

УСТРАНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫХ ДУПЛЕКСОВ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА ДНК

© 2018 г. А.Ю. Иконникова, О.А. Заседателева, С.А. Суржиков, В.О. Пожитнова, Д.О. Фесенко, А.А. Стомахин, 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 14.09.18 г.

Апробирован метод, позволяющий корректно определять точечный полиморфизм в участках последовательности ДНК, образующих шпилечные структуры. В качестве примера выбраны участки гена ангиотензиногена *AGT* и гена цитохрома *CYP2C19*, содержащие варианты rs699 (T>C) и rs4986893 (G>A) соответственно. ДНК-зонды, комплементарные этим участкам, имели в своем составе шпилечные структуры длиной шесть нуклеотидов в случае rs699 (ген *AGT*) и четыре нуклеотида в случае rs4986893 (ген *CYP2C19*). Флуоресцентно меченая ДНК-мишень получена в результате двухэтапной мультиплексной ПЦР с одновременным включением флуоресцентной метки в продукт амплификации второго этапа. При гибридизации ДНК-мишени с соответствующими зондами, иммобилизованными в ячейках биочипа, флуоресцентный сигнал от ячеек или отсутствовал, или был значительно снижен. Внесение однонуклеотидных замен в последовательность зондов привело к разрушению внутримолекулярных структур, что было подтверждено соответствующими кривыми плавления. Однако в результате замены нуклеотида последовательности зондов перестали быть полностью комплементарными ДНК-мишени. Для восстановления комплементарного взаимодействия с зондом в последовательность амплифицируемой ДНК-мишени методом сайт-направленного мутагенеза также были введены соответствующие замены нуклеотидов. Предложенный подход позволил существенно повысить уровень специфических флуоресцентных сигналов в ячейках биочипа и провести корректное определение генотипов для rs699 и rs4986893.

Ключевые слова: внутримолекулярный дуплекс, шпилечная структура, ДНК, биологические микрочипы, гибридизация, кривая плавления.

DOI: 10.1134/S0006302918060066

Биологические микрочипы (биочипы, microarrays) получили широкое распространение в молекулярно-генетических исследованиях как быстрый, недорогой и высокопроизводительный метод определения мутаций, профиля экспрессии генов, идентификации микроорганизмов на основе гибридизационного анализа [1]. Чувствительность и специфичность микрочипов как инструмента анализа зависят от кинетики гибридизации, температуры проведения реакции, концентрации зондов и мишени и других факторов [2]. Были проведены многочисленные экспериментальные исследования и предложены различные теоретические модели для описания кинетики и термодинамики твердофазной гибридизации нуклеиновых кислот [3–5].

Гидрогелевые биочипы получили развитие, в первую очередь, как диагностический инструмент, применяемый в разных областях меди-

цины [6–8]. Именно поэтому вопросы чувствительности и специфичности гибридизации при проведении гибридизационного анализа приобретают первостепенное значение. Вместе с тем в ряде случаев возникают сложности при определении клинически значимых ДНК-маркеров в связи с особенностями самой последовательности ДНК в анализируемой области, в том числе в результате образования внутримолекулярных структур типа «шпилек».

В настоящей работе исследовано влияние внутримолекулярных структур ДНК-зондов на результаты гибридизационного анализа на примере биочипа для идентификации фармакогенетических маркеров в гене ангиотензиногена *AGT* и генах цитохромов семейства P450 (*CYP2C9* и *CYP2C19*). Этот биочип применяется для определения индивидуальной чувствительности к ряду препаратов для лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

В гене *CYP2C9* наличие нуклеотидных замен в положениях 430C>T (rs1799853) и 1075A>C

Сокращения: ПЦР – полимеразная цепная реакция, п.о. – пара оснований.

(rs1057910) приводит к изменениям в аминокислотной последовательности белка, вследствие чего снижается его ферментативная активность («медленный метаболизм») [9]. Это важно учитывать при назначении таких препаратов, как варфарин и фенитоин [10,11].

В гене *CYP2C19* точечные замены могут также приводить к нарушениям функциональной активности фермента. Варианты 681G>A (rs4244285) и 636G>A (rs4986893) являются маркерами «медленного метаболизма», а замена в промоторной области –806 C>T (rs12248560), наоборот, повышает экспрессию гена и, соответственно, уровень активного белка. Эти аллели гена *CYP2C19* являются важными фармакогенетическими маркерами при назначении клопидогрела [12], некоторых антидепрессантов [13] и других лекарственных препаратов [14]. Существуют данные о влиянии rs699 в гене *AGT* на эффективность терапии ателололом [15], ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента [16] и других антигипертензивных препаратов.

