

УДК 577.113.5, 577.151.4

ДНК-МИКРОЧИПЫ НА ПОРИСТЫХ МЕМБРАННЫХ НОСИТЕЛЯХ С КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

М.М. Уляшова, Ю.Ю. Рябова, М.Ю. Рубцова, А.М. Егоров

(кафедра химической энзимологии; e-mail: mmulyashova@gmail.com)

Разработана технология ДНК-микрочипов на пористых мембранных носителях с колориметрической детекцией на основе пероксидазы хрена. Проведено сравнение способов иммобилизации олигонуклеотидов на мембранах разной химической природы, оптимизированы условия колориметрической детекции биотина в составе ДНК-дуплексов на поверхности микрочипов. Возможность использования разработанного метода показана на примере определения типа генов β -лактамаз расширенного спектра.

Ключевые слова: ДНК-микрочипы, гибридизационный анализ, иммобилизация олигонуклеотидов, пероксидаза хрена, β -лактамазы расширенного спектра.

В последнее время одним из интенсивно развивающихся направлений ДНК-диагностики становится использование ДНК-микрочипов для анализа нуклеотидных последовательностей. Основным преимуществом этих методов является возможность одновременного анализа образца по нескольким параметрам при минимальном расходе анализируемого материала и реагентов. Сейчас ДНК-микрочипы становятся эффективным аналитическим инструментом для фундаментальных и прикладных молекулярно-биологических исследований, таких, как идентификация генов, определение уровня их экспрессии, исследование генетического полиморфизма ДНК [1–2].

ДНК-микрочип представляет собой небольшую по площади поверхность носителя с иммобилизованными в определенном порядке короткими олигонуклеотидными зондами или фрагментами молекул ДНК. Исследуемая ДНК, в которую предварительно вводится метка, гибридизуется с ДНК-зондами на поверхности микрочипа. В случае комплементарности первичных последовательностей образуются ДНК-дуплексы, которые можно обнаружить по появлению аналитических сигналов. Большая часть разработанных к настоящему времени ДНК-микрочипов основана на использовании в качестве подложек стеклянных пластин с химически модифицированной поверхностью и флуоресцентных красителей в качестве меток [3–4]. Это обеспечивает необходимую чувствительность анализа, кроме того, сканирование и обработка результатов производятся сразу после стадии гибридизации. Однако высокая стоимость подложек данного рода, флуоресцентных меток и особенно оборудования для регистрации

флуоресценции препятствуют использованию технологии ДНК-микрочипов в клинической практике.

Цель данной работы – создание технологии ДНК-микрочипов на пористых мембранных носителях с колориметрической детекцией на основе пероксидазы хрена (ПХ). В задачи исследования входили сравнительное изучение иммобилизации олигонуклеотидов на мембранных носителях разной химической природы, а также оптимизация условий выявления биотина в составе ДНК-дуплексов на поверхности микрочипа. Возможность использования разработанного метода изучалась на примере определения типа генов β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС). Продукция данных ферментов – один из наиболее распространенных и клинически значимых механизмов резистентности патогенных микроорганизмов к современным β -лактамамным антибиотикам [5]. В настоящий момент насчитывается около 400 различных БЛРС, большая часть которых относится к ферментам TEM-, SHV- и CTX-M-групп. Определение наличия и типа продуцируемой β -лактамазы является одним из этапов скрининга инфекционных штаммов микроорганизмов на антибиотикорезистентность.

Экспериментальная часть

Набор праймеров для полимеразной цепной реакции (ПЦР) и amino-модифицированные олигонуклеотидные зонды были синтезированы фирмой “Синтол” (Россия). Образцы ДНК, выделенные из клинических штаммов энтеробактерий-продуцентов БЛРС, предоставлены сотрудниками НИИ антимикробной химиотерапии СГМА (г. Смоленск, Россия).

