

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ 2'-О-МЕТИЛ-АНАЛОГОВ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ ИЗМЕНЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ЗОНДОВ И ПОВЫШЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА

© 2018 г. А.Ю. Иконникова, С.А. Суржиков, В.О. Пожитнова,
А.С. Заседателев, Т.В. Наседкина

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

E-mail: nased@biochip.ru

Поступила в редакцию 24.09.18 г.

Специфичность взаимодействия олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных на биологическом микрочипе (биочипе), и ДНК-мишени зависит от ряда факторов, в числе которых главными являются длина зонда и последовательность нуклеотидов (прежде всего GC-состав). Известно, что 2'-О-метил-олигорибонуклеотиды характеризуются способностью образовывать более стабильные дуплексы с комплементарной последовательностью ДНК в сравнении с 2'-дезоксирибонуклеотидными зондами. Показана возможность применения 2'-О-метил-олигорибонуклеотидов для повышения специфичности взаимодействия ДНК-мишени с зондами, иммобилизованными на биочипе. Для получения флуоресцентно меченой ДНК-мишени применяли одноэтапную ассиметричную полимеразную цепную реакцию с одновременным включением флуоресцентной метки в получаемый продукт. В результате гибридизации с иммобилизованными зондами показано, что при идентичных последовательностях ДНК и одинаковых концентрациях зондов интенсивность флуоресцентных сигналов от ячеек с 2'-О-метил-олигорибонуклеотидными зондами в среднем в два раза выше, чем от ячеек биочипа, содержащих 2'-дезоксирибонуклеотидные зонды. При этом увеличение интенсивности флуоресценции в большей степени выражено в случае совершенных дуплексов, чем в случае несовершенных.

Ключевые слова: 2'-О-метил-олигорибонуклеотиды, 2'-дезоксирибонуклеотиды, биологические микрочипы, гибридизация, совершенный дуплекс, несовершенный дуплекс.

DOI: 10.1134/S0006302918060054

Химически модифицированные олигонуклеотиды привлекают большое внимание исследователей, в первую очередь, как потенциальные терапевтические агенты [1,2]. Среди множества типов олигонуклеотидных аналогов наиболее широко были исследованы метилфосфонаты, 2'-О-фосфонаты, фосфотиоаты, 2'-О-метил- и 2'-О-этил-олигорибонуклеотиды. Интерес к олигонуклеотидам подобного типа связан с такими их свойствами, как устойчивость к действию нуклеаз и способность проникать через клеточные мембраны [3,4]. С точки зрения практического применения важным моментом является простота автоматического синтеза с использованием коммерчески доступных мономеров и очистка методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии [5]. Кроме

того, большое количество исследований с использованием модифицированных аналогов олигонуклеотидов убедительно демонстрирует, что их химические свойства можно использовать для достижения необходимых биологических и физических результатов. В частности, длина олигомеров, последовательность нуклеиновых оснований, их позиция и хиральность могут влиять на активность и термическую стабильность комплексов, образуемых этими соединениями [6–8]. В последнее время большое внимание уделяется модифицированным аналогам нового поколения, таким как пептидные нуклеиновые кислоты (PNA, peptide nucleic acid), имеющие псевдопептидную основу: «замкнутые» нуклеиновые кислоты (LNA, locked nucleic acid), морфолиновые олигонуклеотиды, для которых показана повышенная термостабильность в составе ДНК–ДНК и ДНК–РНК дуплексов [9,10].

Сокращения: ПЦР – полимеразная цепная реакция, ДО – дискриминационное отношение.

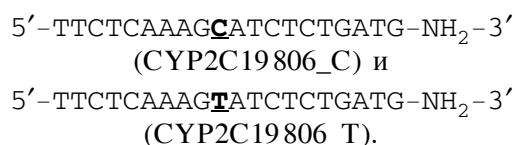
Конструкции на основе модифицированных аналогов олигонуклеотидов используются для решения ряда задач молекулярной биологии, биотехнологии и медицины: изучения функций определенных генов и некодирующих малых РНК, регуляции экспрессии генов путем воздействия на уровне мРНК, микроРНК и геномной ДНК, определения мутаций [11–15].

