

ВЛИЯНИЕ СТРОЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НУКЛЕОТИДОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИХ ВСТРАИВАНИЯ В ДНК В ХОДЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

© 2017 г. А.Ю. Иконникова, Т.С. Лисица, В.Е. Шершов, М.А. Спицын, Т.О. Гусейнов, Д.О. Фесенко, С.А. Лапа, В.Е. Кузнецова, 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 04.09.17 г.

Исследована эффективность флуоресцентного маркирования ДНК с использованием четырех флуоресцентных производных 5'-трифосфата 2'-дезоксинуридина с различной ориентацией главной оси красителя, проходящей через полиметиновую цепочку связей, относительно линкера, соединяющего нуклеотид с красителем. Для определения скорости полимеразной цепной реакции с участием двух коммерческих ДНК-полимераз с 5'→3'-экзонуклеазной активностью и горячим стартом использовали метод полимеразной цепной реакции в реальном времени с добавлением интеркалирующего красителя. Для определения эффективности встраивания исследуемых соединений в образующийся в ходе полимеразной цепной реакции продукт проводили количественный анализ продуктов амплификации с помощью электрофореза в агарозном геле. Флуоресцентно-меченный продукт далее гибридизовали на биологическом микрочипе и определяли соотношение сигналов совершенных и несовершенных дуплексов. Показано, что эффективность встраивания и степень дискриминации между совершенными и несовершенными дуплексами зависит от взаимной ориентации красителя и линкера, соединяющего краситель с пиримидиновым основанием, и от наличия гидрофильных групп в составе красителя. Найдены соединения, демонстрирующие эффективное включение в растущую цепь ДНК и высокую специфичность гибридизационного анализа с использованием биочипов.

Ключевые слова: флуоресценция, модифицированные нуклеотиды, цианиновые красители, ПЦР в реальном времени, эффективность ПЦР, биологические микрочипы, аллель-специфичная гибридизация.

Дезоксиуридинтрифосфаты (dUTP), маркированные индодикарбоцианиновыми красителями (аналогами Cy5), используют для флуоресцентного маркирования ДНК с целью визуализации результатов гибридизационного анализа в технологии биологических микрочипов [1–3]. Важным фактором является способность флуоресцентно-меченных нуклеотидов встраиваться в синтезируемую *de novo* цепь ДНК в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Ранее было показано, что электрический заряд хромофора, структура линкера и самого индодикарбоцианинового красителя может оказывать существенное влияние на взаимодействие с ферментом Taq-полимеразой и, соответ-

ственно, на встраивание модифицированных нуклеотидов в ДНК [4,5]. В настоящей работе исследованы флуоресцентно-меченные аналоги дезоксиуридинтрифосфата с разной ориентацией главной оси красителя, проходящей через полиметиновую цепочку связей, относительно линкера, соединяющего нуклеотид с красителем. Для оценки эффективности флуоресцентного маркирования ДНК ферментом Taq-полимеразой использовали следующие методы: ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем, электрофоретическое разделение и количественный анализ ПЦР-продуктов, аллель-специфичную гибридизацию на биочипе. Комбинация этих подходов позволила выявить зависимость эффективности встраивания от тонких структурных различий, связанных с пространственной ориентацией различных химических групп в составе Cy5-dUTP.

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови человека с помощью набора QIA-amp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Для работы ПЦР продукта были синтезированы праймеры к участку гена *ABCB1*, содержащему полиморфный локус rs1045642 (C3435T): прямой праймер *ABCB1_F*

5'-TCATTGGATCTCATTACATCC
TGTTTGA CTGCAGCATTG-3'

и обратный праймер *ABCB1_R*

5'-ATGTATGTTGGCCTCCTTTGCTG-3'.

Размер продукта составлял 106 п.о. Последовательность прямого праймера включала локус-специфичную часть и адаптер (выделен подчеркиванием), что позволяло асимметрично нарабатывать ПЦР-продукт в ходе одноэтапной ПЦР для последующей гибридизации на биочипе.