Идентификация точечных полиморфизмов в генах *AGT*, *CYP2C9* и *CYP2C19* имеет большое значение для индивидуализации терапии и предотвращения тяжелых побочных эффектов. Поэтому создание методического подхода, который позволяет повысить точность определения значимых фармакогенетических маркеров, явилось актуальной задачей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотиды для иммобилизации на биочипе были синтезированы на автоматическом синтезаторе 394 DNA/RNA Synthesizer (Applied BioSystems, США) с использованием стандартной фосфоамидитной процедуры. На 3'-конец олигонуклеотидов помещали спейсер со свободной аминогруппой, который вводили при синтезе с помощью 3'-Amino-Modifier C7 CPG 500 (Glen Research, США). Биочипы были изготовлены методом фотоиндуцируемой совместной полимеризации олигонуклеотидов и компонентов полиакриламидного геля. В ячейках биочипа были иммобилизованы ДНК-зонды для анализа точечного полиморфизма в генах *AGT* (rs699), *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910) и *CYP2C19* (rs4244285, rs4986893, rs12248560). Подбор олигонуклеотидных зондов проводили с помощью программы Clone Manager 7 версии 7.11 (США). Структура и чистота синтезированных олигонуклеотидов была подтверждена методом MALDI TOF-масс-спектрометрии. Масс-спектры положительных ионов получены на приборе AB SCIEX 4800 Plus (Applied BioSystems, США) в линейном режиме

с использованием 3-гидроксипиколиновой кислоты в качестве матрицы.

При проведении гибридизационного анализа использовали ДНК, выделенную из крови человека с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, США) согласно инструкции производителя. Для наработки фрагментов ДНК использовали двухэтапную мультиплексную полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Реакционная смесь (25 мкл) на первом этапе ПЦР содержала 5 пкмоль каждого праймера, 67 мМ трис-НCl, рН 8,6, 166 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% тритона X100, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов, 2,5 ед. акт. Таq-полимеразы (Sileks, Германия) и матрицу в количестве не менее 10 нг геномной ДНК. Реакцию проводили в следующем режиме: предварительная денатурация ДНК при 94°C (5 мин), далее 35 циклов: 94°C, 30 с; 60°C, 30 с; 72°C, 1 мин; далее 72°C, 5 мин. Второй этап ПЦР проводили в реакционной смеси того же состава (в качестве матрицы использовали 2 мкл продукта первого этапа ПЦР), но с добавлением 8 мМ флуоресцентно-меченого аналога 5'-трифосфата 2'-дезоксинуридина (Cy5) и избытка обратных праймеров (50 пкмоль), для получения преимущественно одноцепочечного флуоресцентно меченого ПЦР-продукта.

Гибридизационную смесь, содержащую 25% формамида, 5 × SSPE (5 мМ ЭДТА, 745 мМ NaCl, 50 мМ фосфатный буфер рН, 7,0), 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) при выдержке 500 мс. Возбуждение флуоресценции осуществляли лазером с длиной волны 655 нм, регистрацию – в области 716 ± 22 нм. Анализ изображений проводили с помощью программы ImageWare (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия).

Электрофорез проводили в 2%-м агарозном геле с красителем SYBR Green I (Sileks, Германия). Учет результатов проводили с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США). Проводили гнездную ПЦР как описано выше. Для наработки продукта *AGT* rs699 использовали праймеры 5'-GACAA-GAAGTGCACCTCCCG-3' и 5'-GTCACCAGGTAT-GTCCGCAG-3' на первом этапе, 5'-GGAT-GTTGCTGCTGAGAAGATTG-3' и 5'-СТТGGGAAGTG-GACGTAGGTGTTG-3' – на втором этапе. Для наработки продукта *CYP2C19* rs4986893 использовали праймеры 5'-GATCAGCAATTTCTTAACT-TGATGGAAAA-3' и 5'-CATGGCTGTCTAGGCAA-

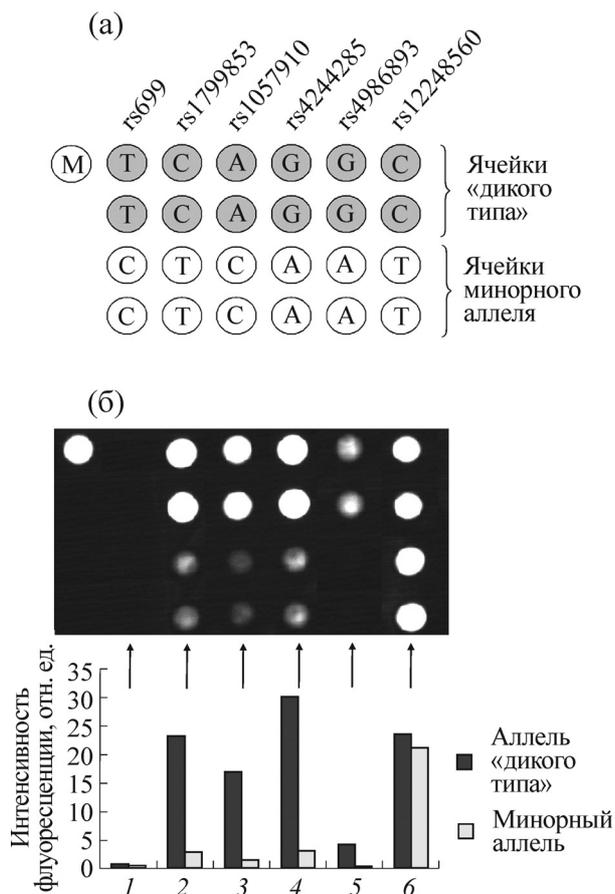


Рис. 1. Биочип для анализа фармакогенетических маркеров в генах *AGT* (rs699), *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910) и *CYP2C19* (rs4244285, rs4986893, rs12248560). (а) – схема биочипа (М – ячейки с красителем Cy5), (б) – картина гибридизации и значения сигналов флуоресценции.