В нашей работе мы использовали 2'-О-метил-аналоги олигорибонуклеотидов для анализа локуса rs12248560 гена *CYP2C19* (замена –806 С>Т) на биологическом микрочипе. Наличие замены в промоторной области гена приводит к возникновению аллельного варианта (аллель *17), который характеризуется повышенной экспрессией, и таким образом опосредует быстрый метаболизм лекарственных препаратов, в биотрансформации которых участвует фермент *CYP2C19* [16]. К таким препаратам относятся ингибиторы протонной помпы, антидепрессанты (сертралин, циталопрам, эсциталопрам, амитриптилин) антиагреганты (клопидогрел) и ряд других. Для определения аллельных вариантов гена *CYP2C19* методом аллель-специфичной гибридизации на биочипе были использованы олигонуклеотидные зонды с различными термическими характеристиками. Показано, что (2'-О-метил)-зонды, иммобилизованные на биочипе, эффективнее взаимодействуют с ДНК-мишенью по сравнению с аналогичными (2'-дезоксид)-зондами за счет образования термически более устойчивых структур.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотиды для иммобилизации на биочипе были синтезированы на автоматическом синтезаторе 394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems, США) с использованием стандартной фосфоамидитной процедуры и очищены методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. На 3'-конец олигонуклеотидов помещали спейсер со свободной аминогруппой, который вводили при синтезе с помощью 3'-Amino-Modifier C7 CPG 500 (Glen Research, США). Для синтеза 2'-О-метил-олигорибонуклеотидов использовали 2'-О-метил-фосфорамидиты (А, G, С и Т) (Glen Research, США).

Биочипы были изготовлены методом фотоиндуцируемой совместной полимеризации олигонуклеотидов и компонентов полиакриламидного геля, как описано ранее [17]. В ячейках биочипа были иммобилизованы ДНК-зонды:



При проведении гибридизационного анализа использовали ДНК, выделенную из крови человека с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, США) согласно инструкции производителя. Проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в объеме 25 мкл: 1 × ПЦР-буфер, дНТФ (0,2 мМ каждого), 2,5 мМ MgCl₂, 1 е.а. Hot Start Taq ДНК полимеразы (реактивы СибЭнзим, Россия), по 1 пмоль праймеров *CYP2C19 806_F* CATCTCTGGGGCTGTTTTTCCTTAGATAA и *CYP2C19 806_R* TCATTGGATCTCATTTAGATGCCCATCGTGGCGC (подчеркиванием выделена последовательность универсального праймера), 50 пмоль универсального праймера *Sy5-TCATTGGATCTCATTA*, 8 мМ Sy5 (флуоресцентно-меченого аналога 5'-трифосфата 2'-дезоксидуридина) и 1 мкл ДНК (15–55 нг/мкл). ПЦР проводили по следующей программе: 40 циклов × (94°C – 30 с, 65°C – 30 с, 67°C – 30 с, 69°C – 30 с, 72°C – 20 с), далее 40 циклов × (94°C – 30 с, 56°C – 10 с, 72°C – 30 с). Гибридизационную смесь, содержащую 25% формамида, 5 × SSPE, 50% ПЦР-продукта, наносили в камеру биочипа, инкубировали в течение 12 ч при 37°C, затем биочипы промывали и высушивали. Флуоресцентные сигналы регистрировали на портативном цифровом флуоресцентном анализаторе (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия). Возбуждение флуоресценции осуществляли лазером с длиной волны 655 нм, регистрацию – в области 716 ± 22 нм [18]. Анализ изображений проводили с помощью программы ImaGeWare (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия).

Дискриминационные отношения (ДО) рассчитывали по формуле $ДО = \Sigma I_C / \Sigma I_T$, где ΣI_C – сумма значений сигналов ячеек «дикого типа», ΣI_T – сумма значений сигналов ячеек минорного аллеля. Полученные значения располагали на графике в логарифмической шкале [19].

