

УДК 577.113.6,577.151.4

ОПТИМИЗАЦИЯ ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА ДНК НА МИКРОЧИПАХ С КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

М.М. Уляшова, М.Ю. Рубцова, Т. Бахманн*, А.М. Егоров

(кафедра химической энзимологии; e-mail: mmulyashova@gmail.com)

Разработан метод гибридизационного анализа на ДНК-микрочипе с использованием колориметрической детекции на основе пероксидазы хрена (ПЦР). Оценена эффективность включения биотина в качестве метки в молекулу ДНК в процессе ПЦР и оптимизированы условия гибридизации меченной биотином ДНК с иммобилизованными на поверхности чипа олигонуклеотидами. Возможность использования разработанного метода показана на примере определения точечных мутаций в генах СТХ-М β -лактамаз.

В последнее время одним из интенсивно развивающихся направлений биотехнологии нуклеиновых кислот становится использование ДНК-микрочипов для анализа нуклеотидных последовательностей. Эта группа методов имеет значительные преимущества перед традиционными молекулярно-биологическими методами, так как позволяет уменьшить размеры исследуемого образца, что значительно снижает стоимость анализа и время его проведения. Технология ДНК-микрочипов находит широкое применение в фундаментальных и прикладных исследованиях, таких как идентификация определенных генов и определение уровня их экспрессии, а также исследование генетического полиморфизма ДНК [1–4].

В технологии ДНК-микрочипов на небольшую по размеру поверхность стекла или другого носителя иммобилизуют в виде правильно расположенных микроматриц фрагменты ДНК с известной последовательностью нуклеотидов. Для этого используют в основном два подхода: короткие олигонуклеотиды синтезируют прямо на поверхности подложки или предварительно полученные фрагменты ДНК прикрепляют к ней ковалентными и нековалентными связями [5, 6]. Далее проводится гибридизация исследуемой нуклеотидной последовательности, в которую предварительно была введена метка, с иммобилизованными фрагментами ДНК. При совпадении их первичных структур на поверхности микрочипа образуются гетеродуплексы, которые можно обнаружить по появлению на данных участках аналитических сигналов.

Результаты гибридизации зависят от нескольких факторов: длины и состава иммобилизованных олигонуклеотидов и меченой ДНК, температуры гибридизации, состава гибридизационной смеси, типа вводимой метки [7–9]. Большинство разработанных ДНК-микрочипов основано на использовании различных флуоресцентных меток [10, 11]. Это обеспечивает необходимую чувствительность анализа, однако значительно увеличивает его стоимость (высокая стоимость как флуоресцентных меток, так и используемых для регистрации сигнала флуоресцентных сканеров).

Цель данной работы состояла в разработке метода (ПЦР) гибридизационного анализа на ДНК-микрочипе с использованием колориметрической детекции на основе пероксидазы хрена (ПХ). При данном способе детекции в исследуемый ген в качестве метки в процессе ПЦР вводятся молекулы биотина, которые затем выявляются конъюгатом стрептавидин-ПХ с последующей колориметрической детекцией ПХ. При разработке этого метода мы модифицировали принцип анализа, предложенный в работе [12] для ДНК-микрочипов с флуоресцентной детекцией.

Возможность использования данного метода показана на примере определения точечных мутаций в генах β -лактамаз СТХ-М типа. Данные ферменты являются причиной устойчивости микроорганизмов к цефалоспорином третьего поколения. Установлено, что расширение спектра активности β -лактамаз связано с возникновением точечных мутаций в кодирующих их генах. Изучая данные мутации, можно сле-

* Институт технической биохимии, Штутгарт, Германия.

лать вывод о субтипе фермента и определить его субстратную специфичность.