GAATG-3' на первом этапе, 5'-GAATGAAAACAT-CAGGATTGTAAGCASC-3' и 5'-TGТАСТTCAGGGCT-TGGTC-3' – на втором этапе. Для определения длин фрагментов использовали ДНК-маркер 100–1000 п.о. («СибЭнзим», Россия)

Измерение поглощения олигонуклеотидов на длине волны 260 нм в буфере, содержащем 25% формамида, 5 мМ ЭДТА, 745 мМ NaCl, 50 мМ фосфатный буфер (pH 7,0), 35 мМ трис-HCl (pH 8,6), 8,3 мМ (NH₄)₂SO₄ и 1,25 мМ MgCl₂ (pH 8,0), в зависимости от температуры проводили на спектрофотометре Jasco V-550 (JASCO International Co. Ltd., Япония), оборудованном ячейкой Пельтье и термодатчиком. Спектры поглощения регистрировали каждые семь минут, увеличивая температуру образца со скоростью один градус в минуту (две минуты занимало измерение спектра и переключение температуры). Кривые аппроксима-

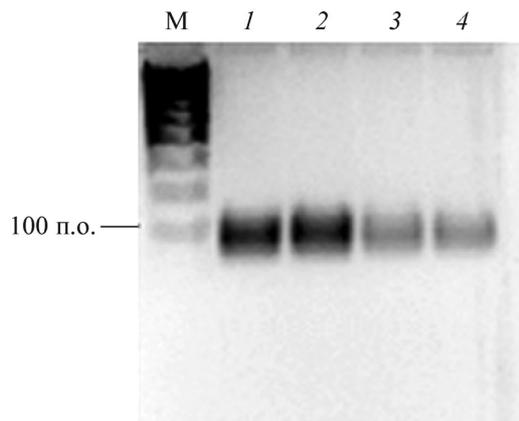


Рис. 2. Результат электрофореза ПЦР-продуктов *AGT* (rs699) (дорожки 1 и 2) и *CYP2C19* (rs4986893) (дорожки 3 и 4), М – маркер длин фрагментов.

ции получены с помощью метода наименьших квадратов и следующего уравнения [17]:

$$A_{260}(T) = A + B/(1 + (T/T_M)^N), \quad (1)$$

в котором A_{260} – поглощение олигонуклеотида на длине волны 260 нм, T – температура, A – поглощение олигонуклеотида на 260 нм при образовании вторичных структур, $A + B$ – поглощение олигонуклеотида на 260 нм в однонитевом состоянии, T_M – температура плавления вторичной структуры, N – параметр. Аппроксимацию проводили в программе OriginPro 8.6 (Origin Lab Corp., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биочип для анализа фармакогенетических маркеров в генах *AGT* (rs699), *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910) и *CYP2C19* (rs4244285, rs4986893, rs12248560) содержал 12 олигонуклеотидных зондов длиной 15–21 с расчетными температурами плавления 52–60°C. В результате мультитиплексной ПЦР получены флуоресцентно меченные продукты участков генов *AGT*, *CYP2C9*, *CYP2C19* и проведена гибридизация на биочипе. Схема биочипа и картина распределения флуоресцентных сигналов после гибридизации ДНК-мишени на биочипе представлены на рис. 1а, 1б. Сигналы флуоресценции от ячеек с зондами для локуса rs699 гена *AGT* практически отсутствовали. Сигналы от ячеек для локуса rs4986893 гена *CYP2C19* были в пять–шесть раз ниже по сравнению с сигналами от совершенных дуплексов в других ячейках биочипа, что не позволяло достоверно определить генотип образца (рис. 1б).