Секвенирование по Сэнгеру проводили на автоматическом секвенаторе 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для анализа локуса rs12248560 гена *CYP2C19* (замена –806 С>Т) были синтезированы пары олигонуклеотидных зондов, соответствующих последовательности дикого типа (TTCTCAAAG–CATCTCTGATG) и последовательности минорного аллеля (TTCTCAAAGTATCTCTGATG) (вариабельный нуклеотид подчеркнут). Каждая пара

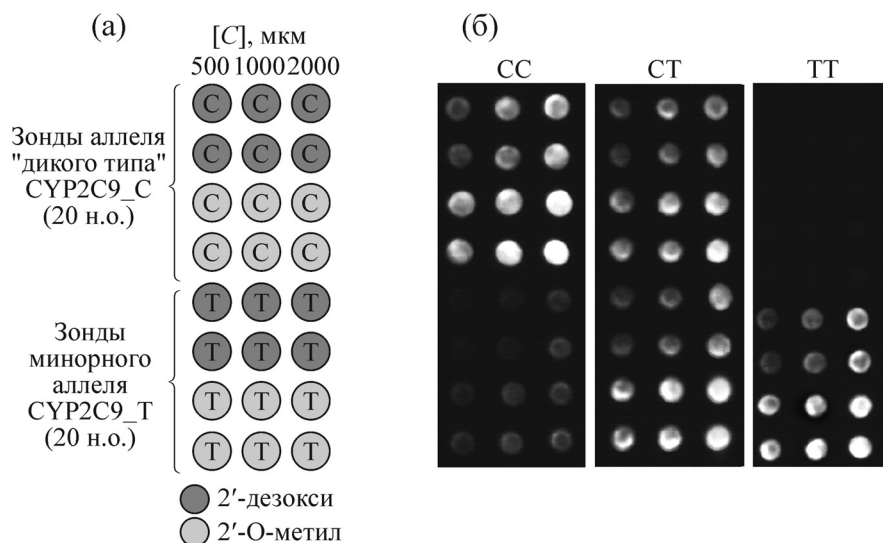


Рис. 1. Биочип для анализа локуса rs12248560 (–806 C>T) в гене *CYP2C19*: (а) – схема биочипа (ячейки продублированы), (б) – примеры картин гибридизации для разных генотипов (СС – гомозигота по «дикому типу», СТ – гетерозигота, ТТ – гомозигота по минорному аллелю).

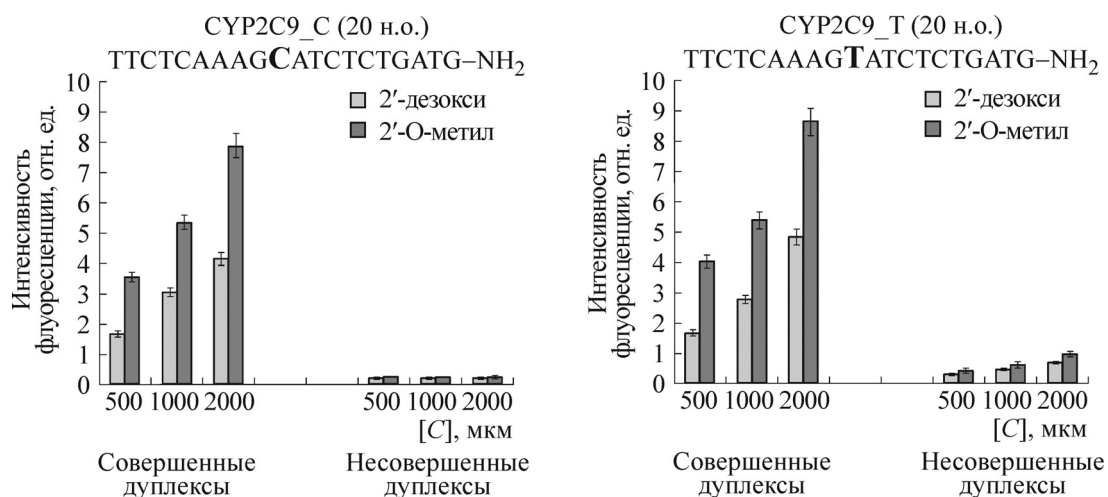


Рис. 2. Средние значения флуоресцентных сигналов от ячеек с совершенными дуплексами и несовершенными.

