



**ЧЕМЕРИС Дмитрий Алексеевич**

**ИЗОТЕРМИЧЕСКИЕ И УПРАВЛЯЕМЫЕ СМЕНОЙ ТЕМПЕРАТУР  
РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ  
ДЕТЕКЦИИ СПЕЦИФИЧНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ  
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ**

**03.00.03 — молекулярная биология**

**Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Работа выполнена в Институте биохимии и генетики Уфимского  
научного центра Российской академии наук**

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Никоноров Юрий Михайлович

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
Шакирова Фарида Миннихановна

доктор медицинских наук, профессор  
Мавзютов Айрат Радикович

**Ведущая организация:** Институт биологии гена РАН

Защита диссертации состоится «27» декабря 2006 г. в 14 часов  
на заседании Регионального диссертационного совета КМ 002.133.01  
при Институте биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН  
по адресу: 450054, Уфа, проспект Октября, 71.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Уфимского науч-  
ного центра РАН.

Автореферат разослан «27» ноября 2006 г.

Ученый секретарь Регионального  
диссертационного совета, к.б.н.



Бикбулатова С.М.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** После своего появления в середине 80-х гг. полимеразная цепная реакция (ПЦР) [Saiki et al., 1985; 1988] очень быстро стала по существу методом №1 в фундаментальных исследованиях нуклеиновых кислот и в ДНК-диагностике. Оставаясь таковым и поныне, она все же заметно изменилась, что в первую очередь связано с переводом этой реакции в режим реального времени, где детекция накопления ампликонов ведется в ходе самого процесса амплификации. ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) сильно повлияла на взгляды как исследователей, использующих метод ПЦР для получения новых знаний о функционировании генов и геномов, так и тех, кто занят исключительно ДНК-диагностикой. Если для первых главным среди других задач является возможность количественного определения с помощью ПЦР-РВ числа копий мишени в стартовом материале, то вторые, помимо этого, отдают ей предпочтение еще и ввиду практически полного исключения загрязнения ампликонами рабочих помещений и сведения, таким образом, риска получения ложнопозитивных результатов к абсолютному минимуму, что при массовом характере анализов при использовании обычной ПЦР удастся добиться далеко не всегда. Однако, несмотря на большое количество предложенных вариантов детекции ампликонов в ПЦР-РВ [Higuchi et al., 1993; Lee et al., 1993; Tyagi et al., 1996; Nazarenko et al., 1997; Whitcombe et al., 1999; Rasmussen et al., 2003; Costa et al., 2004; Sherrill et al., 2004; Monis et al., 2005 и др.], остается возможность разработки новых способов, по некоторым параметрам превосходящих существующие.

Вслед за ПЦР на рубеже 90-х гг. появился целый ряд других реакций амплификации и способов высокочувствительной детекции специфичных фрагментов ДНК или РНК, среди которых можно отметить лигазную цепную реакцию (ЛЦР) [Barany, 1991], амплификацию смещением цепи [Walker et al., 1992], ее разновидность в виде амплификации катящимся кольцом [Lizardi et al., 1998], технологию циклирующей пробы [Duck et al., 1990], самоподдерживающуюся репликацию [Guatelli et al., 1990; Compton, 1991], Q $\beta$ -репликационную амплификацию [Lomeli et al., 1989], разветвленную гибридизационную пробу [Horn, Urdea, 1989]. К настоящему времени большинство из них переведены в передовую и наиболее удобный для ди-

агностики режим реального времени, однако в ряде случаев такой перевод оказался не очень эффективным и не лишенным серьезных недостатков.

Особый интерес эти реакции вызывают еще и тем, что все они (за исключением ЛЦР и стандартной ПЦР) протекают в изотермических условиях, благодаря чему нет потерь времени на смену температур и за счет этого не происходит искусственного сдерживания работы ферментов, что в ряде случаев более технологично.

**Цели и задачи исследования.** Цели исследования заключались в разработке новых вариантов управляемых сменой температур или протекающих изотермически в режиме реального времени реакций амплификации и высокочувствительной детекции нуклеиновых кислот и демонстрации их применения на практике.

В задачи исследования входило:

- 1) разработать основанный на флуоресцентном резонансном переносе энергии (FRET-эффекте) способ детекции ампликонов в ходе ПЦР-РВ на платформе "УФА" (Универсальная Флуоресцентная Амплификация) и показать возможность его применения для фундаментальных и прикладных исследований;
- 2) разработать способ детекции ампликонов в ходе ПЦР-РВ, основанный на временном гашении свечения флуорохрома, находящегося с гасителем в одном праймере, и возникновении флуоресценции вследствие расщепления ампликона термостабильной рестрикционной эндонуклеазой;
- 3) разработать основанный на FRET-эффекте способ детекции ампликонов в ходе ЛЦР-РВ, обеспечивающий отсутствие нематричного лигирования;
- 4) разработать новый способ детекции специфичных фрагментов ДНК путем объединения технологии циклирующей пробы с амплификацией по типу катящегося кольца с образованием множественных дезоксирибозимов 10-23;
- 5) разработать новый способ детекции ампликонов на платформе "УФА" в ходе двухпраймерной амплификации катящимся кольцом (раификации) в реальном времени;
- 6) преобразовать гибридизационную цепную реакцию нуклеиновых кислот в режим реального времени (ГЦР-РВ);
- 7) показать применимость разработанных методов амплификации и высокочувствительной детекции на практике.

