

ОБНАРУЖЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ РНК-МИШЕНЕЙ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИМЕРИЗАЦИИ

© 2023 А.Р. Сахабутдинова, А.В. Чемерис, Р.Р. Гарафутдинов*

*Институт биохимии и генетики
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук,
450054 Уфа, Башкортостан, Россия; электронная почта: garafutdinovr@gmail.com*

Поступила в редакцию 22.11.2022

После доработки 26.02.2023

Принята к публикации 09.03.2023

Обнаружение специфических РНК-мишеней с помощью методов, основанных на амплификации, широко используется в фундаментальных исследованиях и медицине ввиду высокой значимости роли, которую молекулы РНК играют при реализации генетической информации и развитии заболеваний. В данной работе описан подход к обнаружению РНК-мишеней, в основе которого лежит особый вид изотермической амплификации – реакция мультимеризации нуклеиновых кислот. Предлагаемый метод требует использования только одного фермента – ДНК-полимеразы, обладающей активностями обратной транскриптазы и ДНК-зависимой ДНК-полимеразы, а также цепь-вытесняющей активностью. Определены условия реакции, обеспечивающие эффективную детекцию целевых РНК. Подход был апробирован на генетическом материале коронавируса SARS-CoV-2, взятом в качестве модельной мишени. Реакция мультимеризации позволила с высокой достоверностью дифференцировать SARS-CoV-2-положительные и SARS-CoV-2-отрицательные образцы. Предлагаемый способ позволяет обнаруживать РНК даже в образцах, подвергшихся многократному замораживанию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибонуклеиновые кислоты (РНК), коронавирус SARS-CoV-2, молекулярная диагностика, изотермическая амплификация, мультимеризация, сближенные праймеры.

DOI: 10.31857/S032097252305010X, **EDN:** AYYVQY

ВВЕДЕНИЕ

Амплификационно-опосредованный анализ РНК проводится при изучении экспрессии генов и некодирующих РНК [1], а также при обнаружении вирусных патогенов [2]. В 2020 г. РНК-содержащий вирус SARS-CoV-2 вызвал пандемию COVID-19, что актуализировало необходимость постоянного мониторинга эпидемиологической ситуации по особо опасным возбудителям [3]. В начале пандемии COVID-19 проблема «пропущенных» и бессимптомных пациентов высветила недостатки широко используемых методов амплификации и выявила потребность в разработке новых, более быстрых, чувствительных и недорогих способов обнаружения патогенов [3, 4]. Хотя ПЦР остаётся «золотым стандартом» и наиболее популярным методом молекулярной диа-

гностики инфекционных заболеваний, необходимость надёжного обнаружения SARS-CoV-2 привела к разработке подходов, основанных на микрофлюидных и биосенсорных технологиях, инструментах геномного редактирования (CRISPR/Cas) и др. [5–7].

Значительный прогресс был достигнут в развитии изотермических методов детекции специфических РНК [8–10], включая подходы, не требующие стадии обратной транскрипции (например, гибридационная цепная реакция, дезоксирибозимное расщепление, лигирование на РНК-мишени с последующей амплификацией «катящимся кольцом» и др.) [11–13]. В целом, изотермические методы являются отличной альтернативой ПЦР, не требуют дорогостоящего оборудования для термоциклирования и применимы для анализа различных биомолекул [13, 14]. Одним из перспективных видов изотермической амплификации является реакция мультимеризации (ММ) [15]. Было показано, что ММ может использоваться для определения РНК-мишеней [16]. Механизм [17, 18] и факторы, влияющие на ход

Принятые сокращения: ДТТ – дитиотреит; ММ – мультимеризация; НК – нуклеиновые кислоты; Tt – пороговое время.

* Адресат для корреспонденции.

этой реакции [19–22], были подробно изучены. Так, согласно работе Wang et al. [17], ММ начинается после образования псевдоциклических ДНК-структур за счёт частичной денатурации ампликонов («дыхания ДНК») с последующим загибанием свободных 3'-концевых участков цепей и их отжигом на противоположных частях ДНК-дуплекса. Было показано, что стабилизация псевдоциклических ДНК-структур происходит благодаря ионному взаимодействию фосфатных групп синтезируемых цепей ДНК с поверхностными аминогруппами (лизина и аргинина) полимеразы [18]. ММ эффективно протекает только при определённых условиях [19] и приводит к продуктам, представляющим собой тандемные нуклеотидные повторы, проявляющиеся в виде лестницы на электрофоретических гелях.

Как и в случае ПЦР, обнаружение специфической РНК с помощью изотермических методов требует использования РНК-зависимых ДНК-полимераз (обратных транскриптаз) для синтеза комплементарной ДНК (кДНК). Кроме того, из-за низкой стабильности молекул РНК работа с РНК-содержащими образцами требует соблюдения строгих правил. В случае с SARS-CoV-2 эти проблемы часто приводили к получению недостоверных результатов [23–25]. Обнаружение РНК с помощью изотермической амплификации с использованием ДНК-полимеразы Bst может упростить анализ и повысить его надёжность; обратнотранскриптазная активность ДНК-полимеразы Bst [26] делает её пригодной для прямого обнаружения РНК.

Целью данной работы стала демонстрация применимости мультимеризации, представляющей собой новый тип изотермической амплификации, для прямого обнаружения специфической РНК на примере РНК коронавируса SARS-CoV-2 как модельной мишени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные реагенты. ДНК-полимераза Bst 2.0 и изотермический буфер («New England Biolabs», США), дезоксирибонуклеотиды (дНТФ) («Биолабмикс», Россия), интеркалирующий краситель dsGreen («Lumiprobe», Россия), дитиотреит (ДТТ), персульфат аммония, акриламид, Tris, N,N'-метиленбисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, натриевая соль N,N,N',N'-этилендиаминтетрауксусной кислоты («Sigma», США). Все растворы готовили с использованием воды высшей категории качества (> 18 МОм, «Millipore», США).