Оценку влияния исследуемых Cy5-dUTP на реакцию ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 5 мкг ДНК, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) в концентрации 200 мкМ каждый, праймеры в концентрации 300 нМ, интеркалирующий краситель EvaGreen (Biotium, США) и ПЦР-буфер в рекомендованных производителем концентрациях, соответствующая Taq-полимераза в концентрации 0,1 ед. фермента на 1 мкл реакционной смеси. Добавляли один из четырех Cy5-dUTP (dU1, dU2, dU3, dU4) (рис. 1) в концентрации 20, 8 и 4 мкМ и проводили амплификацию на приборе Light-Cycler 96 (Roche, Швейцария) по программе: 95°C – 10 мин; 40 × (95°C – 30 с, 65°C – 30 с, 72°C – 20 с). Использовали две коммерчески доступные ДНК-полимеразы российских производителей – Hot Start Taq ДНК полимеразы («СибЭнзим», Россия) и HotTaq полимеразы («Силекс», Россия) – с горячим стартом и 5'→3'-экзонуклеазной активностью.

Для оценки показателя динамики ПЦР в реальном времени использовали скорость амплификации, рассчитанную по тангенсу угла наклона линейного участка кривой накопления флуоресцентного сигнала ($tg\alpha$) [5], которую нормировали на скорость ПЦР без добавления модифицированных нуклеотидов.

Продукты реакции ПЦР осаждали ацетатом натрия в этиловом спирте, супернатант удаляли. Осадок анализировали электрофорезом в 4%-м агарозном геле с красителем SYBR Green I

(«Силекс», Россия). Гель-документирование осуществляли по каналам SYBR Green I и Cy5 на конфокальном сканере Turphoon FLA 9500 (GE Healthcare, США). Возбуждение флуоресценции проводили на длинах волн 473 и 635 нм, флуоресцентные сигналы регистрировали с диапазоном пропускания ≥ 510 нм и ≥ 665 нм соответственно.

Электрофореграммы анализировали с помощью программы ImageJ. Эффективность встраивания (*Eff*) исследуемых Cy5-dUTP определяли как долю флуоресцентно-меченного продукта в общем количестве наработанного, т.е. как отношение интенсивности сигналов по каналу Cy5 (I_{Cy5}) к интенсивности сигналов по каналу SYBR Green I (I_{SG}) с учетом квантового выхода (q) по формуле:

$$Eff = \frac{I_{Cy5}}{I_{SG} \cdot q_{Cy5}}$$

Для проведения аллель-специфичной гибридизации с флуоресцентно-меченым ПЦР-продуктом использовали фрагмент биочипа («ФАРМ-БИОЧИП», Россия), позволяющий определять генотипы по полиморфизму rs1045642 (C3435T) гена *ABCB1*. В ячейках биочипа были иммобилизованы ДНК-зонды 5'-CCCTCAC-GATCTCTTCC-NH2-3' (*ABCB1* 3435_C) и 5'-CCCTCACAATCTCTTCCCT-NH2-3' (*ABCB1* 3435_T), каждая ячейка была продублирована.

Процедура генотипирования включала одностадийную мультиплексную ПЦР с включением флуоресцентной метки в продукты реакции, как описано ранее [2], и последующую гибридизацию с ДНК-зондами, иммобилизованными на биочипе. Концентрацию красителей в ПЦР подбирали таким образом, чтобы регистрировать флуоресцентный сигнал от совершенных дуплексов в диапазоне 10–30 усл. ед. при выдержке 500 мс. Для dU1, dU2 и dU4 эта концентрация составила 8 мкМ, для dU3 – 4 мкМ. Гибридизацию на биочипе осуществляли в смеси, содержащей 25% формамида, 5×SSPE, 50 об. % ПЦР-продукта, в течение 12 ч при 37°C, затем биочипы промывали и высушивали. Флуоресцентные сигналы на биочипе регистрировали на портативном анализаторе (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия) и анализировали 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 с иммобилизованными олигонуклеотидами *ABCB1* 3435_C, ΣI_T – сумма значений сигналов ячеек с имму-

