными лабораторными методами [9]; удобство и простота исполнения; минимальные время и трудозатраты. Удовлетворение перечисленных критериев будет способствовать успешному внедрению вновь создающихся РОСТ-систем как адекватно отвечающим современным требованиям к оказанию медицинской помощи в рамках профилактических и диагностических услуг.

Среди множества активно развиваемых направлений определенный интерес представляют колориметрические ДНК тест-системы на основе меток наночастиц золота (НЧЗ) [10]. Спустя более чем 20 лет после выхода в 1996 г. пионерской публикации С.А. Mirkin и соавт. [11] было предложено большое количество работ по использованию ЗНЧ в качестве меток для генетических РОСТ-систем, некоторые из которых доведены до клинического применения [12]. Принцип действия большинства известных вариантов колориметрических тест-систем заключается в биоспецифической либо солевой агрегации НЧЗ, индуцируемой нуклеотидной гибридизацией «зонд –

мишень». В частности, одна из стратегий реализуется за счет использования ковалентно меченых НЧЗ специфическими олигоДНК-зондами, с комплементарными выявляемому фрагменту мишени последовательностями [11]. Вторая стратегия основана на электростатических силах и реализована в безметочном (label-free) формате за счет специально подобранных модификаторов поверхности НЧЗ и состава гибридационного буфера [13]. Непосредственный интерес ко второй стратегии обусловлен рядом объективных причин, подробно обсужденных в наших предыдущих работах [14]. Ранее нами был предложен вариант колориметрического ДНК-теста [15], защищенного патентом РФ [16]. Принцип метода заключается в изменении цвета коллоида при наличии в исследуемом образце ДНК-мишени, обусловленном агрегацией НЧЗ. Регистрация специфического сигнала может осуществляться несколькими вариантами с разной чувствительностью: невооруженным глазом либо инструментально с использованием стандартной спектрофотометрии поглощения, методом динамического рассеяния света (ДРС, регистрация изменения среднего гидродинамического размера частиц), спектрофлуориметрии, микроскопического анализа и другими вариантами.

Цель – разработать простую и удобную технологию выявления ДНК-мишеней для диагностики социально значимых заболеваний на основе колориметрического агрегационного теста с использованием НЧЗ.

В рамках разрабатываемой концепции мы предлагаем усовершенствованный вариант колориметрического ДНК-теста на основе меток супермонодисперсных сферических НЧЗ. Ключевое преимущество предлагаемой модификации заключается в увеличении чувствительности детекции с одновременным сокращением времени проведения теста за счет уникальных агрегационных свойств и суперсферичности НЧЗ по сравнению с ранее использованными квазисферическими НЧЗ. Кроссвалидация аналитических характеристик тест-системы на модели выявления протяженных участков генов, кодирующих 18-s рРНК *Babesia canis canis*, были взяты из работы [17], праймеры для выявления генов-предшественников криптического антигена *Babesia canis canis* – из работы [18] соответственно. Дизайн мишень-специфических последовательностей праймеров для амплификации коротких фрагментов гена 18-s рРНК *Babesia canis canis* методом ПЦР-РВ осуществлялся с использованием общепринятых алгоритмов. В качестве зондов для колориметрического теста на метках НЧЗ были взяты олигонуклеотиды с последовательностями, аналогичными прямым ПЦР-праймам. Специфичность всех разработанных

Таблица 1

Олигонуклеотиды, используемые в данном исследовании

Обозначение	Функциональный тип	5'-3'-последовательность	Длина ампликона, п.н.	Ссылка
ВAB-P	Зонд для мечения ЗНЧ	GTCTTGTAATTGGAATGATGG	–	[17]
ВAB_Fw_Un	Прямой праймер для ПЦР-ЭФ	GTCTTGTAATTGGAATGATGG	559	
ВAB_Rv_L	Обратный праймер для ПЦР-ЭФ	CCAAAGACTTTGATTTCTCTC		
ВAB_Fw_Un	Прямой праймер для ПЦР-РВ	GTCTTGTAATTGGAATGATGG	61	Настоящая работа
ВAB_Rv_S	Обратный праймер для ПЦР-РВ	CACCAGACTTGCCTCCAAT		
СВА_P	Зонд для мечения ЗНЧ	ACCATGATGCTGCTCTTCGCCTTG	–	[18]
СВА_Fw	Прямой праймер для ПЦР-ЭФ	ACCATGATGCTGCTCTTCGCCTTG	1065	
СВА_Rv	Обратный праймер для ПЦР-ЭФ	GCGAAAAACATGAGTGGGACC		
ОКО	Отрицательный контроль	TCCTGCAGATACACTCCACCAA	–	[15]

последовательностей была подтверждена путем сравнения с геномными фрагментами мишеней, аннотированными во всемирной базе Genbank. Оптимизацию температуры плавления, а также верификацию последовательностей на наличие неспецифических сайтов взаимного комплементарного связывания олигонуклеотидов проводили с использованием олигокалькулятора.

