

КИНЕТИКА ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МАРКИРОВАНИЯ ДНК С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ХИМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ Taq-ПОЛИМЕРАЗ

© 2017 г. Т.С. Лисица, В.Е. Шершов, М.А. Спицын, Т.О. Гусейнов, А.Ю. Иконникова, Д.О. Фесенко, С.А. Лапа, А.С. Заседателев, А.В. Чудинов, Т.В. Наседкина

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32
E-mail: nased@biochip.ru*

Поступила в редакцию 16.11.16 г.

Исследована кинетика маркирования ДНК в ходе полимеразной цепной реакции с использованием шести флуоресцентных производных 5'-трифосфата 2'-дезоксинуридина. Исследованные соединения различались химическим строением, суммарным электрическим зарядом и длиной линкера, соединяющего краситель с C5-положением пиримидинового основания. Установлена эффективность встраивания флуоресцентных производных в растущую цепь ДНК четырьмя коммерческими Taq ДНК-полимеразами с 5'→3'-экзонуклеазной активностью и горячим стартом с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени с TaqMan-зондом и последующего электрофоретического анализа продуктов реакции. Модифицированные дезоксиуридины с суммарным положительным или отрицательным зарядом хромофора практически не встраивались Taq-полимеразами в ходе полимеразной цепной реакции. Способностью эффективно встраиваться в ДНК обладали модифицированные дезоксиуридины с нейтральным зарядом хромофора. Увеличение длины линкера между пиримидиновым основанием и хромофором приводило к уменьшению ингибирования полимеразной цепной реакции и к эффективному включению модифицированных нуклеотидов в растущую цепь ДНК, что, видимо, связано с уменьшением стерических эффектов, обусловленных красителем. По результатам экспериментов выбраны наиболее перспективные сочетания флуоресцентно-меченого нуклеотида и Taq-полимеразы для дальнейшего использования в реакции флуоресцентного маркирования ДНК.

Ключевые слова: флуоресценция, модифицированные нуклеотиды, цианиновые красители, ПЦР в реальном времени, эффективность ПЦР.

В настоящее время флуоресцентные метки широко применяются для визуализации, оценки динамики и конечных результатов реакций в различных молекулярно-биологических методах. К веществам, используемым в качестве таких меток, предъявляются высокие требования, такие как химическая стабильность, устойчивость к многократным циклам облучения–флуоресценции и нагрева–охлаждения в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР), высокий квантовый выход, низкая фоновая флуоресценция и минимизация влияния на исследуемый процесс.

Дезоксиуридинтрифосфаты, маркированные индодикарбоцианиновыми красителями (аналогами красителя Cy5), используются для флуоресцентного маркирования ДНК с целью визуализации продукта ПЦР при гибридном анализе в технологии биологических микрочипов [1–3]. Флуоресцентно-меченые нуклеотиды обладают способностью встраиваться в растущую в ходе ПЦР цепь ДНК. Ранее было показано, что электрический заряд хромофора, структура линкера и самого индодикарбоцианинового красителя могут оказывать существенное влияние на взаимодействие с ферментом и, соответственно, встраивание модифицированных нуклеотидов Taq-полимеразой в растущую цепь ДНК [4,5].

Сокращения: ПЦР – полимеразная цепная реакция, Cy5-dUTP – флуоресцентно-меченые аналоги 5'-трифосфата 2'-дезоксинуридина, Cy5-dU – модифицированные нуклеотиды в составе ДНК.

Сравнительная характеристика Taq-полимераз

	HS Taq	Maxima Hot Start	Syn Taq	Hot Start Taq
Инактивация	Специфические моноклональные антитела	Термолabileные блокирующие группы	Специфические моноклональные антитела	Специфические моноклональные антитела
Концентрация ионов магния в реакционной смеси, мМ	3	1	2,5	4
Количество фермента в реакционной смеси	1 U	1 U	2,5 U	1 U

Для оценки эффективности встраивания модифицированных нуклеотидов, содержащих аналоги Су5, ранее использовали различные методы: ПЦР с электрофоретическим разделением продуктов, гибридизацию на биочипе, ПЦР в реальном времени с красителем SYBR Green [4,5]. В настоящей работе использована комбинация метода ПЦР в реальном времени с TaqMan-зондом и последующего электрофоретического анализа меченого продукта. С применением этого подхода исследована эффективность встраивания в растущую цепь ДНК шести флуоресцентных производных 5'-трифосфата 2'-дезоксинуридина (Су5-dUTP) четырьмя коммерческими Taq-полимеразами. По результатам исследования выбраны наиболее перспективные сочетания флуоресцентно-меченого нуклеотида и Taq-полимеразы для дальнейшего использования в реакции флуоресцентного маркирования ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы клетки больных лейкемией, содержащие химерный ген *BCR-ABL/p190*. РНК выделяли набором RNeasy-MiniKit (Qiagen, Германия), обратную транскрипцию проводили с использованием набора MMLV RT kit (Евроген) согласно прилагаемым протоколам, полученную кДНК использовали в качестве матрицы в ПЦР.