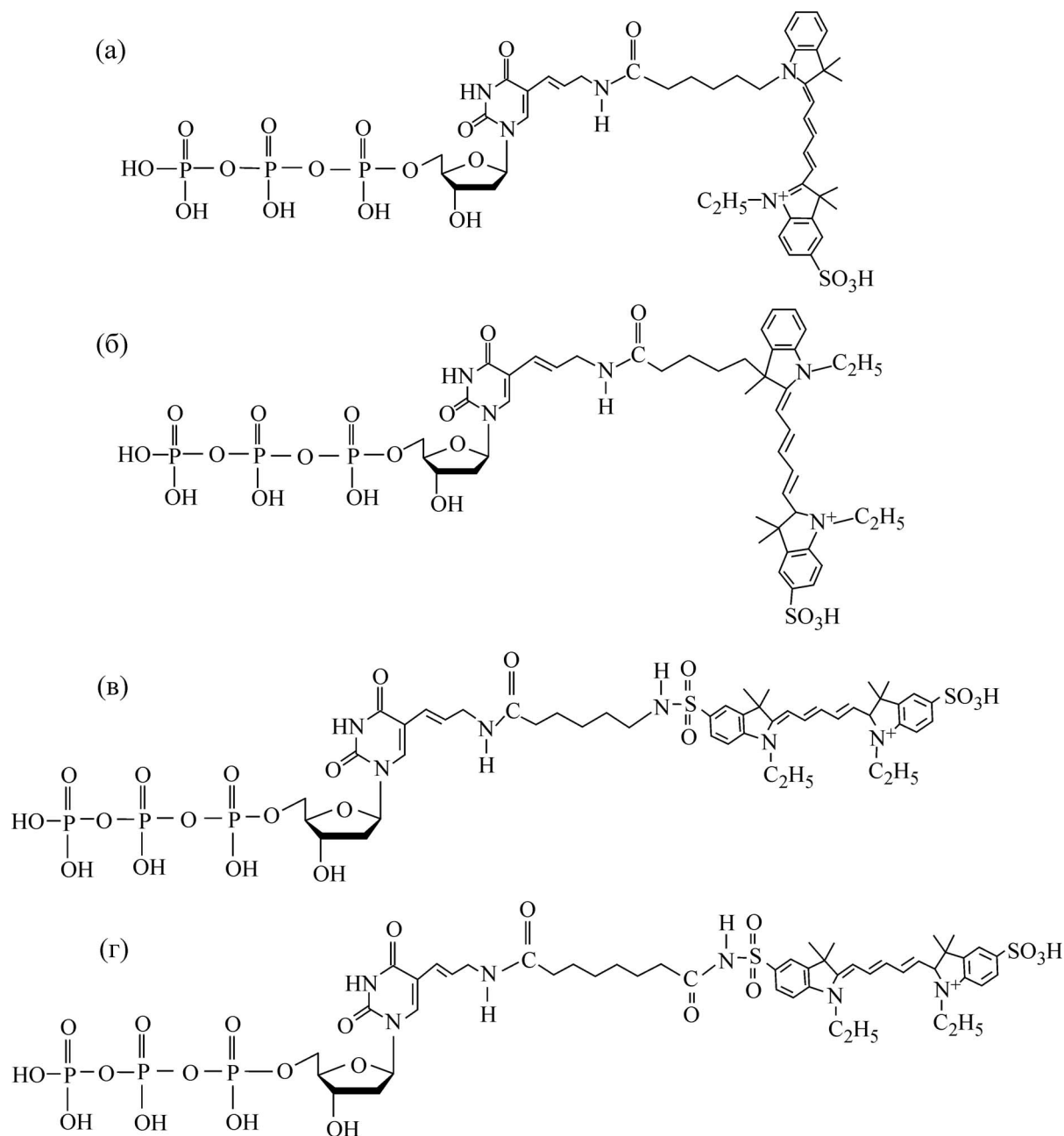


Рис. 1. Химическое строение модифицированных дезоксиуридинтрифосфатов dU1 (а), dU2 (б), dU3 (в), dU4 (г).

билизованными олигонуклеотидами ABCVI 3435_T. Полученные значения располагали на графике в логарифмической шкале.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетику ПЦР в присутствии Cy5-dUTP (dU1, dU2, dU3, dU4) (рис. 1) изучали методом ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя EvaGreen, который встраивается в образующуюся в процессе реакции двухцепочечную ДНК и начинает

флуоресцировать. Каждый из исследуемых dU добавляли в трех концентрациях: 20, 8 и 4 мкМ.