Характеристики всех использованных олигонуклеотидов приведены в табл. 1. Синтез олигонуклеотидов осуществляли методом автоматизированной фосфорамидитной химии на твердофазном носителе CPG-500 (стекло с контролируемым размером пор 500Å), на олигосинтезаторе Polygen 12 (PolyGen GmbH, Германия). Для отщепления синтезированных олигонуклеотидов от носителя проводили инкубацию в 37% водном растворе аммиака при температуре 55°C в течение 24 ч, затем осуществляли грубую очистку олигонуклеотидов от органических примесей обессаливанием в н-бутаноле и пересаживанием в водный раствор. Препаративную очистку олигонуклеотидов выполняли методом высокоразрешающего гель-электрофореза в 20% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с последующей элюцией продукта из геля в буфер (10 мМ водный раствор Трис-этилендиаминтетрауксусной кислоты с рН 8).

Пробоподготовка биообразцов. Выделение геномной ДНК из образцов крови собак с клинически подтвержденным диагнозом пироплазмоза (пробы любезно представлены профессором С.А. Староверовым, ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова») осуществляли с использованием коммерческого набора для экстракции геномной ДНК (DNA blood mini-kit, Qiagen, Германия). Процедуру осуществляли в условиях ламинарного бокса БМВ-II («Ламинар-С», Россия), следуя инструкциям производителя. Всего в работе использовано 37 клинических образцов. Чистоту препаратов и их концентрацию (OD₂₆₀=1 соответствует 50 мкг/мл ДНК) проверяли методом ультрафиолетовой (УФ) спектрофотометрии на длинах волн 230/260/280 нм с использованием оптического анализатора NanoDrop OneS (Thermo FS, США). Полученные образцы ДНК

хранили в 1,5 мл микропробирках при –20°C (ПО-ЗИС ХЛ-340, Россия) до начала проведения колориметрического теста и ПЦР-амплификации.

Процедура постановки полимеразной цепной реакции с электрофоретическим вариантом детекции результатов. ПЦР-амплификацию проводили в 200 мкл тонкостенных пробирках (Scientific Specialties, Inc., США) в термоциклере SimpliAmp (Thermo FS, США). Амплификационная смесь содержала 3 мкл 10 × ПЦР-буфера, 10 мМ dNTP, 25 мМ MgCl₂, 5 ед/мкл Taq ДНК-полимеразы, смесь прямого и обратного праймеров по 50 пмоль каждого, 2 мкл геномной ДНК (30 нг/мкл), доведенная деионизованной водой Milli-Q (Merck Millipore, Германия) до общего объема 30 мкл. Режимы амплификации (для обеих праймерных смесей ВAB и СВА): 5 мин предварительной денатурации при 94°C; 45 циклов, включающих 60 с денатурацию при 92°C, 60 с отжиг праймеров при 52°C и 90 с элонгацию при 72°C; 7-минутная финальная элонгация 72°C. Результаты амплификации визуализировали методом горизонтального агарозного гель-ЭФ с использованием интеркалирующего красителя бромистого этидия («Хеликон», Россия). В каждую лунку вносили по 10 мкл смеси ПЦР-продуктов с буфером для внесения, в качестве маркеров длин использовали фрагменты 50–1500 п.н. Step50 bp Plus («Биолабмикс», Россия). Разделение фрагментов проводили в 1,5% агарозном геле (агароза Е, низкий ЕЕО, #D00391, «Диа-М», Россия), приготовленном на 1хTAE буфере (Thermo, Литва), с использованием системы для ЭФ Blue Marine 200 Cx (Serva, Германия), подключенной к источнику постоянного тока 310 Marine Power Supply (Serva, Германия) при следующих условиях: напряжение – 130 В, мощность – 30 Вт, сила тока – 55 мА, длительность – 90 мин. Захват электрофоретических изображений осуществляли с использованием геледокументирующей системы BlueCube-300 (Serva, Германия).