Нуклеиновые кислоты (НК). Генетический материал коронавируса SARS-CoV-2 был получен из носоглоточных мазков больных COVID-19 (N = 60) с использованием набора М-Сорб-ООМ-96 («Синтол», Россия). Диагноз COVID-19 был подтверждён методом ОТ-ПЦР с использованием набора ОТ-ПЦР-SARS-CoV-2 («Синтол»). В качестве контроля использовались лизаты носоглоточных мазков, для которых были получены сомнительные (N = 50) или отрицательные (N = 50) результаты ПЦР-тестирования на SARS-CoV-2, а также мазков от здоровых индивидов (N = 25).

Олигонуклеотиды, использованные в работе

Ген	Название	Последовательность, 5'→3'	Длина, нт
S	F-S1	GTTATCAGACTCAGACTAATTCTCCTC	27
	R-S1	TTGACTAGCTACACTACGTGCCC	23
	F-S2	G TACAGACTCAGACTAATTCTCCTC*	26
	R-S2	T GACTGACTAGCTACACTACGTGCCC	26
	Qt	GTTaucagacucagacuaauucuccucggcgggcacguaguguagcuaguCAA**	53
N	F-N	T GACGCTTCAGCGTTCTTCGGAATGTC*	27
	R-N	G TCAAGGTGTGACTTCCATGCCAATG	23
ORF1a	F-O	T GACAAAAGTATTCTACACTCCAGGGAC	28
	R-O	G TCAAAATGACTCTTACCAGTACCAGGTG	27

* Жирным шрифтом выделены 5'-концевые нуклеотиды, не имеющие гомологии с нуклеотидной последовательностью SARS-CoV-2.

** Прописные буквы – дезоксирибонуклеотиды, строчные – рибонуклеотиды.

Путём смешивания по 20 соответствующих лизатов объёмом 30 мкл каждый из указанных групп были получены четыре типа образцов Rmix: Rmix(+) (SARS-CoV-2-положительные), Rmix(?) (SARS-CoV-2-сомнительные), Rmix(-) (SARS-CoV-2-отрицательные) и Rmix(H) (от здоровых индивидов). Rmix(+) был дополнительно разделён на 5 аликвот, которые подвергались 2-, 5-, 10- или 20-кратному замораживанию при -20°C и последующему оттаиванию. В результате были получены образцы Rmix0 (без замораживания), Rmix2, Rmix5, Rmix10 и Rmix20 соответственно.

Олигонуклеотиды. Олигонуклеотидные праймеры и искусственная РНК-мишень Qt (таблица) были сконструированы с помощью онлайн-утилиты OligoAnalyzer («Integrated DNA Technologies», США) и приобретены в компании «Синтол». В качестве мишеней для амплификации были выбраны нуклеотидные последовательности генов *S*, *N* и *ORF1a* коронавируса SARS-CoV-2.

Реакция ММ. Все образцы для амплификации готовили в ПЦР-боксе UVC/T-M-AR («Biosan», Латвия). Рабочее пространство, дозаторы и пластиковую посуду предварительно облучали ультрафиолетом в течение 20 мин. Амплификацию проводили в ДНК-амплификаторе iQ5 («Bio-Rad Laboratories», США).

Реакционные смеси объёмом 20 мкл содержали по 5 пмоль каждого праймера, 0,25 мМ дНТФ, 1× изотермический буфер, 0,2× интеркалирующий краситель dsGreen, 10 мМ ДТТ, 3 ед. акт. ДНК-полимеразы Bst 2.0 и 1 мкл лизата носоглоточных мазков (или образца Rmix, или воды). Программа амплификации состояла из следующих этапов: 1) 70°C , 30 с; 2) 65°C , 60 с; 3) 60°C , 3 ч. В ряде случаев результаты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 10%-ном ПААГ с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в приборе GelDoc XR («Bio-Rad Laboratories»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Амплификация любой РНК начинается с синтеза её ДНК-копии (кДНК) в ходе реакции обратной транскрипции, которую обычно проводят до амплификации с помощью специального фермента (обратной транскриптазы) при относительно низкой температуре. Однако представляется удобным амплифицировать РНК без проведения отдельного этапа обратной транскрипции, т. е. с использованием одного фермента, обладающего как обратной транскриптазной, так и ДНК-полимеразной