Экспериментальная часть

Прямой (5'-ATG GTG ACA AAG AGA GTG C-3') и обратный (5'-CCT TTC GGC GAT GAT TCT CGC-3') праймеры для группы β -лактамаз СТХ-М9, олигонуклеотиды для определения точечных мутаций в генах β -лактамаз группы СТХ-М-9 были синтезированы фирмой "Metabion", Германия. Образцы β -лактамазы СТХ-М-9 предоставлены сотрудниками НИИ антимикробной химиотерапии (г. Смоленск).

Для иммобилизации олигонуклеотиды с аминогруппами на 5'-конце растворяли в солевом буфере (160 мМ Na₂SO₄, 130 мМ Na₂HPO₄) до конечной концентрации 20 пмоль/мкл и наносили с помощью робота "MicroGrid II" ("BioRobotics", Великобритания) на стеклянные пластины с эпокси-группами ("Eppendorf", Германия), после чего инкубировали в течение 30 мин при 60°C.

Аmplификацию гена β -лактамазы СТХ-М-9 проводили в общем объеме 25 мкл в тонкостенных пробирках, содержащих 10 мМ Трис-НСl (рН 8,3 при 25°C), 2,5 мМ ацетата магния, 50 мМ KCl, 2,5 ед. Taq ДНК полимеразы, 100 мкМ dATP, dGTP, dCTP, 60 мкМ dTTP ("Eppendorf", Германия), 40 мкМ dUTP-биотина ("Roche", Германия), по 0,4 мкМ прямого и обратного праймера и 5 мкл раствора матрицы ДНК. Реакции проводили в ДНК-амплификаторе Терцик ("ДНК-технология", Россия) по следующей схеме: начальная денатурация при 94°C (2 мин), затем 30 циклов: денатурация при 94°C (45 с), отжиг праймеров при 55°C (1 мин), элонгации при 72°C (1 мин), завершающий этап элонгации при 72°C (10 мин). Очистку ПЦР-продукта проводили на колонках "QIAquick" согласно протоколу производителя.

Горизонтальный электрофорез продуктов ПЦР проводили в 1%-м агарозном геле с использованием ТАЕ-буфера (40 мМ Трис, 20 мМ уксусной кислоты, 1 мМ ЭДТА, рН 8,5). В гель добавляли раствор бромистого этидия до конечной концентрации 1,6 мкг/мл. Визуализацию проводили на УФ-трансиллюминаторе при длине волны 260 нм.

Фрагментацию ДНК проводили при комнатной температуре в течение 5 мин. Для этого амплифицированную ДНК растворяли до конечной концентрации 30 нг/мкл в реакционном буфере (40 мМ Трис-НСl, 10 мМ MgSO₄, 1 мМ CaCl₂, рН 8.0) и добавляли ДНКазу I ("Promega", Германия). Реакцию останавливали, добавляя 3 мМ ЭДТА и инкубируя в течение 10 мин при 65°C.

Перед проведением гибридизации ДНК-микрочипы с нанесенными на них олигонуклеотидами отмывали при комнатной температуре (5 мин в 0,1% Тритон X-100 в ddH₂O, 4 мин в растворе HCl, 10 мин в 100 мМ KCl) и затем блокировали свободные эпокси-группы (инкубация стекол в 25%-м растворе этиленгликоля при 50°C в течение 15 мин). Гибридизационную смесь, состоящую из фрагментированной ДНК, буфера (20xSSPE: 3,0 М NaCl, 0,2 М NaH₂PO₄, 20 мМ ЭДТА, рН 7,7) и воды, взятых в определенном соотношении, наносили (по 70 мкл) на ДНК-микрочип, закрывали рамкой и инкубировали в течение 4 ч при определенной температуре. Затем стекла отмывали: 2xSSC (0,3 М NaCl, 0,03 М цитрат натрия), содержащий 0,1% SDS, затем 2xSSC и 0,2xSSC (каждая стадия длилась 10 мин при комнатной температуре). После блокирования свободных центров связывания белков (инкубация в 1%-м растворе БСА в буфере ФСБ в течение 30 мин при 37°C) микрочипы инкубировали 1 ч при комнатной температуре в растворе конъюгата стрептавидин-ПХ в ФСБТ (разведение 1/1000). После этого стекла отмывали (ФСБТ, 2 раза по 5 мин) и помещали в субстратный раствор, содержащий 4 мМ о-дианизидин, 4 мМ 4-хлор-1-нафтол, 1 мМ перексид водорода в 0,1 М калий-цитратном буфере (рН 4,7). Микрочипы сканировали на пленочном сканере "Nikon Coolscan 4000" с разрешением 4000 dpi. Для определения интенсивности окраски пятен полученное изображение обрабатывали при помощи программы "Scan Array Express" ("PerkinElmer", version 3.0).