В работе использовали следующие мембраны: «*Biodyne A*» (наилон), «*Biodyne C*» (отрицательно активированный найлон), «*BioTrace NT*» (нитроцеллюлоза) («*Pall Corporation*», США). Модификация мембран осуществлялась с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида («*Sigma*», США) по методике, описанной в [6]. Для синтеза конъюгатов биотина с пероксидазой хрена ($R_z = 3,0$; «*Яринвест*», Россия) мы использовали следующие производные биотина: N-гидроксисукцинимидный эфир биотина, N-гидроксисукцинимидный эфир биотинамидогексановой кислоты, N-гидроксисукцинимидный эфир биотинамидогексаноил-6-аминогексановой кислоты («*Sigma*», США); синтез проводили согласно методике [7].

Для иммобилизации олигонуклеотиды растворяли в солевом буфере (160 мМ Na_2SO_4 , 130 мМ Na_2HPO_4) до нужной концентрации и наносили роботом «*XactIITM Arrayer*» («*LabNEXT Inc.*», США) с иглами диаметром 300 мкм на мембраны, после чего мембраны инкубировали в термостате при 60°C в течение 30 мин.

Мультиплексную ПЦР проводили в объеме 25 мкл, содержащем 10 мМ Трис-HCl (pH 8,3), 2,5 мМ ацетата магния, 50 мМ KCl, 2,5 ед. Taq ДНК полимеразы, 100 мкМ dATP, dGTP, dCTP, 60 мкМ dTTP, 40 мкМ dUTP-11-биотин («*Fermentas*», Германия), по 0,8 мкМ прямого и обратного праймера для каждой группы β -лактамаз и 1 мкл раствора матрицы ДНК. Амплификацию проводили в амплификаторе «*Mastercycler gradient*» («*Eppendorf*», Германия) по следующей схеме: начальная денатурация при 94°C (2 мин), 25 циклов амплификации (20 с – денатурация при 94°C, 30 с – отжиг праймеров при 65°C, 1 мин – элонгация при 72°C), завершающий этап элонгации при 72°C (6 мин). Горизонтальный электрофорез продуктов ПЦР проводили в 1%-м агарозном геле с использованием ТАЕ-буфера (40 мМ Трис, 20 мМ уксусной кислоты, 1 мМ ЭДТА; pH 8,5) и добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 1,6 мкг/мл. Визуализацию проводили на УФ-транслюминаторе при длине волны 260 нм.

Перед проведением гибридизации микрочипы отмывали ФСБТ* (0,01 М K_2HPO_4 ; 0,15 М NaCl; 0,05% Твин 20; pH 7,0) 2 раза по 10 мин при комнатной температуре и блокировали в растворе 1%-го бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 1%-го казеина («*Sigma*», США) в ФСБТ** (0,01 М K_2HPO_4 ; 0,15 М NaCl; pH 7,0) при 37°C в течение 30 мин. Необходи-

мые количества меченой ДНК (концентрацию оценивали спектрофотометрически при $\lambda = 260$ нм на спектрофотометре «*Shimadzu*», Япония) растворяли в гибридизационном буфере (2'SSPE: 0,3 М NaCl; 0,02 М NaH_2PO_4 ; 0,002 М ЭДТА; pH 7,4), содержащем 1,6 пмоль/мл контрольного олигонуклеотида, меченного биотином (положительный контроль гибридизации). Микрочип помещали в гибридизационную смесь (300 мкл на 1 микрочип) и инкубировали в течение 3 ч при 45°C в термомиксере «*Thermomixer comfort*» («*Eppendorf*», Германия). После гибридизации проводили отмывку мембран ФСБТ – 2 раза по 15 мин при комнатной температуре.