Для оценки влияния исследуемых Су5-dUTP на динамику накопления ПЦР-продукта использовали ПЦР в реальном времени с TaqMan-зондом. Реакцию проводили в 25 мкл смеси следующего состава: 1 мкл кДНК, каждый из дезоксинуклеозидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) в концентрации 200 мкМ, праймеры ENF (5'-CTGGCCCAACGATGGCGA-3') и ENR (5'-CACTCAGACCCTGAGGCTCAA-3') в концентрации 300 нМ, TaqMan-зонд ENP (5'-ROX-CCCTCAGCGGCCAGTAGCATCTGAVHQ2-3') в концентрации 200 нМ [5], полимеразы в концентрации, рекомендованной произ-

водителем и поставляемый с ней 1×ПЦР-буфер. Испытания проводили с использованием шести Су5-dUTP – dU1, dU2, dU3, dU4, dU5 и dU6 (рис. 1) – в концентрации 20 мкМ, 8 мкМ и 4 мкМ (количество химически модифицированного по отношению к нативному dTTP составляло 10, 4 и 2% соответственно). Испытаны четыре Taq ДНК полимеразы: HS Taq ДНК полимеразы (Евроген, Россия), Maxima Hot Start (Thermo Fisher Scientific, США), SynTaq (Синтол, Россия), Hot Start Taq (СибЭнзим, Россия) (таблица). Амплификацию проводили в 96-луночных планшетах на приборе LightCycler 480 II (Roche, Швейцария) по программе: 50°C – 2 мин, 95°C – 10 мин и 40 циклов (95°C – 15 с, 60°C – 1 мин).

Продукт амплификации длиной 92 п.о. включал 18 позиций аденина А (6А на участке от праймера ENF до зонда ENP) и 17 позиций тимидина Т:

5'-CTGGCCCAACGATGGCGAGGGCGCC
TTCCATGGAGACGCAGAAGCCCTTCAGC
GGCCAGTAGCATCTGACTTTGAGCCTCA
GGGTCTGAGTG-3'

(области отжига праймеров обозначены подчеркиванием, область гибридизации зонда – двойным подчеркиванием).

После проведения ПЦР в реальном времени продукт очищали переосаждением ацетатом натрия в этиловом спирте для удаления свободного Су5-dUTP. Далее проводили электрофорез в 2%-м агарозном геле с красителем SYBR Green I (Invitrogen, США). Гель-документирование проводили на настольном конфокальном сканере Turphoon FLA 9500 (GE Healthcare, США). Для документирования по каналу SYBR Green I возбуждение флуоресценции проводили лазером с длиной волны 473 нм, для регистрации флуоресценции использовали фильтр LPB (510 LP) с диапазоном пропускания ≥ 510 нм. Для документирования по каналу Су5 возбуждение флуоресценции проводили ла-