**Научная новизна и практическая значимость.** Разработан улучшенный способ детекции накопления ампликонов в ПЦР-РВ на платформе "УФА", по большинству параметров превосходящий аналогичные методы. Показана применимость данного способа ПЦР-РВ для проведения как ДНК-диагностики, так и для фундаментальных исследований, где он может быть использован для определения уровня экспрессии генов, содержащих интроны, а также безинтронных генов без ДНКазной обработки. Разработан способ детекции ампликонов в ПЦР-РВ, основанный на временном гашении свечения флуорохрома, расположенного с гасителем в пределах одного праймера и возникновении флуоресценции вследствие их разобщения в процессе расщепления ампликона термостабильной рестриктазой *Tmi* в ходе самой амплификации. Путем использования FRET-эффекта ЛЦР переведена в режим реального времени и при этом нематричное лигирование с помощью LiCl сведено к минимуму. Разработана ГЦР-РВ, основанная в варианте I на временном гашении свечения флуорохрома темновым гасителем, а вариант II рассчитан на эффект FRET. Продемонстрирована высокая специфичность данной реакции, позволяющая дискриминировать инициаторные молекулы с единичными заменами нуклеотидов, что может быть использовано при анализе однонуклеотидного полиморфизма ДНК человека. Показана возможность использования в ГЦР молекул РНК в качестве инициатора самосборки без их перевода в кДНК. Произведено объединение технологии амплификации ДНК катящимся кольцом с регистрацией этого процесса с помощью циклирующих проб, расщепляемых под действием образующихся при смещении цепи ДНК множественных дезоксирибозимов. Показано, что протекание двухпраймерной рамификации в реальном времени может контролироваться с помощью регистрации FRET-эффекта на платформе "УФА".

Практическая значимость работы заключается в значительном расширении спектра методов амплификации и высокочувствительной детекции в реальном времени специфичных последовательностей ДНК или РНК. Показана возможность их использования как для фундаментальных, так и прикладных целей, в том числе для детекции коронавируса, хантавируса, вируса птичьего гриппа субтипа H5N1, выявления генетически модифицированных ингредиентов (ГМИ) путем обнаружения наиболее часто используемого для создания трансгенных растений промотора 35S.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на III съезде ВОГиС (Москва, 2004), международном симпозиуме "Трансгенные растения и проблемы биобезопасности" (Москва, 2004), II и III съездах Общества биотехнологов России (Москва, 2004, 2005), 2-ой международной конференции "Биотехнология-Биомедицина-Окружающая среда" (Пушино, 2005), 3-ей международной конференции "Международное сотрудничество в биотехнологии: ожидания и реальность" (Пушино, 2006), XIII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2006" (Москва, 2006), международной школо-конференции молодых ученых «Биотехнология будущего» (Санкт-Петербург, 2006), всероссийской научно-практической конференции "Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом" (Уфа, 2006).

**Конкурсная поддержка работы.** Исследования выполнены в рамках Программы государственной поддержки ведущих научных школ РФ – НШ-2217.2003.4, НШ-1003.2006.4 и Государственных контрактов ФЦНТИ №№ 02.445.11.7018, 02.445.11.7381.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 176 работ. Диссертация изложена на 158 страницах, содержит 53 рисунка и 2 таблицы.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Объектами исследований служили искусственные молекулы ДНК (олигонуклеотиды) и РНК (рибоолигонуклеотиды), синтезированные методом фосфорамидитного синтеза. 75 различных олигонуклеотидов длиной от 12 до 96 звеньев общей протяженностью свыше 2300 звеньев были синтезированы в ИБГ УНЦ РАН, в ЗАО "Синтол" (Москва) и НПО "Литех" (Москва). Часть из них имели различные модификации и несли различные флуорохромы, а также их гасители, фосфатные и биотиновые группы. В работе также были использованы природные молекулы ДНК и РНК, имеющие вирусное происхождение (вирус птичьего гриппа

субтипа H5N1, хантавирус серотипа PUU), бактериальное (*E.coli*), растительное (табак) и животное (лосось, курица, человек) происхождение.

ДНК из разных биологических объектов выделяли классическим фенольно-детергентным методом с перхлоратом натрия. РНК выделяли гуанидин тиоцианатным методом. Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса. Концентрацию РНК или ДНК в образцах определяли по оптической плотности на спектрофотометре SmartSpec Plus (Bio-Rad, США).

ПЦР "по конечной точке" проводили в ДНК амплификаторе Термик (ДНК-Технология, Россия). Амплификацию и высокочувствительную детекцию в реальном времени проводили в ДНК амплификаторах моделей iCycler iQ (Bio-Rad, США) и АНК-32 (ИАП РАН / ЗАО Синтол, Россия). При проведении изотермических реакций регистрация изменений флуоресценции раствора велась через равные промежутки времени, варьирующие в разных экспериментах от 10 до 60 сек.

Электрофоретический анализ продуктов ПЦР-РВ, ЛЦР-РВ, ГЦР-РВ, а также рамификации проводили в 10 - 12%-ных полиакриламидных гелях в приборе вертикального типа Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, США). Анализ более крупных молекул РНК или ДНК, включая плазмиды, проводился в 1%-ном агарозном геле в приборе горизонтального типа Wide Mini (Bio-Rad, США). По завершению электрофореза гель окрашивали бромидом этидия и фотографировали в фотодокументационной системе Gel Camera System (UVP, Inc., США). Для олигонуклеотидов, несущих различные флуорохромы, а также ампликонов, полученных с их участием, перед окрашиванием сначала регистрировалась их собственная флуоресценция. Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей, подбор праймеров и олигонуклеотидов проводили с помощью пакета компьютерных программ Lasergene фирмы DNASTAR Inc. (США) и Oligo 4.1 (National Biosciences Inc., США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Поскольку ПЦР-РВ предназначена для выявления или количественной оценки тех или иных последовательностей ДНК или РНК, то размер целевых продуктов нет смысла делать большим. В разработанном нами варианте ПЦР-РВ раз-

мер ампликонов составляет всего 40 - 50 пн благодаря тому, что праймеры отжигаются встык или почти встык, что зависит от особенностей нуклеотидных последовательностей в конкретном выбранном месте. При подборе праймеров учитывалась возможность включения в них внутренних меток в виде флуорохромов, представляющих или пару донор/акцептор или пару краситель/гаситель. Подход к проведению ПЦР-РВ с таким расположением внутренне меченных соответствующими флуорохромами прямого и обратного праймеров (рис. 1) был назван "УФА" ("Универсальная Флуоресцентная Амплификация"), поскольку оказалось, что такой способ детекции флуоресценции, возникающей благодаря FRET-эффекту между донорным и акцепторным красителями, может быть использован и для других методов амплификации нуклеиновых кислот.