Для того чтобы убедиться в том, что участки генов *AGT* и *CYP2C19* нарабатываются в

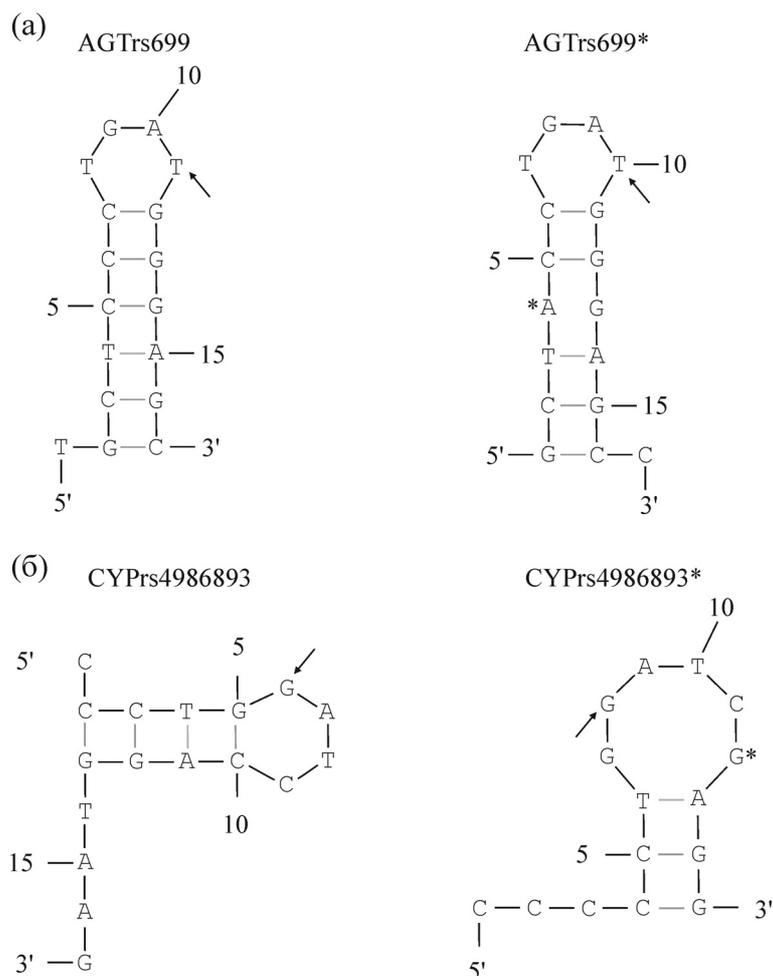


Рис. 3. Внутримолекулярные дуплексы длиной более двух пар оснований, образуемые последовательностью нуклеотидов «дикого типа» ДНК-зондов AGTrs699 (а) и CYPPrs4986893 (б). Слева представлены структуры с исходной последовательностью, справа – структуры, образуемые после замены нуклеотида (отмечены звездочкой). Стрелками отмечены позиции полиморфных нуклеотидов, распознаваемых в процессе гибридизации. Расчеты структур выполнены для раствора, содержащего 1 М NaCl.

ходе ПЦР, была проведена амплификация с локус-специфичными праймерами с последующим электрофорезом ПЦР-продуктов в агароз-

Таблица 1. Последовательности ДНК-зондов для анализа локусов генов *AGT* (rs699) и *CYP2C19* (rs4986893): исходный вариант и вариант с искусственной заменой нуклеотида (отмечен звездочкой) для последовательности «дикого типа». Варибельный нуклеотид, анализируемый на биочипе, отмечен подчеркиванием. Место замены нуклеотида отмечено серым цветом.

| Название ДНК-зонда | Последовательность 5'–3' |
|--------------------|--------------------------|
| AGTrs699 | TGCTCCTGATGGGAGC |
| AGTrs699* | GCTACCTGATGGGAGCC |
| CYPPrs4986893 | CCCTGGATCCAGGTAAG |
| CYPPrs4986893* | CCCCCTGGATCCGAGG |

ном геле (рис. 2). Расчетные длины ПЦР-продуктов составили 125 п.о. для *AGT* (rs699) и 134 п.о. для *CYP2C19* (rs4986893). Как видно из рис. 2, в ходе ПЦР нарабатываются продукты с длинами, соответствующими расчетным. Кроме того, результаты секвенирования ПЦР-продуктов по Сэнгеру показали, что они полностью соответствуют анализируемому участкам генов *AGT* и *CYP2C19*.

Было предположено, что отсутствие сигналов на биочипе обусловлено образованием внутримолекулярных структур в составе ДНК-зондов, препятствующих взаимодействию с ДНК-мишенью. Последовательности зондов приведены в табл. 1. Модели образования внутримолекулярных дуплексов для последовательностей зондов AGTrs699 и CYPPrs4986893, полученные с помощью программы Unafold, США [18], представлены на рис. 3. Последова-