Процедура постановки флуоресцентной регистрации результатов в режиме реального времени. Реакционная смесь для ПЦР-РВ содержала 2 мкл геномной ДНК (30 нг/мкл); 10 мкл готовой реакционной смеси для амплификации, содержащей интеркалирующий краситель SYBR Green

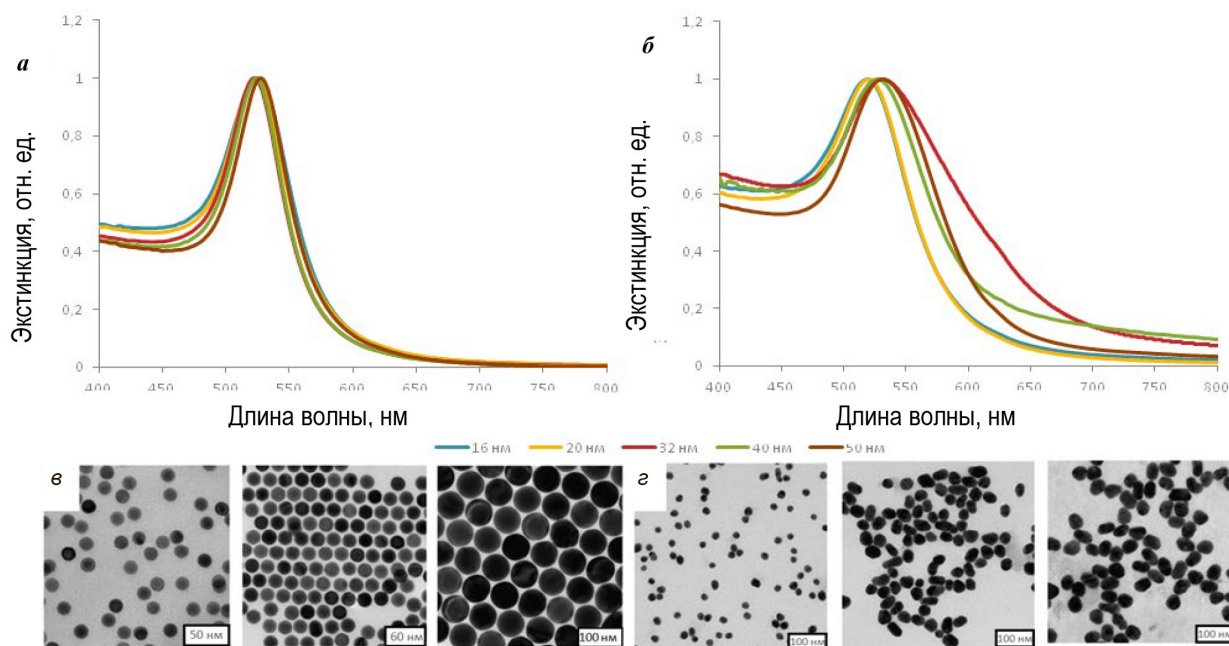


Рис. 1. Спектры экстинкции и изображения просвечивающего электронного микроскопа монодисперсных сфер в мицеллярном растворе цетилтриметиламмония хлорида (а, в) и квазисферических коллоидных частиц золота (б, з) диаметрами 16, 20, 32, 40 и 50 нм. Масштабные полосы соответствуют 100 нм

(2X HS-qSYBR-blue, «Биолабмикс», Россия); смесь праймеров (BAB_Fw_Up и BAB_Rv_S) – по 0,4 пмоль каждого; объем реакционной смеси доведен водой Milli-Q до общего объема 20 мкл. Амплификацию проводили в 3-кратной повторности с использованием прибора для ПЦР-РВ LightCycler 96 (Roche, Швейцария). Режимы амплификации: 1 цикл 94°C (5 мин), затем 45 циклов [94°C (10 с), 60°C (20 с) + детекция на канале FAM]. Анализ амплификационных кривых проводили на сертифицированном программном обеспечении LightCycler® 96 Software версии 1.1.0.1320.

