

УДК 543.9

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ДНК ВИЧ НА ОСНОВЕ АЛЛОСТЕРИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ ПЕРОКСИДАЗА-ПОДОБНОГО ДНКЗИМА

О.Л. Бодулев, А.В. Грибас, М.М. Вдовенко, И.Ю. Сахаров*

(кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ
имени М.В. Ломоносова; *email: sakharovivan@gmail.com)

Разработан гомогенный хемилюминесцентный метод обнаружения ДНК ВИЧ, основанный на аллостерической активации пероксидаза-подобного ДНКзима (ППДНКзим). Зонды, используемые в анализе, содержат фрагмент ППДНКзима и дополнительную олигонуклеотидную последовательность, комплементарную к ДНК ВИЧ. Взаимодействие фрагмента ППДНКзима и дополнительной олигонуклеотидной последовательности приводит к перестройке структуры G-квадруплекса ППДНКзима и уменьшает пероксидаза-подобную активность зонда. В присутствии ДНК ВИЧ такое взаимодействие разрушается вследствие формирования стабильного дуплекса между дополнительным фрагментом зонда и ДНК-аналитом. В результате происходит некоторая реорганизация структуры G-квадруплекса зонда, сопровождающаяся повышением каталитической активности ППДНКзима. Механизм ДНК-зависимой активации зондов, содержащих ППДНКзим, был подтвержден методом КД-спектроскопии, а также моделированием зондов и их комплексов с ДНК-аналитом. Калибровочные кривые для определения ДНК ВИЧ позволили оценить аналитические параметры анализа. Показано, что предел обнаружения ДНК ВИЧ и ее линейный диапазон составляют 0,3 и 0,3–15 нМ соответственно. Чувствительность анализа очень высока ($190\,000\text{ нМ}^{-1}$). Значения коэффициента вариации (CV), измеренные в рабочем диапазоне, не превышают 4%, что свидетельствует о высокой точности предлагаемого метода анализа.

Ключевые слова: аллостерическая активация, пероксидаза-подобный ДНКзим, хемилюминесценция, ДНК, ВИЧ.

Обнаружение ДНК играет важную роль в прогнозировании рака, выявлении патогенных микроорганизмов, а также в судебно-медицинской экспертизе [1, 2]. Чувствительные и специфические методы для обнаружения нуклеиновых кислот находят свое применение в аналитической практике [3–7]. Определение ДНК-аналита обычно проводят путем амплификации следовых количеств анализируемого вещества до детектируемых уровней. Наиболее часто для амплификации нуклеиновой кислоты используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР) [8, 9]. В последние годы в качестве альтернативы ПЦР разработаны некоторые методы изотермической амплификации, такие как амплификация по типу катящегося кольца (RCA) [10], петлевая амплификация (LAMP) [11, 12], амплификация вытеснения цепей (SDA) [13, 14], амплификация с использованием геликаза-зависимой реакции (HDA) [15, 16] и реакция цепной гибридизации (HCR) [17, 18]. Амплификация нуклеиновых кислот при постоянной температуре перспективна для развития дешевых методов молекулярной диагностики.

В последние годы были разработаны чувствительные гибридизационные методы обнаружения ДНК [19–24]. Некоторые из них, такие как ДНК-чипы с разными способами детекции аналитических сигналов, являются гетерогенными [25]. Однако хорошо известно, что гибридизация зондов, иммобилизованных на твердой поверхности, протекает медленно, следовательно, гетерогенные методы занимают много времени.

Обнаружение ДНК в гомогенном растворе происходит быстрее и проще [26, 27]. Флуоресценция имеет широкое применение в гомогенных анализах ДНК. Некоторые флуоресцентные красители и наночастицы используются в качестве меток ДНК-зондов [28]. Чувствительные анализы ДНК разработаны с использованием молекулярных маячков, которые становятся флуоресцирующими при их связывании с комплементарной последовательностью одноцепочечной ДНК [29, 30]. Недостатки этого подхода заключаются в том, что для измерения флуоресценции требуется дорогостоящая аппаратура, и все флуоресцентные анализы показывают высокий фоновый сигнал.