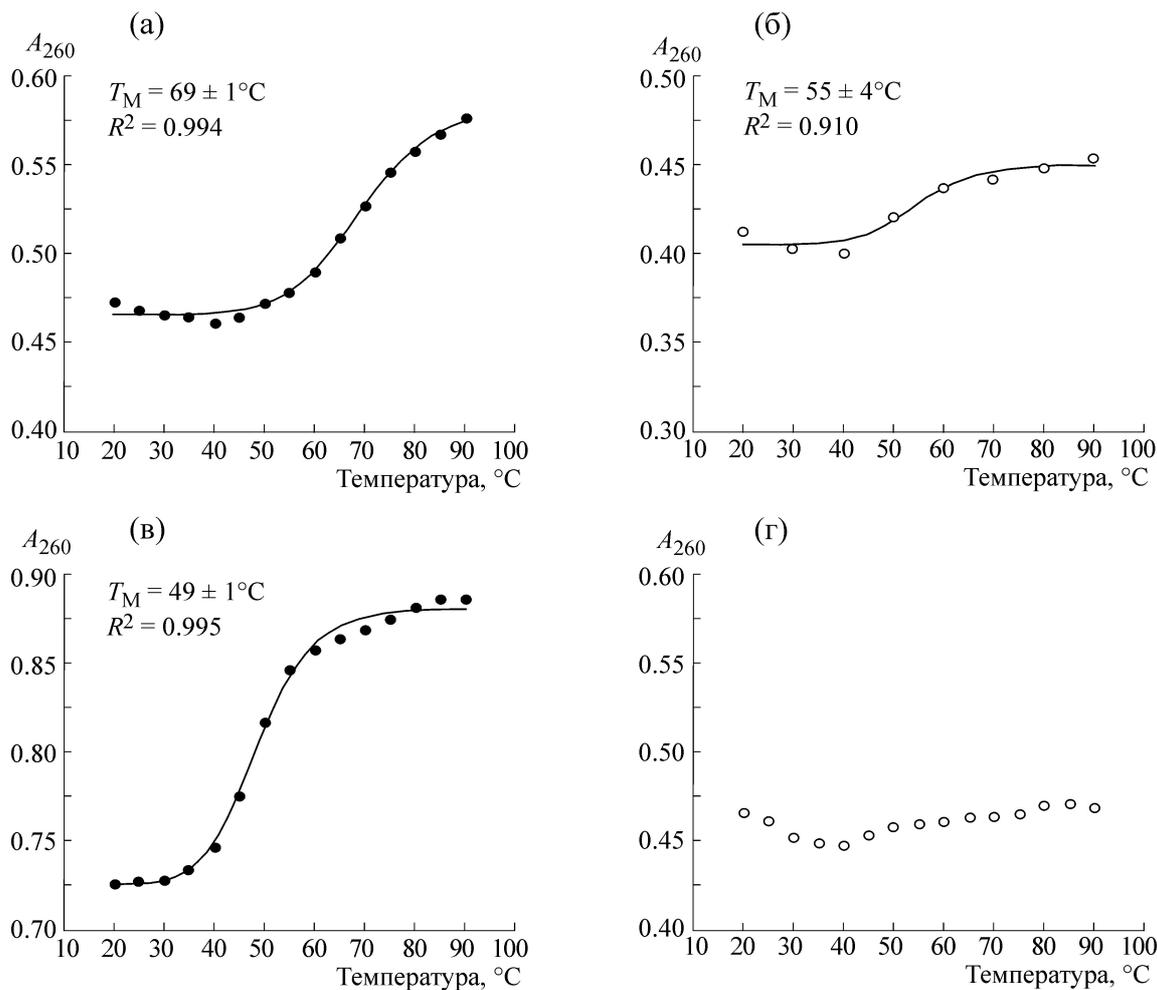


Рис. 4. Кривые плавления олигонуклеотидов AGTrs699 (а) и AGTrs699* (б), CYPrs4986893 (в) и CYPrs4986893* (г), полученные в гибридизационном буфере, содержащем 25% формамида, 5 мМ ЭДТА, 745 мМ NaCl, 50 мМ фосфатный буфер (pH 7,0), 35 мМ трис-HCl (pH 8,6), 8,3 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и 1,25 мМ MgCl_2 (pH 8,0) (суммарная ионная сила буфера эквивалентна 1 М NaCl). Указаны температуры плавления T_M внутримолекулярных дуплексов и коэффициент достоверности R^2 . О наличии внутримолекулярных дуплексов свидетельствует рост A_{260} с повышением температуры, приводящем к плавлению дуплекса.

тельность AGTrs699 длиной 17 нуклеотидов содержит стабильную шпильчатую структуру длиной шесть п.о. (рис. 3а), последовательность rs4986893 имеет в своем составе шпильку длиной четыре п.о. (рис. 3б). Сдвиг последовательности олигонуклеотидных зондов влево и вправо на два-три нуклеотида не привел к существенным изменениям в картинах гибридизации (данные не приводятся).

Для того чтобы предотвратить образование шпильчатой структуры в иммобилизованных олигонуклеотидных зондах, были синтезированы олигонуклеотиды с заменой одного из нуклеотидов в области шпильки (табл. 1). Это привело к заметным изменениям внутримолекулярной структуры олигонуклеотидов. Рассчитанная структура для зонда AGTrs699*, в ко-

тором цитозин (С) в положении 5 был заменен на аденин (А), показывает, что шпильчатая структура распадается на два коротких дуплекса длиной две и три п.о. соответственно (рис. 3а, структура справа). В последовательности CYPrs4986893* цитозин (С) в положении 10 был заменен на гуанин (G), кроме того, последовательность была сдвинута на два нуклеотида влево. Это также привело к изменению структуры ДНК-зонда. В случае CYPrs4986893* возможно образование трех различных структурных вариантов, два из которых имеют дуплексы длиной две пары оснований, а один – три пары оснований. Последний вариант представлен на рис. 3б (структура справа).