Результаты и их обсуждение

Принцип метода гибридизационного анализа на ДНК-микрочипе с колориметрической детекцией для идентификации β -лактамаз типа СТХ-М состоял в следующем. На стекло в определенном порядке ковалентно иммобилизовывали одноцепочечные олигонуклеотиды. Для определения каждой мутации использовался набор из 4 олигонуклеотидов с уникальной последовательностью оснований, соответствующих структуре гена β -лактамаз в данном участке и отличающихся друг от друга только нуклеотидом в центральной позиции (А, G, С или Т). Определение наличия мутаций в гене β -лактамазы заключалось в амплификации гена, выделенного из клинического образца, с одновременным введением в качестве метки молекул биотина (в составе dUTP-биотин), фрагментирования полученного ПЦР-продукта и его последующей гибридизации со специфическими олигонуклеотидами на поверхности диагностического ДНК-чипа

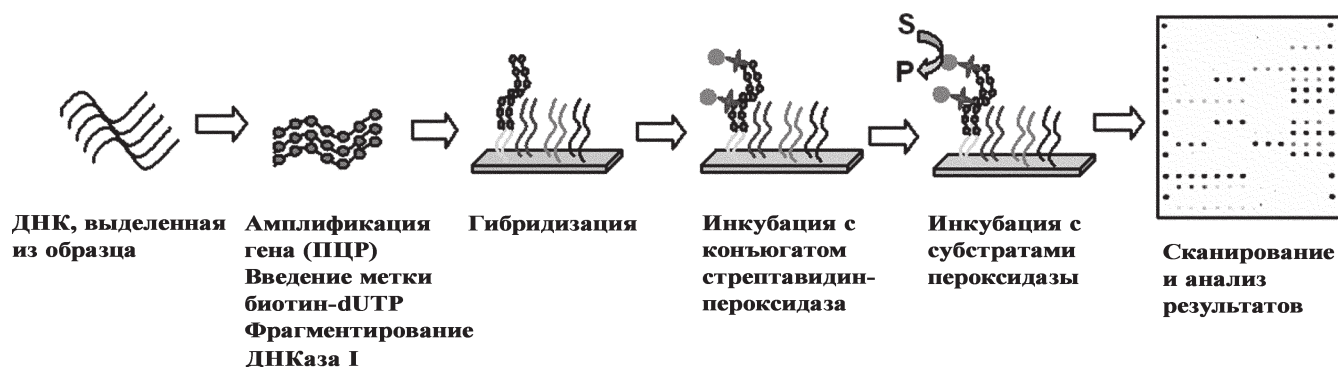


Рис. 1. Схема метода гибридационного анализа на ДНК-микрочипе с колориметрической детекцией на основе пероксидазы хрена