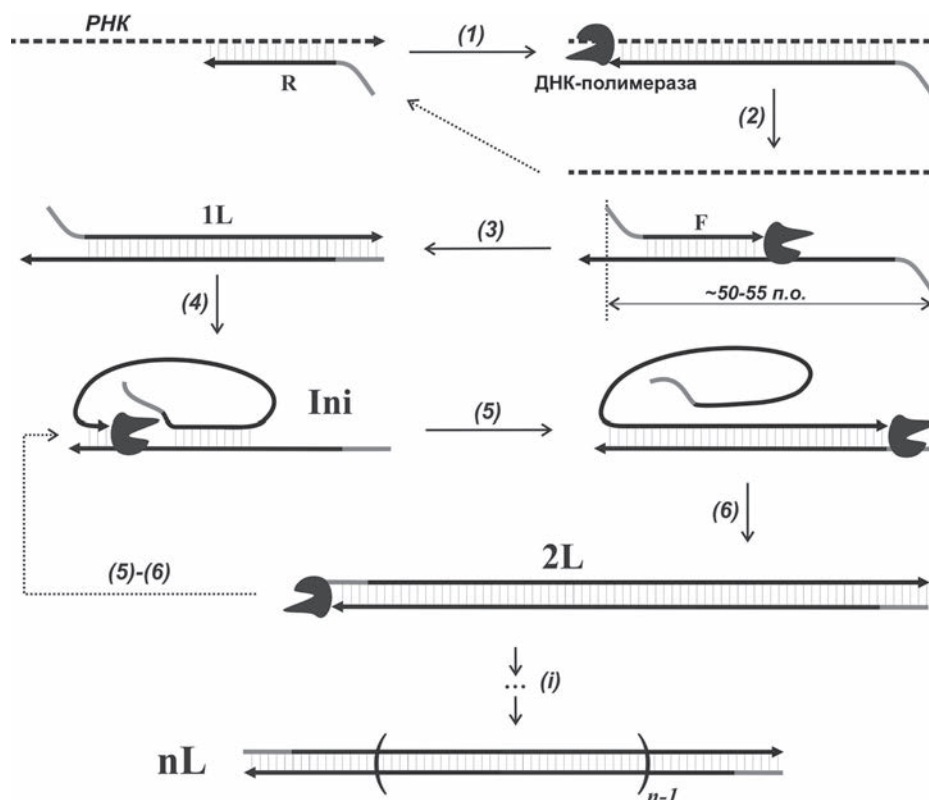


Рис. 1. Схема детекции РНК с помощью реакции мультимеризации. F и R – праймеры; Ini – инициаторный комплекс; L – длина мономерного участка (повтора) двуцепочечной ДНК; (1)-(i) – этапы реакции

активностью. Недавно было показано, что фермент *Немо KlenTaq*, который позиционируется как ДНК-зависимая ДНК-полимераза, обладает обратнo-транскриптазной активностью и обеспечивает успешную амплификацию РНК-мишеней [27]. Для проведения изотермической амплификации интерес может представлять большой фрагмент ДНК-полимеразы *Bst* (*Bst* *exo*-) из-за сильной цепь-вытесняющей активности, умеренной термостабильности и высокой процессивности. Обратнo-транскриптазная активность (проявляется вплоть до 72 °С) заявляется производителем только для ДНК-полимеразы *Bst* 3.0 (<https://neb.com/products/>), но, вероятно, такой активностью могут обладать все коммерчески доступные формы *Bst* *exo*- [26].

Однозначное протекание реакции мультимеризации при определённых условиях позволяет использовать её для обнаружения НК-мишеней [16]. Так, если сконструировать пару специфичных сближенных праймеров, предназначенных для обнаружения какой-либо одноцепочечной НК (например, РНК), можно ожидать успешного протекания амплификации посредством мультимеризации, как показано на рис. 1.

На первой стадии реакции один из праймеров (обозначен как *R* на рис. 1) отжигается на цепи РНК и удлиняется ДНК-полимеразой, обладающей обратнo-транскриптазной активностью, в результате чего образуется двуцепочечный ДНК/РНК-гетеродуплекс. Затем за счёт «дыхания» цепей появляется возможность отжига второго праймера (обозначенного как *F*) на синтезированной цепи кДНК, что приводит к ампликону размером 1L (этапы 2 и 3). Праймеры *F* и *R* имеют 5'-концевые последовательности, не гомологичные РНК-мишени, но комплементарные друг другу. Они способствуют повышению эффективности «дыхания» ДНК, облегчают образование инициаторного комплекса (*Ini*, шаг 4) и обеспечивают дальнейшее накопление мультимерных продуктов (шаги 5–i). Образование дуплексов длиной > 2L переводит реакцию в экспоненциальный режим за счёт увеличения числа мест отжига для обоих праймеров. Следует отметить, что молекулы РНК хорошо подходят для запуска ММ, поскольку являются одноцепочечными и обеспечивают лёгкий отжиг первого (*R*) праймера.

ММ начинается с образования *Ini*, однако вероятность данного события крайне мала. Представляется, что для начала ММ достаточно наличия любой двуцепочечной НК и праймеров для её амплификации. Ранее нами было показано, что накопление детектируемого количества продуктов ММ начинается

через 25–70 мин после начала реакции в зависимости от концентрации матрицы и условий реакции (в данном случае протекает «специфическая» ММ) [19]. В отсутствие матрицы и димеров праймеров (т.е. для качественных праймеров) продолжительность периода накопления таких продуктов составляет более 100 мин; в данном случае можно говорить о протекании «неспецифической» ММ. Также было показано, что наибольшая эффективность ММ наблюдается для ДНК-полимеразы *Bst* 2.0, ДНК-матриц длиной около 50 нт, при пониженной концентрации интеркалирующего красителя SYBR Green [19]. Стоит отметить, что 10 мМ ДТТ заметно увеличивает эффективность ММ (собственные данные, не приведены).

Принимая во внимание механизм протекания ММ [17, 18], повышения эффективности данной реакции можно добиться с помощью праймеров с определённой структурой. Так, было показано, что праймеры с комплементарными 5'-концевыми мотивами ускоряют ММ [16]. В данной работе были сконструированы две модельные пары праймеров: обычная пара *F-S1/R-S1* и праймеры с комплементарными четырехнуклеотидными 5'-концевыми участками (*F-S2/R-S2*). Влияние структуры праймеров на ММ оценивали с помощью искусственной РНК-матрицы *Qt*, содержащей по три дезоксирибонуклеотида на 5'- и 3'-концах соответственно, что обеспечивает более высокую устойчивость этой РНК к расщеплению рибонуклеазами. Праймеры *F-S1/R-S1* обеспечивали более низкую эффективность ММ (пороговое время, *Tt*, составило около 70 мин) по сравнению с *F-S2/R-S2* (*Tt* ~50 мин) (рис. 2, *a*, кривые 1 и 3 соответственно).

