

## НОВАЯ КОНСТРУКЦИЯ ДНК-РЕПОРТЕРА ДЛЯ ИММУНО-ПЦР

© 2012 г. И. Г. Никитина, Ю. А. Букурова, В. Л. Карпов, Н. А. Лисицын, С. Ф. Берестень\*

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 11999*

Поступила в редакцию 06.07.2011 г.

Принята к печати 08.09.2011 г.

Разработана новая конструкция ДНК-репортера для количественной детекции белков методом иммуно-ПЦР (полимеразной цепной реакции). Показано, что эффективность амплификации конструкции, содержащей фрагмент аденовируса 2 человека, на концах которого находится последовательность гомопраймера, значительно выше по сравнению с обычным форматом ПЦР, основанным на использовании двух праймеров с различными последовательностями. Разработанная конструкция и система ее детекции могут быть использованы для значительного повышения чувствительности иммуно-ПЦР и эффективности ПЦР единичных молекул.

**Ключевые слова:** ПЦР единичных молекул, иммуно-ПЦР, ДНК-репортер, гомопраймер.

**A NEW CONSTRUCT OF DNA REPORTER FOR IMMUNO-PCR, by I. G. Nikitina, Yu. A. Bukurova, V. L. Karpov, N. A. Lisitsyn, S. F. Beresten\*** (Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; \*e-mail: sberesten@gmail.com). A new construct of DNA reporter has been designed for protein quantification by immuno-PCR. It has been shown that amplification efficiency of a reporter that contains a fragment of human adenovirus 2 flanked by homoprimer sequences is much higher vs. standard PCR format based on use of two different primers. Application of a new construct and its homoprimer-based detection opens a way to a significant increase in the immuno-PCR sensitivity and the efficiency of single molecule PCR.

**Keywords:** single molecule PCR, immuno-PCR, DNA reporter, homoprimer.

Разработанный почти тридцать лет назад метод ПЦР-амплификации фрагментов ДНК [1] нашел широкое применение в молекулярной биологии, медицинской диагностике, криминалистике и ряде других областей [2]. Многочисленные модификации основного протокола широко используются для количественной детекции и синтеза фрагментов ДНК, кДНК копий мРНК и микроРНК, а также для анализа белков методом иммуно-ПЦР. В наиболее часто используемом формате ПЦР в реакционную смесь добавляют два праймера, комплементарных 3'-концевым последовательностям амплифицируемого фрагмента ДНК. Такой формат хорошо работает в большинстве областей применения, однако для амплификации единичных молекул ДНК требуется 60–80 циклов ПЦР, проводимых в два раунда [3]. Ранее показано, что эффективность ПЦР единичных молекул значительно повышается при наличии идентичных последовательностей на 3'-концах амплифицируемого фрагмента [4–6]. При этом для ПЦР используется только один олигонуклеотид (гомопраймер). В

данной работе синтезирован ДНК-репортер новой конструкции, содержащий одну и ту же последовательность на обоих концах. Показано, что эффективность амплификации такого репортера значительно выше по сравнению со стандартным форматом. Использование новой конструкции ДНК-репортера позволит повысить чувствительность детекции низкокопийных белков методом иммуно-ПЦР, а также увеличить эффективность амплификации единичных молекул ДНК в процессах секвенирования и генотипирования.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Химико-ферментативный синтез ДНК-репортера.** Олигонуклеотидные последовательности верхней и нижней цепей фрагмента аденовируса, праймеры TopR, BottomR и гомопраймер R получены на синтезаторе 3400 (“Applied Biosystems”, США) и очищены с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Смесь фрагментов 2–6 верхней цепи, а также смесь фрагмента 1 с шестью олигонуклеотидами нижней цепи (по 2 мкмоль каждого в объеме 25 мкл) фосфорилировали с использованием ки-

\* Эл. почта: sberesten@gmail.com

ПЦР-праймеры, использованные в работе

Праймеры*	Последовательности
TopR	5'-caagGGATCCagcactctccagcctctcaccgacTAGAATTGGATGGAATTAACACC
BottomR	5'-tattGGATCCagcactctccagcctctcaccgacACCACACATGGTTTTAATAAGAG
R	5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAC

