



УДК 577.2:577.113.4

ВЛИЯНИЕ ДЛИНЫ СПЕЙСЕРОВ НА СВОЙСТВА ДНК-ЗОНДОВ В ГИБРИДИЗАЦИОННОМ АНАЛИЗЕ

© 2021 г. Р. А. Мифтахов*, С. А. Лапа*, В. Е. Кузнецова*, А. М. Золотов*, В. А. Василисков*,
В. Е. Шершов*, С. А. Суржиков*, А. С. Заседателев*, А. В. Чудинов*^{#,*}

*ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 20.12.2020 г.

После доработки 26.12.2020 г.

Принята к публикации 29.12.2020 г.

Разработан метод иммобилизации олигонуклеотидов на поверхности полиэтилентерефталатной (ПЭТ) подложки. Исследована эффективность комплементарного связывания олигонуклеотидами мишени с олигонуклеотидами-зондами в зависимости от длины спейсеров, связывающих олигонуклеотиды-зонды с ПЭТ-подложкой. Показано, что увеличение длины спейсера приводит к возрастанию гибридационного сигнала.

Ключевые слова: активация поверхности ПЭТ, иммобилизация олигонуклеотидов, гибридационный анализ

DOI: 10.31857/S013234232106018X

ВВЕДЕНИЕ

При анализе нуклеиновых кислот используется формат выполнения анализа на поверхности твердой подложки, когда олигонуклеотиды, участвующие в анализе, ковалентно связаны с поверхностью подложки. В методе биочипов (англ. microarray) проводится анализ по связыванию анализируемой ДНК с набором олигонуклеотидов (зондов), закрепленных в матрице ячеек, каждая из которых содержит олигонуклеотид известного строения [1]. По пространственному распределению зондов на подложке можно классифицировать существующие технологические платформы биочипов на две основные группы: двумерные (2D), полученные на поверхности [2], и трехмерные (3D) – в гидрогелевых ячейках, закрепленных на поверхности подложки [3]. Вместимость пробы в гидрогелевых 3D-ячейках в ~100 раз больше, чем в 2D-ячейках [4, 5]. Олигонуклеотиды, непосредственно иммобилизованные в 2D-ячейке, менее доступны для взаимодействия с комплементарной ДНК из-за пространственных затруднений со стороны твердой подложки. Кинетика реакции гибридализации ДНК с олигонуклеотидами, иммобилизованными в 2D-ячейках за 3'- или 5'-конец, близка к кинетике реакции в растворе, в то время как в гидрогелевой ячейке она существенно осложнена

диффузией анализируемой ДНК внутрь гидрогелевой ячейки, особенно для длинных молекул ДНК [4]. Использование спейсеров, отдаляющих иммобилизованные олигонуклеотиды от поверхности, позволяет увеличивать гибридационный сигнал [6].

Хорошо отработаны методы иммобилизации для кремний-содержащих подложек [7] и подложек, покрытых тонким слоем золота [8]. Иммобилизация на полимерных подложках требует проводить подбор материала, совместимого с процедурами и компонентами, используемыми при анализе ДНК, и дает возможность получить на поверхности подложки функциональные химические группы, необходимые для иммобилизации олигонуклеотидов.

Цель данного исследования – разработка метода иммобилизации олигонуклеотидов на поверхности полиэтилентерефталатной подложки и изучение влияния длины используемых спейсеров на уровень гибридационного сигнала.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В разработанном методе иммобилизация олигонуклеотидов осуществляется на поверхности полиэтилентерефталатной (ПЭТ) подложки. ПЭТ прозрачен в видимом и ближнем ИК-свете, биосовместим, термо- и химостоек в условиях проведения анализа ДНК [9].

Сложноэфирные группы на поверхности ПЭТ гидролизовали спиртовым раствором КОН, на по-

Сокращения: ПЭТ – полиэтилентерефталат.

[#] Автор для связи (тел.: +7 (499) 135-98-00; эл. почта: chud@eimb.ru; chudhome@rambler.ru).