Значения скорости ПЦР, высчитанные на основе тангенса угла наклона линейного участка кривой накопления флуоресцентного сигнала в присутствии модифицированных трифосфатов, нормировали на скорость ПЦР без модифицированных нуклеотидов. Результаты представлены на рис. 2. Эффект ингибирования ПЦР для обеих Taq-полимераз возрастал в ряду dU2 > dU4 > dU1 > dU3, при использовании

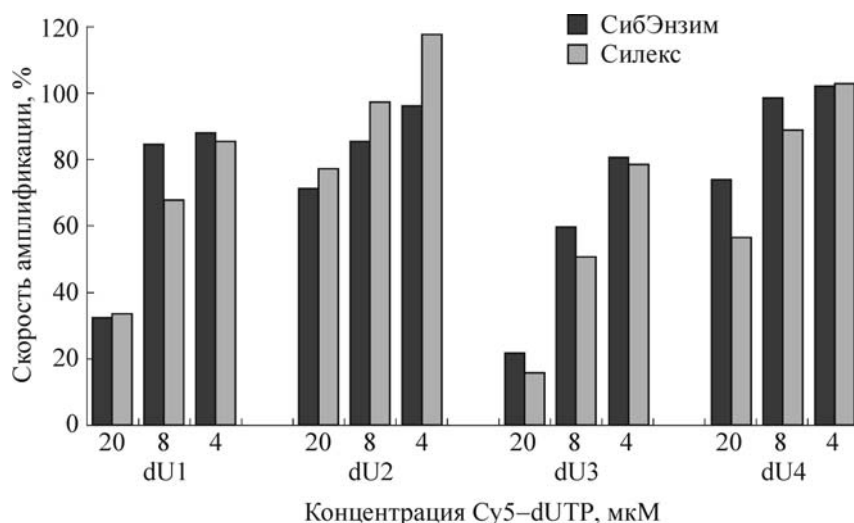


Рис. 2. Относительная скорость амплификации в зависимости от типа и концентрации Cy5-dUTP.

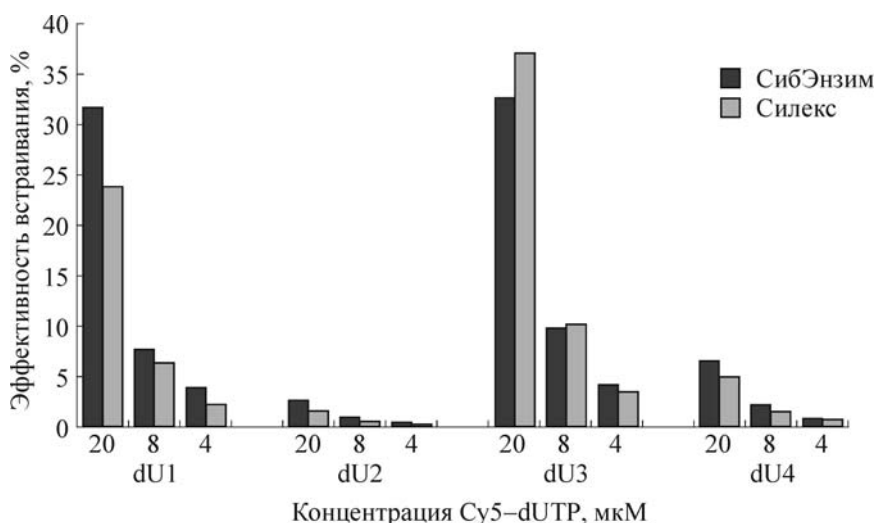


Рис. 3. Эффективность встраивания модифицированных Cy5-dUTP в зависимости от концентрации.

меньших концентраций красителя ингибирующий эффект проявлялся слабее.

Способность изучаемых модифицированных нуклеотидов встраиваться в ДНК в ходе ПЦР оценивали на основании количественного анализа электрофореграмм, полученных для продуктов ПЦР в реальном времени, по каналам SYBR Green I и Cy5. Эффективность встраивания трифосфатов Taq-полимеразами определяли как долю флуоресцентно-меченного продукта (канал Cy5), в общем количестве нарабатанного в реакции полноразмерного продукта (канал SYBR Green I) с учетом квантового выхода красителя. Эффективность встраивания нуклеотидов в растущую цепь ДНК возрастала в ряду $dU2 > dU4 > dU1 > dU3$ (рис. 3).