Альтернативная стратегия основана на использовании хемилюминесцентных методов, которые по своей чувствительности не уступают флуоресцентным методам, но имеют низкий фон и более дешевое оборудование. Многие из таких анализов предполагают использование пероксидаза-подобных ДНКзимов (ППДНКзим) [21, 31–33]. Хорошо известно, что ППДНКзим (нековалентный комплекс гемина и его аптамера) проявляет каталитическую активность в отношении субстратов пероксидазы хрена, включая и люминол. Таким образом, и фрагмент зонда, ответственный за ДНК-чувствительность, и катализатор-метка (ППДНКзим) являются олигонуклеотидами, что позволяет синтезировать олигонуклеотидные зонды для обнаружения ДНК.

Недавно мы описали эффект аллостерической активации ППДНКзима в присутствии комплементарной ДНК [34]. В настоящей работе описан новый хемилюминесцентный метод обнаружения ДНК ВИЧ на основе этого явления.

Материалы и методы

Ниже перечислены олигонуклеотиды ДНК, использованные в настоящей работе. Все олигонуклеотиды – продукты фирмы «Синтол» (Россия).

Зонды, содержащие ППДНКзим

Зонд 1. 5'-ctg-gga-ggg-agg-gag-gga-tgc-atc-cag-gtc-atg-tta-3'

Зонд 2. 5'-ctg-gga-ggg-agg-gag-gga-tgc-atc-cag-gtc-atg-ttc-cca-g-3'

Зонд 3. 5'-ctg-gga-ggg-agg-gag-gga-tgc-atc-cag-gtc-atg-ttc-cca-ccc-3'

ДНК-ВИЧ-олигонуклеотид

5'-aga-aga-tat-ttg-gaa-taa-cat-gac-gat-gca-3'

ДНК-аналит с единичной заменой

АЕЗ – 5'-aga-aga-tat-ttg-gaa-taa-cat-gac-ttg-gat-gca-3'

ДНК-аналит с двумя заменами

АДЗ₁ – 5'-aga-aga-tat-ttg-gaa-taa-cat-aac-ttg-gat-gca-3',

АДЗ₂ – 5'-aga-aga-tat-ttg-gaa-taa-cat-tac-ctg-tat-gca-3'.

Некомплементарный олигонуклеотид

НО, 5'-ttg-gct-ttc-agt-tat-atg-gat-gat-gtg-tct-gta-3'.

Определение концентрации ДНК-аналита проводили следующим образом. Смесь, содержащую зонд (13 нМ) (аптамер EAD2, связанный с олигонуклеотидом, комплементарным ДНК ВИЧ), гемин (250 нМ) и ДНК ВИЧ (0–50 нМ) в 25 мМ Трис-буфере (pH 8,0) с 20 мМ KCl, 200 мМ NaCl и 0,05% тритона X-100 предварительно нагревали при 88 °С в течение 15 мин, а затем охлаждали до комнатной температуры в течение 60 мин.

Хемилюминесцентное определение активности зондов, содержащих ППДНКзим, проводили в лунках черных полистироловых планшетов для иммуноферментного анализа («Costar», США). Для этого в полученные образцы добавляли водные растворы люминола и H₂O₂; конечные концентрации люминола и пероксида водорода в лунках составляли соответственно 5 мкМ и 1,3 мМ [35]. Интенсивность света измеряли через 1 мин после начала окисления люминола при комнатной температуре на люминометре («Spectra Max L», США). Интенсивность выражалась в условных единицах люминесценции (y.e.).

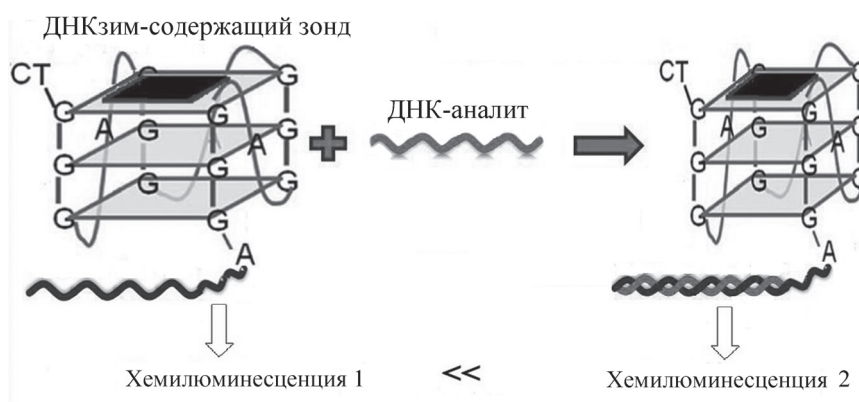


Рис. 1. Схема анализа обнаружения ДНК ВИЧ на основе аллостерической активации пероксидаза-подобного ДНКзима