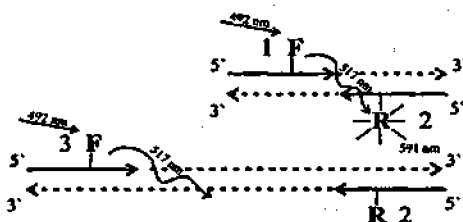


Рис. 1. Схема ПЦР-РВ на платформе "УФА" с FRET-эффектом между донорным (F - FAM) и акцепторным (R - ROX) красителями. Волнистой стрелкой показан перенос энергии. Расходящиеся лучи от красителя-акцептора символизируют свечение

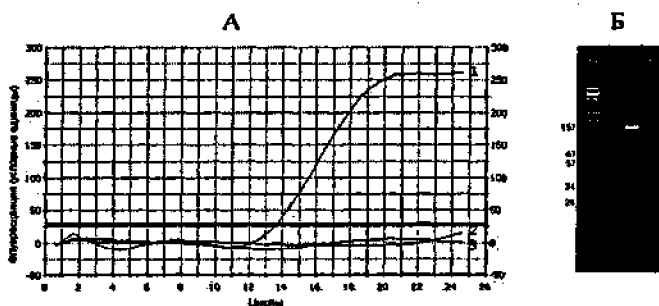


Рис. 2. ПЦР-РВ на платформе "УФА". А - кривые роста флуоресценции. Б - электрофоретический анализ ампликонов. 1 - праймеры 1 и 2; 2 - праймеры 3 и 2 (положительно-отрицательный контроль); 3 - праймеры 1 и 2 без матричной ДНК (отрицательный контроль), М - маркерная ДНК

Праймеры на отрицательно-положительный контроль подбирались с таким расчетом, чтобы расстояние между красителем-донором и красителем-акцептором не позволяло бы произойти FRET, но при этом нарабатывался бы соответствующий ПЦР-продукт. На рис. 2А виден рост флуоресценции целевого продукта, ограниченного праймерами 1 и 2, и отсутствие аналогичного подъема для пары праймеров 3 и 2. Электрофоретический контроль (рис. 2Б) показал, что основной целевой продукт, регистрируемый в ходе ПЦР-РВ, имеет ожидаемый размер в 42 пн, тогда как отрицательно-положительный контроль не показывал изменения сигнала флуоресценции во время ПЦР-РВ (рис. 2А), но при окрашивании бромистым этидием хорошо заметен.

Ввиду того, что не все ДНК амплификаторы с оптическим модулем рассчитаны на детекцию FRET-эффекта, нами был разработан вариант с гашением флуоресценции красителя, входящего в состав одного из праймеров, соответствующим гасителем, находящимся в составе другого праймера (рис. 3 и 4).

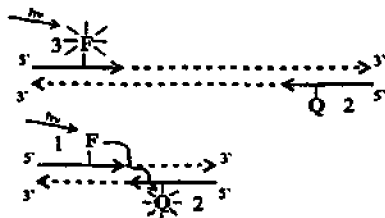
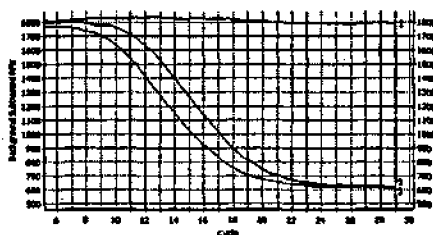


Рис. 4. Кривые изменения флуоресценции в варианте ПЦР-РВ с эффектом гашения. 1 - праймеры 3 и 2 (положительно-отрицательный контроль); 2 и 3 - праймеры 1 и 2 в присутствии ДНК-мишени, отличающейся по количеству на порядок

Рис. 3. Схема ПЦР-РВ с гашением флуоресценции красителя универсальным гасителем. Расходящиеся прямые лучи от красителя-донора символизируют свечение, а волнистые лучи, исходящие от гасителя, обозначают выделение тепловой энергии



В расположении меченых флуорохромами праймеров при отжиге на мишени в такой близости друг от друга при проведении варианта ПЦР-РВ с переносом энергии между ними на платформе "УФА" есть сразу несколько преимуществ.

Во-первых, такое расположение праймеров обеспечивает возникновение FRET-эффекта, ввиду того, что эффективность переноса обратно пропорциональна расстоянию между красителем-донором и красителем-акцептором в шестой степени и не может иметь место при расположении праймеров на некотором, и тем более, значительном удалении друг от друга.

Во-вторых, до минимума сокращается время, достаточное для удлинения праймера на требуемое количество нуклеотидов, и такой этап, как этап элонгации, становится не нужен, поскольку построение второй цепи ДНК успевает произойти полностью еще на этапе отжига или в ходе повышения температуры для денатурации ампликонов, что приводит к заметной экономии времени.

В-третьих, из-за того, что целевой продукт имеет небольшой размер, существенно снижается температура денатурации, при которой цепи ампликона должны разойтись и стать новыми матрицами для отжига праймеров. И здесь есть сразу два важных момента. С одной стороны, это экономия времени вообще, так как переходы от одной температуры к другой не мгновенны. Другим важным обстоятельством является сокращение времени пребывания ДНК полимеразы при неоптимальных для работы фермента температурах (повышенных) и тем самым продлевается время его жизни, обеспечивая в целом более надежную амплификацию.

В-четвертых, такое расположение праймеров способно обеспечить амплификацию довольно коротких фрагментов или, точнее, обломков молекул ДНК или РНК, которые с большей вероятностью могут сохраняться в старых или подвергнувшихся сильному разрушительному воздействию образцах.

В-пятых, благодаря расположению праймеров встык (или почти встык), можно считать, что число значимых нуклеотидов, исходя из которых рассчитывается количество возможных комбинаций, увеличивается вдвое, и для двух праймеров по 20 звеньев оно становится равным 40, что при возведении четырех азотистых оснований в сороковую степень дает гептиллион ( $10^{24}$ ) комбинаций. Тем самым обеспечивается высокая специфичность данного варианта ПЦР-РВ, поскольку случаи фальш-праймирования, вызванные отжигом на других местах, расположенных вплотную, сразу двух праймеров, "связанных" между собой эффектом переноса энергии, практически невозможны.