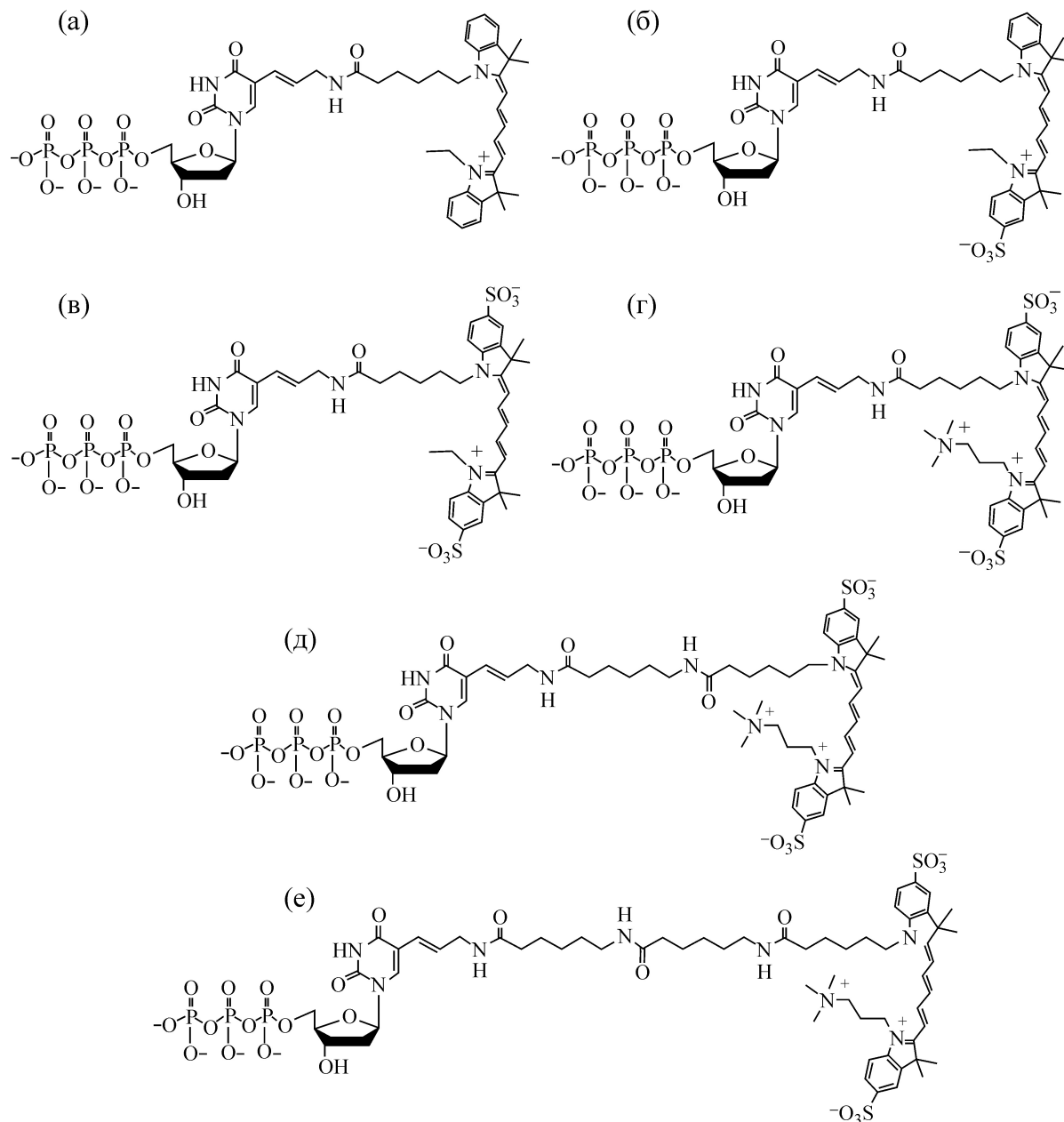


Рис. 1. Химическое строение и спектральные характеристики модифицированных дезоксиуридинтрифосфатов: (а) – dU1, $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 641$ нм, $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 660$ нм, $q = 0,17$; (б) – dU2, $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 644$ нм, $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 662$ нм, $q = 0,14$; (в) – dU3, $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 648$ нм, $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 665$ нм, $q = 0,31$; (г) – dU4, $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 646$ нм, $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 664$ нм, $q = 0,27$; (д) – dU5, $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 646$ нм, $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 663$ нм, $q = 0,32$; (е) – dU6, $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 647$ нм, $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 664$ нм, $q = 0,30$.

зером 635 нм, для регистрации флуоресценции использовали фильтр LPR (665 LP) с диапазоном пропускания ≥ 665 нм. На рис. 2 приведены спектры возбуждения и флуоресценции для dU2.

В качестве показателя динамики ПЦР в реальном времени использовали скорость амплификации, рассчитанную по тангенсу угла наклона линейного участка кривой накопления флуоресцентного сигнала ($\text{tg}\alpha$).

Электрофореграммы анализировали с помощью программы ImageJ: вычисляли интенсивность флуоресценции в диапазоне SYBR Green I (I_{SG}) и в диапазоне Cy5 (I_{Cy5}). Основываясь на том, что SYBR Green I коррелирует с количеством двуцепочечной ДНК, а Cy5 – с количеством встроившихся в ДНК модифицированных нуклеотидов (Cy5-dU), эффективность встраивания Eff , с учетом квантового выхода