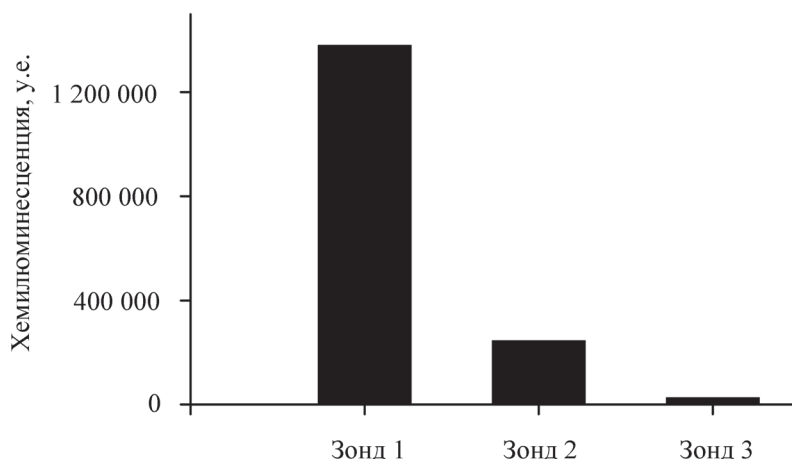


Рис. 2. Влияние структуры зондов на их каталитическую активность

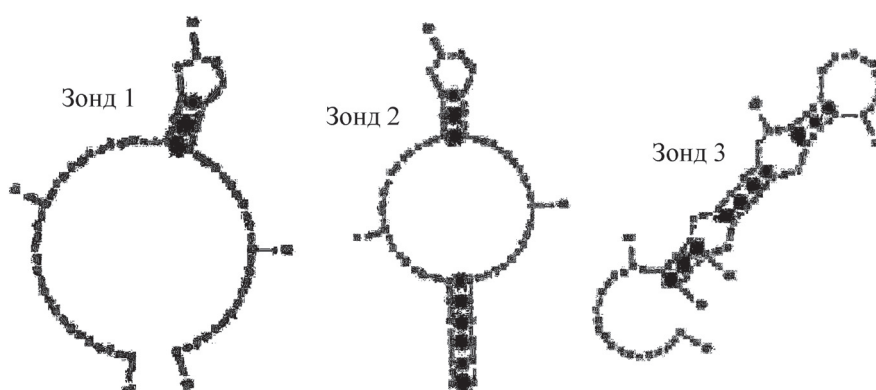


Рис. 3. Схематическая иллюстрация химических структур, образовавшихся в результате внутримолекулярного взаимодействия в зондах 1, 2 и 3

Исследования кругового дихроизма проводили на спектрополяриметре «JASCO J-815» при 25 °С в кювете длиной светового пути 1 см. Образцы получали путем смешивания 2 мкМ одного из олигонуклеотидных зондов с 40 мМ гемина (или в его отсутствие) в 25 мМ Трис-буфера (200 мМ NaCl, 20 мМ KCl и 0,05% тритона X-100, pH 8,0). Затем образцы нагревали до 88 °С и охлаждали до комнатной температуры в течение 60 мин. Комплексы зондов и ДНК-аналита получали аналогичным образом, только с добавлением 2,0 мкМ ДНК ВИЧ. Измерения проводили в интервале от 230 до 290 нм при скорости сканирования 50 нм/мин.

Результаты и их обсуждение

В настоящей работе в качестве анализита использован фрагмент ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Метод анализа основан на ДНК-зависимой аллостерической активации ППДНКзима, описанной нами ранее [34]. При разработке метода анализа ДНК

ВИЧ мы использовали зонд, содержащий нековалентный комплекс гемина и его аптамера EAD2 [35, 36] (ППДНКзим), связанный с ДНК-олигонуклеотидной последовательностью, которая комплементарна ДНК-мишени. В результате гибридизации зонда и анализита с образованием ДНК-дуплекса происходит активация ППДНКзима (рис. 1).