Что касается вероятного отжига праймеров самих на себя с образованием гетеродимеров, между которыми возможен FRET, то это может быть легко обнаружено на стадии плавления образовавшихся ампликонов, где наличие пика с меньшей температурой плавления, чем целевой продукт, будет свидетельствовать об имеющей место неспецифичной ПЦР, однако подобное должно быть полностью исключено еще на этапах подбора праймеров и отработки метода с конкретной их парой.

Еще один разработанный вариант ПЦР-РВ основан на временном гашении находящегося в составе одного праймера флуоресцентного красителя расположенным поблизости в нем же универсальным гасителем. Как можно видеть из приведенной на рис. 5 краткой схемы этой реакции, свечение красителя гасится универсальным гасителем до тех пор, пока не произойдет их физическое разобщение под действием термостабильной рестрикционной эндонуклеазы, расщепляющей возникающие в ходе ПЦР ее двуцепочечные сайты узнавания, нарушая тем самым целостность праймера, несущего краситель с гасителем. В данном случае расположение праймеров, как и в предыдущем варианте, встык друг к другу имеет под собой, помимо тех же причин в виде желаемого сокращения времени реакции и обеспечения амплификации деградированных фрагментов ДНК и РНК, еще и цель повысить тем самым специфичность реакции.

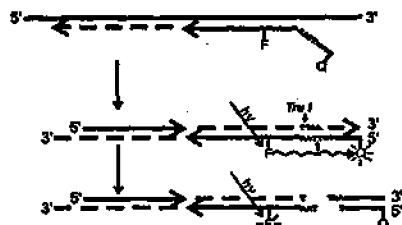
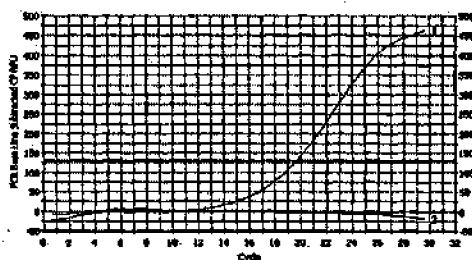


Рис. 6. Кривая роста флуоресценции в варианте ПЦР-РВ с расщеплением ампликонов термостабильной рестриктазой *TruI*. 1 - в присутствии рестриктазы *TruI*; 2 - в отсутствии рестриктазы *TruI*

Рис. 5. Сокращенная схема ПЦР-РВ с термостабильной рестрикционной эндонуклеазой *TruI* и временным гашением свечения флуоресцентного красителя (F) универсальным гасителем (Q)



Представленная на рис. 6 кривая роста флуоресценции свидетельствует о происходящем расщеплении увеличивающегося числа ампликонов под действием термостабильной рестриктазы *TthI*. Выбор фермента диктовался, в том числе, и узнаваемой им последовательностью (для *TthI* - T<sup>5</sup>TAA), поскольку она не должна быть GC-богатой, чтобы не повлечь за собой заметное повышение температуры денатурации ампликонов.

### Лигазная цепная реакция в режиме реального времени

Для ЛЦР-РВ применяли два варианта детекции ампликонов, один из которых был основан на использовании интеркалирующего красителя SYBR Green I, а второй - на возникновении FRET-сигнала между донорным и акцепторным красителями, входящими в состав соседних олигонуклеотидов, которые в результате лигирования становились цельной молекулой (рис.7). В первом случае (с SYBR Green I) флуоресценция раствора измерялась при температуре, выше той, что достаточна для плавления одиночных дуплексов (неизбежно образующихся в каждом цикле) и ниже температуры плавления двойного дуплекса, составляющего целевой продукт. Плавление получившихся продуктов (рис.8А) служило дополнительным контролем специфичности реакции, поскольку позволяло дискриминировать пики, принадлежащие одиночным и двойным дуплексам.

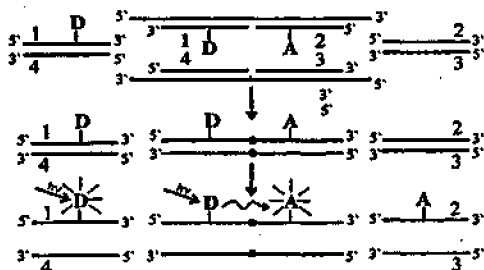


Рис. 7. Краткая схема ЛЦР-РВ с детекцией ампликонов с помощью FRET-сигнала. D - донорный краситель, А - акцепторный краситель. 1/4 и 2/3 - одиночные дуплексы, 1/4+2/3 - двойные дуплексы, представляющие собой целевой продукт

Регистрация роста флуоресценции в варианте с FRET (рис.8Б) велась при температуре, при которой происходила денатурация, в том числе, и двойных дуплексов, что исключало вероятность возникновения сигнала в результате простого

отжига соседних олигонуклеотидов на мишени, не сопровождающегося лигированием ввиду неспаривания нуклеотидов в месте образования ника.

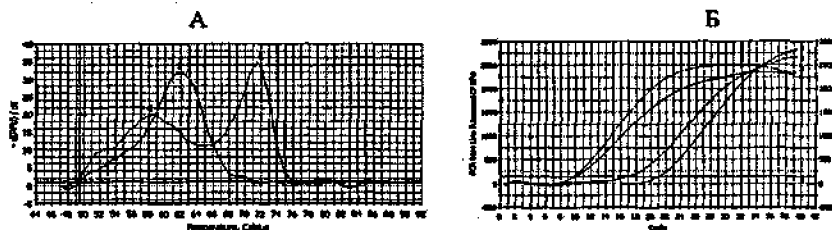


Рис. 8. Типичные профили плавления (А) при проведении ЛЦР-РВ, основанной на использовании интеркалирующего красителя SYBR Green I и кривые роста флуоресценции (Б) в ЛЦР-РВ, основанной на FRET-эффекте.

Определенную проблему при проведении ЛЦР представляет собой нематричное лигирование по тупым концам одиночных дуплексов, которое было сведено к минимуму путем добавления в лигазную смесь хлористого лития.