Получение и характеристика коллоидных меток наночастиц золота. Получение препаратов квазисферических коллоидных частиц золота (НЧЗ-цит) осуществляли по методу Френса [19] с дополнительной модификацией поверхности цетилтриметиламмонием бромидом (ЦТАБ), как описано в [15]. Получение препаратов монодисперсных сфер в мицеллярном растворе цетилтриметиламмония хлорида (НЧЗ-ЦТАХ) осуществляли жидкофазным химическим синтезом по зародышевому методу Xia [20]. Типичный набор спектральных и геометрических характеристик свежеприготовленных коллоидов получали с использованием общепринятых процедур и методов УФ-видимой спектроскопии и метода ДРС. Морфологию частиц и их размеры определяли также по изображениям, полученным с помощью просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия) в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ФИЦ СНЦ РАН.

Определение рабочих параметров наночастиц золота для колориметрического теста. Суть оптимизации состояла в последовательном определении рабочих параметров компонентов реакционной смеси на основе меток НЧЗ, при которых не происходит агрегации частиц в гибридационном-солевом буфере до момента внесения раствора

целевой ДНК-мишени. Вкратце пошаговая процедура выглядит следующим образом. Свежеприготовленные препараты НЧЗ, отмытые от избытка реакционной смеси путем центрифугирования при 12 000 об/мин в течение 30 мин, ресуспендировали в мицеллярном водном растворе ЦТАБ с различными концентрациями (1, 3, 5 и 10 мМ раствора ЦТАБ). Затем для каждого из полученных коллоидных растворов комплексов НЧЗ-ЦТАБ была проверена солевая устойчивость НЧЗ. Для этого готовили серию смесей, состоящих из 900 мкл раствора НЧЗ-ЦТАБ и 100 мкл растворов хлорида натрия (NaCl) с концентрациями от 0,1 до 1 М. Далее для определения оптимальной концентрации зонда готовили смеси НЧЗ и растворов олигонуклеотидов *BAB-P* в гибридационном буфере (7 мМ Tris-HCl, pH 7,4; 170 мМ NaCl) в концентрационном ряду от 0 до 50 нМ. Спустя 10 мин после приготовления описанных тестовых смесей по 100 мкл переносили в лунки оптически прозрачных 96-луночных планшетов с плоским дном и регистрировали спектр поглощения в диапазонах длин волн на планшетном мультиридере Multiskan SKYHIGH TC (Thermo Scientific, США).

Процедура постановки колориметрического теста. Колориметрический тест проводился по схеме, описанной в нашей работе [15] с незначительными модификациями. Типичный набор опытных и контрольных реакционных смесей включает:

- бланк – НЧЗ в воде;
- стандарт 1 – НЧЗ в гибридационно-солевом буфере;
- стандарт 2 – смесь НЧЗ в гибридационном буфере и зонда;
- ОКО – смесь НЧЗ в гибридационном буфере, зонда и отрицательного контрольного образца;
- ПКО – смесь НЧЗ в гибридационном буфере, зонда и контрольного образца (синтетический образец с последовательностью ДНК-мишени с заведомо известной концентрацией);
- образец – смесь НЧЗ в гибридационном буфере, зонда и исследуемой пробы (преамплифицированный

фрагмент ДНК мишени после 5–10 циклов стандартной амплификации).

Компоненты смешивали в 2 мл микропробирках в следующем соотношении: 600 мкл суспензии НЧЗ-ЦТАБ с оптической плотностью 0,2 на длине волны 520 нм, 900 мкл гибридизационного буфера (смесь 50 мМ Tris-HCl, pH 7,4; 1,2 М NaCl и воды Milli-Q в объемном соотношении 1:1:2), 150 мкл раствора зонда, 150 мкл раствора мишени (добавляется в последнюю очередь) и вода Milli-Q до достижения финального объема смеси 1800 мкл. Регистрацию результатов проводили невооруженным глазом, спектрофотометрически (в кювете либо в лунках оптически прозрачных 96-луночных планшетов) через 5 мин либо методом ДРС через 30 мин после приготовления смесей соответственно.

Статистическая обработка полученных данных. Анализ проведен посредством стандартных пакетов Microsoft Excel 2010. Полученные данные представлены в виде средней арифметической и ее стандартного отклонения ($M \pm SD$). Проверку нормальности распределения количественных признаков проводили с использованием теста Шапиро – Уилка. Проверку равенства дисперсий осуществляли с помощью теста Левена. Для оценки значимости различий количественных признаков использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Рассчитывали уровень значимости p , критическим показателем которого принимали равным 0,05.