В работе использованы три олигонуклеотидных зонда (зонды 1–3). Хемилюминесцентную активность ППДНКзима этих зондов измеряли в отношении люминола и пероксида водорода в качестве субстратов. Следует отметить, что усилители пероксидаза-зависимой хемилюминесценции [37–39] не применялись, так как в случае ППДНКзима они были неэффективны.

Как показано на рис. 2, каталитическая активность зонда 1, измеренная в отсутствие ДНК ВИЧ, была выше, чем у зондов 2 и 3. Мы предположили, что это явление связано с тем, что в зондах существует внутримолекулярное взаимодействие между последовательностью ППДНКзима и свя-

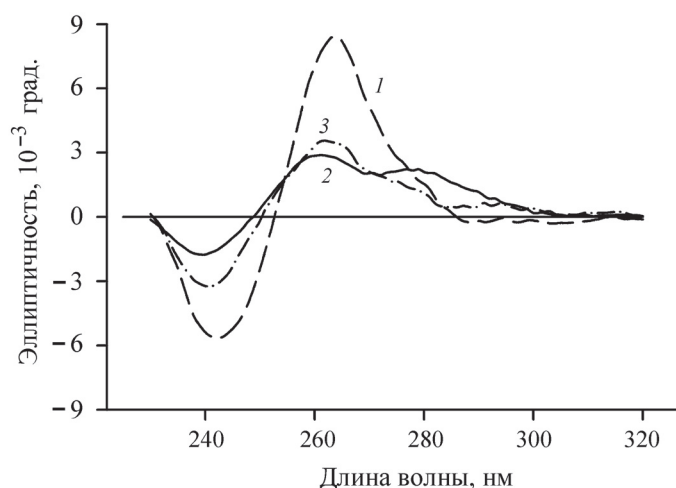


Рис. 4. Спектры кругового дихроизма: зонд 1 (1), зонд 2 (2) и зонд 3 (3). Образцы получали путем смешивания одного из олигонуклеотидных зондов (2 мкМ) с геминном (40 мМ) в 25 мМ Трис-буфере (200 мМ NaCl, 20 мМ KCl и 0,05% тритона X-100, pH 8,0), которые затем нагревали до 88 °С и охлаждали до комнатной температуры в течение 60 мин

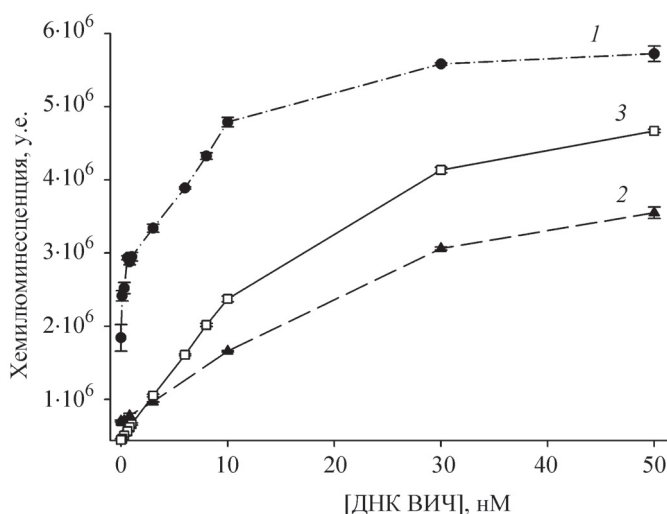


Рис. 5. Калибровочные кривые для обнаружения ДНК ВИЧ, основанные на аллостерической активации ППДНКзима (1 – зонд 1, 2 – зонд 2, 3 – зонд 3)

занным с ней фрагментом, которое инициирует некоторые пространственные изменения в структуре G-квадруплекса ППДНКзима и, следовательно, уменьшает его каталитическую активность. Моделирование структур зондов (рис. 3) позволило продемонстрировать возможность таких взаимодействий и вычислить значения энергии Гиббса для внутримолекулярного взаимодействия в зондах 1, 2 и 3 (2,4; 4,3 и 5,2 ккал/моль соответственно). Это объясняет, почему зонд 1, имеющий самое низкое значение ΔG , показал самую высокую каталитическую активность.