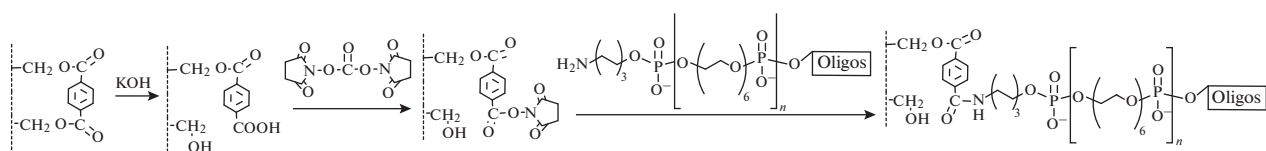


Рис. 1. Схема иммобилизации олигонуклеотидов-зондов на полиэтилентерефталатной подложке. Oligos – соответствующая последовательность олигонуклеотида; $n = 0, 1, 2, 4, 8$.

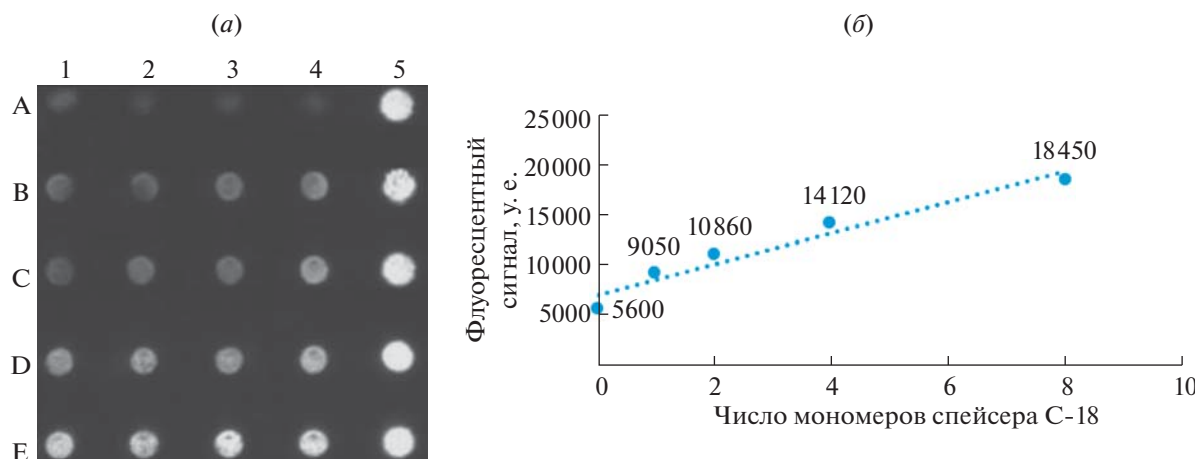


Рис. 2. (а) – Флуоресцентная картина гибридизации олигонуклеотида-мишени с олигонуклеотидами-зондами с различным числом (n) мономеров спейсера C-18. Горизонтальные ряды А–Е: $n = 0, 1, 2, 4, 8$ соответственно; вертикальные ряды: 1–4 – повторы олигонуклеотидов, 5 – контрольные ячейки с красителем Cy5; (б) – график зависимости средних значений гибридизационных сигналов в четырех повторах от числа мономерных звеньев спейсеров C-18 на олигонуклеотидах-зондах.

верхности получали карбоксильные группы. Карбоксильные группы активировали дисукцинимидкарбонатом. Поверхностную концентрацию доступных активированных карбоксильных групп определяли по связыванию с индикаторным веществом, цианиновым красителем Cy5, несущим первичную алифатическую аминогруппу, по ранее опубликованному методу [10]. Поверхностная концентрация составила 12 пмоль/см^2 .

