



ООО «НКЦ «ЛАБТЕСТ»
Россия, Москва, 123557,
Большой Тишинский пер.38
Тел: +7 (495) 605 3507, 605 3610
Факс: +7 (495) 518 9452
info@lab-test.ru, www.lab-test.ru



Применение системы обнаружения и быстрого подсчёта
флуоресцентных частиц Quanta (ISS, США)
в биохимических и медицинских исследованиях.

Аннотация статьи:

RAPID DETECTION OF SINGLE BACTERIA IN UNPROCESSED BLOOD USING INTEGRATED
COMPREHENSIVE DROPLET DIGITAL DETECTION

Dong-Ku Kang, M. Monsur Ali, Kaixiang Zhang, Susan S. Huang, Ellena Peterson, Michelle A. Digman, Enrico Gratton, Weian Zhao,

Nature Communications, 5, 5427 (2014).

**БЫСТРОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ОДИНОЧНЫХ МОЛЕКУЛ В НЕОБРАБОТАННОЙ КРОВИ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕГРИРОВАННОЙ КОМПЛЕКСНОЙ СИСТЕМЫ ОБНАРУЖЕНИЯ И
ПОДСЧЁТА**

Бактериальные инфекции крови, такие как сепсис, занимают одно из первых мест среди причин смертности во всём мире. Сепсис ежегодно поражает около 18 миллионов человек, смертность даже в развитых странах составляет до 30—40 %. Чрезвычайно высокая смертность при сепсисе объясняется, в частности, трудностями при обнаружении и диагностике сепсиса на ранних стадиях и, соответственно, его лечением.

Основой общей антибактериальной терапии являются антибиотики. При этом, обычно подбор антибиотиков является эмпирическим: препараты подбирают с учётом природы предполагаемого возбудителя и первичного источника заражения. Такое лечение часто приводит к формированию у возбудителя инфекции антибиотикорезистентности (устойчивости к антибиотикам), поэтому так важно уметь правильно диагностировать тип инфекции на ранней стадии. Молекулярно-биологические методы, основанные на выделении и амплификации бактериальной ДНК (такие как ПЦР), могут сократить диагностику заболеванию до нескольких часов, однако они часто не чувствительны к бактериям, присутствующим в крови в небольшом количестве ($\ll 1$ —100 колониеобразующих единиц (КОЕ)), характерным при заболеваниях крови. Кроме того, эти методы характеризуются плохой специфичностью и высоким фоновым сигналом, поскольку целевые клетки бактерий окружены миллиардами нецелевых клеток (в т.ч. клетками человека). Поэтому существующие методы диагностики инфекций крови обычно требуют дорогостоящего оборудования и длительной комплексной обработки образца крови (обработка включает лизис клеток, экстракцию нуклеиновых кислот, центрифугирование, магнитное разделение и др.), что не только приводит к потере редких целевых микроорганизмов (и ошибкам при идентификации инфекции), но и ограничивает их широкое применение.

Группой американских исследователей из Калифорнийского университета в Ирвайне была опубликована работа, в которой было предложено использование **системы подсчёта флуоресцирующих макромолекул компании ISS** для выборочного обнаружения интересующего штамма бактерий из нескольких мл необработанной (но разбавленной) крови. Система подсчёта флуоресцентных макромолекул, с которой работали калифорнийские учёные, в настоящее время легла в основу прибора **Quanta**.

В основе работы используемого анализатора лежит регистрация флуоресценции отдельных клеток в растворе. Для создания флуоресценции использовались биосенсоры на основе ДНКзимов. ДНКзимы (ДНК-энзимы или дезоксирибозимы) представляют собой новый класс каталитически активных олигодезоксирибонуклеотидов, способных сайт-специфично расщеплять РНК. Специфичность может быть использована для создания ДНКзимных сенсоров, селективно взаимодействующих с бактериальными РНК.