(рис. 1). Введенный биотин выявляли с помощью конъюгата стрептавидин-ПХ и колориметрической детекции ПХ. Для этого в качестве субстратов были выбраны *o*-дианизидин и 4-хлор-1-нафтол, которые при совместном ферментативном окислении пероксидом водорода образуют нерастворимый темно-фиолетовый продукт, хорошо адсорбирующийся на поверхности стекла вблизи локализации молекул фермента. После сканирования получали изображение микроматрицы с точками, интенсивность окраски которых была пропорциональна ферментативной активности пероксидазы, а следовательно, и количеству образующихся при гибридизации гетеродуплексов. Количественная обработка результатов состояла в построении профилей абсолютной интенсивности окраски, оцениваемой с использованием программы “*Scan Array Express*”. Предполагалось, что в каждой группе олигонуклеотид, полностью комплементарный фрагменту меченой ДНК-мишени, дает гораздо более сильный сигнал, чем три остальные, отличающиеся от него в центральной позиции. Для определения специфичности выявления мутации (соотношение сигнала комплементарной гибридизации к сигналу неспецифической гибридизации) абсолютные значения интенсивностей переводились в относительные, при этом за единицу принимался сигнал комплементарной гибридизации.

Получение меченого биотином гена β -лактамазы СТХ-М-9 методом ПЦР

Для обеспечения высокой чувствительности гибридационного анализа проба для гибридизации должна иметь высокое удельное включение метки. Метод ПЦР является эффективным и хорошо воспроизводимым, так как позволяет получить значительные количества специфической пробы в течение короткого

времени, при этом в качестве исходной матрицы используют минимальные количества образца ДНК. Однако молекулы метки, присоединенные к dNTP, могут препятствовать включению ДНК-полимеразой модифицированных оснований в синтезируемую цепь ДНК. В настоящей работе проведена оценка эффективности включения молекул биотина в ген β -лактамазы СТХ-М-9 в процессе ПЦР при использовании результатов определения молекулярной массы ПЦР-продуктов методом гель-электрофореза (рис. 2). Известно, что ген β -лактамазы типа СТХ-М имеет длину 876 пар оснований. Поскольку средняя молекулярная масса одной пары оснований равна 614, молекулярная масса гена СТХ-М β -лактамазы составляет приблизительно 540000. При введении молекул биотина масса амплифицированного фрагмента увеличилась приблизительно на 45000, что соответствует 80 молекулам биотина. Таким образом, количество нук-

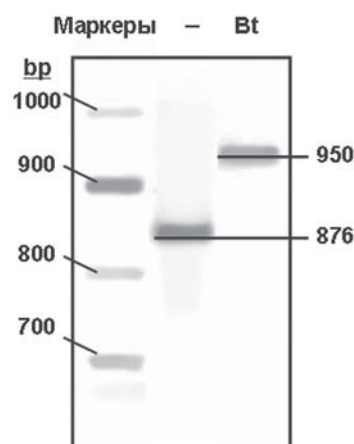


Рис. 2. Результаты гель-электрофореза немеченого и меченого биотином гена β -лактамазы СТХ-М-9

леотидов в одноцепочечной молекуле ДНК, на которое приходится одна молекула метки, было равно 20.

Ранее было показано, что при введении флуоресцентной метки Су3 в ген ТЕМ β-лактамаз при том же соотношении концентраций меченого/немеченого dNTP эта величина обычно составляла 50–150 в зависимости от качества ДНК-образца [12]. Таким образом, биотин включается в молекулу ДНК в процессе ПЦР в 2,5–7 раз эффективнее по сравнению с часто используемым в качестве метки в технологии ДНК-микрочипов флуоресцентным красителем Су3.

Оптимизация условий гибридизации на ДНК-микрочипе

Задачей анализа на ДНК-микрочипе является одновременное определение всех описанных для данного фермента положений мутаций. Поэтому далее мы проводили оптимизацию условий гибридизации на ДНК-микрочипе с целью подбора условий, при которых возможно идентифицировать максимальное число мутаций. Для этого использовали микрочип, содержащий олигонуклеотиды для определения 13 описанных для β-лактамаз подгруппы СТХ-М-9 мутаций, расположенных в следующих положениях аминокислотной последова-

тельности: 7, 21, 29, 52, 121, 167, 183, 220.1, 220.2, 231, 240, 274, 288.

Известно, что результаты гибридизации зависят от нескольких параметров, основными из которых при фиксированной длине иммобилизованных олигонуклеотидов являются температура гибридизации и молярность гибридизационного буфера.