#### **Амплификация по типу катящегося кольца с дезоксирибозным расщеплением химерной пробы**

Объединение технологий циклирующей пробы и молекулярного сигнального огня, совмещенные с амплификацией по типу катящегося кольца, позволяет успешно детектировать однонуклеотидный полиморфизм, но при этом необходимо участие трех ферментов - ДНК лигазы, обеспечивающей дискриминирующее лигирование кольцевой матрицы ("С-пробы") на анализируемом (искомом) фрагменте ДНК; ДНК полимеразы со смещающей старую цепь ДНК активностью; РНКазы Н, разрушающей молекулярные сигнальные огни, представленные рибобиконами. Последний фермент может быть заменен дезоксирибозимом, возникающим в ходе смещения цепи ДНК, поскольку сконструированная С-проба содержит в своем составе, помимо участков для отжига искомой последовательности ДНК и участка для отжига удлиняющегося праймера, еще и антисенс-последовательность дезоксирибозима 10-23. Важным преимуществом замены РНКазы Н дезоксирибозимом является то, что в первом случае количество фермента в ходе реакции остается неизменным, и активность его может только падать, тогда как при изотермической

амплификации по типу катящегося кольца с образованием длинной цепи одноцепочечной ДНК на ней через равные промежутки формируются все новые дезоксирибозимы, служащие одновременно и местами отжига гибридизационных циклирующих проб в виде меченных флуорохромом и соответствующим ему гасителем химерных ДНК/РНК/ДНК-олигонуклеотидов (рис. 9).

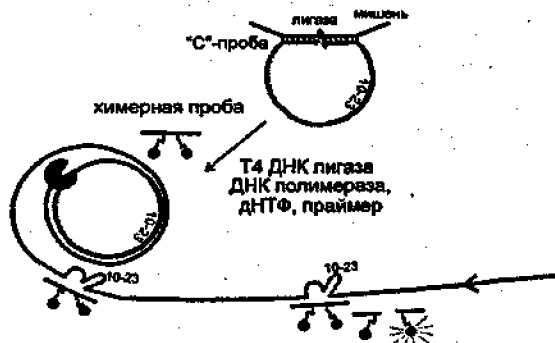


Рис. 9. Краткая схема технологии циклирующей пробы, совмещенной с амплификацией по типу катящегося кольца с образованием функциональных дезоксирибозимов 10-23.

На рис. 10 представлена кривая роста флуоресценции, возникающей за счет разрушения химерных проб и физического разобщения красителя с гасителем, типичная для всех опробованных температурных и концентрационных условий, поскольку дезоксирибозим способен проявлять свою каталитическую активность в широком диапазоне.

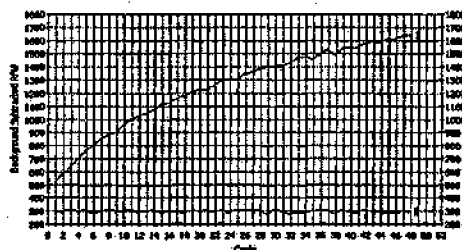


Рис. 10. Кривая роста флуоресценции в технологии циклирующей пробы, совмещенной с амплификацией катящимся кольцом с образованием функциональных дезоксирибозимов. 1 - лигированная С-проба; 2 - линейная С-проба

## Рамификация в реальном времени

Значительный интерес представляет реакция рамификации, где наличие двух праймеров, обеспечивает экспоненциальное накопление разветвленных продуктов такой реакции. С этой целью была синтезирована соответствующая С-проба, которая несла участки для отжига искомой последовательности ДНК, участок для отжига первого праймера и участок, представляющий собой копию второго праймера, на котором он мог отжигаться только после появления в реакционной смеси смещенной цепи ДНК, комплементарной исходному олигонуклеотиду. Для регистрации амплификации молекул ДНК, оба праймера были помечены флуоресцентными красителями FAM и ROX, составляющими пару донор/акцептор и позволяющими давать FRET-сигнал. Причем, для обеспечения переноса энергии расположение праймеров и красителей в них соответствовало принципу "УФА", подтверждая тем самым его универсальность.

Из приведенной на рис. 11А краткой схемы процесса рамификации видно, что по мере удлинения новой цепи ДНК образуется все большее число мест для отжига второго праймера, смещающего встречающиеся ему на пути вторичные цепи ДНК с таких же вторых праймеров, отжегшихся ранее, образуя фрагменты первичной С-пробы. В свою очередь, на этих образующихся фрагментах опять возникают множественные места отжига для первых праймеров, которые также удлиняются, смещая отжегшиеся ниже в направлении 5'→3'. Таким образом, в процессе рамификации в реакционной смеси постоянно присутствует довольно сложная смесь как одно- и двуцепочечных фрагментов ДНК, так и частично одноцепочечных, частично двуцепочечных.

Проведенный электрофоретический анализ продуктов реакции рамификации (рис. 11Б) показывает довольно сложную, но ожидаемую картину с наличием характерной "лестницы" полос ДНК. При этом в силу специфики рамификации, неизменным условием которой является смещение цепей ДНК, не все праймеры образуют места, где происходит FRET, что можно видеть из принципиальной схемы этой реакции. Тем не менее, образующихся конечных продуктов вкупе со временно

существующими промежуточными полупродуктами, где также возникает FRET-эффект, вполне достаточно для регистрации подъема флуоресценции раствора.

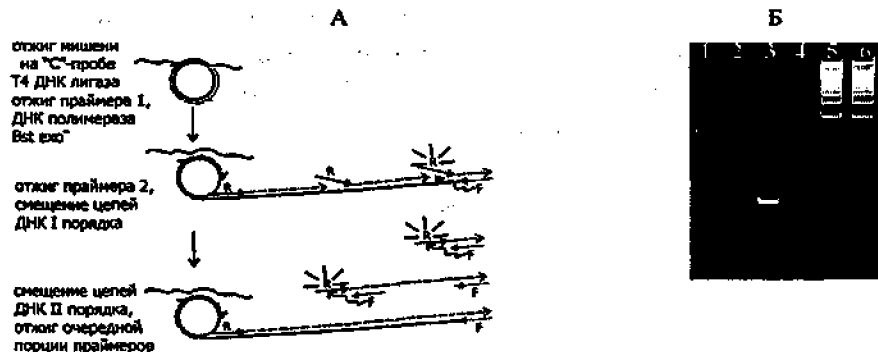


Рис. 11. Рамификация. А - краткая схема рамификации в реальном времени. Б - электрофорез продуктов рамификации. 1 - линейная С-проба; 2 - олигонуклеотид, имитирующий искомый фрагмент ДНК; 3 - праймер 1 с красителем-донором; 4 - праймер 2 с красителем-акцептором; 5 и 6 - продукты рамификации, отличающиеся различным количеством олигонуклеотида 2