зондов длиной 20 н.о. была синтезирована в двух вариантах: «2'-дезоксид» и «2'-О-метил». Также были синтезированы олиго(2'-дезоксирибонуклеотиды) длиной 21 н.о. Олигонуклеотиды иммобилизовали в гидрогелевых ячейках, находящихся на поверхности подложки. Зонды с последовательностями CYP2C9_C (20 н.о.) и CYP2C9_T (20 н.о.) в двух вариантах (2'-дезоксид-) и (2'-О-метил-) были нанесены в концентрациях 500, 1000 и 2000 мкМ, ячейки продублированы (рис. 1а).

Был проведен анализ на биочипе 20 образцов ДНК с известными генотипами по локусу rs12248560 (–806 C>T) в гене *CYP2C19*: 15 образцов имели генотип СС, 4 образца – генотип

СТ, один образец был гомозиготой по минорному аллелю с генотипом ТТ. Генотипы образцов были предварительно определены методом секвенирования по Сэнгеру. Примеры картин гибридизации для разных генотипов приведены на рис. 1б.

Для каждого варианта зонда была определена интенсивность флуоресцентного сигнала от ячеек, в которых при гибридизации с ПЦР-продуктом были образованы совершенные и несовершенные (mismatch) дуплексы (рис. 2). Под совершенным дуплексом понимали полностью комплементарный дуплекс, образованный парой зонд-ПЦР-продукт. Как видно из рис. 2, гибридизационные сигналы от совершенных ду-

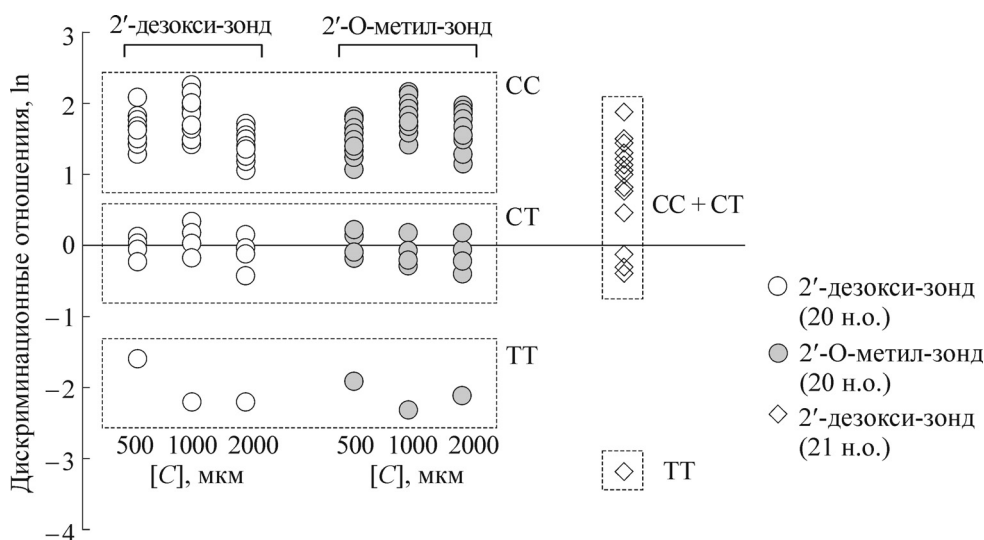


Рис. 3. Распределение дискриминационных отношений для 2'-дезоксид- и 2'-О-метил-зондов.

плексов, образованных олиго(2'-О-метил)рибонуклеотидами, в 1,7–2,3 раза выше по сравнению с сигналами от совершенных дуплексов, образованных олиго(2'-дезоксид)рибонуклеотидами в той же концентрации. При образовании несовершенных дуплексов рост флуоресцентных сигналов был менее выражен. Сигналы от ячеек с несовершенными дуплексами лишь в 1,2–1,3 раза выше в случае (2'-О-метил)-зондов.