Различие в пространственной организации ППДНКзима зондов 1–3 изучалось с помощью

спектроскопии кругового дихроизма (КД). Как показано на рис. 4, КД-спектр зонда 1 имеет положительный сигнал при ~264 нм и отрицательный сигнал при 242 нм. Это означает, что в зонде 1 некоторая часть олигонуклеотидной цепи формирует G-квадруплекс, поскольку такой спектр характерен для параллельных G-квадруплексных структур [36, 40]. Напротив, в КД-спектрах зондов 2 и 3 такие пики очень слабо выражены (рис. 4). Другими словами, эти зонды не формируют G-квадруплексов или эта структура сильно деформирована. Полученные результаты объясняют низкую каталитическую активность зондов 2 и 3.

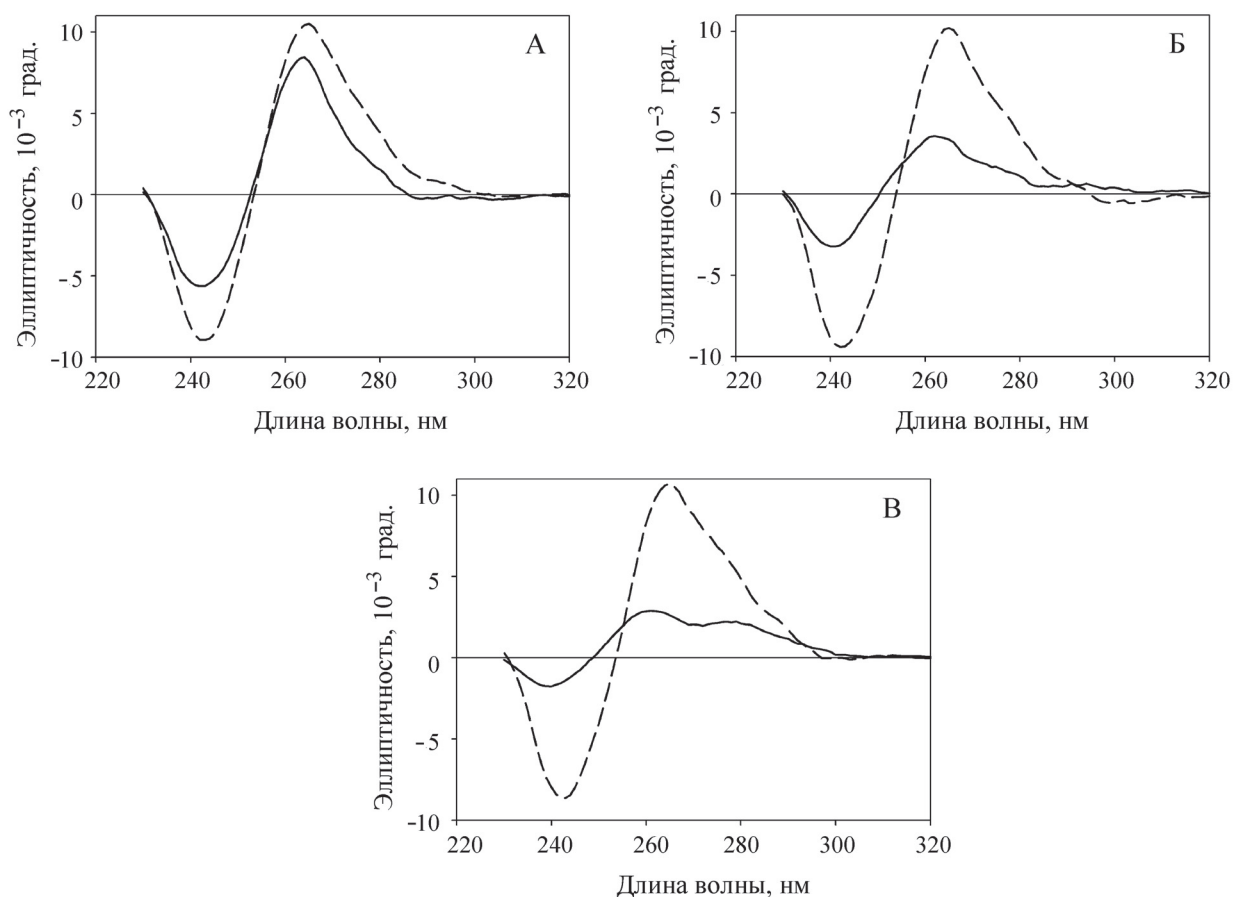


Рис. 6. Спектры кругового дихроизма зонда 1 (А), зонда 2 (Б) и зонда 3 (В) (сплошная линия) и комплексов каждого зонда с ДНК-аналитом (длинное тире). Образцы получали путем смешивания одного из олигонуклеотидных зондов (2 мкМ), гемина (40 мМ) и ДНК ВИЧ (0 или 2 мкМ) в 25 мМ Трис-буфере (200 мМ NaCl, 20 мМ KCl и 0,05% тритона X-100, pH 8,0), которые нагревали до 88 °С, а затем охлаждали до комнатной температуры в течение 60 мин