### Гибридизационная цепная реакция в реальном времени

Движущей силой ГЦР является временно сокрытая энергия, заключенная в особым образом сконструированных олигонуклеотидных наноструктурах, представляющих собой шпильки с верхушечной петлей, двуцепочечным стержнем и одноцепочечным участком. В обычных условиях данные олигонуклеотидные конструкции стабильны и в отсутствии инициаторной молекулы не вступают в реакцию гибридизации. Однако стоит только появиться молекуле-инициатору в виде искомой последовательности нуклеиновых кислот, как шпильки раскрываются и начинает происходить рост цепей ДНК.

Теоретически потенциал ГЦР для целей ДНК и РНК диагностики весьма велик и мы посчитали возможным усовершенствовать эту реакцию путем перевода ее в режим реального времени (ГЦР-РВ), где детекция роста цепей ДНК может вестись по увеличивающейся флуоресценции соответствующего красителя за счет исчезновения эффекта гашения, что будет иметь место при пошаговом удлинении

цепей ДНК и разнесении за счет этого в пространстве пары молекул флуорохром/гаситель. С этой целью нами были синтезированы соответствующие модифицированные олигонуклеотиды с парой FAM/Dabcyl (рис. 12), а также различные варианты инициаторных молекул, включая более протяженные по длине, что имитировало случайно фрагментированную ДНК.

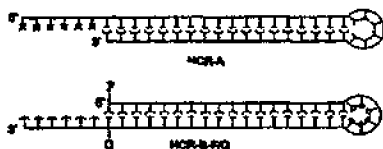


Рис. 12. Шпильчатые наноструктуры для метода ГЦР-РВ. F - флуоресцентный краситель, Q - универсальный гаситель. Комплементарные друг другу блоки нуклеотидов показаны комплементирующими символами

Проведенные эксперименты показали успешное преобразование ГЦР в ГЦР-РВ. Так, на рис. 13А можно видеть характерную кривую, свидетельствующую об увеличении свечения красителя, нарастающего в ходе реакции по мере того как все большее число шпилек оказывается вовлечено в построение цепей ДНК. При этом рост флуоресценции не наблюдался в реакционной смеси, где присутствовали одни шпильки без инициаторной ДНК.

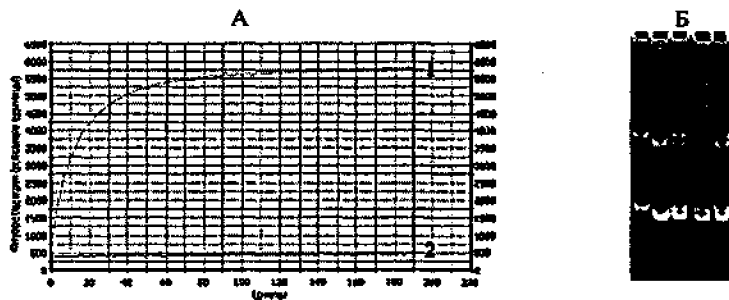


Рис. 13. ГЦР-РВ с эффектом дегащения флуоресценции. А - кривая роста флуоресценции. 1 - образец; 2 - отрицательный контроль (без инициатора). Б - электрофоретический контроль продуктов, образовавшихся в ходе ГЦР-РВ со шпильками, самосборка которых инициируется геном нуклеокапсидного белка хантавируса. 1. шпилька а; 2. шпилька б; 3. шпильки а и б; 4. шпильки а и б в присутствии одноцепочечной ДНК фрагмента гена нуклеокапсидного белка хантавируса; 5. шпильки а и б в присутствии чужеродной одноцепочечной ДНК

Электрофоретический анализ (рис. 13Б) подтвердил рост наноконструкций и отсутствие такового в образцах без инициатора. Присутствие неспецифической ДНК также не запускало процесс самосборки.

Другое свидетельство высокой специфичности ГЦР было получено путем опробования различных олигонуклеотидов, отличающихся от полностью комплементарного заменами отдельных оснований или делециями, на предмет их способности служить инициаторной молекулой, но ни один из них в таком качестве себя не проявил (рис. 14).

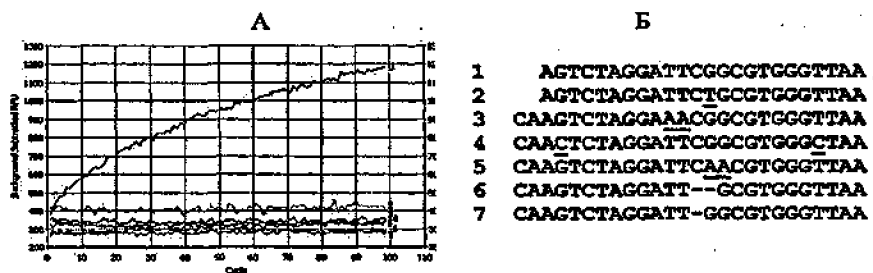


Рис. 14. Дискриминирующие способности ГЦР, обеспечивающие детекцию однонуклеотидного полиморфизма. А - кривые флуоресценции. Б - Инициаторные олигонуклеотиды. Подчеркивания и дефисы обозначают замены и делеции нуклеотидов

Исходя из описанного выше принципа расположения комплементарных участков были сконструированы наноструктуры с другими нуклеотидными последовательностями, включая пару ROX/Dabcyl. В качестве инициаторной молекулы был взят клонированный фрагмент гена нуклеокапсидного белка хантавируса. Еще один комплект таких олигонуклеотидных шпилек, несущих пару краситель/гаситель - R6G/BHQ1, и инициаторный олигонуклеотид к ним были изготовлены для детекции коронавируса. И те, и другие показали в целом типичное протекание ГЦР-РВ. Также были сконструированы варианты шпилек, отличающиеся местом расположения флуорохромов, что обеспечивало более заметное датирование флуоресценции в ходе ГЦР-РВ. В продолжение экспериментов на специфичность ГЦР, хотя и уже с другой целью, была успешно осуществлена мультиплексная

ГЦР-РВ, где велась одновременная детекция увеличения свечения обоих красителей FAM и ROX, что свидетельствовало о независимом росте обеих наноструктур.