Для точного определения генотипа методом аллель-специфичной гибридизации на биочипе большое значение имеет соотношение флуоресцентных сигналов от совершенных и несовершенных дуплексов (дискриминационное отношение, ДО), образующихся при взаимодействии иммобилизованных олигонуклеотидных зондов и анализируемой ДНК-мишени. Ранее было показано, что в зависимости от использованного в реакции красителя эти соотношения могут различаться [6]. Для проведения гибридного анализа выбрали фрагмент ДНК в локусе *ABCB1*, содержащий полиморфизм rs1045642 (C3435T). Использовали восемь образцов ДНК, генотипы которых ранее были определены прямым секвенированием по Сэнгеру. Три образца ДНК имели генотип C/C,

другие три были гетерозиготами С/Т, два образца имели гомозиготный генотип Т/Т. Для каждого образца анализ выполняли с использованием двух Taq-полимераз.

Примеры картин гибридизации для каждого варианта генотипа представлены на рис. 4а. Дискриминационные отношения высчитывали как отношение суммы сигналов ячеек аллеля С к сумме сигналов ячеек аллеля Т. Распределение значений ДО в логарифмической шкале (рис. 4б) показало, что для достоверного генотипирования подходят не все исследованные Су5-dUTP. При использовании dU3 в качестве флуоресцентной метки распределение ДО не позволяет провести границу между генотипами С/Т и Т/Т, интервал между генотипами С/С и С/Т также был меньше, чем в случае остальных Су5-dUTP. При этом суммарная интенсивность флуоресцентных сигналов на биочипе для dU3 оказалась самой высокой. Наилучшие показатели ДО, позволяющие наиболее достоверно разделять генотипы, были достигнуты для dU1 и dU4.

Таким образом, в настоящей работе применен комплексный анализ эффективности флуоресцентного маркирования ДНК в ходе ПЦР с использованием независимых методических подходов. Оценена скорость накопления флуоресцентно-меченных продуктов методом ПЦР в реальном времени. Определена эффективность встраивания флуоресцентно-меченных нуклеотидов в ходе ПЦР с использованием метода электрофореза с количественной оценкой анализируемых продуктов. Исследовано влияние встроенных в ПЦР-продукт Су5-dUTP на взаимодействие этого продукта с олигонуклеотидными зондами методом аллель-специфичной гибридизации на биочипе. По спектральным характеристикам все четыре Су5-dUTP близки между собой. Различия в эффективности встраивания в ДНК связаны, скорее всего, с их субстратной специфичностью для Taq ДНК-полимераз. Линкеры, соединяющие нуклеотид и краситель, у всех четырех Су5-dUTP достаточно гибкие, но они, вероятно, не могут в полной мере обеспечить беспрепятственное размещение объемных заместителей в ферментативном центре ДНК-полимеразы. Хромофорный центр красителя Су5 имеет плоскую структуру. У dU1 хромофорный центр красителя находится в одной плоскости с линкером, а у dU2 – в разных плоскостях [4,6]. Трифосфат dU1, видимо, лучше воспринимается Taq ДНК-полимеразой, чем более объемный по структуре dU2. При этом оба трифосфата при встраивании в ДНК-мишень не нарушают ее способно-

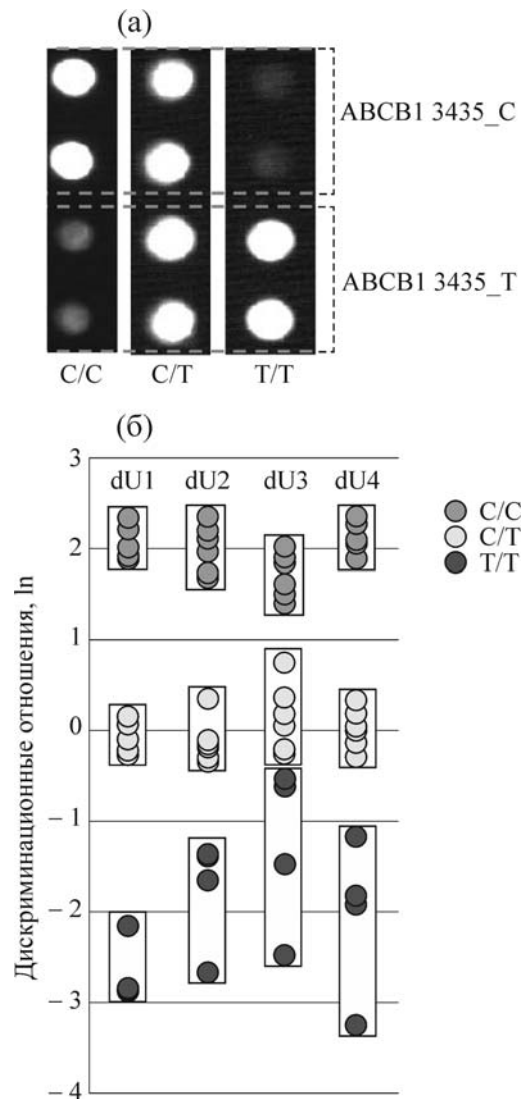


Рис. 4. Примеры картин гибридизации на биочипах (а) и дискриминационные отношения (б) при использовании различных Су5-dUTP.