Однако в присутствии ДНК ВИЧ каталитическая активность всех трех зондов увеличивается (рис. 5). В то же время КД-исследования показали, что в присутствии аналита интенсивность пиков, характерных для *G*-квадруплекса, также увеличивается (рис. 6). Поэтому мы предполагаем, что ДНК ВИЧ, реагирующая с дополнительным фрагментом зондов, разрушает структуру шпильки в зондах, что приводит к восстановлению структуры *G*-квадруплекса ППДНКзима и одновременно увеличивает его активность.

Полученные зависимости хемилюминесцентного сигнала от концентрации ДНК ВИЧ позволили вычислить аналитические характеристики метода определения аналита. В случае зондов 1, 2 и 3 пределы обнаружения составляли 1; 0,5 и 0,3 нМ соответственно. Калибровочные кривые линейны в диапазоне концентрации ДНК ВИЧ 1–10; 0,5–30 и 0,3–15 нМ для зондов 1, 2 и 3 соответственно. Очевидно, что зонд 3 позволяет обнаруживать аналит в более низком диапазоне

концентраций, чем остальные. Чувствительность разработанного метода анализа с использованием зондов 1, 2 и 3 составляла соответственно 200 100, 95 000 и 190 000 у.е./нМ мишени. Коэффициент вариации (*CV*) для определения концентраций ДНК ВИЧ с применением всех зондов в линейной диапозоне был ниже 4%. Полученные результаты показали, что все зонды позволяют определять ДНК ВИЧ с высокой чувствительностью и точностью.

Специфичность анализа с использованием зонда 3 была исследована при сравнении перекрестной реактивности ДНК ВИЧ, ДНК-аналита с единичной заменой (АЕЗ), ДНК-аналитов с двумя заменами (АДЗ₁ и АДЗ₂) и некомплементарного олигонуклеотида (НО). Данные, представленные на рис. 7, показывают, что замена одного основания в последовательности ДНК ВИЧ снижает эффективность его взаимодействия с зондом на 10%. Перекрестная реактивность для АДЗ₁ составляет 24%. В то же время перекрестная реак-

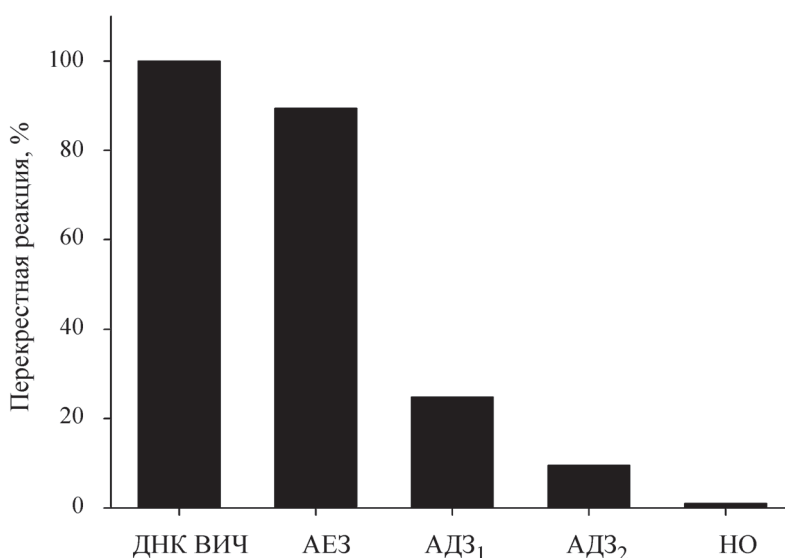


Рис. 7. Специфичность метода анализа ДНК ВИЧ, основанного на аллостерической активации ППДНКзима. Каталитическую активность зондов, содержащих ППДНКзим, измеряли после смешивания 13 нМ зонда 3, 250 нМ гемина и 3 нМ исследованных аналитов (ДНК ВИЧ, АЕЗ, АДЗ₁, АДЗ₂ и НО) в 25 мМ Трис-буфере (200 мМ NaCl, 20 мМ KCl и 0,05% тритона X-100, pH 8,0), нагрели до 88 °С и охлаждали до комнатной температуры в течение 60 мин