Для экспериментальной проверки предсказанных структур олигонуклеотидов проводили

Таблица 2. Характеристика внутримолекулярных структур в составе олигонуклеотидных зондов AGTrs699 и CYPPrs4986893 до и после введения искусственной замены нуклеотида

| Название зонда | Структурный элемент | Размер и положение элемента | T_M |
|-------------------|---|--|------------|
| AGTrs699 | Спираль Петля шпильки | 6 п.о. Замыкание парой C ⁷ -G ¹² | 69 ± 1°C |
| AGTrs699* | Спираль Внутренняя петля Спираль Петля шпильки | 3 п.о. Замыкание парой T ³ -A ¹⁴ и C ⁵ -G ¹² 2 п.о. Замыкание парой C ⁶ -G ¹¹ | 55 ± 4°C |
| CYPPrs4986893 | Спираль Петля шпильки | 4 п.о. Замыкание парой G ⁵ -C ¹⁰ | 49 ± 1°C |
| CYPPrs4986893*(1) | Спираль Петля шпильки | 3 п.о. Замыкание парой T ⁶ -A ¹³ | Менее 37°C |
| CYPPrs4986893*(2) | Спираль Петля шпильки | 2 п.о. Замыкание парой C ² -G ⁷ | Менее 37°C |
| CYPPrs4986893*(3) | Спираль Петля шпильки | 2 п.о. Замыкание парой C ³ -G ⁷ | Менее 37°C |

Примечание. П.о. – пара оснований (см. рис. 3), T_M – экспериментально определенные температуры плавления (см. рис. 4).

плавление олигонуклеотидных зондов AGTrs699T и AGTrs699T*, CYPPrs4986893 и CYPPrs4986893*. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 4. Характеристики внутримолекулярных структур (спирали и петли), а также экспериментально полученные значения температур плавления этих структур в гибридационном буфере представлены в табл. 2. Как видно из рис. 3 и 4, а также табл. 2, замена нуклеотида в области шпильки в обоих случаях привела к разрушению стабильного внутримолекулярного дуплекса, наличие которого, как предполагалось, препятствовало взаимодействию с ДНК-мишенью в процессе гибридизации.

Однако введение такой замены в последовательность зондов делает их не полностью комплементарными анализируемым участкам генов *AGT* и *CYP2C19*. Для решения этой проблемы использовали метод сайт-направленного мутагенеза. При амплификации ДНК-мишени

использовали праймеры, содержащие соответствующую замену нуклеотида на расстоянии четыре–пять п.о. от 3'-конца праймера. Это не препятствовало отжигу праймера на соответствующем участке ДНК-мишени и его дальнейшей элонгации. Таким образом, синтезированная *de novo* ДНК содержала искусственно введенную замену нуклеотида и была полностью комплементарной измененным олигонуклеотидным зондам (рис. 5).

Аналогичные изменения были внесены в ДНК-зонды для минорных аллелей генов *AGT* и *CYP2C19*. Картины гибридизации на биочипе, в ячейках которого иммобилизованы зонды с введенными нуклеотидными заменами, препятствующими образованию внутримолекулярных дуплексов в ДНК, представлены на рис. 6. Уровень флуоресцентных сигналов от ячеек биочипа, содержащих зонды AGTrs699* и CYPPrs4986893*, вырос в пять–шесть раз, что

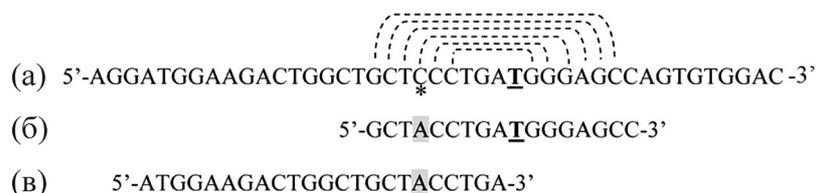


Рис. 5. Дизайн зонда и соответствующего праймера для сайт-направленного мутагенеза последовательности гена *AGT* (rs699): (а) – исходная последовательность ДНК в гене *AGT*, шпильчатая структура обозначена пунктиром, позиция заменяемого нуклеотида отмечена звездочкой, варибельный нуклеотид Т (rs699) отмечен подчеркиванием; (б) – последовательность зонда AGTrs699* с заменой С на А; (в) – праймер для амплификации участка гена *AGT*, замена нуклеотида выделена серым прямоугольником.