Оказалось, что ММ протекает быстрее с искусственной РНК (рис. 2, *a*, кривые 1 и 2, или 3 и 4). Вероятно, это связано с тем, что олигорибонуклеотид *Qt* имеет конечную длину, которая обеспечивает быстрое образование *Ini* и способствует более раннему началу ММ. Следует отметить, что по сравнению с ПЦР кривые мультимеризации демонстрируют меньшую сходимость в повторах (рис. 2, *a*, кривые 1, 2 и 4). Для ММ расхождение значений *Tt* несколько увеличивается с уменьшением числа копий мишени [16]. Это относительное отклонение от нелинейности объясняется особенностью реакции ММ. Как было сказано выше, начало ММ является случайным событием, и по мере уменьшения количества копий мишени требуется больше времени для запуска реакции, в результате чего возникает большая разница между повторами в скорости начала экспоненциальной стадии реакции.

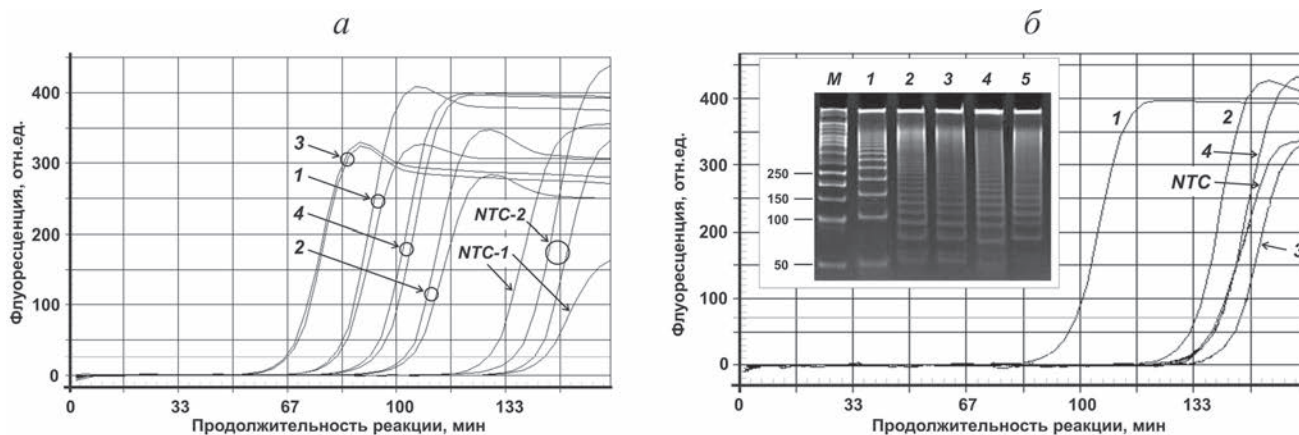


Рис. 2. Протекание реакции мультимеризации при использовании разных типов праймеров и РНК. *а* – Влияние структуры праймеров и типа РНК-мишени на скорость мультимеризации: 1 – пара праймеров F-S1/R-S1 и искусственная (Qt) РНК; 2 – F-S1/R-S1 и Rmix(+); 3 – пара праймеров F-S2/R-S2 и Qt; 4 – F-S2/R-S2 и Rmix(+); NTC-1 – отрицательный контроль для F-S1/R-S1; NTC-2 – отрицательный контроль для F-S2/R-S2. *б* – Кривые амплификации (данные для праймеров F-S2/R-S2; приведены только по одному из двух повторов): 1 – образец Rmix(+); 2 – Rmix(?); 3 – Rmix(-); 4 – Rmix(H); NTC – отрицательный контроль. Вставка – электрофоретический анализ образцов 1–4 (M – маркер длин фрагментов ДНК, дорожка 5 – образец NTC)

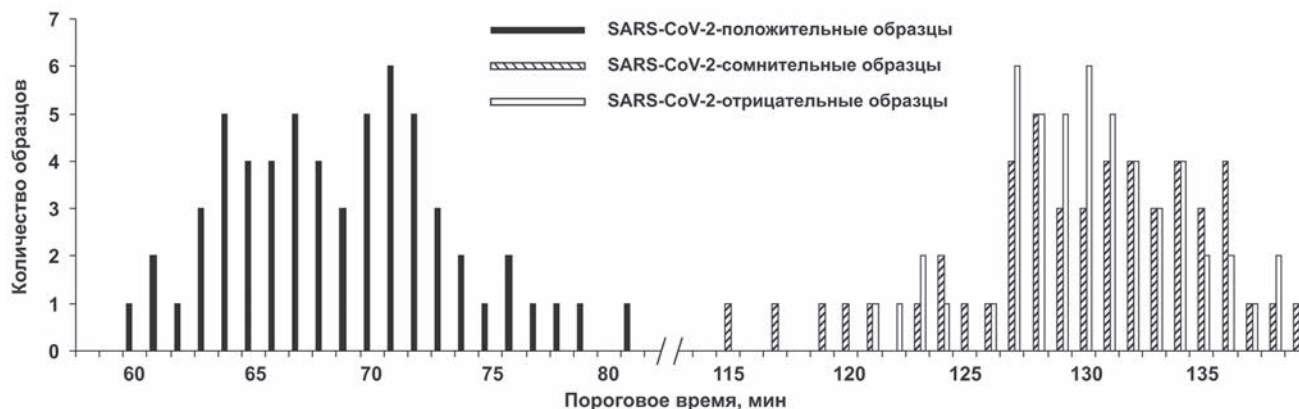


Рис. 3. Распределение значений Tt для SARS-CoV-2-положительных (N = 60), SARS-CoV-2-сомнительных (N = 50) и SARS-CoV-2-отрицательных образцов (N = 50) (приведены данные для пары праймеров F-S2/R-S2)