Ранее было показано, что дуплексы с 2'-О-метил-модифицированными последовательностями имеют большую термическую стабильность по сравнению с не модифицированными ДНК-олигонуклеотидами. Температура плавления олигомеров нуклеиновых кислот повышается приблизительно на 1°C при замене одного нуклеотида на модифицированный 2'-О-метил-аналог [20]. Свой вклад в стабильность образуемых дуплексов вносит сама последовательность нуклеиновой кислоты, условия гибридизации (концентрация формамида и соли). Также следует иметь в виду, что при гибридизации с (2'-дезоксид)-зондом происходит образование ДНК–ДНК дуплексов (В-форма). В то же время при использовании (2'-О-метил)-зондов образуются гибридные РНК–ДНК дуплексы, более вероятно принимающие конформацию А-формы, которая характерна для двуспиральной РНК [20].

Для оценки вклада термической устойчивости образуемых дуплексов в специфичность взаимодействия иммобилизованных зондов с ДНК-мишенью определяли ДО как отношение суммы сигналов ячеек аллеля С к сумме сигналов ячеек аллеля Т для генотипов СС, СТ и ТТ (рис. 3). Результаты определения ДО не выявили существенной разницы между (2'-О-

метил)- и (2'-дезоксид)-зондами при идентичной последовательности и одинаковой концентрации иммобилизованного зонда. Возможно, это связано с повышенной стабильностью как совершенных, так и несовершенных дуплексов, образуемых (2'-О-метил)-зондами.

Тем не менее использование (2'-О-метил)-модифицированных нуклеотидов в технологии биочипов может быть весьма перспективным. При проведении мультиплексного анализа на биочипе очень важным моментом является подбор олигонуклеотидных зондов с одинаковой температурой плавления. Поскольку температура плавления зависит от GC-состава ДНК, для АТ-богатых участков приходится подбирать более длинные зонды, что резко ухудшает дискриминацию между совершенными и несовершенными дуплексами. При гибридизации ПЦР-продукта на биочипе, в ячейках которого были нанесены зонды длиной 21 н.о. (добавлен один нуклеотид G с 5'-конца) в концентрации 1000 мкМ, были получены следующие значения интенсивности флуоресценции для совершенных и несовершенных дуплексов соответственно: 4,7 и 0,3 для «дикого типа» и 4,1 и 1,6 для минорного аллеля. Эти значения флуоресцентных сигналов сопоставимы со значениями, полученными для (2'-О-метил)-зондов, однако при анализе ДО видно, что эта пара зондов длиной 21 н.о. не позволяет различить генотипы СС и СТ (рис. 3).

Таким образом, увеличение температуры плавления зонда за счет включения модифицированных нуклеотидов без увеличения его длины позволяет повысить специфичность гибридизации в случае сложных для анализа последовательностей ДНК. Ранее было показано при-