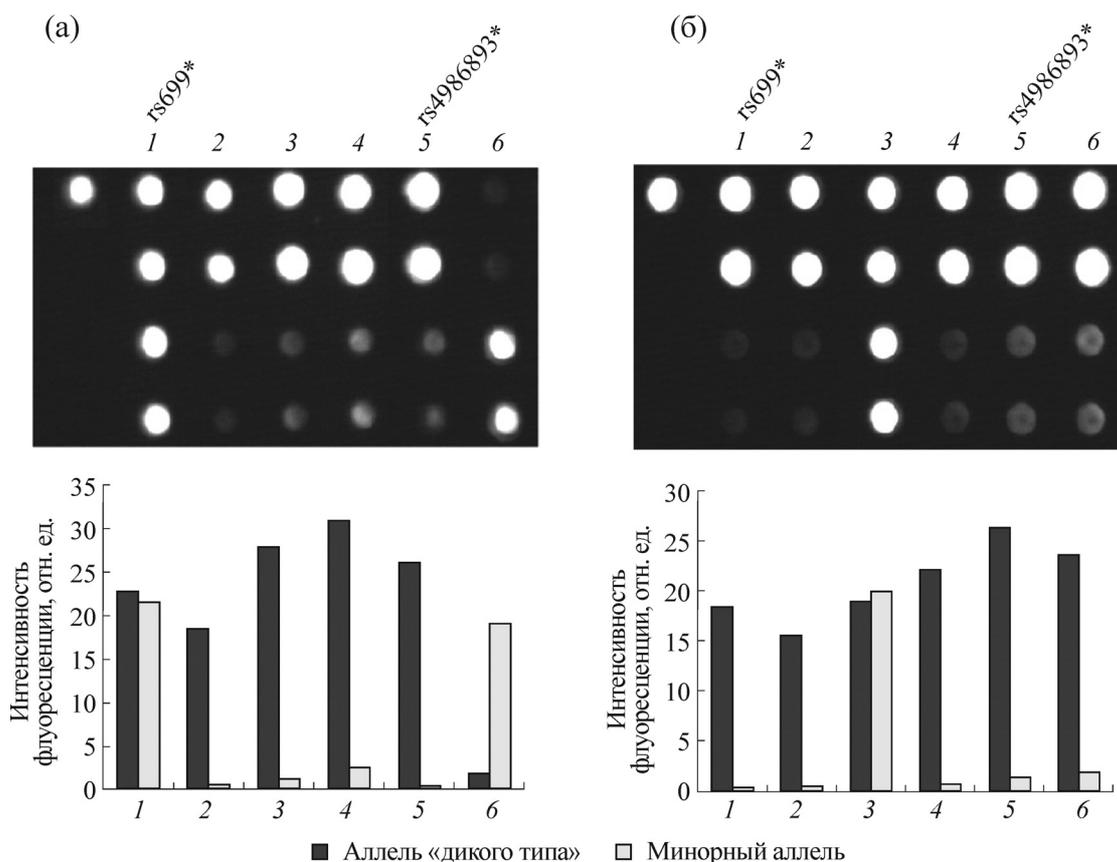


Рис. 6. Результаты гибридизации на биочипе, в ячейках которого иммобилизованы зонды с внесенными нуклеотидными заменами, препятствующими образованию внутримолекулярных дуплексов: (а) – гетерозигота по локусу *AGT* rs699 и гомозигота по аллелю «дикого типа» локуса *CYP2C19* rs4986893; (б) – гомозигота по аллелям «дикого типа» обоих локусов. Вверху представлены картины распределения флуоресцентных сигналов, внизу – диаграммы значений интенсивности флуоресценции в ячейках биочипа.

позволяет провести корректное определение генотипов для генов *AGT* и *CYP2C19*. На рис. 6а представлено изображение биочипа для образца, гетерозиготного по локусу rs699 и гомозиготного по локусу rs4986893, аллель «дикого типа»; на рис. 6б – для образца, гомозиготного по аллелям «дикого типа» обоих локусов.

В случае зонда CYPrs4986893* внесение од- нонуклеотидной замены привело к полному разрушению внутримолекулярных дуплексов при температуре гибридизации (37°C) (табл. 2). В случае зонда AGTrs699* снижение температуры плавления внутримолекулярных дуплексов на 15°C привело к дестабилизации шпильчатой структуры и обеспечило возможность корректного взаимодействия зонда с ДНК-мишенью с образованием межмолекулярных совершенных дуплексов между комплементарными последовательностями.

Несмотря на то что ДНК-микрочипы широко используются в биотехнологии и биомедицине, механизмы процесса твердофазной гиб-

ридизации нуклеиновых кислот изучены достаточно слабо [19]. В то же время для более полного использования потенциала биочипов как исследовательского и диагностического инструмента необходимо более глубокое и фундаментальное понимание закономерностей взаимодействия нуклеиновых кислот в различных условиях. В нашем случае дополнительное влияние на скорость протекания реакции гибридизации и эффективность образования совершенных и несовершенных дуплексов оказывает трехмерная структура ячеек полиакриламидного геля на поверхности биочипа, в которых иммобилизованы олигонуклеотидные зонды [20]. Уровень флуоресцентных сигналов зависит, в том числе, от скорости диффузии молекул ДНК в гелевые ячейки, что определяется составом геля и длиной анализируемого фрагмента ДНК-мишени [21]. Тем не менее нами получено выраженное соответствие между расчетными структурами, модельными экспериментами в растворе и результатами гибридизации на био-

чипе, что позволяет говорить об универсальности предложенных решений.