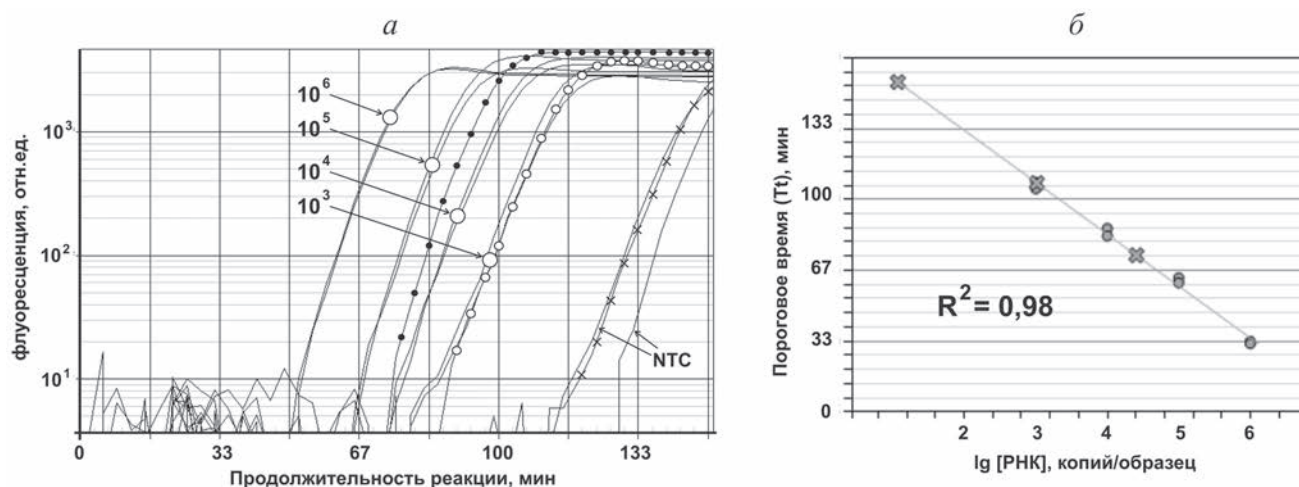


Рис. 4. Чувствительность обнаружения вирусной РНК с помощью ММ (приведены данные для пары праймеров F-S2/R-S2). *а* – Пример количественного анализа РНК коронавируса SARS-CoV-2 (пара праймеров F1/R1, логарифмическая шкала): кривые амплификации для Rmix(+), Rmix(?) и Rmix(-) образцов и калибровочные образцы (сплошные линии), содержащие 10³–10⁶ копий мишени Qt. *б* – Калибровочный график (калибровочные образцы содержали 10³, 10⁴, 10⁵ и 10⁶ копий/мкл)

Таким образом, на основании ранее опубликованных и полученных в этой работе данных можно рекомендовать следующие способы повышения эффективности «специфической» ММ: 1) использование двух праймеров с комплементарными друг другу 5'-концами, 2) обеспечение образования праймерами первичного ампликона размером ~50–55 п.о., 3) использование ДНК-полимеразы Bst 2.0 и её буфера, добавление в реакционную смесь ДТТ (до 10 мМ) и уменьшенного количества интеркалирующего красителя, проведение реакции при ~60 °С.

Применимость ММ для обнаружения специфических РНК изучали на генетическом материале коронавируса SARS-CoV-2. Использовались установленные по результатам ПЦР-тестирования SARS-CoV-2-положительные, SARS-CoV-2-сомнительные, SARS-CoV-2-отрицательные образцы и образцы, полученные от здоровых индивидов. Для исключения влияния первичной структуры мишеней на эффективность ММ были сконструированы три пары праймеров для амплификации трёх разных генов коронавируса SARS-CoV-2. Все специфические пары праймеров содержали комплементарные 5'-мотивы. Эксперименты не показали влияния мишени на протекание ММ, поэтому далее приводятся результаты только для пары праймеров F-S2/R-S2.

При использовании препаратов группы Rmix было обнаружено, что амплификация происходит для всех образцов, как для SARS-CoV-2-положительных (Rmix(+)), так и для контролей (Rmix(?), Rmix(-) и Rmix(H)). Однако для Rmix(+) значения Tt находились в пределах 60–90 мин от начала реакции, в то время как для остальных превышали 110–120 мин (рис. 2, б). Для Rmix(+) электрофоретический анализ показал образование характерных мультимерных продуктов – ДНК с размерами, кратными ожидаемому (~55 п.н.). В остальных образцах также образовались мультимерные продукты, но их размер не соответствовал размеру первичного ампликона, что указывает на протекание неспецифической ММ (рис. 2, б).

Анализ данных, полученных при амплификации индивидуальных образцов (всего N = 160), показывает возможность дифференциации специфической и неспецифической ММ. Значения Tt для SARS-CoV-2-положительных образцов находились в пределах 60–80 мин; в то же время для образцов из остальных групп значения Tt превышали 115 мин, что свидетельствует об отсутствии в них мишени (рис. 3).

Полученные значения Tt хорошо коррелируют со значениями порогового цикла Ct, найденными для этих же образцов после ПЦР-

тестирования (данные не представлены). Диапазоны значений Tt для SARS-CoV-2-положительных образцов и образцов, не содержащих РНК-мишень, не перекрывались, что позволяет различать эти типы образцов и с высокой достоверностью выявлять патогенную РНК. Таким образом, значение Tt ≈ 110 мин можно считать порогом аналитической значимости (для использованных условий реакции).

Для оценки возможности количественного определения РНК коронавируса с помощью мультимеризации использовали Qt. Калибровочные образцы, содержавшие 10³–10⁶ копий Qt, получали последовательными 10-кратными разведениями стокового раствора. Следует отметить, что количество копий РНК-мишени в клинических образцах было неизвестно. Однако ранее сообщалось, что экстракты носоглоточных мазков COVID-19-положительных пациентов содержат в среднем около 10⁴–10⁵ копий мишени на 1 мкл раствора в зависимости от типа биоматериала, вирусной нагрузки, способа выделения РНК и метода её обнаружения [28–31]. Эксперименты позволили количественно определить содержание РНК коронавируса в образцах от SARS-CoV-2-положительных пациентов. Для большинства образцов число копий мишени находилось в диапазоне 10⁴–10⁵ (рис. 4, а).