\*Последовательности праймеров TopR/BottomR включали: четыре основания, необходимых для последующей рестрикции ПЦР-продукта (строчные буквы); последовательность узнавания эндонуклеазой рестрикции BamHI, что необходимо для клонирования репортера в состав плазмиды (заглавные буквы); 24 основания гомопраймера R (строчные буквы) и 23 основания, комплементарных последовательности аденовируса (заглавные буквы). Праймеры TopA и BottomA, содержащие концевые последовательности фрагмента аденовируса, использовались для ПЦР ДНК-репортера в стандартном формате.

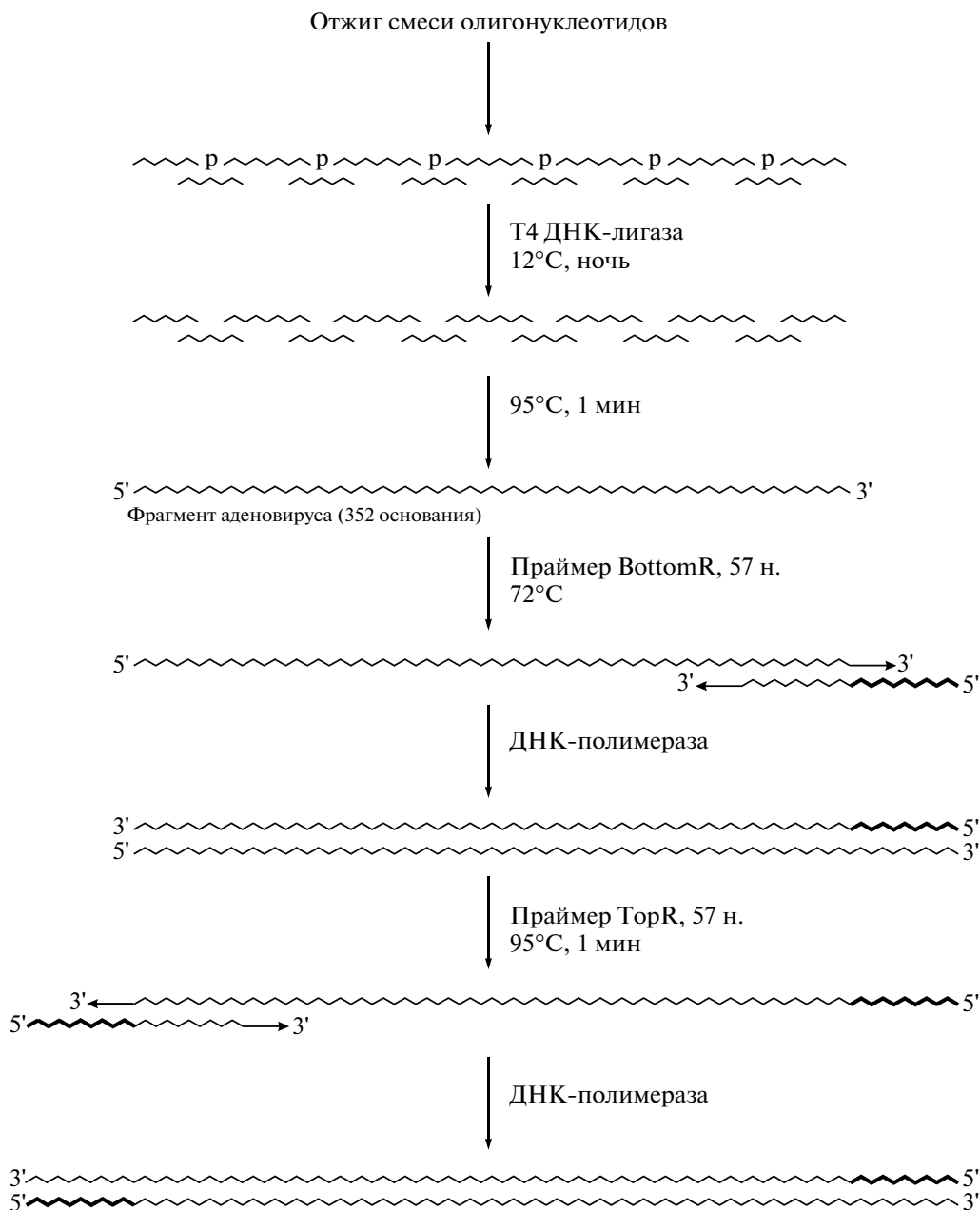
назы фага T4 по стандартному протоколу [7]. После инактивации киназы (55°C, в течение 15 мин) объединяли по 5 мкл каждой из двух смесей, прогревали олигонуклеотиды при 95°C в течение 1 мин и отжигали их друг на друга в результате медленного остывания термоблока до комнатной температуры.