Для детекции результатов гибридизации микрочипы инкубировали в растворе стрептавидина (0,2 мкг/мл) в ФСБТ, содержащем 1% БСА, в течение 30 мин при 37°C. Затем мы проводили отмывку (ФСБТ – 10 мин при 37°C) и инкубацию с раствором конъюгата биотин-ПХ в ФСБТ (разведение 1/8000) в течение 30 мин при 37°C. Затем мембраны снова отмывали (ФСБТ – 10 мин, ФСБ – 10 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании) и помещали в субстратный раствор на основе 3,3,5,5-тетраметилбензидина (ТМБ) и H_2O_2 («*HBO Иммунотех*», Россия) с добавлением декстран сульфата натрия ($M_r = 8000$, «*Pharmacia*», Швеция) до конечной концентрации 0,5% (по массе) на 10 мин при комнатной температуре. После этого мембраны промывали дистиллированной водой, сушили на воздухе. Мембранные микрочипы сканировали на сканере «*Perfection V750 Pro*» («*Epson*», Германия) при разрешении 4800 dpi. Полученные изображения (в формате TIF) обрабатывали количественно с использованием программы «*Scan Array Express*» («*PerkinElmer*», version 3.0, Германия).

Результаты и их обсуждение

Выбор типа мембранного носителя для иммобилизации олигонуклеотидов

Одна из основных задач при разработке мембранного ДНК-микрочипа – подбор типа мембранного носителя и способа иммобилизации олигонуклеотидов на его поверхности. Мы провели сравнение различных методов иммобилизации, включая нековалентную иммобилизацию методом физической адсорбции на нитроцеллюлозе и разных типах найлона, а также ковалентную иммобилизацию на тех же типах мембран, модифицированных 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-

*Фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,05% Tween 20; **фосфатно-солевой буферный раствор.

карбодиимидом (EDC). Для этого были изготовлены микрочипы, содержащие олигонуклеотид, меченный биотином



в разных концентрациях (от 0,02 до 10,0 пмоль/мкл). Для выявления молекул биотина микрочипы инкубировали сначала в растворе стрептавидина, а затем – в растворе конъюгата биотин-ПХ. После отмывки мы проводили колориметрическое определение ферментативной активности ПХ по накоплению окрашенного продукта на носителе. Интенсивность окраски образующегося пятна была пропорциональна концентрации фермента и соответственно количеству иммобилизованных молекул меченого олигонуклеотида.

На рис. 1 приведены кривые адсорбции меченого биотином олигонуклеотида на различных мембранах. Максимальное количество иммобилизованного олигонуклеотида наблюдалось при использовании методов ковалентной иммобилизации на нитроцеллюлозе и отрицательно активированном нейлоне, модифицированных EDC. Это объясняется высокой плотностью находящихся на их поверхности электрофильных групп. Они легко активируются EDC с образованием промежуточного соединения, которое, будучи нестабильным, может активно реагировать с нуклеофильными группами олигонуклеотидов. Физическая адсорбция на тех же типах носителей происходит менее эффективно. При использовании отрицательно активированного нейлона мы практически не наблюдали иммобилизацию олигонуклеотида, что можно объяснить сильным электростатическим отталкиванием его сахарофосфатного остова от отрицательно заряженной поверхности носителя. Модификация нативного нейлона не приводила к увеличению концентрации олигонуклеотида на носителе, что, по-видимому, связано с низ-

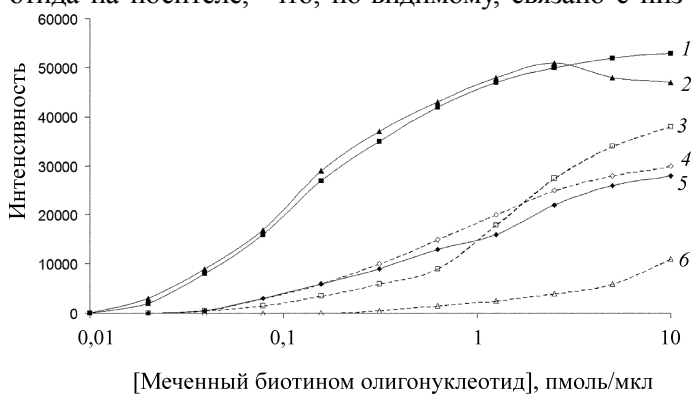


Рис. 1. Кривые адсорбции меченого биотином олигонуклеотида на различных мембранных носителях: 1 – нитроцеллюлоза + EDC, 2 – отрицательно активированный нейлон + EDC, 3 – нитроцеллюлоза, 4 – нейлон, 5 – нейлон + EDC, 6 – отрицательно активированный нейлон

кой плотностью карбоксильных групп на его поверхности.