В целом, полученные результаты хорошо коррелируют с данными ОТ-ПЦР, проводимой без специфических флуорогенных зондов [3, 4, 32–34], и обеспечивают чувствительность определения на уровне пикомолярных концентраций. Однако для образцов с очень низкой вирусной нагрузкой обнаружение мишени с помощью ММ можно считать полуколичественным из-за недостаточно высокой сходимости значений Tt в повторях (рис. 4, б).

Предлагаемый подход обладает рядом преимуществ благодаря использованию сближенных праймеров, позволяющих амплифицировать короткие НК, такие как разрушенная ДНК [35] или микроРНК [16], и обеспечивающих высокие уровни специфичности, чувствительности анализа и достоверности результата. Для молекул РНК деградация является более актуальной проблемой по сравнению с ДНК из-за их меньшей стабильности. В этом случае использование сближенных праймеров позволяет анализировать сохранившиеся относительно короткие фрагменты РНК, пригодные для амплификации. Кроме того, если ДНК-полимераза обладает слабой обратной-транскриптазной активностью, предпочтительна амплификация более коротких РНК-последовательностей. Для оценки применимости ММ для анализа разрушенной РНК были приготовлены

препараты РНК коронавируса путём многократного замораживания-оттаивания образца Rmix(+). Эксперименты в целом показали небольшое увеличение значений Tt с ростом количества циклов замораживания-оттаивания, что свидетельствует о снижении количества амплифицируемых РНК-мишеней (рис. 5).

Неожиданным оказалось то, что для образца Rmix2, подвергнутого двухкратному замораживанию, наблюдалось незначительное снижение значения Tt, что, вероятно, связано с увеличением эффективности ММ за счёт образования более коротких РНК-молекул. Увеличение количества циклов замораживания-оттаивания приводило к постепенному увеличению Tt, но даже для образца Rmix20 Tt не превысило 110 мин, что позволило с высокой достоверностью выявить целевую РНК. Таким образом, сближенное расположение праймеров позволяет обнаруживать разрушенную РНК и, соответственно, предъявлять более щадящие требования к транспортировке и хранению РНК-содержащих материалов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показали, что реакция мультимеризации может быть использована для обнаружения вирусной РНК. Эффективность и специфичность ММ может быть повышена за счёт специальной конструкции праймеров, содержащих комплементарные 5'-концевые мотивы, и использования определённых реакционных компонентов, а именно ДНК-полимеразы Bst 2.0, ДТТ и уменьшенного количества интеркалирующего красителя. Амплификация посредством ММ протекает в изотермических условиях и исключает добавление в реакционную смесь обычной обратной транскриптазы; необходим только один фермент с обратнo-транскриптазной, ДНК-полимеразной и цепь-вытесняющей активностями. ММ позволяет с высокой достоверностью отличить РНК-положительные образцы от РНК-отрица-

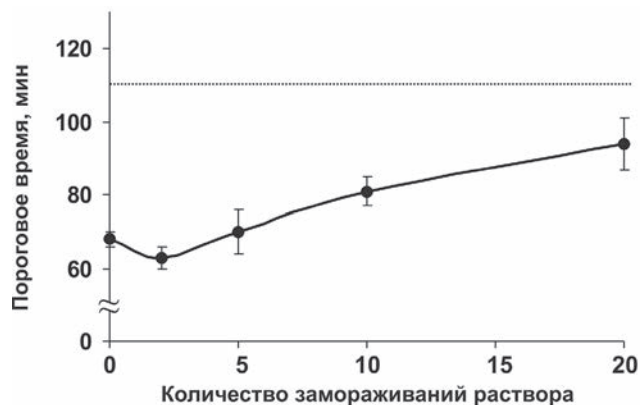


Рис. 5. Влияние многократного замораживания раствора Rmix(+) на скорость мультимеризации. Пунктирная линия при Tt = 110 мин соответствует порогу аналитической значимости (приведены данные для пары праймеров F-S2/R-S2)

тельных. Предлагаемый подход основан на использовании сближенных праймеров, которые обеспечивают эффективную амплификацию и выявление РНК-мишени даже в образцах, подвергшихся многократному замораживанию. Для образцов, содержащих низкое число копий мишени, анализ с помощью мультимеризации можно считать полуколичественным из-за меньшей сходимости значений Tt в повторах.

Вклад авторов. Сахабутдинова А.Р. — проведение экспериментов, написание статьи; Чемерис А.В. — обсуждение результатов, редактирование рукописи; Гарафутдинов Р.Р. — разработка концепции исследования, проведение экспериментов, редактирование рукописи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00235).

Благодарности. Авторы выражают благодарность проф. Мавзютову А.Р. за любезно предоставленные образцы РНК коронавируса SARS-CoV-2.