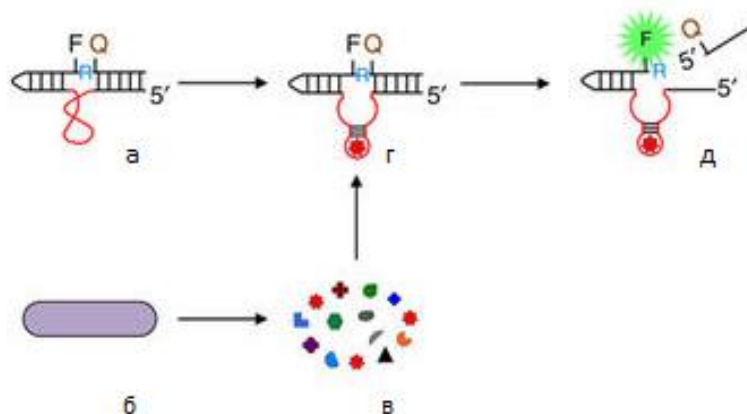


Рис. 1. Механизм возникновения флуоресцентного сигнала: ДНКзим, лигированный содержащим флуоресцентную метку и гаситель комплексом ДНК-РНК (а), взаимодействует с полученным путём лизиса из бактерии *Escherichia coli* (б) клеточным лизатом (в) с образованием сложного комплекса (г), сопровождающимся конформационным изменением ДНКзима, его активацией и расщеплением рибонуклеотида (д).

В данной научно-исследовательской работе были использованы сложные ДНК-машины, состоявшие из неактивного ДНКзима, лигированного субстратом ДНК-РНК. Сайт расщепления рибонуклеотида фланкирован флуорофором и гасителем. Пока ДНКзим не активизирован рибонуклеотид сохраняет свою целостность, сигнал флуоресценции слабый из-за близости флуорофора и гасителя. Активизация ДНКзима происходит после изменения конформации, вызванного связыванием ДНКзима с бактериальным субстратом. При расщеплении рибонуклеотида ДНКзимом флуорофор и гаситель удаляются друг от друга, что приводит к увеличению сигнала флуоресценции. При этом, лигированные клетки дают больший сигнал флуоресценции, поэтому образцы клеток бактерий предварительно обрабатывают лизоцимом. В своей работе исследователи использовали ДНКзимы, чувствительные к штаммам *Escherichia coli*, для анализа смесей, содержащих *Escherichia coli K12*, *Escherichia coli Top10*, *Escherichia coli RP347*, *Escherichia freundii*, *Citrobacter freundii*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* и некоторые другие штаммы, а также клетки лимфобласта человека CCRF-CEM и эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC).

Система подсчёта частиц, позволяет проводить измерения множества образцов за короткий промежуток времени. При этом, система позволяет регистрировать одиночные флуоресцирующие бактерии среди миллионов не флуоресцирующих. В качестве источника возбуждения используется лазер низкой мощности (несколько мВт). Лазерный луч проходит через дихроичное зеркало и попадает на образец. Испускаемая флуоресценция собирается тем же объективом и передаётся с помощью дихроичного зеркала на детектор (фотоэлектронный умножитель). Лазерные источники работают на различных длинах волн, в диапазоне 375-635 нм, в сочетании с дихроичным фильтром, лазерные и модули и фильтры подбираются исходя из свойств флуорофора. Вращающийся держатель образца создаёт центробежную силу, заставляющую частицы концентрироваться у стенок флакона, что упрощает их регистрацию. Лазерное излучение отсекает в толще жидкости конусообразный объём, т.н. объём возбуждения. Частица, попадая в объём возбуждения, флуоресцирует. Число пиков флуоресценции соответствует числу частиц, находящихся

в объёме возбуждения. Программное обеспечение производит вычисление общего количества частиц в растворе.

По мнению калифорнийских исследователей, данная система подсчёта частиц одновременно удовлетворяет многочисленным важным биоаналитическим параметрам, таким как чувствительность, селективность, время анализа, пропускная способность и надёжность, что является давней неудовлетворенной задачей в биодетекции. Было показано, что система обнаруживает целевые клетки, не реагируя на другие штаммы, а также на клетки человека. Прибор показал возможность детектирования одиночных клеток бактерий в объёме жидкости 2 мл. Исследователи уверены, что использование нескольких флуоресцентных зондов в сочетании с несколькими лазерными источниками и детекторами обеспечит мультиплексный параллельный анализ нескольких патогенов в исследуемых образцах. В перспективе **система подсчёта флуоресцентных частиц**, интегрированная с другими методами измерения (ферментативный анализ, ПЦР и др.), станет платформой для быстрого обнаружения и анализа почти любых маркеров в биологических образцах: клеток (бактерий, циркулирующих опухолевых клеток и стволовых клеток), внеклеточных везикул (например, экзосом), вирусов (в т.ч. ВИЧ) и молекулярных маркеров (нуклеиновых кислот и белков).

Подготовил Алексей Шнитко
ООО «НКЦ «ЛАБТЕСТ»
тел.: +7 495 605 35 07
факс: +7 495 605 39 44
a.shnitko@lab-test.ru
www.lab-test.ru