сти комплементарно взаимодействовать с олигонуклеотидными зондами.

Трифосфаты dU3 и dU4 имеют сходное геометрическое строение [7,8]. При этом dU3 лучше встраивается в продукты ПЦР, в то же время дискриминационные отношения для различных генотипов перекрываются, что не дает возможности провести четкое разграничение между гомо- и гетерозиготами. Возможно, это связано с тем, что сульфамидная группа $-\text{SO}_2-\text{NH}-$, входящая в состав dU3, в отличие от группы $-\text{SO}_2-\text{NH}-\text{CO}-$, входящей в dU4, приводит к более частому встраиванию Taq-полимеразой модифицированного нуклеотида в продукт ПЦР, что отражается на способности данного участка ДНК правильно связываться с компле-

ментарным зондом. Протон, входящий в группу $-\text{SO}_2-\text{NH}-$ (dU3), в отличие от протона, входящего в группу $-\text{SO}_2-\text{NH}-\text{CO}-$ (dU4), обладает «кислыми» свойствами и может взаимодействовать с основными аминокислотными остатками полипептидной цепи ДНК-полимеразы, что приводит к различиям их субстратных свойств.

По совокупности параметров, наилучшими соединениями для флуоресцентного маркирования ДНК в ходе однораундовой моноплексной ПЦР и проведения аллель-специфичной гибридизации на биочипе являются dU1 и dU4.

Таким образом, комплексный подход к оценке эффективности флуоресцентного маркирования ДНК позволяет дифференцировать флуоресцентно-меченные нуклеотиды и может быть применен для оценки способности ДНК-полимераз встраивать производные нуклеотидов в растущую в ходе ПЦР цепь ДНК и выбора оптимального Су5-dUTP при разработке тест-систем с использованием технологии биочипов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Ис-

следования 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. 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. Т. С. Лисица, В. Е. Шершов, М. А. Спицын и др., Биофизика **62** (3), 464 (2017).
6. V. E. Kuznetsova, M. A. Spitsyn, V. E. Shershov, et al., Mendeleev Commun. **26**, 95 (2016).
7. М. А. Спицын, В. Е. Кузнецова, В. Е. Шершов и др., Биоорганич. химия **43** (4), 444 (2017).
8. М. А. Spitsyn, V. E. Kuznetsova, V. E. Shershov, et al., Dyes and Pigments **147**, 199 (2017).

Influence of the Structure of Fluorescent Labeled Nucleotide Derivatives on Efficiency of Their Incorporation into DNA in the Course of Polymerase Chain Reaction

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

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

The efficiency of fluorescent labeling of DNA was studied using four fluorescent derivatives of 5'-triphosphate 2'-deoxyuridine with different orientation of the main axis of the dye passing through the polymethine chain relatively to a linker linking nucleotide and the dye. To determine the rate of polymerase chain reaction with two commercial DNA polymerases with a 5'→3'-exonuclease activity and "hot start", a real-time polymerase chain reaction with an intercalating dye was used. To determine the efficiency of incorporation of the tested compounds into the product formed during polymerase chain reaction, quantitative analysis of the amplification products was performed by agarose gel electrophoresis. The fluorescent labeled product was further hybridized on a biological microchip and the ratio of signals between perfect match and mismatch duplexes was determined. It was shown, that the efficiency of incorporation and discrimination between perfect match and mismatch duplexes depend on mutual orientation of a dye and a linker linking the dye and pyrimidine base, as well as on the presence of hydrophilic groups in the dye. Compounds showing both effective incorporation into the growing DNA strand and high specificity of hybridization analysis have been found using biochips.

Keywords: fluorescence, modified nucleotides, cyanine dyes, real-time PCR, PCR efficiency, biological microchips, allele-specific hybridization