Результаты. Согласно представленным данным электронно-микроскопических изображений (рис. 1) НЧЗ-цит обладают существенной квазисферичностью, степень которой возрастает с увеличением размера частиц (рис. 1, а), что также отражается в уширении спектра экстинкции (рис. 1, б). Напротив, использованный нами метод доразрачивания «зародышей» позволяет получать монодисперсные образцы НЧЗ идеальной сферической формы и контролировать размер частиц в широком диапазоне от 10 до 150 нм (рис. 1, а, в).

Использование высококачественных образцов наночастиц с низкой степенью полидисперсности и полиморфности в качестве меток для агрегационного ДНК-теста имеет принципиальное значение. Регистрация характерных явлений, происходящих при агрегации частиц, может осуществляться невооруженным глазом (качественно, по

изменению цвета исходного коллоида с красного до серо-синего или бесцветного) или количественно методами УФ-видимой спектрофотометрии и ДРС. Отсутствие ложных пиков на гистограмме, связанное с вращательной диффузией квазисферических НЧЗ, при регистрации методом ДРС актов агрегации частиц, индуцируемой ДНК – ДНК гибридизацией, позволяет более точно проводить анализ и тем самым повысить его чувствительность. Действительно, проведенная на модельных синтетических олигонуклеотидах независимая оценка нижнего порога детекции тестов на основе НЧЗ-цит+ЦТАБ и НЧЗ-ЦТАХ (по наличию сигнала, достоверно отличающегося от контрольных) в 3 вышеуказанных способах детекции показала существенные преимущества монодисперсных НЧЗ. Последующая апробация теста на реальных образцах (см. рис. 1) на примере выявления специфических фрагментов генов *Babesia canis canis* подтвердила выявленные высокие значения порога детекции. Идентификацию видовой принадлежности возбудителя пироплазмоза параллельно осуществляли методом ПЦР с электрофоретическим учетом результатов. Было выявлено наличие *Babesia canis canis* в 37 клинических образцах крови собак со 100-процентной специфичностью, в качестве референсных были использованы общеклинические данные (анамнез, мазок крови, гемодинамические показатели, коммерческий ПЦР-тест).

Сопоставление пределов детекции колориметрического теста на НЧЗ-ЦТАХ с ПЦР-ЭФ (рис. 2, а) показало преимущество разрабатываемого теста практически на 3 порядка (табл. 2). Отметим, что предложенный нами колориметрический тест наиболее близок к варианту количественной ПЦР с использованием гибридизующихся флуоресцентных зондов, роль которых выполняют НЧЗ. Выполнение теста сводится к преамплификации (от 1 до 5–15 циклов в зависимости от количества копий нуклеиновых кислот агентов-мишеней в исходном образце) и детекции в буферном растворе, содержащем НЧЗ и узнающие зондовые молекулы. Согласно представленным в табл. 2 данным значительные количественные показатели пределов детекции были достигнуты в 3 вариантах регистрации биоспецифической агрегации: невооруженным глазом (сопоставимые с ОТ-ПЦР-РВ), спектрофотометрически (чувствительность на порядок выше ПЦР-РВ) либо методом ДРС (в 100–1000 раз более чувствительным, чем ПЦР-РВ).