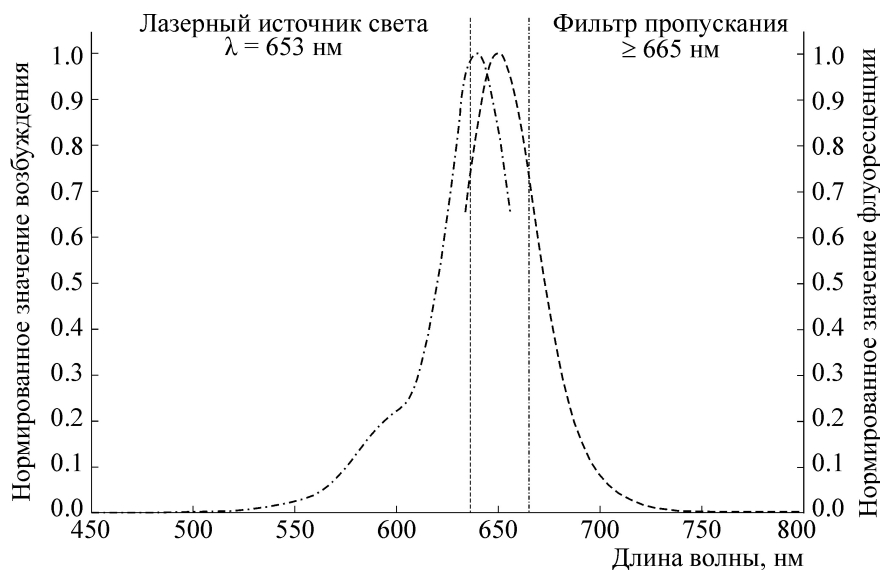


Рис. 2. Спектр возбуждения (1) и флуоресценции (2) dU2. Пунктирной вертикальной линией обозначена длина волны лазерного источника света сканера Turphoon FLA 9500, штрих-пунктирной вертикальной линией – коротковолновая граница фильтров регистрации флуоресценции.

q_{Cu5} исследуемых Cu5-dUTP, оценивали по следующей формуле:

$$Eff = \frac{I_{\text{Cu5}}}{I_{\text{SG}}q_{\text{Cu5}}}$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки влияния модифицированных дезоксиридинтрифосфатов на кинетику образования целевого продукта исследуемыми полимеразы использовали ПЦР в реальном времени с TaqMan-зондом. TaqMan-зонд длиной 25 н.о. содержал на 5'-конце молекулу флуорофора ROX, а на 3'-конце – тушитель флуоресценции BHQ2, и комплементарно связывался с амплифицируемым фрагментом ДНК. В составе зонда тушитель подавлял флуоресценцию ROX. В процессе элонгации амплифицируемого фрагмента Taq-полимеразы разрушала TaqMan зонд за счет 5'-3'-экзонуклеазной активности, что приводило к высвобождению флуорофора. Свободный флуорофор в растворе начинал светиться, рост сигнала флуоресценции отражал скорость накопления целевого продукта амплификации. На рис. 3а представлен пример S-образной кривой амплификации, скорость накопления целевого продукта определяли по тангенсу угла наклона центрального линейного участка. Для разных полимераз скорость амплификации целевого продукта в присутствии нативных дНТФ несколько различалась (рис. 3б),

что далее учитывали при определении скорости амплификации в присутствии Cu5-dUTP.

Исследовали кинетику реакции для четырех полимераз в присутствии каждого из шести Cu5-dUTP (dU1–dU6) в трех концентрациях: 10, 4 и 2% по отношению к нативному дезокситимидинтрифосфату. Для определения скорости амплификации в присутствии модифицированных Cu5-dUTP значение тангенса угла наклона кривой амплификации нормировали на значение тангенса угла наклона в реакции с нативными дезоксиридинтрифосфатами для соответствующей полимеразы. Как видно на рис. 4, наибольший ингибирующий эффект на реакцию амплификации оказывает dU1. Так, для фермента Maxima Hot Start ингибирование амплификации наблюдали для всех концентраций dU1, для ферментов HS Taq и Syn Taq полное ингибирование происходило при 10 и 4% содержания dU1 в смеси, для фермента Hot Start Taq – при 10% от количества нативного дезокситимидина. Для остальных пяти соединений полного ингибирования реакции не наблюдали даже при 10% модифицированного дезоксиридина ни для одной полимеразы. Однако для всех ферментов прослеживалось заметное снижение скорости амплификации в зависимости от концентрации модифицированного Cu5-dUTP. Наиболее ярко этот эффект был выражен для полимеразы Maxima Hot Start, скорость амплификации была снижена в два-четыре раза при концентрации 10% по сравнению с концентрацией 2%. Менее всего ингибирующий эффект модифицированных Cu5-