ция для АДЗ₂, имеющего, как и АДЗ₁, две замены, но в других местах, составляет 9%. Присутствие НО практически не влияет на хемилюминесцентный сигнал зонда 3 (1%). Полученные результаты указывают на высокую специфичность разработанного анализа ДНК.

Таким образом, в результате наших исследований создан хемилюминесцентный метод обна-

ружения ДНК ВИЧ на основе аллостерической активации ППДНКзима, который может эффективно катализировать окисление люминола H₂O₂. Выполнение анализа не требует ни меченых олигонуклеотидов, ни дорогостоящих инструментов. Метод позволяет селективно измерять ДНК ВИЧ с пределом обнаружения 0,3 нМ и линейным диапазоном 0,3–15 нМ.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-14-01042).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saks M.J., Koehler J.J. // *Science*. 2005. Vol. 309. P. 892.
2. Lord C.J., Ashworth A. // *Nature*. 2012. Vol. 481. P. 287.
3. Meakin G., Jamieson A. // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2013. Vol. 7. P. 434.
4. Hassanein M., Callison J. C., Callaway-Lane C., Aldrich M.C., Grogan E.L., Massion P.P. // *Cancer Prev. Res.* 2012. Vol. 5. P. 992.
5. Nicoloso L., Crepaldi P., Mazza R., Ajmone-Marsan P., Negrini R. // *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* 2013. Vol. 5. P. 9.
6. Sforza S., Corradini R., Tedeschi T., Marchelli R. // *Chem. Soc. Rev.* 2011. Vol. 40. P. 221.
7. Fendler A., Jung K. // *Crit. Rev. Oncog.* 2013. Vol. 18. P. 289.
8. Gerasimova Yu. V., Kolpashchikov D.M. // *Chem. Soc. Rev.* 2014. Vol. 43. P. 6405.
9. Botes M., de Kwaadsteniet M., Cloete T. E. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. Vol. 405. P. 91.
10. Lizardi P. M., Huang X. H., Zhu Z. R., Bray-Ward P., Thomas D. C., Ward D. C. // *Nat. Genet.* 1998. Vol. 19. P. 225.
11. Hsieh K., Patterson A.S., Ferguson B.S., Plaxco K.W., Soh H.T. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012. Vol. 51. P. 4896.
12. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28. P. e63.
13. Connolly A.R., Trau M. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010. Vol. 49. P. 2720.
14. Walker G.T., Little M.C., Nadeau J.G., Shank D.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. Vol. 89. P. 392.
15. Huang J., Wu Y., Chen Y., Zhu Z., Yang X., Yang C.J., Wang K., Tan W. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011. Vol. 50. P. 401.
16. Vincent M., Xu Y., Kong H. // *EMBO Rep.* 2004. Vol. 5. P. 795.
17. Dirks R.M., Pierce N.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004. Vol. 101. P. 15275.
18. Dong J., Cui X., Deng Y., Tang Z. // *Biosens. Bioelectron.* 2012. Vol. 38. P. 258.
19. Zhang Y., Pilapong C., Guo Y., Ling Z., Cespedes O., Quirke P., Zhou D. // *Anal. Chem.* 2013. Vol. 85. P. 9238.