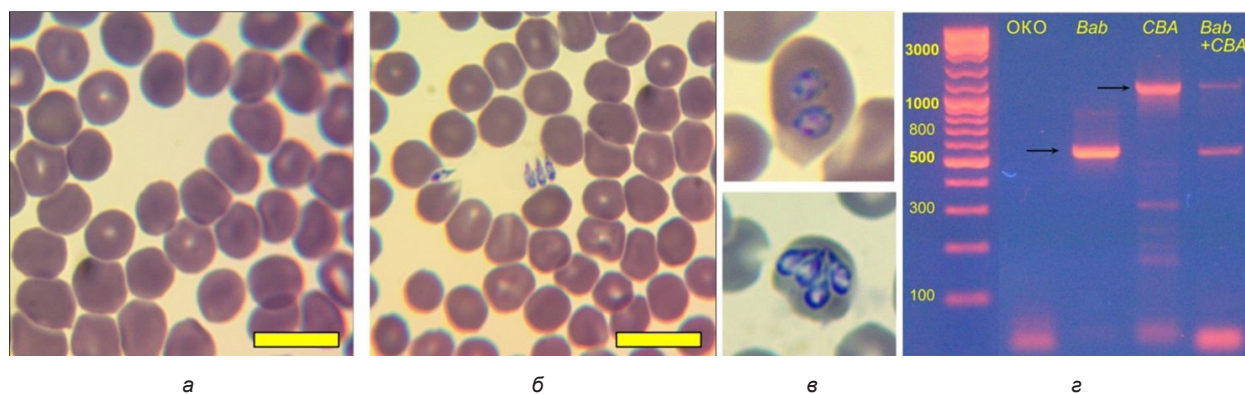


Рис. 2. Светомикроскопическое выявление в культуральной жидкости на 14 день культивирования (а–в) и детекция специфических фрагментов генов *B. canis* методом ПЦР-ЭФ (а). Окраска по осуществлена по методу Романовского – Гимзы. Подписи дорожек электрофореграммы (а) слева направо: маркеры длин ДНК (100–10000 п.н.); OKO – отрицательный контроль (вода вместо ДНК-матрицы); Bab – видоспецифическое выявление фрагментов генов 18s рРНК; CBA – идентификация фрагментов генов криптического антигена; Bab+CBA – мультиплексное выявление обоих генов. Масштабные полосы соответствуют 20 мкм

Сравнительная характеристика аналитической чувствительности колориметрического и ПЦР-тестов на примере идентификации генов 18-s рПНК *Babesia canis canis*

Тест-система	Вариант детекции ампликонов	Длительность анализа (без учета пробоподготовки), мин	Возможность количественного определения	Нижний порог выявления ДНК-мишени
ПЦР-ЭФ	Визуальный (гель-ЭФ)	300–400	Нет	10 нг
ПЦР-РВ	флуоресцентный	120–180	Да	1 нг
Колориметрический тест на метках НЧ3-цит-ЦТАБ	Визуальный (невооруженным глазом)	2–20	Нет	100 нг
	UV-vis	3–5	Да	10 нг
	ДРС	30–60	Да	1 нг
Колориметрический тест на метках НЧ3-ЦТАХ	Визуальный (невооруженным глазом)	2–20	Нет	10 пг
	UV-vis	3–5	Да	1 пг
	ДРС	30–60	Да	0,1 пг

Наконец, достоинствами колориметрического метода являются его простота и оперативность: время для анализа сокращается от нескольких часов (характерного для ПЦР-РВ) до 30–60 мин при этом не требуется дорогостоящего оборудования, помимо обычного термоциклера и спектрофотометра.

Обсуждение. Сравнение нашего «безметочного» варианта с известными колориметрическими тестами на основе конъюгатов НЧ3 с химически пришитыми тиопроизводными олигоДНК-зондами [11] позволяет сделать следующие замечания. Во-первых, простота и оперативность проведения анализа. Сравнительно трудоемкая и времязатратная стадия приготовления конъюгатов в нашем случае отсутствует. Детекция происходит непосредственно после добавления раствора мишени (содержащего выделенные из пробы НК после 5–15 циклов преамплификации либо без нее) к смеси растворов ЗНЧ и узнающих молекул. Таким образом, в самом простом варианте – детекции невооруженным глазом без стадии преамплификации с момента забора биоматериала, выполнение теста сводится к выделению НК и колориметрической детекции. При этом общее время на процедуру составляет 30–40 мин. Во-вторых, немаловажную роль играет себестоимость, что особенно значимо на этапах практической реализации: коммерческий синтез немодифицированных олигонуклеотидов на порядок дешевле, чем их тиопроизводных. Таким образом, разрабатываемый подход отличается простотой и доступностью для последующей коммерциализации в качестве прототипа тест-системы с возможностью адаптации под различные аналиты и системы детекции.