При выборе температуры гибридизации основным критерием является то, что она должна быть значительно ниже, чем температура плавления ($T_{пл}$) образующихся гетеродуплексов. Однако резко понижать ее нельзя, так как при этом теряется специфичность анализа. Поскольку $T_{пл}$ олигонуклеотидов для детекции мутаций в генах β-лактамаз типа СТХ-М составляет 52,4–84,1°C, было решено исследовать диапазон температур гибридизации 42–48°C. Данные по тестированию гена β-лактамазы СТХ-М-9 на ДНК-чипах с колориметрической детекцией, полученные при разных температурах гибридизации, представлены на рис. 3.

При сравнении данных диаграмм видно, что при снижении температуры с 48 до 42°C абсолютная интенсивность сигналов возрастает, что свидетельствует об увеличении эффективности гибридизации, а значит, и чувствительности анализа. Так, при 42°C удается увидеть результаты гибридизации для ряда по-

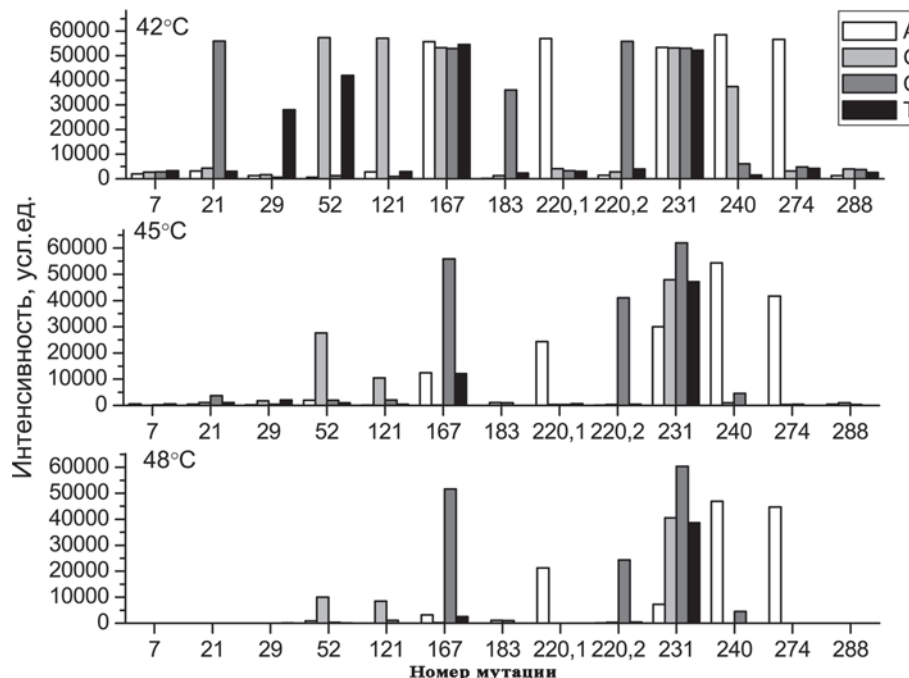


Рис. 3. Результаты тестирования β-лактамазы СТХ-М-9 на ДНК-микрочипе с колориметрической детекцией, полученные при различных температурах гибридизации. Условия гибридизации: 0,3 М NaCl; размер фрагментов – 100–200 п.н.

ложений мутаций, которые невозможно идентифицировать при более высоких температурах (21, 29, 183) из-за очень низких сигналов, сравнимых по интенсивности с фоном. Поэтому для дальнейшего проведения мультианализа на ДНК-чипе была выбрана температура 42°C. Однако с уменьшением температуры наблюдалось снижение специфичности определения мутации, и при 42°C мы не могли достоверно определить тип нуклеотида в положениях 52, 167, 231 и 240.