20. Cao Z., Li Z., Zhao Y., Song Y., Lu J. // *Anal. Chim. Acta.* 2006. Vol. 557. P. 152.
21. Wang F., Lu C.-H., Willner I. // *Chem. Rev.* 2014. Vol. 114. P. 2881.
22. Li T., Dong S., Wang E. // *Chem. Commun.* 2007. Vol. 41. P. 4209.
23. Zheng J., Yang R., Shi M., Wu C., Fang X., Li Y., Li J., Tan W. // *Chem. Soc. Rev.* 2015. Vol. 44. P. 3036.
24. Wu C., Wan S., Hou W., Zhang L., Xu J., Cui C., Wang Y., Hu J., Tan W. // *Chem. Commun.* 2015. Vol. 51. P. 3723.
25. Fabris L., Dante M., Braun G., Lee S. J., Reich N. O., Moskovits M., Nguyen T. Q., Bazan G. C. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. Vol. 129. P. 6086.
26. Zuo X., Xia F., Xiao Y., Plaxco K. W. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. Vol. 132. P. 1816.
27. Guo Y., Xu P., Hu H., Zhou X., Hu J. // *Talanta.* 2013. Vol. 114. P. 138.
28. Du Y., Dong S. // *Anal. Chem.* 2017. Vol. 89. P. 189.
29. Tyagi S., Kramer F.R. // *Nat. Biotechnol.* 1996. Vol. 14. P. 303.
30. Marras S.A.E. // *Methods Mol. Biol.* 2006. Vol. 335. P. 3.
31. Zong C., Wu J., Xu J., Hu H., Yan F. // *Biosen. Bioelectron.* 2013. Vol. 4. P. 372.
32. Ren J., Wang T., Wang E., Wang J. // *Analyst.* 2015. Vol. 140. P. 2556.
33. Kosman J., Juskowiak B. // *Anal. Chim. Acta.* 2011. Vol. 707. P. 7.
34. Gribas A.V., Zhao S., Sakharov I.Y. // *RSC Adv.* 2015. Vol. 5. P. 82865.
35. Gribas A.V., Zhao S., Sakharov I.Y. // *Anal. Biochem.* 2014. Vol. 466. P. 19.
36. Nakayama S., Wang J., Sintim H.O. // *Chem.–Eur. J.* 2011. Vol. 17. P. 5691.
37. Vdovenko M.M., Sakharov I.Y. // *Anal. Biochem.* 2013. Vol. 434. P. 12.
38. Chen G., Jin M., Du P., Zhang C., Cui X., Zhang Y., Wang J., Jin F., She Y., Shao H., Wang S., Zheng L.F. // *Food Agric. Immunology.* Vol. 28. N 2. P. 315.
39. Vdovenko M.M., Della Ciana L., Sakharov I.Y. // *Anal. Biochem.* 2009. Vol. 392. P. 54.
40. Tóthová P., Krafciková P., Viglaský V. // *Biochemistry.* 2014. Vol. 53. P. 7013.

Поступила в редакцию 23.11.17

CHEMILUMINESCENT DETECTION OF HIV DNA USING ALLOSTERIC ACTIVATION OF PEROXIDASE-MIMICKING DNAZYME

O.L. Bodulev, A.V. Gribas, M.M. Vdovenko, I.Yu. Sakharov*

(Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University; *e-mail: sakharovivan@gmail.com)

Homogeneous chemiluminescent method for HIV DNA detection based on allosteric activation of peroxidase-mimicking DNAzyme (PMDNAzyme) was developed. The probes used in the assay contained PMDNAzyme fragment and the oligonucleotide complementary to HIV DNA which interacted each other resulting in changes in G-quadruplex structure of the PMDNAzyme and decreasing peroxidase-like activity of the probe. In the presence of HIV DNA such interaction was destroyed because the complementary fragment of the probe formed stable duplex with DNA target. As a result of this, some reorganizations in G-quadruplex structure of the probe are observed, which are accompanied by enhancement of catalytic activity of the PMDNAzyme. The mechanism of the DNA-dependent activation of PMDNAzyme containing probes was confirmed by CD spectroscopy and modeling of the probes and their complexes with DNA target. The calibration curves for HIV DNA determination allowed estimating the analytical parameters of the assay. The detection limit value and the linear range were shown to be 0.3 nM and 0.3–15 nM, respectively. The sensitivity of the assay was very high (190 000 nM⁻¹). The values of coefficient of variation (CV) measured within the working range varied less than 4%, which says about a high precision of the proposed assay.

Key words: Allosteric activation; Peroxidase-mimicking DNAzyme; Chemiluminescence; HIV; DNA.

Сведения об авторах: Бодулев Олег Леонидович – студент кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (bodulevoleg@mail.ru); Грибас Анастасия Владимировна – науч. сотр. кафедры энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (anastasiagribas@gmail.com); Вдовенко Марина Михайловна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (marinavdovenko@gmail.com); Сахаров Иван Юрьевич – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, профессор, докт. хим. наук (sakharovivan@gmail.com).