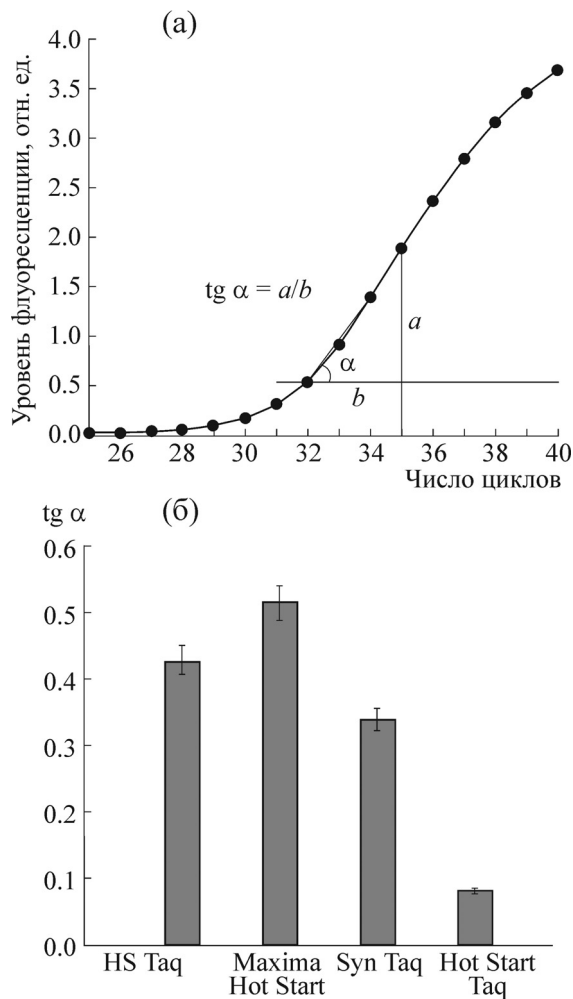


Рис. 3. Эффективность амплификации целевого продукта исследованными Taq-полимеразами в присутствии нативных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов: (а) – кривая роста флуоресцентного сигнала в ходе полимеразной цепной реакции с TaqMan-зондом; (б) – численные значения $\tan \alpha$ угла наклона кривой для различных полимераз.

dUTP проявлялся в реакции с полимеразой Hot Start Taq.

Однако способность полимеразы амплифицировать ДНК в присутствии модифицированных Cy5-dUTP не отражала способности фермента встраивать Cy5-dU в растущую цепь ДНК, так как в реакции всегда присутствовало достаточное количество нативного дТТФ. Для оценки способности Cy5-dU встраиваться в растущую цепь ДНК полноразмерные продукты амплификации, полученные в результате элонгации цепи после высвобождения TaqMan-зонда, анализировали в агарозном геле в присутствии красителя SYBR Green I. Регистрацию результатов электрофореза проводили на двух каналах флуоресценции: для красителя SYBR

Green I и для красителя Cy5. Интенсивность флуоресцентного сигнала в диапазоне SYBR Green I отражала общее количество целевого продукта, а интенсивность в диапазоне Cy5 – количество флуоресцентно-меченого продукта, что являлось пропорциональным количеству встроившихся молекул Cy5-dU.

Пример электрофоретического анализа продуктов амплификации для Taq-полимеразы Maxima Hot Start приведен на рис. 5. Как видно, ингибирование Taq-полимеразы dU1 приводит практически к полному отсутствию полноразмерного продукта. Присутствие производных дезоксиуридина dU2-dU6 не влияет на образование полноразмерных продуктов, однако в случае dU3 и dU4 не происходит включения модифицированного нуклеотида в синтезированную *de novo* цепь ДНК. В то же время для dU2, dU5 и dU6 наблюдается эффективное встраивание с образованием флуоресцентно-меченых фрагментов ДНК. Аналогичную картину наблюдали в реакции с другими Taq-полимеразы (данные не приводятся).

На основании денситометрического анализа электрофореграмм, полученных для всех четырех Taq-полимераз, рассчитана эффективность встраивания модифицированных дезоксиуридинов в реакции с исследованными Taq-полимеразы. Эффективность встраивания, в данном случае, определялась как доля флуоресцентно-меченого продукта в общем количестве наработанного в реакции полноразмерного продукта (рис. 6).

Обобщая результаты исследований, можно сделать следующие выводы. Модифицированный трифосфат дезоксиуридина dU1 обладает суммарным положительным зарядом хромофора, и соответствующий нуклеотид практически не встраивается Taq-полимеразы. Только одна из исследованных полимераз, Syn Taq, оказалась способной встраивать Cy5-dU1 при минимальной концентрации соответствующего трифосфата – 2%. При этом dU1 проявляет выраженный ингибирующий эффект на реакцию амплификации. dU3 имеет суммарный отрицательный заряд красителя, не ингибирует реакцию амплификации, но Cy5-dU3 практически не встраивается. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными ранее при использовании dU1 и dU3 в реакции с другими ферментами семейства Taq-полимераз [4].