Одним из способов устранения неспецифических взаимодействий при проведении гибридационного анализа является повышение молярности гибридационного буфера. На рис. 4 приведены результаты гибридализации гена β -лактамазы СТХ-М-9, полученные при различном содержании NaCl в гибридационном буфере. Для положений 52 и 240 специфичность определения значительно улучшается при увеличении концентрации NaCl до 0,6 М, в то время как для положения 167 и 231 требовалось дальнейшее увеличение концентрации соли до 1,0 М. Но поскольку при концентрации 1,0 М для положений 29 и 183 интенсивность гибридационных сигналов была очень низкой, для дальнейшего проведения гибридализации была выбрана концентрация NaCl 0,6 М.

Еще одним параметром, влияющим на эффективность и специфичность гибридализации, является размер молекул исследуемой ДНК. Увеличение размера

фрагментов позволяет повысить количество метки, вводимое на единицу площади носителя. Однако в молекулах ДНК, имеющих большую длину, неизбежно образуются вторичные структуры, вызывающие стерические затруднения при проведении гибридализации и понижающие ее специфичность. Поэтому в дальнейшем мы увеличили степень фрагментации, меченой ДНК, для чего подняли концентрацию ДНКазы с 0,2 мЕд/нг ДНК (размер фрагментов 100–200 п.н.) до 0,5 мЕд/нг ДНК (размер фрагментов 40–150 п.н.). При этом интенсивность сигналов понизилась незначительно, что существенно не отразилось на чувствительности анализа, зато улучшилась специфичность гибридализации в положениях 52, 167 и 240 (рис. 5).

Таким образом, использование ДНК-микрочипов с колориметрической детекцией позволяет идентифицировать 11 из 13 групп олигонуклеотидов для определения мутаций, описанных для данного субтипа β -лактамаз. Одно положение (231) характеризуется низкой специфичностью определения (рис. 5), сигналы в положениях 7 и 288 остаются близкими к фоновым значениям при любых условиях проведения гибридализации. Возможно, это объясняется низкой эффективностью включения метки в данные участки, так как они являются крайними в гене и находятся близко к области отжига праймеров.

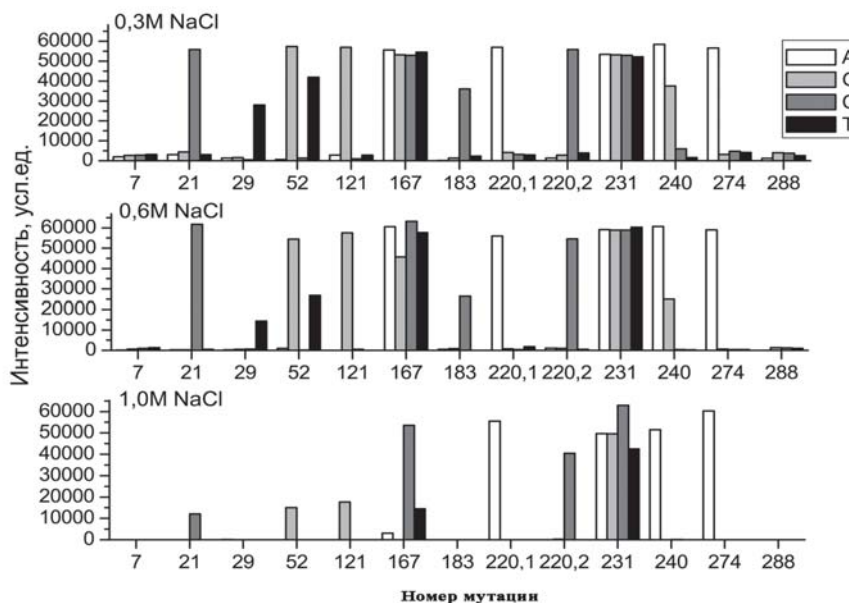


Рис. 4. Результаты тестирования β -лактамазы СТХ-М-9 на ДНК-микрочипе с колориметрической детекцией, полученные при использовании различных концентраций NaCl в гибридационном буфере. Условия гибридализации: 42°C; размер фрагментов – 100–200 п.н.