Следует отметить, что для запуска ГЦР нет необходимости перевода молекул РНК в их ДНК-копию, поскольку нет препятствий к образованию ДНК/РНК-гетеродуплексов. При этом нами в качестве инициаторной молекулы вместо природной РНК был использован специально химически синтезированный рибоолигонуклеотид, также обеспечивший самосборку с характерной кривой роста флуоресценции.

Более перспективным является использование ГЦР-РВ, основанной на FRET-эффекте. С этой целью нами были сконструированы и синтезированы новые олигонуклеотидные шпильки, где одна из них в своей последовательности несла краситель-донор, а вторая - краситель-акцептор.

Как можно видеть из схемы ГЦР-РВ с использованием FRET-эффекта, приведенной на рис. 15, в процессе самосборки олигонуклеотидных шпилек донорные и акцепторные красители оказываются друг от друга на достаточно близком расстоянии, обеспечивающем перенос энергии, тогда как отдельные шпильки, не вовлеченные в цепную реакцию, вклада в регистрируемое свечение не вносят.

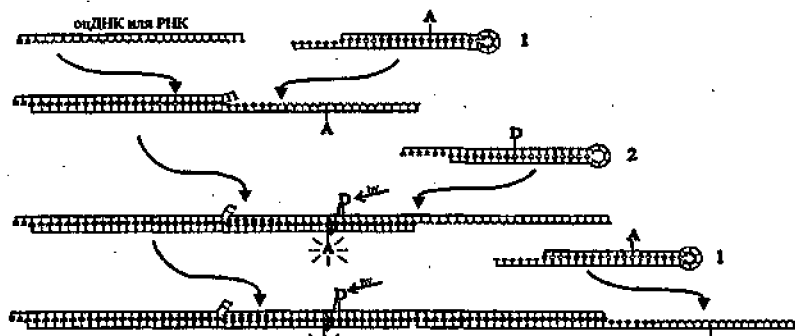


Рис. 15. Схема ГЦР-РВ с FRET-эффектом. D - краситель-донор, A - краситель-акцептор

В случае проведения ГЦР-РВ, основанной на FRET-эффекте, непосредственно в самом ДНК амплификаторе может быть обеспечен единый для всех образцов старт этой реакции путем нагрева реакционной смеси до температуры, при ко-

торой произойдет полная денатурация успевших собраться цепей ДНК, и исчезнет возникший FRET-сигнал. При снижении температуры реакции до оптимальной для самосборки, этот процесс запустится заново сам собой при условии присутствия в образце инициаторных последовательностей (рис. 16).

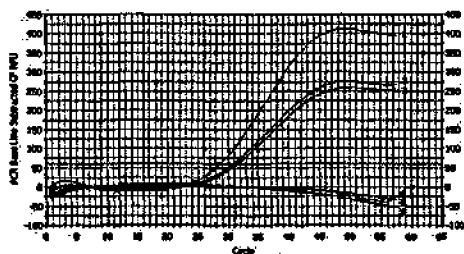


Рис. 16. Кривые роста флуоресценции в ГЦР-РВ, основанной на FRET-эффекте. 1 и 2 - разные количества инициаторных молекул, отличающиеся на порядок; 3 - то же что и 2, но с добавлением чужеродной денатурированной ДНК; 4, 5 и 6 - с отсутствием инициатора, при этом в 5 образце присутствует чужеродная денатурированная ДНК, а в 6 - чужеродная РНК

На основе разработанных в рамках данной работы методов амплификации и высокочувствительной детекции специфичных последовательностей нуклеиновых кислот в режиме реального времени были созданы соответствующие системы праймеров и олигонуклеотидных конструкций, пригодные для выявления и анализа промоторов, генов, их транскрипционных продуктов, прочих участков в геномах организмов различной сложности, среди которых РНК-содержащие хантавирусы и коронавирус, агробактерия, трепонема, ГМИ, ДНК человека и др.

## ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

1. Разработаны два скоростных и высокочувствительных способа детекции ампликонов в полимеразной цепной реакции в реальном времени, один из которых основан на переносе флуоресцентной резонансной энергии на платформе "УФА" (Универсальная Флуоресцентная Амплификация) между донорным и акцепторным красителями, входящими в состав прямого и обратного праймеров, отжигающихся встык; второй способ рассчитан на эффект гашения флуорохрома соответствующим гасителем, входящих в состав разных праймеров, отжигающихся аналогичным образом.

2. Разработаны варианты лигазной цепной реакции в реальном времени, основанные как на FRET-эффекте, так и на использовании интеркалирующего красителя SYBR Green I, в которых нематричное лигирование благодаря присутствию LiCl сведено к минимуму.

3. Произведено объединение технологии амплификации ДНК по механизму катящегося кольца с регистрацией этого процесса в реальном времени с помощью циклирующих химерных ДНК/РНК/ДНК-проб, расщепляемых под действием образующихся при смещении цепи ДНК множественных дезоксирибозимов.

4. Предложен способ детекции в реальном времени протекания реакции рамификации (двухпраimerной амплификации катящимся кольцом), основанный на переносе флуоресцентной резонансной энергии на платформе "УФА".