Дезоксиуридины dU2, dU4, dU5 и dU6 имеют суммарный нейтральный заряд хромофора, однако ведут себя по-разному. Наиболее эффективно встраивается в растущую цепь ДНК Cy5-dU2. В присутствии 10% dU2 в реакцион-

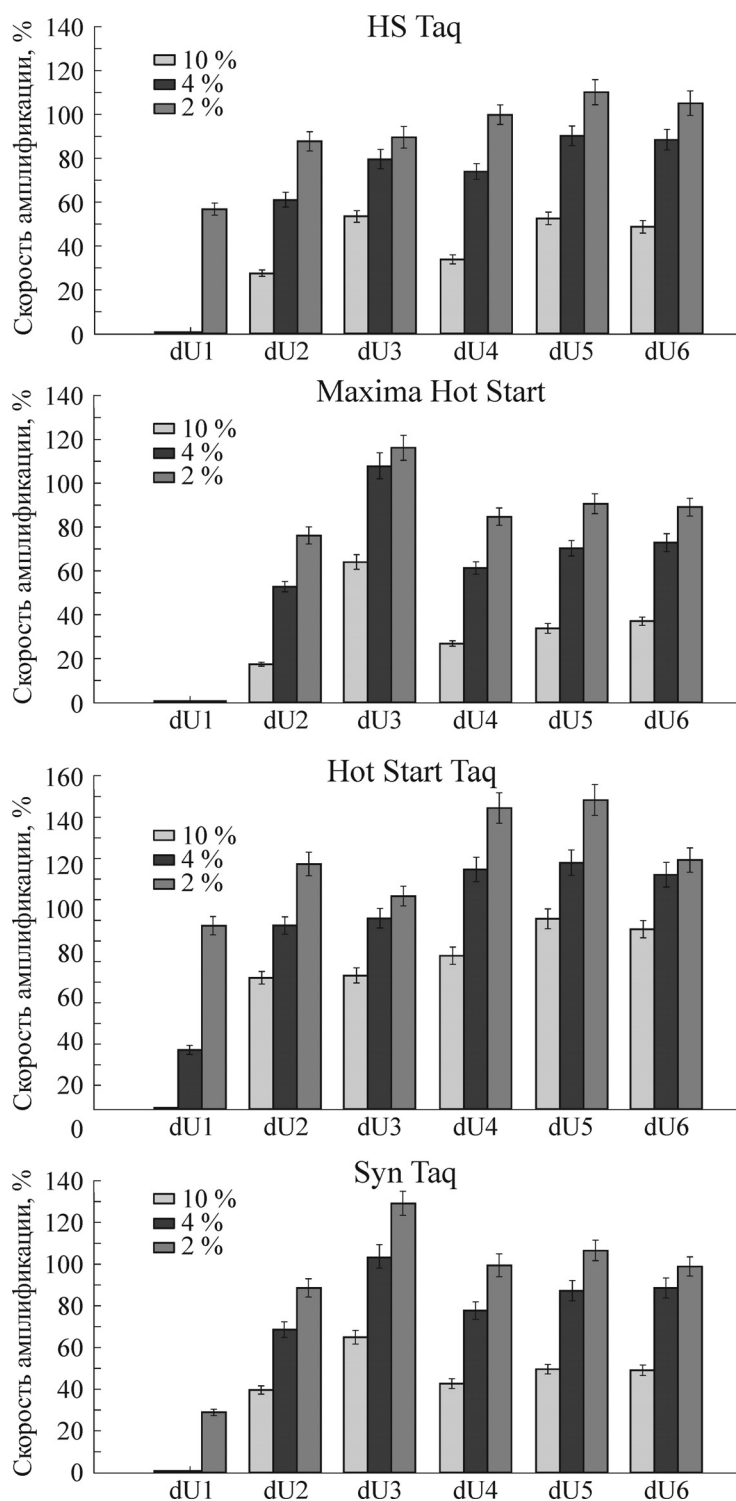


Рис. 4. Скорость амплификации в зависимости от типа и концентрации модифицированных Су5-dUTP.

ной смеси встраивание происходит более эффективно для трех полимераз, и только для полимеразы Syn Taq максимальная эффективность встраивания отмечена при концентрации 4% (рис. 5). Однако при 10%-м содержании

dU2 в реакционной смеси уже начинает проявляться эффект ингибирования реакции амплификации (рис. 4). dU4 также обладает суммарным нейтральным зарядом красителя, но отличается от dU2 наличием группы четвер-