Помимо эффективности иммобилизации олигонуклеотидов на поверхности мембран, обеспечивающей величину аналитического сигнала, в технологии ДНК-микрочипов важен диаметр точек (ячеек), получаемых при нанесении. Наименьший диаметр точек (350 мкм) наблюдался на нитроцеллюлозе, что связано с меньшей пористостью и смачиваемостью материала данного типа. Поэтому именно нитроцеллюлоза была выбрана в качестве носителя для производства мембранных ДНК-микрочипов с колориметрической детекцией.

Оптимизация колориметрической детекции биотина на поверхности нитроцеллюлозы

Одним из наиболее важных параметров, определяющих чувствительность гибридационного анализа на ДНК-микрочипе, является чувствительность детектирующей системы. После проведения гибридизации на поверхности мембранного чипа образуются двухцепочечные комплексы ДНК, меченные биотином. Поэтому на следующей стадии необходимо было разработать высокочувствительную систему детекции биотина на поверхности нитроцеллюлозы. Оптимизацию системы детекции мы также проводили на микрочипах, содержащих на своей поверхности меченный биотином олигонуклеотид, наносимый из раствора с концентрацией 2,5 пкмоль/мкл. Необходимо отметить, что использование конъюгата стрептавидин-ПХ для выявления меченой биотином ДНК на поверхности нитроцеллюлозы оказалось невозможным из-за высокого фонового окрашивания. Поэтому для выявления биотина мы использовали двухстадийную схему выявления биотина сначала стрептавидином, а затем биотинилированной ПХ.

Первым шагом оптимизации детектирующей системы был подбор рабочей концентрации стрептавидина. Для этого микрочипы после гибридизации инкубировали в растворах, содержащих разные концентрации белка (от 0,025 до 1 мкг/мл). Критерием выбора рабочей концентрации стрептавидина служила интенсивность и четкость окраски зоны детекции. В качестве оптимальной для проведения анализа на микрочипах была выбрана концентрация стрептавидина 0,2 мкг/мл, так как при больших концентрациях наблюдался высокий уровень неспецифического связывания белка, приводящий к очень сильному фоновому окрашиванию, а при более низких концентрациях уменьшалась интенсивность окраски зоны детекции.

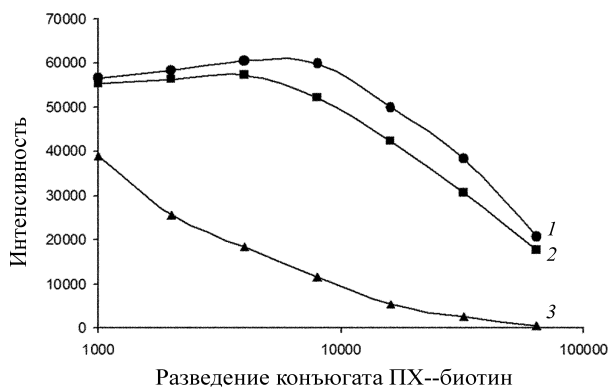


Рис. 2. Кривые титрования комплекса стрептавидина с иммобилизованным на поверхности микрочипа олигонуклеотидом конъюгатами биотина с ПХ: 1 – ПХ-С₁₂-Бт, 2 – ПХ-С₆-Бт, 3 – ПХ-Бт

При оптимизации стадии взаимодействия стрептавидина с биотинилированной ПХ были синтезированы три типа конъюгатов ПХ с биотином: ПХ, непосредственно связанная с биотином (ПХ-Бт), ПХ, связанная с биотином через ножку из аминокaproновой кислоты (ПХ-С₆-Бт), и ПХ, связанная с биотином через ножку из двух молекул аминокaproновой кислоты (ПХ-С₁₂-Бт). Концентрация ПХ в полученных растворах конъюгатов составляла $1,5 \times 10^{-5}$ М. Сравнение полученных конъюгатов проводили при титровании ими комплекса стрептавидина с иммобилизованным олигонуклеотидом на поверхности микрочипов.