Конкурентными преимуществами невозмущающего метода ДРС является его простота, оперативность, и высокая чувствительность к образованию агрегатов в системе [15]. С другой стороны, на корректность измерения сигнала существенно влияют геометрические параметры наночастиц (мономорфность и изодисперсность). Традиционно используемые в биоаналитике НЧ3-цит [19] обладают значительной степенью несферичности, растущей с увеличением размера частиц. Кроме того, с увеличением размера частиц снижается их коллоидная стабильность, что делает невозможным дальнейшее применение частиц крупнее 35 нм. Отмеченные принципиальные недостатки отражаются на эффективности применения цитратных наносфер

для колориметрических ДНК-тестов. В связи с этим, в данной работе использованы НЧ3 с улучшенными характеристиками (степенью изодисперсности и мономорфности не менее 98%) и возможностью контроля размера частиц в широком диапазоне от 10 до 150 нм [20]. Следует отметить, что используемый для синтеза метод контролируемого доразвивания «зародышей» в мицеллярном растворе НЧ3-ЦТАХ приводит к получению частиц с положительным поверхностным зарядом, готовых к применению для колориметрического теста после отмывки от ростового раствора. Напротив, в случае использования НЧ3-цит [19] необходима дополнительная стадия модификации поверхности частиц молекулярным слоем ЦТАБ. Таким образом, мы предполагаем, что замена только одного компонента – НЧ3 одного типа на другой – позволит преодолеть выявленный ранее [15] диагностический предел чувствительности (приблизительно 10 нг ДНК, что эквивалентно чувствительности ПЦР-ЭФ) с одновременным упрощением процедуры.

Заключение. В настоящей работе приведены результаты пилотных испытаний разработанного колориметрического теста на основе ультрамонодисперсных сферических НЧ3 для быстрого и чувствительного выявления специфических фрагментов ДНК-мишеней. Валидация количественных показателей показала существенные преимущества (до 3 порядков чувствительности) разрабатываемого подхода перед методом ПЦР-РВ. Разработанный прототип тест-системы для специфического обнаружения *Babesia* sp. может быть адаптирован для дальнейшего применения в клинической лабораторной диагностике и ветеринарной практике для выявления возбудителя пироплазмоза у человека и хозяйственно важных животных. Полученные результаты могут быть востребованы в лабораторной и клинической практике как альтернатива методу ПЦР и как основа новых разработок в области клеточной инженерии, молекулярной диагностики, фармакологии и пр.

Благодарности. Авторы выражают благодарность профессору С.А. Староверу, ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» за предоставление клинических образцов для тестирования.

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект №24-25-00420).

Вклад авторов: С.С. Веретенников – исследование методом полимеразной цепной реакции, написание первоначального варианта статьи; Т.Е. Пылаев – синтез наночастиц золота, дизайн статьи, обработка данных, написание и редактирование рукописи. Авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

References (Список источников)

1. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, et al. Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(8):472-84. DOI:10.1038/nrclinonc.2013.110
2. Hsieh K, Melendez JH, Gaydos CA, et al. Bridging the gap between development of point-of-care nucleic acid testing and patient care for sexually transmitted infections. *Lab on a Chip*. 2013;22(3):476-511. DOI:10.1039/D1LC00665G
3. Zhan J, Wang S, Li X, et al. Molecular engineering of functional DNA molecules toward point-of-care diagnostic devices. *Chem Commun (Camb)*. 2025;61(22):4316-38. DOI:10.1039/d5cc00338e
4. Dementiyva II, Morozov YuA, Tchamaya MA, Gontcharova AV. The point-of-care technologies in clinic of emergency states. *Klinicheskaja laboratornaia diagnostika*. 2013;(7):5-10. (In Russ.) Дементьева И.И., Морозов Ю.А., Чарная М.А., Гончарова А.В. Технологии point of care в клинике неотложных состояний. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013;(7):5-10.
5. Khan S, Burciu B, Filipe CDM, et al. DNAzyme-based biosensors: Immobilization strategies, applications, and future prospective. *ACS Nano*. 2021;15(9):13943-69. DOI:10.1021/acsnano.1c04327
6. Li Y, Liu S, Deng Q, et al. A sensitive colorimetric DNA biosensor for specific detection of the HBV gene based on silver-coated glass slide and G-quadruplex-hemin DNAzyme. *J Med Virol*. 2018;90(4):699-705. DOI:10.1002/jmv.24993
7. Srisomwat C, Yakoh A, Avihingsanon A, et al. An alternative label-free DNA sensor based on the alternating-current electroluminescent device for simultaneous detection of human immunodeficiency virus and hepatitis C co-infection. *Biosens Bioelectron*. 2022;196:113719. DOI:10.1016/j.bios.2021.113719
8. Wang C, Liu M, Wang Z, et al. Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices. *Nano Today*. 2021; 37: 101092. DOI:10.1016/j.nantod.2021.101092