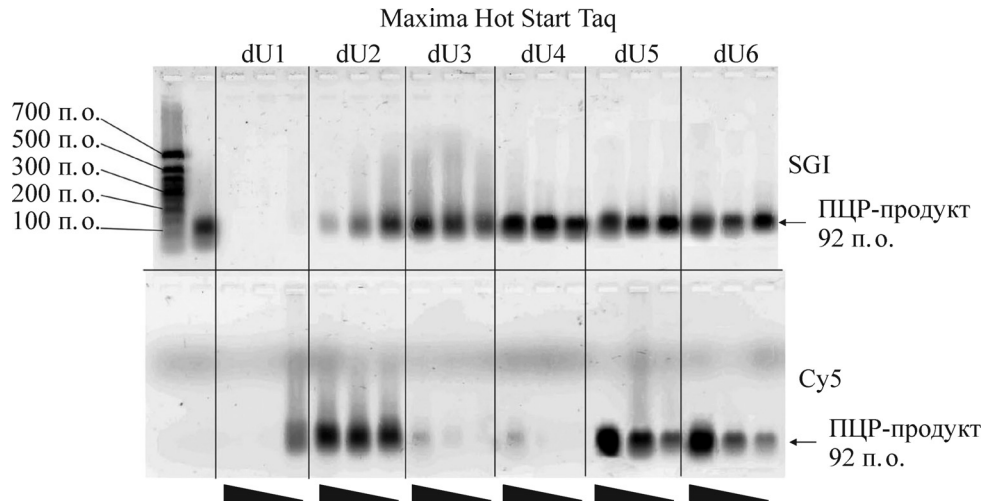


Рис. 5. Электрофореграмма ПЦР-продуктов в 2%-м агарозном геле в диапазоне красителей SYBR Green I и Cy5 после переосаждения с ацетатом натрия.

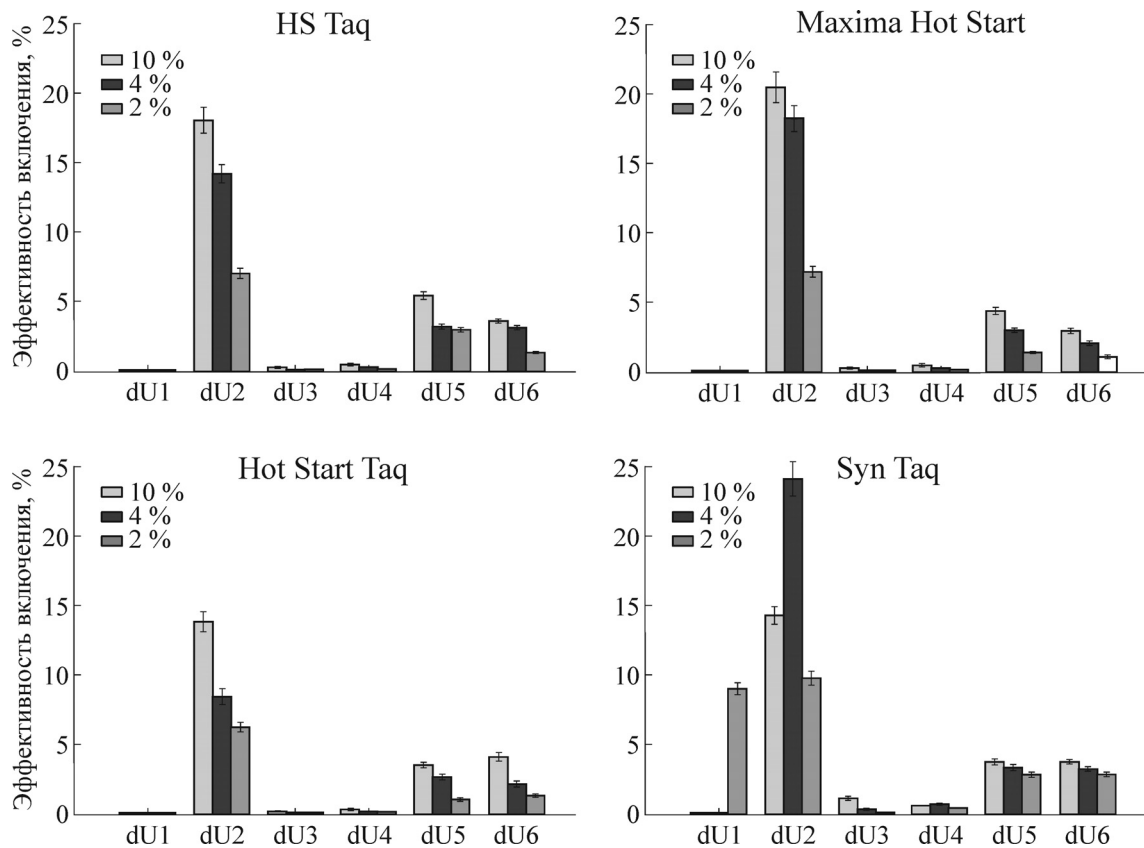


Рис. 6. Эффективность включения модифицированных Cy5-dUTP в зависимости от концентрации.