Кривые титрования представлены на рис. 2. Максимальная интенсивность окраски ячеек микрочипа для всех разведений наблюдалась в случае использования конъюгата, в котором ПХ биотинилирована через ножку из двух молекул аминокaproновой кислоты (ПХ-С₁₂-Бт). В этом случае, по-видимому, увеличивается подвижность фермента на фазе и активный центр более доступен для взаимодействия с молекулами субстрата. Поэтому для дальнейших исследований мы использовали именно этот конъюгат в разведении 1/8000.

Гибридизационный анализ на мембранных микрочипах с колориметрической детекцией для определения генов БЛРС

ДНК-микрочип для идентификации основных типов БЛРС представляет собой нитроцеллюлозную подложку размером $3,5 \times 9,0$ мм, на которой в определенном порядке иммобилизованы олигонуклеотиды с уникальными нуклеотидными последовательностями, специфичными к различным участкам генов БЛРС типов TEM, SHV и CTX-M (таблица). Выбор последовательности олигонуклеотида для идентификации определенной группы БЛРС мы проводили на основе выравнивания кодирующих последовательностей генов всех ферментов этой группы, при этом определялись консервативные участки, не имеющие гомологии с генами β -лактамаз других групп. На основе их последовательностей синтезировались олигонуклеотидные

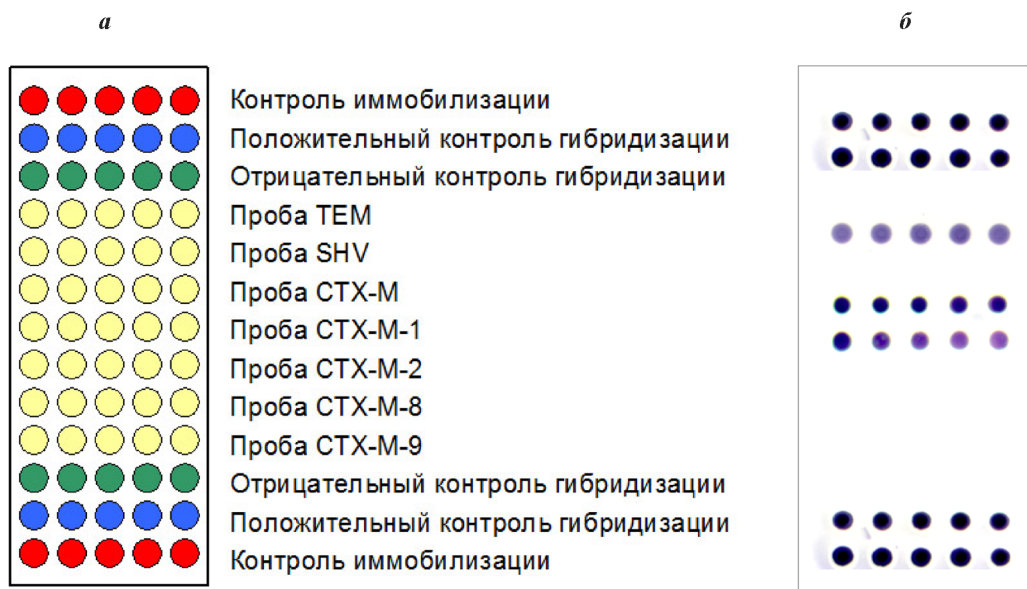


Рис. 3. Расположение олигонуклеотидных зондов на ДНК-микрочипе для идентификации типа генов, кодирующих БЛРС (а); результаты тестирования образца, содержащего гены β -лактамаз групп TEM и CTX-M-1, на мембранном ДНК-микрочипе с колориметрической детекцией (б)

Последовательности олигонуклеотидных проб для идентификации генов БЛРС и праймеров для мультиплексной ПЦР