менение LNA-нуклеотидов в гибридизационном анализе на биочипе для определения полиморфизма в гене *UGT1A1*, обусловленного количеством нуклеотидных повторов (ТА) [21]. LNA-нуклеотиды вносят большой вклад в термическую устойчивость дуплексов по сравнению с (2'-О-метил): замена одного дезоксирибонуклеотида на LNA-нуклеотид в составе зонда повышает температуру плавления дуплексов в среднем на 2°C [22]. Однако 2'-О-метил-рибонуклеотиды более дешевы и доступны по сравнению с LNA-нуклеотидами, что является преимуществом при использовании в рутинной лабораторной практике.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 14.604.21.0166, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60417X0166).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y. S. Cho-Chung, Expert Opinion on Therapeutic Patents **10** (11), 1711 (2000).
2. S. M. Gryaznov, Chem. Biodivers. **7** (3) 477 (2010).
3. J. Manson, T. Brown, and G. Duff, Lymphokine Res. **9**, 35 (1990).
4. M. Matsukura, K. Shinozuka, G. Zon, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 7706 (1987).
5. W. J. Stec, G. Zon, and B. Uznanski, J. Chromatogr. **326**, 263 (1985).
6. L. Kibler-Herzog, G. Zon, and B. Uznanski, et al., Nucl. Acids Res. **19** (11), 2979 (1991).
7. A. Tsourkas, M.A. Behlke, G Bao. Nucl. Acids Res. **30** (23), 5168 (2002).
8. M. Szabat, T. Pedzinski, T. Czapik, et al., PLoS One **10** (11), e0143354 (2015).
9. A. Gupta, A. Mishra, and N. Puri, J. Biotechnol. **10** (259), 148 (2017).
10. M. Emelyanova, L. Ghukasyan, I. Abramov, et al., Oncotarget. **8**(32), 52304 (2017).
11. T. Yamamoto, M. Nakatani, K. Narukawa, et al., Future Med. Chem. **3** (3), 339 (2011).
12. T. Shimo, R. Maruyama, and T. Yokota, Methods Mol. Biol. **1687**, 143 (2018).
13. C. Kratschmer and M. Levy, Nucl. Acid Ther. **27** (6), 335 (2017).
14. E. Lenartowicz, A. Nogales, E. Kierzek, et al., Nucl. Acid Ther. **26** (5), 277 (2016).
15. D. Zhao, Y. Yang, N. Qu, et al., Biomaterials **100**, 172 (2016).
16. S.C. Sim, C. Risinger, M. L. Dahl, et al., Clin. Pharmacol. Ther. **79** (1),103 (2006).
17. А. С. Глотов, Т. В. Наседкина, Т. Э. Иващенко и др., Молекуляр. биология **39** (2), 403 (2005).
18. Y. Lysov, V. Barsky, D. Urasov, et al., Biomed. Opt. Express **8** (11), 4798 (2017).
19. А. Ю. Иконникова, Т. С. Лисица, В. Е. Шершов и др., Биофизика **62** (6), 900 (2017).
20. A. M. Kawasaki, M. D. Casper, S. M. Freier, et al., J. Med. Chem. **36** (7) 831(1993).
21. E. E. Fesenko, R. N. Heydarov, E. V. Stepanova, et al., Clin. Chem. Lab. Med. **51** (6), 1177 (2013).
22. B. Vester and J. Wengel, Biochemistry **43** (42), 13233 (2004).

Application of 2'-O-Methyl-Analogs of Oligoribonucleotides for Changing Temperature Characteristics of Immobilized Probes and Enhancing the Specificity of Hybridization

A.Yu. Ikonnikova, S.A. Surzhikov, V.O. Pozhitnova, A.S. Zasedatelev, and T.V. Nasedkina

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

The specificity of interactions between oligonucleotide probes immobilized onto a biological microchip (biochip) and target DNA depends on a number of factors but the main among them are the length of the probe and the nucleotide sequence (primarily, GC-composition). It is known that 2'-O-methyl-oligoribonucleotides are characterized by their ability to form more stable duplexes with the complementary DNA sequence as compared to 2'-deoxyribonucleotides probes. In the present work, the possibility of application of 2'-O-methyl-oligoribonucleotides for enhancing of the specificity of interaction between the target DNA and probes immobilized onto the biochip was shown. Fluorophore-labeled target DNA was obtained during one-round asymmetric PCR with simultaneous incorporation of a fluorescent label in the PCR product. As a result of hybridization with immobilized probes, it was shown that for the identical DNA sequences and the same probe concentrations, the intensity of fluorescent signals from the gel pads with 2'-O-methyl-oligoribonucleotides probes is on average twice higher, than that from the gel pads containing 2'-deoxyribonucleotides probes. At the same time, the increase in the intensity of fluorescence is more pronounced for perfect versus imperfect (mismatched) duplexes.

Keywords: 2'-O-methyl-oligoribonucleotides, 2'-deoxyribonucleotides, biological microchips, hybridization, perfect duplex, mismatched duplex