Лигирование отожженных олигонуклеотидов проводили в течение ночи в объеме 50 мкл в стандартных условиях [7], а затем добавляли 450 мкл TE-буфера 10 mM Трис-НСI (рН 8.0), 1 mM ЭДТА с тРНК (5 мкг/мл). Один микролитр лигата переносили в 50 мкл ПЦР-смеси, содержащей: 67 mM Трис-НСI, рН 8.8, при 25°C, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM β-меркаптоэтанол, 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 300 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 1 мкМ праймеры TopR и BottomR (таблица) и 2 ед. Taq ДНК-полимеразы ("Fermentas", Литва). После денатурации цепей (95°C, 2 мин) проводили 20 циклов амплификации (95°C, 30 с, 72°C, 2 мин) и окончательную застройку (72°C, 3 мин). ПЦР-продукт гидролизовали рестрикционной эндонуклеазой BamHI и лигировали с линейаризованной эндонуклеазой BamHI плазмидой pUC19, которую предварительно дефосфорилировали бактериальной щелочной фосфатазой. Последовательности вставок, содержащихся в пяти независимых клонках, полученных в результате трансформации клеток *E. coli*, определяли секвенированием.

**ПЦР амплификация единичных молекул ДНК-репортера.** Разведения плазмиды в буфере TE с тРНК (5 мкг/мл) использовали для ПЦР (40 циклов) в присутствии 1 mM гомопраймера, как описано выше (таблица). Наличие ПЦР-продукта определяли электрофорезом в 2%-ном агарозном геле.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе проведен синтез ДНК-репортера, на концах которого находится последовательность гомопраймера. В качестве центральной последовательности, фланкированной гомопраймером, был выбран BglIII фрагмент ДНК аденовируса 2 человека длиной 352 п.н., результаты амплификации которого в сложных смесях с использованием гомопраймера описаны ранее [4]. Верхнюю цепь последовательности репортера подразделили на семь фрагментов длиной 48–55 н., а в местах шести стыков этих фрагментов на нижней цепи выбрали комплементарные олигонуклеотиды длиной 30–35 н., перекрывающие точку стыка на 15–17 н. в каждую сторону (рис. 1). Химически синтезированные олигонуклеотиды фосфорилировали, отжигали и лигировали по схеме, приведенной на рис. 1. Верхнюю цепь репортера амплифицировали в присутствии концевых праймеров TopR и BottomR (таблица). Короткие концевые фрагменты ПЦР-продукта отщепляли рестрикционной эндонуклеазой BamHI, а центральный фрагмент ДНК с липкими концами лигировали в состав плазмидного вектора. Лигат использовали для трансформации клеток кишечной палочки, из полученных индивидуальных колоний выделяли плазмиды, затем последовательности вставок определяли секвенированием. Таким образом получили плазмиду, содержащую ДНК-репортер новой конструкции. Последующие эксперименты показали значительное увеличение эффективности ПЦР-амплификации плазмидной вставки по сравнению со стандартным форматом [8]: после 40 циклов ПЦР надежно детектировались четыре молекулы в образце при полном отсутствии ложноположительных результатов, тогда как при использовании стандартного формата в пробе, со-