Соблюдение этических норм. Эта статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных, выполненных кем-либо из авторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Palazzo, A. F., and Lee, E. S. (2015) Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front. Genet.*, **6**, 2, doi: 10.3389/fgene.2015.00002.
- Bukasov, R., Dossym, D., and Filchakova, O. (2021) Detection of RNA viruses from influenza and HIV to Ebola and SARS-CoV-2: a review, *Anal. Methods*, **13**, 34-55, doi: 10.1039/d0ay01886d.
- Vindeirinho, J. M., Pinho, E., Azevedo, N. F., and Almeida, C. (2022) SARS-CoV-2 diagnostics based on nucleic acids amplification: from fundamental concepts to applications and beyond, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **12**, 799678, doi: 10.3389/fcimb.2022.799678.
- Verna, R., Alallon, W., Murakami, M., Hayward, C. P. M., Harrath, A. H., Alwasel, S. H., Sumita,

- N. M., Alatas, O., Fedeli, V., Sharma, P., Fuso, A., Capuano, D. M., Capalbo, M., Angeloni, A., and Bizzarri, M. (2021) Analytical performance of COVID-19 detection methods (RT-PCR): scientific and societal concerns, *Life (Basel)*, **11**, 660, doi: 10.3390/life11070660.
5. Thapa, S., Singh, K. R., Verma, R., Singh, J., and Singh, R. P. (2022) State-of-the-art smart and intelligent nanobiosensors for SARS-CoV-2 diagnosis, *Biosensors (Basel)*, **12**, 637, doi: 10.3390/bios12080637.
6. Yin, B., Wan, X., Sohan, A. S. M. M. F., and Lin, X. (2022) Microfluidics-based POCT for SARS-CoV-2 diagnostics, *Micromachines (Basel)*, **13**, 1238, doi: 10.3390/mi13081238.
7. Zhang, L., Jiang, H., Zhu, Z., Liu, J., and Li, B. (2022) Integrating CRISPR/Cas within isothermal amplification for point-of-care assay of nucleic acid, *Talanta*, **243**, 123388, doi: 10.1016/j.talanta.2022.123388.
8. Islam, M. M., and Koirala, D. (2022) Toward a next-generation diagnostic tool: a review on emerging isothermal nucleic acid amplification techniques for the detection of SARS-CoV-2 and other infectious viruses, *Anal. Chim. Acta*, **1209**, 339338, doi: 10.1016/j.aca.2021.339338.
9. Maiti, B., Anupama, K. P., Rai, P., Karunasagar, I., and Karunasagar, I. (2022) Isothermal amplification-based assays for rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: opportunities and recent developments, *Rev. Med. Virol.*, **32**, e2274, doi: 10.1002/rmv.2274.
10. Chaouch, M. (2021) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): an effective molecular point-of-care technique for the rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2, *Rev. Med. Virol.*, **31**, e2215, doi: 10.1002/rmv.2215.
11. Bi, S., Yue, S., and Zhang, S. (2017) Hybridization chain reaction: a versatile molecular tool for biosensing, bioimaging, and biomedicine, *Chem. Soc. Rev.*, **46**, 4281-4298, doi: 10.1039/c7cs00055c.
12. Yue, S., Li, Y., Qiao, Z., Song, W., and Bi, S. (2021) Rolling circle replication for biosensing, bioimaging, and biomedicine, *Trends Biotechnol.*, **39**, 1160-1172, doi: 10.1016/j.tibtech.2021.02.007.
13. Garafutdinov, R. R., Sakhabutdinova, A. R., Gilvanov, A. R., and Chemeris, A. V. (2021) Rolling circle amplification as a universal method for the analysis of a wide range of biological targets, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **47**, 1172-1189, doi: 10.1134/S1068162021060078.
14. Bodulev, O. L., and Sakharov, I. Y. (2020) Isothermal nucleic acid amplification techniques and their use in bioanalysis, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 147-166, doi: 10.1134/S0006297920020030.
15. Hafner, G. J., Yang, I. C., Wolter, L. C., Stafford, M. R., and Giffard, P. M. (2001) Isothermal amplification and multimerization of DNA by Bst DNA polymerase, *BioTechniques*, **30**, 852-856, doi: 10.2144/01304rr03.
16. Garafutdinov, R. R., Burkhanova, G. F., Maksimov, I. V., and Sakhabutdinova, A. R. (2023) New method for microRNA detection based on multimerization, *Anal. Biochem.*, **664**, 115049, doi: 10.1016/j.ab.2023.115049.
17. Wang, G., Ding, X., Hu, J., Wu, W., Sun, J., and Mu, Y. (2017) Unusual isothermal multimerization and amplification by the strand-displacing DNA polymerases with reverse transcription activities, *Sci. Rep.*, **7**, 13928, doi: 10.1038/s41598-017-13324-0.
18. Sakhabutdinova, A. R., Kamalov, M. I., Salakhieva, D. V., Mavzyutov, A. R., and Garafutdinov, R. R. (2021) Inhibition of nonspecific polymerase activity using poly(aspartic) acid as a model anionic polyelectrolyte, *Anal. Biochem.*, **628**, 114267, doi: 10.1016/j.ab.2021.114267.
19. Garafutdinov, R. R., Gilvanov, A. R., and Sakhabutdinova, A. R. (2020) The influence of reaction conditions on DNA multimerization during isothermal amplification with Bst DNA polymerase, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **190**, 758-771, doi: 10.1007/s12010-019-03127-6.
20. Garafutdinov, R. R., Gilvanov, A. R., Kupova, O. Y., and Sakhabutdinova, A. R. (2020) Effect of metal ions on isothermal amplification with Bst exo⁻ DNA polymerase, *Int. J. Biol. Macromol.*, **161**, 1447-1455, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.028.
21. Garafutdinov, R. R., Sakhabutdinova, A. R., Kupryushkin, M. S., and Pyshnyi, D. V. (2020) Prevention of DNA multimerization during isothermal amplification with Bst exo⁻ DNA polymerase, *Biochimie*, **168**, 259-267, doi: 10.1016/j.biochi.2019.11.013.
22. Sakhabutdinova, A. R., Mirsaeva, L. R., Garafutdinov, R. R., Oscorbin, I. P., and Filipenko, M. L. (2020) Elimination of DNA multimerization arising from isothermal amplification in the presence of Bst exo⁻ DNA polymerase, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **46**, 52-59, doi: 10.1134/s1068162020010082.
23. Qasem, A., Shaw, A. M., Elkamel, E., and Naser, S. A. (2021) Coronavirus disease 2019 (COVID-19) diagnostic tools: a focus on detection technologies and limitations, *Curr. Issues Mol. Biol.*, **43**, 728-748, doi: 10.3390/cimb43020053.
24. Panchali, M. J. L., Oh, H. J., Lee, Y. M., Kim, C. M., Tariq, M., Seo, J. W., Kim, D. Y., Yun, N. R., and Kim, D. M. (2022) Accuracy of real-time polymerase chain reaction in COVID-19 patients, *Microbiol. Spectr.*, **10**, e0059121, doi: 10.1128/spectrum.00591-21.
25. Meena, D. S., Kumar, B., Kachhwaha, A., Kumar, D., Khichar, S., Bohra, G. K., Sharma, A., Kothari, N., Garg, P., Sureka, B., Banerjee, M., Garg, M. K., and Misra, S. (2022) Comparison of clinical characteristics and outcome in RT-PCR positive and false-negative RT-PCR for COVID-19: a retrospective analysis, *Infez. Med.*, **30**, 403-411, doi: 10.53854/liim-3003-8.
26. Jackson, L. N., Chim, N., Shi, C., and Chaput, J. C. (2019) Crystal structures of a natural DNA polymerase