Название		Нуклеотидная последовательность, 5'→3'		Длина, нуклеотиды	$T_{пл}$, °C
Контроль иммобилизации		NH ₂ -TTTTTTTTTTTTCTAGACAGCCACTCATA-биотин		18	52
Положительный контроль гибридизации		NH ₂ -TTTTTTTTTTTTGATTGGACGAGTCAGGAGC		19	60
Отрицательный контроль гибридизации		NH ₂ -TTTTTTTTTTTTCTAGACAGCCACTCATA		18	52
Олигонуклеотидные пробы	группа TEM	NH ₂ -TTTTTTTTTCCAGAAACGCTGGTGAAAGTA		21	62
	группа SHV	NH ₂ -TTTTTTTTTTTGTTGATCCGCTCCGTGCTG		19	60
	группа CTX-M	NH ₂ -TTTTTTTTTTTATATCGCGGTGATCTGGCC		19	58
	подгруппа CTX-M-1	NH ₂ -TTTTTTTTTTTACCCAGCCTCAACCTAA		18	56
	подгруппа CTX-M-2	NH ₂ -TTTTTTTTTTTACCCAACCGGAGCAGA		18	56
	подгруппа CTX-M-8	NH ₂ -TTTTTTTTTTTACCCAGCCAGAGCAGAA		18	58
	подгруппа CTX-M-9	NH ₂ -TTTTTTTTTTTACCCAGCCGCAACAGA		17	56
Праймеры	группа TEM	прямой	ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTC	24	70
		обратный	TAAATCAGTGAGGCACCTATCTC	23	70
	группа SHV	прямой	GCCGGGTATTCTTATTTGTCGC	23	72
		обратный	GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG	20	69
	подгруппа CTX-M-1	прямой	ATGGTAAAAAATCACTGCGCCAG	24	72
		обратный	CCGTCGGTGACGATTTTAGCCG	22	73
	подгруппа CTX-M-2	прямой	ATGATGACTCAGAGCATTCGCC	22	70
		обратный	CCGTGGGTACGATTTTCGCCG	22	73
	подгруппа CTX-M-8	прямой	ATGATGAGACATCGCGTTAAGC	22	66
		обратный	CCGTCGGTGACGATTTTCGCG	21	70
	подгруппа CTX-M-9	прямой	GGTGACAAAGAGAGTGCAACGG	22	72
		обратный	CCCTTCGGCGATGATTCTCGC	21	72

пробы, каждая из которых иммобилизовалась на поверхности микрочипа в пяти повторях (рис. 3, а). Каждый микрочип содержал три типа контрольных олигонуклеотидов: 1) контроль иммобилизации (олигонуклеотид, меченный биотином); 2) положительный контроль гибридизации (олигонуклеотид, нуклеотидная последовательность которого комплементарна меченому биотином олигонуклеотиду, добавляемому к гибридизационной смеси); 3) отрицательный контроль гибридизации (олигонуклеотид со случайной последовательностью оснований). Определение наличия генов БЛРС в образцах методом гибридизационного анализа на ДНК-микрочипе состояло из следующих этапов: 1) амплификация гена β-лактамазы из клинического материала в процессе мультиплексной ПЦР с набором праймеров (таблица), для введения молекул биотина в амплифицируемый ген часть дезокситимидинтрифосфата (dTTP) в реакционной смеси заменяли на меченный биотином дезоксиурацилтрифосфат

(dUTP-11-биотин); 2) гибридизация меченной биотином ДНК со специфическими олигонуклеотидами на поверхности микрочипа; 3) детекция результатов гибридизации с помощью системы стрептавидин-биотинилированная ПХ с последующей колориметрической детекцией фермента. Изображение микрочипа после гибридизации с генами β-лактамаз групп TEM и CTX-M-1 приведено на рис. 3, б.