Иглой робота-манипулятора на подложку наносили микрокапли раствора олигонуклеотидов [3]. Олигонуклеотиды соответствуют фрагменту гена *rhoB* *Mycobacterium tuberculosis*, содержат первичную аминогруппу и спейсеры различной длины на 5'-конце (рис. 1). Спейсеры C-18 на основе гексаэтиленгликоля вводили в олигонуклеотиды при автоматическом синтезе. После инкубации и отмывки проверяли продуктивность иммобилизованных олигонуклеотидов в гибридизационном анализе с комплементарным олигонуклеотидом-мишенью, маркированным флуоресцентным красителем Cy5. Интенсивность флуоресценции ячеек измеряли методом цифровой флуоресцентной спектроскопии на канале красителя Cy5 [11].

Полученные результаты представлены на рис. 2. Видно, что увеличение длины спейсера C-18 по-

вторением мономерной части 1, 2, 4 и 8 раз приводит к увеличению гибридизационных сигналов. Наибольший относительный эффект наблюдается для первого спейсера, сигнал увеличивается в 1.8 раза. Дальнейшее увеличение длины спейсера приводит к увеличению сигнала в ~ 1.2 раза на каждую мономерную часть спейсера. Общее увеличение сигнала составляет ~ 3.3 раза. График зависимости гибридизационных сигналов от длины спейсера далек от выхода на плато. Твердая поверхность затрудняет связывание иммобилизованных олигонуклеотидов-зондов с комплементарным олигонуклеотидом-мишенью даже при длине спейсера >144 атомов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали образцы бесцветной пленки полиэтилентерефталата ПЭТ Э (ГОСТ 24234-80, плотность 1.39 г/см^3 , $M_r = 20\,000\text{--}40\,000$, размер $25 \times 75 \text{ мм}$, толщина 200 мкм). Карбоксильные группы на поверхности ПЭТ получали выдерживанием пленки в 0.5 М растворе KOH в 96% -ном этаноле в течение 60 мин при комнатной температуре. Карбоксильные группы активировали 0.1 М раствором дисукцинимидкарбоната в диме-

тилсульфоксиде в течение ночи при комнатной температуре.

Синтезировали набор олигонуклеотидов-зондов: 5'-NH₂-Sp_n-TTGTTCTGGTCCATGAAT-3' ($n = 0, 1, 2, 4, 8$; Sp – спейсеры C-18 на основе гексаэтиленгликоля); олигонуклеотид-мишень: 5'-ATTTCATGGACCAGAACAAC-3'. Твердофазный синтез олигонуклеотидов осуществляли с помощью автоматического синтезатора ABI 394 DNA/RNA (Applied Biosystems, США) по стандартному регламенту с использованием коммерческих растворителей и реагентов. Последовательность олигонуклеотида-зонда описана ранее [12], последовательность олигонуклеотида-мишени полностью комплементарна зонду. Спейсеры синтезировали по амидофосфитной технологии из коммерческих реагентов Glen Research (США).