- that functions as an XNA reverse transcriptase, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 6973-6983, doi: 10.1093/nar/gkz513.
27. Sakhabutdinova, A. R., Gazizov, R. R., Chemeris, A. V., and Garafutdinov, R. R. (2022) Reverse transcriptase-free detection of viral RNA using Hemo KlenTaq DNA polymerase, *Anal. Biochem.*, **659**, 114960, doi: 10.1016/j.ab.2022.114960.
 28. Silva, A., Azevedo, M., Sampaio-Maia, B., and Sousa-Pinto, B. (2022) The effect of mouthrinses on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral load: A systematic review, *J. Am. Dent. Assoc.*, **153**, 635-648, doi: 10.1016/j.adaj.2021.12.007.
 29. Hernández-Vásquez, A., Barrenechea-Pulache, A., Comandé, D., and Azañedo, D. (2022) Mouthrinses and SARS-CoV-2 viral load in saliva: a living systematic review, *Evid. Based Dent.*, doi: 10.1038/s41432-022-0253-z.
 30. Tallmadge, R. L., Laverack, M., Cronk, B., Venugopalan, R., Martins, M., Zhang, X., Elvinger, F., Plocharczyk, E., and Diel, D. G. (2022) Viral RNA load and infectivity of SARS-CoV-2 in paired respiratory and oral specimens from symptomatic, asymptomatic, or postsymptomatic individuals, *Microbiol. Spectr.*, **10**, e0226421, doi: 10.1128/spectrum.02264-21.
 31. Fujiya, Y., Sato, Y., Katayama, Y., Nirasawa, S., Moriai, M., Saeki, M., Yakuwa, Y., Kitayama, I., Asanuma, K., Kuronuma, K., and Takahashi, S. (2022) Viral load may impact the diagnostic performance of nasal swabs in nucleic acid amplification test and quantitative antigen test for SARS-CoV-2 detection, *J. Infect. Chemother.*, **28**, 1590-1593, doi: 10.1016/j.jiac.2022.07.023.
 32. Dutta, D., Naiyer, S., Mansuri, S., Soni, N., Singh, V., Bhat, K. H., Singh, N., Arora, G., and Mansuri, M. S. (2022) COVID-19 diagnosis: a comprehensive review of the RT-qPCR method for detection of SARS-CoV-2, *Diagnostics (Basel)*, **12**, 1503, doi: 10.3390/diagnostics12061503.
 33. Ravina, Kumar, A., Manjeet, Twinkle, Subodh, Narang, J., and Mohan, H. (2022) Analytical performances of different diagnostic methods for SARS-CoV-2 virus – a review, *Sens. Int.*, **3**, 100197, doi: 10.1016/j.sintl.2022.100197.
 34. Marando, M., Tamburello, A., Gianella, P., Taylor, R., Bernasconi, E., Fusi-Schmidhauser, T. (2022) Diagnostic sensitivity of RT-PCR assays on nasopharyngeal specimens for detection of SARS-CoV-2 infection: a systematic review and meta-analysis, *Caspian J. Intern. Med.*, **13**, 139-147, doi: 10.22088/cjim.13.0.139.
 35. Garafutdinov, R. R., Galimova, A. A., and Sakhabutdinova, A. R. (2017) Polymerase chain reaction with nearby primers, *Anal. Biochem.*, **518**, 126-133, doi: 10.1016/j.ab.2016.11.017.

DETECTION OF SPECIFIC RNA TARGETS BY MULTIMERIZATION

A. R. Sakhabutdinova, A. V. Chemeris, and R. R. Garafutdinov*

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, 450054 Ufa, Bashkortostan, Russia; e-mail: garafutdinovr@gmail.com

Detection of specific RNA targets via amplification-mediated techniques is widely used in fundamental studies and medicine due to an essential role of RNA in realization of genetic information and diseases development. Here, we report on an approach for detection of RNA targets based on a particular type of isothermal amplification, namely, reaction of nucleic acid multimerization. The proposed technique requires only a single DNA polymerase possessing reverse transcriptase, DNA-dependent DNA polymerase and strand-displacement activities. Reaction conditions that lead to efficient detection of the target RNAs through multimerization mechanism were determined. The approach was approved using genetic material of SARS-CoV-2 coronavirus as a model viral RNA. Reaction of multimerization allowed to differentiate SARS-CoV-2 RNA-positive samples from SARS-CoV-2 negative samples with high reliability. The proposed technique determines detection of RNA even in samples, which undergone multiple freezing.

Keywords: ribonucleic acids (RNA), coronavirus SARS-CoV-2, molecular diagnostics, isothermal amplification, multimerization, nearby primers