Последовательности олигонуклеотидных проб для идентификации генов БЛРС и праймеров для мультиплексной ПЦР

В ходе работы нами были подобраны оптимальные условия проведения гибридизации. В качестве гибридизационного буфера был выбран 2xSSPE с добавлением 0,2%-го додецилсульфата натрия для улучшения смачиваемости мембраны. При выборе температуры основным критерием являлось то, что она не должна превышать температуру плавления ($T_{пл}$) олигонуклео-

тидных зондов, однако резко понижать ее нельзя, так как при этом теряется специфичность анализа. Из исследуемого диапазона температур (42–52°C) в качестве оптимальной была выбрана температура 45°C. Оптимизация времени гибридизации была проведена в диапазоне от 0,5 до 4,0 ч. Было показано, что реакция гибридизации меченой биотином ДНК с имеющимся набором олигонуклеотидов на мембранном микрочипе достигает равновесного режима, при котором наблюдается максимальная чувствительность анализа, в течение 3 ч после начала (при интенсивном перемешивании). Однако следует отметить, что при переходе в кинетический режим (продолжительность гибридизации 1,5 ч) происходит лишь незначительное снижение величины аналитического сигнала с сохранением специфичности гибридизации, что позволяет достоверно идентифицировать наличие генов (TEM, SHV и CTX–M) β -лактамаз в гибридизационной смеси. Это актуально при необходимости проведения экспресс-анализа.

На мембранном ДНК-микрочипе с колориметрической детекцией, содержащем иммобилизованные олигонуклеотиды, для идентификации основных групп БЛРС была проведена оценка воспроизводимости результатов и чувствительности метода. Для этого в серии экспериментов изучали зависимость интенсивности окраски определенных ячеек микрочипа от концентрации соответствующего гена БЛРС в гибридизационной смеси. Предел обнаружения изменялся в диапазоне от 0,20 до 0,92 нг/мкл меченой ДНК, а коэффициент вариации находился в интервале от 4 до 11% в зависимости от типа определяемого гена БЛРС, что свидетельствует о хорошей чувствительности и воспроизводимости разработанного метода. Кроме того, проведение анализа не требует дорогостоящих реагентов и оборудования, детекция результатов осуществляется на оптическом сканере или визуально, что делает метод ДНК-микрочипов более доступным для клинической медицины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bilitewski U. // *Methods Mol. Biol.* 2009. **509**. P. 1.
2. Bier F.F., Nickisch-Rosenegk M., Ehrentreich-Forster E. et al. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2008. **109**. P. 433.
3. Heise C., Bier F.F. // *Top Curr. Chem.* 2006. **261**. P. 1.
4. Chee M., Yang R., Hubbell E. et al. // *Science*. 2001. **274**. P. 610.
5. Сидоренко С.В., Тишков В.И. // *Усп. биол. хим.* 2004. **44**. С. 263.
6. Zhang Y., Coyne M.Y., Will S.G. et al. // *Nucleic Acids Res.* 1991. **19**. P. 3929.
7. Bayer E.A., Wilchek M. // *Methods Enzymol.* 1990. **184**. P. 138.

Поступила в редакцию 20.01.10

DNA-MICROARRAYS ON POROUS MEMBRANE SUPPORTS WITH COLORIMETRIC DETECTION

M.M. Ulyashova, Yu.Yu. Ryabova, M.Yu. Rubtsova, A.M. Egorov

(Division of Chemical Enzymology)

The technology of DNA-microarrays on porous membrane supports with colorimetric detection based on horseradish peroxidase was developed. The comparison of the methods of oligonucleotide immobilization on chemically different membranes was carried out, the conditions of colorimetric detection of biotin in DNA duplexes on microarray surface were optimized. The method developed was applied for determining type of genes encoding extended-spectrum β -lactamases.

Key words: DNA-microarrays, hybridization analysis, oligonucleotide immobilization, horseradish peroxidase, extended-spectrum beta-lactamases.

Сведения об авторах: Уляшова Мария Морисовна – аспирантка кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (mmulyashova@gmail.com); Рябова Юлия Юрьевна – студентка химического факультета МГУ; Рубцова Майя Юрьевна – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (mrubtsova@gmail.com); Егоров Алексей Михайлович – глав. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, академик РАН, профессор, докт. биол. наук (alex.m.egorov@gmail.com).