Микрокапли растворов олигонуклеотидов-зондов в буферном растворе Na₂CO₃/NaHCO₃ (рН 10.2) наносили иглой робота-манипулятора на активированную поверхность ПЭТ-подложки. После инкубации и отмывки в ультразвуковой ванне на подложку наносили раствор олигонуклеотида-мишени в гибридационном буфере. После инкубации подложку промывали SSPE-буфером (Invitrogen, США). Флуоресцентные сигналы ячеек на подложке регистрировали на портативном анализаторе (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия) с лазерным возбуждением при 650 нм, запирающим фильтром 716 ± 43 нм (Semrock, США) и цифровой ПЗС-камерой. Изображения анализировали с помощью программы ImaGeWare (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия). В спектральном диапазоне флуоресценции красителя Су5 полимерная подложка из ПЭТ-пленки практически не флуоресцирует и не влияет на регистрируемые сигналы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан метод иммобилизации олигонуклеотидных зондов на поверхности ПЭТ-подложки. Показано, что увеличение длины спейсера, связывающего зонд с подложкой, способствует увеличению гибридационного сигнала. Максимальный гибридационный сигнал достигнут при использовании спейсера, содержащего восемь гексаэтиленгликолевых фрагментов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-00680) и стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики на 2018–2020 гг. (регистрационный номер СП-274.2018.4).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gryadunov D., Dementieva E., Mikhailovich V., Nasedkina T., Rubina A., Savvateeva E., Fesenko E., Chudinov A., Zimenkov D., Kolchinsky A., Zasedatelev A. // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2011. V. 11. P. 839–853. <https://doi.org/10.1586/erm.11.73>
2. Naidu C.K., Suneetha Y. // *Trop. J. Pharm. Res.* 2012. V. 11. P. 153–164. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.4.2199>
3. Rubina A.Y., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 325. P. 92–106. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.010>
4. Zubtsov D.A., Savvateeva E.N., Rubina A.Y., Pan'kov S.V., Konovalova E.V., Moiseeva O.V., Chechetkin V.R., Zasedatelev A.S. // *Anal. Biochem.* 2007. V. 368. P. 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.04.040>
5. Brittain W.J., Brandstetter T., Prucker O., Rühle J. // *ACS Appl. Mat. Int.* 2019. V. 11. P. 39397–39409. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b06838>
6. Halperin A., Buhot A., Zhulina E.B. // *Langmuir.* 2007. V. 22. P. 11290–11304. <https://doi.org/10.1021/la0616606>
7. Oh S.J., Cho S.J., Kim C.O., Park J.W. // *Langmuir.* 2002. V. 18. P. 1764–1769. <https://doi.org/10.1021/ma0020032>
8. Zhi Z.L., Powell A.K., Turnbull J.E. // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 4786–4793. <https://doi.org/10.1021/ac060084f>
9. Dimitrievska S., Maire M., Diaz-Quijada G.A., Robitaille L., Aji A., Yahia L., Moreno M., Merhi Y., Rureau M. // *Macromol. Biosci.* 2011. V. 11. P. 493–502. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000390>
10. Мифтахов Р.А., Лана С.А., Шершув В.Е., Заседателева О.А., Гусейнов Т.О., Спицын М.А., Кузнецова В.Е., Мамаев Д.Д., Лысов Ю.П., Барский В.Е., Тимофеев Э.Н., Заседателев А.С., Чудинов А.В. // *Биофизика.* 2018. Т. 63. С. 661–668. <https://doi.org/10.1134/S000630291804004X>
11. Lysov Y., Barsky V., Urasov D., Urasov R., Cherepanov A., Mamaev D., Yegorov Y., Chudinov A., Surzhikov S., Rubina A., Smoldovskaya O., Zasedatelev A. // *Biomed. Optics Exp.* 2017. V. 8. P. 4798–4810. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.004798>
12. Mikhailovich V., Lapa S., Gryadunov D., Sobolev A., Strizhkov B., Chernyh N., Skotnikova O., Irtuganova O., Moroz A., Litvinov V., Vladimirovskii M., Perelman M., Chernousova L., Erokhin V., Zasedatelev A., Mirzabekov A. // *J. Clin. Microbiol.* 2001. V. 39. P. 2531–2540. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2531-2540.2001>

Effect of Spacers on DNA Probe Properties in Hybridization Analysis

R. A. Miftakhov*, S. A. Lapa*, V. E. Kuznetsova*, A. M. Zolotov*, V. A. Vasiliskov*, V. E. Shershov*,
S. A. Surzhikov*, A. S. Zasedatelev*, and A. V. Chudinov*, #

*Phone: +7 (499) 135-98-00; e-mail: chud@eimb.ru; chudhome@rambler.ru

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

A method of immobilizing oligonucleotides on the surface of a polyethylene terephthalate (PET) substrate has been developed. Effectiveness of complementary binding of target oligonucleotide to oligonucleotides-probes depending on long spacers of binding oligonucleotides-probes to substrate was investigated. It was shown that an increase of the spacer length leads to an increase of the hybridization signal.

Keywords: PET surface activation, oligonucleotide immobilization, hybridization analysis