Таким образом, в работе продемонстрирован один из возможных подходов повышения эффективности гибридизации, иммобилизованных олигонуклеотидных зондов при наличии сложной внутренней структуры зонда, обусловленной последовательностью нуклеотидов.

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. X. Weng, in *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics* (Springer, New York, NY, USA, 2015), pp. 1–8.
2. J. H. Monserud and D. K. Schwartz, *ACS Nano*, **8**, 4488 (2014).
3. Y. A. Jakubek and D. J. Cutler, *BMC Genom.* **13**, 737 (2012).
4. D. Erickson, D. Li, and U. J. Krull, *Anal. Biochem.* **317**, 186 (2003).
5. A. Munir, H. Waseem, M. R. Williams, et al., *Microrarrays* **6** (2), E9 (2017).
6. D. Gryadunov, E. Dementieva, V. Mikhailovich, et al., *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **11** (8), 839 (2011).
7. D. Gryadunov, F. Nicot, M. Dubois, et al., *J. Clin. Microbiol.* **48** (11), 3910 (2010).
8. T. V. Nasedkina, N. A. Guseva, O. A. Gra, et al., *Mol. Diagn. Ther.* **13** (2), 91 (2009).
9. C. R. Lee, J. A. Goldstein, and J. A. Pieper, *Pharmacogenetics and Genomics* **12** (3), 251 (2002).
10. J. A. Johnson, K. E. Caudle, L. Gong, et al., *Clin. Pharmacol. Ther.* **102**, 397 (2017).
11. K. E. Caudle, A. E. Rettie, M. Whirl-Carrillo, et al., *Clin. Pharmacol. Ther.* **96**, 542 (2014).
12. S. A. Scott, K. Sangkuhl, C. M. Stein, et al., *Clin. Pharmacol. Ther.* **94**, 317 (2013).
13. J. K. Hicks, J. R. Bishop, K. Sangkuhl, et al., *Clin. Pharmacol. Ther.* **98**, 127 (2015).
14. A. Tornio and J. T. Backman, *Adv. Pharmacol.* **83**, 3 (2018).
15. L. Kurland, U. Liljedahl, J. Karlsson, et al., *Am. J. Hypertens.* **17**(1), 8 (2004).
16. H. Schelleman, O. H. Klungel, J. C. Witteman, et al., *Eur. J. Hum. Genet.* **15**(4), 478 (2007).
17. O. A. Zasedateleva, V. A. Vasiliskov, S. A. Surzhikov, et al., *Biotechnol. J.* **9** (8), 1074 (2014).
18. <http://unafold.rna.albany.edu>.
19. C. Trapp, M. Schenkelberger, and A. Ott, *BMC Biophys.* **4**, 20 (2011).
20. N. V. Sorokin, V. R. Chechetkin, M. A. Livshits, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.* **22** (6), 725 (2005).
21. N. V. Sorokin, D. Y. Yurasov, A. I. Cherepanov, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.* **24** (6), 571 (2007).

Structural Destabilization of Internal Duplexes Improves the Results of DNA Analysis via Hybridization

A.Yu. Ikonnikova, O.A. Zasedateleva, S.A. Surzhikov, V.O. Pozhitnova, D.O. Fesenko, A.A. Stomakhin, A.S. Zasedatelev, and T.V. Nasedkina

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

The method that allows for correct definition of point polymorphisms in DNA sequences able to form hairpin structures has been tested. As an example, the fragments of angiotensinogen (AGT) gene and the CYP2C19 gene, containing rs699 (T>C) and rs4986893 (G>A), respectively, were chosen. DNA probes, complementary to these sites, formed hairpin structure with the loop size of six nucleotides in case of rs699 (AGT gene) and of four nucleotides in case of rs4986893 (the CYP2C19 gene). Fluorophore-labeled target DNA was obtained after two-round multiplex PCR and simultaneous incorporation of fluorescently labeled fragments in the second round. Hybridization of the target DNA to a corresponding pair of probes immobilized in gel pads on a biochip revealed a complete lack of or substantially lowered fluorescent signals from the gel pads. The replacement of one nucleotide in the DNA probe sequences led to destruction of intramolecular structures as confirmed by the corresponding melting curves. However, because of this nucleotide replacement the DNA probe sequences have completely lost their complementarity to the target DNA. To restore the complementary interaction with the DNA probe, the corresponding nucleotide replacements in the amplified DNA target sequence were made using site-directed mutagenesis. It has been shown that using the proposed approach it was possible to increase significantly the level of specific fluorescent signals for the gel-based biochip and to carry out correct definition of genotypes for rs699 and rs4986893.

Keywords: intramolecular duplex, hairpin structure, DNA, biological microchips, hybridization, melting curve