9. Petralia S, Conoci S. PCR Technologies for point of care testing: Progress and perspectives. *ACS Sens*. 2017;2(7):876-91. DOI:10.1021/acssensors.7b00299

10. Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, et al. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010;49(19):3280-94. DOI:10.1002/anie.200904359

11. Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, et al. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*. 1996;382(6592):607-9. DOI:10.1038/382607a0

12. Chen Q, Yuan L, Wan J, et al. Colorimetric detection of hepatitis E virus based on reverse transcription loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay. *J Virol Methods*. 2014;197:29-33. DOI:10.1016/j.jviromet.2013.11.006

13. Kim SK, Cho H, Jeong J, et al. Label-free and naked eye detection of PNA/DNA hybridization using enhancement of gold nanoparticles. *Chem Commun (Camb)*. 2010;46(19):3315-17. DOI:10.1039/b926940a

14. Pylaev TE, Volkova EK, Kochubey VI, et al. DNA detection assay based on fluorescence quenching of Rhodamine B by gold nanoparticles: The optical mechanisms. *J Quant Spectrosc Radiat Transfer*. 2013;131:34-42. DOI:10.1016/j.jqsrt.2013.04.026

15. Pylaev TE, Khanadeev VA, Khlebtsov BN, et al. Colorimetric and dynamic light scattering detection of DNA sequences by using positively charged gold nanospheres: A comparative study with gold nanorods. *Nanotechnology*. 2011;22(28):285501. DOI:10.1088/0957-4484/22/28/285501

16. Khlebtzov BN, Pylaev TE, Khlebtzov NG. Method for colorimetric detection of oligonucleotides using cationic gold nanospheres. Patent No. 2439161 Russian Federation, IPC C12Q 1/00, B82B 3/00, B82B 1/00. Application No. 2009145189/10; filed 08.12.09; published 10.01.12. Bulletin No. 1. 5 p.: ill. (In Russ.) Хлебцов Б.Н., Пылаев Т.Е., Хлебцов Н.Г. Способ колориметрического детектирования олигонуклеотидов с использованием катионных золотых наносфер. Пат. 2439161 Российская Федерация, МПК C12Q 1/00, B82B 3/00, B82B 1/00. № 2009145189/10; заявл. 08.12.09; опубл. 10.01.12. Бюл. №1. 5 с.: ил.

17. Adaszek Ł, Winiarczyk S. *In vitro* cultivation of *Babesia canis canis* parasites isolated from dogs in Poland. *Parasitol Res*. 2011;108(5):1303-7. DOI:10.1007/s00436-010-2181-7

18. Moubri K, Kleuskens J, Van de Crommert J, et al. Discovery of a recombinant *Babesia canis* supernatant antigen that protects dogs against virulent challenge infection. *Vet Parasitol*. 2018;249:21-9. DOI:10.1016/j.vetpar.2017.11.002

19. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat Phys Sci*. 1973;241:20-2. DOI:10.1038/physci241020a0

20. Zheng Y, Zhong X, Li Z, et al. Successive, seed-mediated growth for the synthesis of single-crystal gold nanospheres with uniform diameters controlled in the range of 5–150 nm. *Part Part Syst Charact*. 2014;31(2):266-73. DOI:10.1002/ppsc.201300256

Статья поступила в редакцию 07.11.2025; одобрена после рецензирования 19.11.2025; принята к публикации 20.11.2025. The article was submitted 07.11.2025; approved after reviewing 19.11.2025; accepted for publication 20.11.2025.

Информация об авторах:

Тимофей Евгеньевич Пылаев – директор научно-производственного и образовательного центра молекулярно-генетических и клеточных технологий, кандидат биологических наук, pylaevte@gmail.com, ORCID 0000-0002-2701-3333; **Сергей Сергеевич Веретенников** – младший научный сотрудник научно-производственного и образовательного центра молекулярно-генетических и клеточных технологий, sergejj-veretennikov0@rambler.ru.

Information about the authors:

Timofey E. Pylaev — Director of the Research, Production and Educational Center for Molecular Genetic and Cellular Technologies, PhD, pylaevte@gmail.com, ORCID 0000-0002-2701-3333; **Sergey S. Veretennikov** — Junior Researcher of the Research, Production and Educational Center for Molecular Genetic and Cellular Technologies, sergejj-veretennikov0@rambler.ru.