точного аммония, которая создает дополнительные стерические эффекты при взаимодействии dU4 с активным центром полимеразы. Это приводит к тому, что dU4 хотя и не ингибирует работу Taq-полимеразы, но почти не способен включаться в растущую цепь ДНК.

Увеличение длины линкера между пиримидиновым кольцом и хромофором в dU5 позволяет избежать стерических эффектов, препятствующих встраиванию дезоксиуридина, поэтому для dU5 можно наблюдать, как отсутствие ингибирования полимеразной цепной реакции, так

и достаточно эффективно включение модифицированного нуклеотида в растущую цепь ДНК. Дальнейшее увеличение длины линкера у dU6 незначительно уменьшает скорость реакции амплификации и эффективность встраивания, особенно при низких концентрациях модифицированного дезоксиуридина трифосфата (2%). Но в целом структура становится более громоздкой, снижается выход основного вещества при синтезе dU6, что делает это соединение менее перспективным в использовании. Таким образом, на эффективность флуоресцентного маркирования существенное влияние оказывает не только суммарный заряд, но и химическое строение хромофора, а также длина линкера между пиримидиновым основанием и хромофором.

Оптимальной концентрацией Cy5-dUTP для флуоресцентного мечения ДНК в ходе ПЦР следует считать 4% от количества нативного dTTP, так как при более низких концентрациях эффективность встраивания заметно снижается, а при повышении концентрации Cy5-dUTP начинает проявляться эффект ингибирования ПЦР. При концентрации 4% наиболее эффективно встраивание можно наблюдать для пары dU2 и полимеразы *Syn Taq*. Наименее эффективно dU2 встраивается полимеразой *Hot Start Taq*. dU5 и dU6 лучше всего встраиваются с реакции амплификации с полимеразой *HS Taq* и *Syn Taq*. Таким образом, экспериментальное

исследование кинетики реакции амплификации и эффективности встраивания модифицированных соединений с использованием методов ПЦР в реальном времени и электрофореза позволяет выбрать наиболее перспективные комбинации фермента и аналога дезоксиуридинтрифосфата для эффективного флуоресцентного маркирования ДНК в ходе ПЦР.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 14.604.21.0117, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0117).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д. О. Фесенко, О. Н. Митяева, Т. В. Наседкина и др. Молекуляр. биология **44** (3), 456 (2010).
2. D. O. Fesenko, A. V. Chudinov, S. A. Surzhikov, et al., Gen. Test. and Mol. Biomarkers **20** (4), 208 (2016).
3. Т. В. Наседкина, Д. О. Фесенко, О. Н. Митяева, и др. Докл. РАН **422** (5), 1 (2008).
4. В. Е. Шершов, В. Е. Кузнецова, Ю. П. Лысов, и др. Биофизика **60** (6), 1216 (2015).
5. Д. О. Фесенко, Т. О. Гусейнов, С. А. Лапа, и др. Молекуляр. биология (в печати) (2017).
6. J. Gabert, E. Beillard, V. H. J. van der Velden, et al., Leukemia **17**, 2318 (2003).

Kinetics of Fluorescent DNA Labeling Using PCR with Different Taq Polymerases Depends on Chemical Structure of Modified Nucleotides

T.S. Lisitsa, V.E. Shershov, M.A. Spitsyn, T.O. Guseinov, A.Yu. Ikonnikova,
D.O. Fesenko, S.A. Lapa, A.S. Zasedatelev, A.V. Chudinov, and T.V. Nasedkina

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

The kinetics of DNA labeling during PCR using six fluorescent derivatives of 5'-triphosphate 2'-deoxyuridine has been studied. The studied compounds differed in chemical structure, total electric charge and the length of the linker between a dye and the C5-position of a pyrimidine base. The efficiency for incorporating fluorescent derivatives into a growing DNA chain by four commercially available Taq DNA polymerases with 5'→3' exonuclease activity and hot start was determined using real-time PCR with TaqMan-probe and subsequent electrophoretic analysis of reaction products. The modified deoxyuridines with a total positive or negative charge of chromophore were not practically incorporated by Taq polymerases during PCR. The modified deoxyuridines with a neutral charge of chromophore had the capability to build in DNA effectively. The extended length of the linker between the pyrimidine base and chromophore led to less PCR inhibition and more effective inclusion of modified nucleotides in the growing DNA chain, which was probably connected to the reduction in steric effects caused by the dye. As a result, the most perspective combinations of fluorescently labeling nucleotide and Taq polymerase were chosen for further use in fluorescent DNA labeling.

Key words: fluorescence, modified nucleotides, cyanine dyes, real-time PCR, PCR efficiency