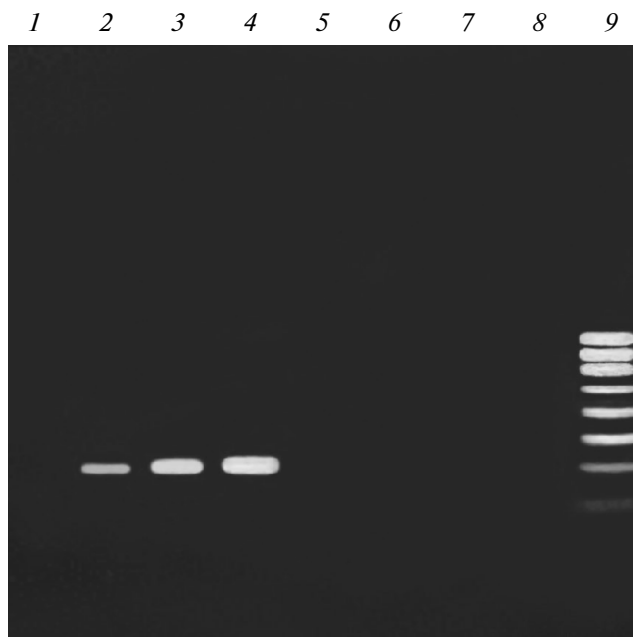


**Рис. 1.** Схема химико-ферментативного синтеза ДНК-репортера.

держашей 36 молекул репортера, специфичного продукта ожидаемой длины обнаружить не удастся (рис. 2).

Увеличение эффективности амплификации единичных молекул ДНК при использовании гомопраймера может быть связано с образованием шпилек комплементарными концами амплифицируемых цепей ДНК. Это резко ограничивает вероятность конкурирующей с основным процессом неспецифической амплификации вследствие про-

странственных ограничений, возникающих при “неправильном” отжиге праймера к внутренним (“неконцевым”) последовательностям ДНК. Вследствие этого амплификация репортера при использовании гомопраймера оказывается возможной лишь в случае разрушения шпильки в результате “правильного” отжига присутствующего в избытке гомопраймера к 3'-концам цепей ДНК-репортера. Разработанная конструкция репортера позволяет значительно повысить эффективность



**Рис. 2.** ПЦР единичных молекул фрагмента ДНК аденовируса с использованием гомопраймера (1–4) и в стандартном формате (5–8). Число молекул ДНК-репортера на пробирку: 0 (1 и 5), 4 (2 и 6), 12 (3 и 7), 36 (4 и 8). 9 – маркер молекулярного веса ДНК (1 kb DNA ladder компании “Invitrogene”).

амплификации ДНК при заметном уменьшении количества ложноположительных результатов. Это открывает возможность повышения чувствительности анализа содержания низкокопийных белков в норме и патологии с использованием метода иммуно-ПЦР, а также синтеза и клонирования протяженных участков ДНК *in vitro* с использованием ПЦР единичных молекул.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 14.740.11.0757).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., et al. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. **230**, 1350–1354.
2. Bartlett J.M., Stirling D. 2003. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol. Biol.* **226**, 3–6.
3. Nakano M., Komatsu J., Kurita H., et al. 2005. Adaptor polymerase chain reaction for single molecule amplification. *J. Biosci. Bioeng.* **100**, 216–218.
4. Lisitsyn N., Lisitsyn N., Wigler M. 1993. Cloning the differences between two complex genomes. *Science*. **259**, 946–951.
5. Brownie J., Shawcross S., Theaker J., et al. 1997. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3235–3241.
6. Ben Yehzekel T., Linshiz G., Buaron H., et al. 2008. *De novo* DNA synthesis using single molecule PCR. *Nucl. Acids Res.* **36**, e107.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. 1984. *Молекулярное клонирование*. М: Мир.
8. Анедченко Е.А., Дмитриев А.А., Краснов Г.С. и др. 2008. Подавление экспрессии генов *RBSP3/CTDSPL*, *NPRL2/G21*, *RASSF1A*, *ITGA9*, *HYAL1* и *HYAL2* при немелкоклеточном раке легкого. *Молекуляр. биология*. **42**, 965–976.