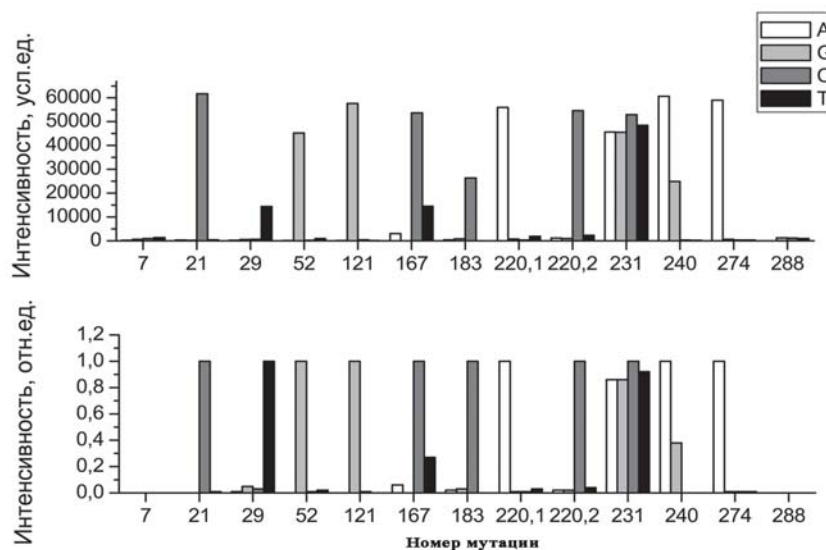


Рис. 5. Результаты тестирования I-лактамазы CTX-M-9 на ДНК-микрочипе с колориметрической детекцией. Условия гибридизации: 42°C; 0.6М NaCl; размер фрагментов – 40–150 п.н.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Duggan D.J., Bittner M., Chen Y. et al. // Nature Genet. 1999. **22**. P. 10.
2. Lockhart D.J., Winzeler E.A. // Nature. 2000. **405**. P. 827.
3. Hacia J.G. // Nature Genet. 1999. **21**. P. 42.
4. Guo Z., Guilfoyle R.A., Thiel A.J. et al. // Nucleic Acids Res. 1994. **22**. P. 5456.
5. Cheung V.G., Morley M., Aguilar F. et al. // Nature Genet. 1999. **21**. P. 15.
6. Dufva M. // Biomol. Engineering. 2005. **22**. P. 173.
7. Mir K.U., Southern E.M. // Nature Biotechnol. 1999. **17**. P. 788.
8. Religio A., Schwager C., Richter A. et al. // Nucleic Acids Res. 2002. **30**. P. 10.
9. Franssen-van Hal N., Vorst O., Kramer E. // Anal. Biochem. 2002. **308**. P. 5.
10. Chee M., Yang R., Hubbell E. et al. // Science. 2001. **274**. P. 610.
11. Stears R.L., Getts R.C., Gullans S.R. // Physiol. Genomics. 2000. **3**. P. 93.
12. Grimm V., Ezaki S., Susa M. et al. // J. Clin. Microbiol. 2004. **42**. P. 3766.

Поступила в редакцию 23.11.07

OPTIMIZATION OF HYBRIDIZATION ANALYSIS ON DNA-MICROARRAYS WITH COLORIMETRIC DETECTION ON BASIS OF HORSERADISH PEROXIDASE

M.M. Ulyasheva, M.Yu. Rubtzova, T. Bachmann, A.M. Yegorov

(Division of Chemical Enzymology)

The method of hybridization analysis on DNA-microarrays with colorimetric detection on basis of horseradish peroxidase was developed. The effectiveness of biotin incorporation in nucleotide sequence during PCR and the influence of different hybridization temperatures, molarity of hybridization buffer and lengths of labeled DNA fragments on sensitivity and specificity of hybridization signals were analyzed. The method developed was applied for genotyping of CTX-M I-lactamases.