5. Разработано 2 варианта метода гибридизационной цепной реакции в реальном времени (ГЦР-РВ), особенностями которой является то, что она протекает изотермически, без участия ферментов и в ней происходит не амплификация нуклеиновых кислот, а под действием инициаторных (искомых) молекул ДНК или РНК имеет место способный дискриминировать в последовательности-мишени даже единичные замены нуклеотидов линейный рост олигонуклеотидных наноструктур, собираемых из пары особым образом сконструированных шпилек:

- вариант I ГЦР-РВ основан на детекции увеличивающейся флуоресценции соответствующего красителя за счет исчезновения эффекта гашения, происходящего при пошаговом удлинении цепей ДНК и разнесении за счет этого в пространстве все большего числа пар молекул флуорохром/гаситель, оба из которых находятся в одной из самособирающихся олигонуклеотидных шпилек;

- вариант II ГЦР-РВ рассчитан на детекцию роста цепей ДНК по увеличению свечения красителя-акцептора после переноса на него флуоресцентной резонансной энергии от красителя-донора, входящих по отдельности в состав пары подобных олигонуклеотидных шпилек, также подверженных процессу самосборки.

6. Показана принципиальная возможность применения ряда разработанных подходов для высокочувствительной диагностики возбудителей различных инфекций и детекции генетически-модифицированных ингредиентов, а также для анализа активности транскрипции как безынтронных, так и содержащих интроны генов.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Чемерис А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Гарафутдинов Р.Р., Малеев Г.В., Алексеев Я.И., Вахитов В.А. Лигазная цепная реакция в режиме реального времени - новая жизнь старой реакции и ее применение для детекции специфических фрагментов ДНК или РНК // Материалы II съезда Общества биотехнологов России. Москва, 2004. - С. 15-16.
2. Чемерис А.В., Никоноров Ю.М., Гарафутдинов Р.Р., Малеев Г.В., Чемерис Д.А., Вахитов В.А. Детекция специфичных фрагментов ДНК в молекулярно-генетических исследованиях и при анализе продуктов на ГМО. Новое в реал-тайм ДНК амплификации // Материалы III съезда ВОГиС "Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития". Москва, 2004. - С. 482.
3. Чемерис А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Гарафутдинов Р.Р., Малеев Г.В., Алексеев Я.И., Вахитов В.А. Лигазная цепная реакция в реальном времени и ее использование для детекции ГМИ // Материалы Международного симпозиума "Трансгенные растения и проблемы биобезопасности". Москва, 2004. - С. 112.
4. Чемерис А.В., Никоноров Ю.М., Вахитов В.А., Чемерис Д.А., Жукова И.Ю., Талипов Р.Ф., Гарафутдинов Р.Р., Малеев Г.В., Магазова Р.А., Вахитова Ю.В., Гималов Ф.Р. Способ амплификации с помощью лигазной цепной реакции специфических фрагментов ДНК или РНК и их детекция в режиме реального времени // Заявка на патент РФ №2003127702 от 15.09.2003 г., опубликована 10.04.2005.
5. Чемерис А.В., Никоноров Ю.М., Романенкова М.Л., Чемерис Д.А., Гарафутдинов Р.Р., Малеев Г.В., Алексеев Я.И., Вахитов В.А. Лигазная цепная реакция в реальном времени как альтернатива ПЦР в ДНК-диагностике. Новая жизнь старой реакции // 2-ая Международная конференция "Биотехнология-Биомедицина-Окружающая среда". Пушкино, 2005. - С. 111-113.
6. Чемерис А.В., Бихбулатова С.М., Чемерис Д.А., Вахитов В.А. Новая старая ДНК // Уфа, 2005. 143 С.
7. Гарафутдинов Р.Р., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Постригань Б.Н., Филатова О.В., Талипов Р.Ф., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Объединение технологий циклической пробы и молекулярного сигнального огня для детекции однонуклеотидных замен в режиме реального времени // Материалы III съезда Общества биотехнологов России. Москва, 2005. - С. 12-13.
8. Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Гарафутдинов Р.Р., Романенкова М.Л., Малеев

- Г.В., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Новые методы улучшенной детекции специфичных фрагментов ДНК и РНК в режиме реального времени с помощью цепных реакций нуклеиновых кислот - полимеразной (ПЦР), лигазной (ЛЦР) и гибридационной (ГЦР) // Материалы III съезда Общества биотехнологов России. Москва, 2005. - С. 19-20.
9. Чемерис А.В., Никоноров Ю.М., Романенкова М.Л., Чемерис Д.А., Гарафутдинов Р.Р., Магазова Р.А., Малеев Г.А., Вахитов В.А., Василов Р.Г. Способ детекции специфических фрагментов ДНК или РНК с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Заявка на патент РФ № 2005132940 от 26.10.2005 г.
  10. Чемерис А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Гарафутдинов Р.Р., Романенкова М.Л., Матниязов Р.Т., Гималов Ф.Р., Малеев Г.В., Вахитов В.А. ПЦР, ЛЦР и ГЦР - цепные реакции нуклеиновых кислот в режиме реального времени // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии. 2005. - Том 1, №2. - С. 5-14.
  11. Чемерис А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Романенкова М.Л., Матниязов Р.Т., Князев А.В., Гималов Ф.Р., Вахитов В.А. Детекция в реальном времени специфических фрагментов ДНК или РНК с помощью основанных на FRET-эффекте полимеразной, лигазной и гибридационной цепных реакций // Третья международная конференция из серии Наука и бизнес Международное сотрудничество в биотехнологии: Ожидания и реальность. Пушкино, 2006. С. 77-80.
  12. Чемерис Д.А., Романенкова М.Л., Матниязов Р.Т. Использование основанных на эффекте переноса флуоресцентной резонансной энергии полимеразной, лигазной и гибридационной цепных реакций для детекции в реальном времени специфических фрагментов ДНК или РНК // Международная школа-конференция молодых ученых "Биотехнология будущего" Санкт-Петербург, 2006. С. 97-99.
  13. Чемерис Д.А. Гибридационная цепная реакция (ГЦР) в реальном времени, основанная на эффекте флуоресцентного резонансного переноса энергии // Сборник тезисов XIII международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов" М., 2006. С. 24-25.
  14. Романенкова М.Л., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Чемерис А.В., Туйгунов М.М., Вахитов В.А. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) в диагностике геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) // Материалы Всероссийской научно-практической конференции "Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом". Уфа, 2006. С.83-88.



Отпечатано с готовых диапозитивов в ООО «Принт+»,  
заказ № 92, тираж 100 шт, 450054, пр. Октября, 71