

ВЫЯВЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА С ПОМОЩЬЮ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ РЕПОРТЕРОВ

© 2012 г. В. В. Красицкая*, Л. П. Буракова*, И. А. Пышная**, Л. А. Франк**[#]

*Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, Академгородок, стр.50;

**Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Поступила в редакцию: 02.06.2011 г. Принята к печати: 30.08.2011 г.

Предложен метод определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) на основе реакции удлинения праймера (PEXT) с последующим биолюминесцентным твердофазным микроанализом продуктов. В качестве репортеров использовали Ca^{2+} -регулируемый фотопротеин обелин и целентеразин-зависимую люциферазу *Renilla muelleri*. Исследования проводили на примере генотипирования SNP гена, кодирующего коагуляционный фактор V человека – FV Leiden (Лейденская мутация) 1691 G→A (R506Q). Геномную ДНК амплифицировали полимеразной цепной реакцией, используя праймеры, фланкирующие полиморфный сайт. Продукты ПЦР размером 140 п.о. использовали как матрицу для двух PEXT-реакций с праймерами, 3'-концевые нуклеотиды которых комплементарны нормальному либо мутантному аллелям. При полной комплементарности матрицы и аллель-специфичного праймера происходило его удлинение ДНК-полимеразой, а полученный продукт содержал биотин, благодаря наличию в реакционной смеси биотинилированного производного дезоксиуридинтрифосфата (B-dUTP). Анализ продуктов проводили с использованием химических конъюгатов обелин-стрептавидин. Определены оптимальные условия проведения PEXT-реакции, позволяющие проводить генотипирование SNP с высокой достоверностью. Разработан вариант одновременного выявления обоих аллелей в одной лунке с использованием двух биолюминесцентных репортеров. Эффективность предлагаемого подхода показана при исследовании клинических образцов ДНК.

Ключевые слова: SNP; PEXT-реакция; обелин; люцифераза; биолюминесцентный микроанализ.

ВВЕДЕНИЕ

Однонуклеотидные замены (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) являются наиболее часто встречающимися генетическими вариациями генома. Огромное количество SNP в геноме человека, а также низкий уровень мутаций на поколение определяют перспективность их использования в качестве генетических маркеров. Генотипирование SNP используют для картирования и исследования генетических основ заболеваний, для установления предрасположенности к болезням и индивидуальной чувствительности к лекарственным средствам и т.д. Как правило, методы генотипирования включают в себя этапы выделения геномной ДНК, ПЦР-амплификации интересующего фрагмента, реакцию генотипирования для дискриминации аллелей и выявление продуктов. Для генотипирования используют аллель-специфичную гибридизацию, лигирование олигонуклеотидных фрагментов, рестриктазный анализ, реакцию удлинения праймера и др. [1]. Анализ результатов реакции генотипирования

Сокращения: B – биотин; B-dUTP – биотинилированный дезоксиуридинтрифосфат; CBP – Ca^{2+} -зависимый целентеразинсвязывающий белок *Renilla*, D – диоксигенин, D-dUTP – диоксигенин-дезоксиуридинтрифосфат; DF – дискриминационный фактор, Obе – обелин, PEXT – ферментативное удлинение праймера, RMLuc или Luc – люцифераза *Renilla muelleri*; SNP – однонуклеотидный полиморфизм; ПЦР – полимеразная цепная реакция; St – стрептавидин; префикс «d» в обозначении олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

[#] Автор для переписки (e-mail: lfrank@yandex.ru; тел. 8 (391) 249-44-30.

проводят измерением светового излучения или поглощения продуктов (флуоресценция, био- и хемиллюминесценция, денситометрия и т.д.), измерением массы продуктов (электрофорез, масс-спектрометрия), методом плазмонного резонанса и электрохимическими методами. Разработка эффективных методов генотипирования – быстрых, надежных и недорогих, является актуальной современной задачей.

В настоящей работе приведены результаты исследований по использованию биолюминесцентных меток на основе Ca^{2+} -регулируемого фотопротеина обелина и целентеразин-зависимой люциферазы *Renilla muelleri* для детекции продуктов реакции генотипирования методом ферментативного удлинения аллельспецифичного праймера (PEXT-реакции, [2]).

Ca^{2+} -регулируемый фотопротеин обелин гидроида *Obelia longissima* представляет собой устойчивый комплекс, состоящий из одноцепочечного полипептида (M 22.2 кДа) и окисленного производного субстрата – пероксицелентеразина. В аминокислотной последовательности обелина имеются три кальций-связывающих сайта EF-hand типа. Присоединение ионов кальция вызывает реакцию декарбоксилирования пероксицелентеразина, продуктами которой являются молекула целентерамида, CO_2 и квант света в видимой области (λ_{max} 485 нм). Биолюминесцентный сигнал представляет собой однократную вспышку (константа спада $k_d=6.9 \text{ c}^{-1}$) и его величина пропорциональна количеству белка. Наличие бактериального штамма-суперпродуцента и разработка эффективной технологии получения рекомбинантного обелина открыли возможность широкого использования этого белка в качестве высокочувствительного репортера в иммуно- и гибридационном анализе [см. обзоры 3, 4].

Целентеразинзависимая люцифераза мягкого коралла *R. muelleri* (RMLuc) – одноцепочечный полипептид (M 38 кДа), катализирует реакцию окисления того же субстрата – целентеразина, молекулярным кислородом с излучением света в той же области спектра (λ_{max} 485 нм) [5]. Биолюминесцентная реакция люциферазы в отличие от фотопротеиновой представляет собой пример обычного фермент-субстратного взаимодействия, а величина и кинетика биолюминесцентного сигнала RMLuc зависят от концентрации субстрата [5]. Люцифераза *Renilla* позволяет легко и быстро проводить высокочувствительный анализ с широким линейным диапазоном определения и используется как репортер в научных исследованиях (см., напр., [6]). Биолюминесценцию *in vitro* инициируют добавлением водно-спиртового раствора целентеразина. При этом показано, что субстрат быстро окисляется и необходимо использовать только свежеприготовленные препараты.

В данной работе впервые был использован альтернативный, более удобный способ запуска реакции RMLuc с применением рекомбинантного Ca^{2+} -зависимого целентеразинсвязывающего белка (СВР) [5]. Этот белок локализует целентеразин в фотофорах животного (свободный

целентеразин легко проникает через клеточную мембрану), а также обеспечивает возможность возникновения билюминесцентного сигнала в ответ на раздражение [7]. СВР представляет собой устойчивый нековалентный комплекс одноцепочечного полипептида (M 20 кДа) и целентеразина. В аминокислотной последовательности этого белка имеется три кальцийсвязывающих EF-hand-сайта. Присоединение Ca^{2+} меняет конформацию СВР, и целентеразин становится доступным для окисления, катализируемого люциферазой [8]. Показано, что по сравнению со свободным целентеразином, СВР, используемый в качестве субстрата, не только существенно упрощает процедуру запуска реакции RMLuc, но и почти в два раза увеличивает квантовый выход билюминесценции [5].

В работе исследовали возможность выявления разрабатываемыми методами мутации FV Leiden (лейденская мутация 1691 G→A, R506Q, dbSNP: rs6025) в гене, кодирующем фактор V системы свертывания крови. Выявление данного полиморфизма имеет прогностическое значение, позволяющее определить риск развития заболеваний сердечно-сосудистой системы вследствие нарушений в свертывающей системе крови, оценить вероятность сердечно-сосудистой патологии у потомства. Коагуляционный фактор V является белковым кофактором при образовании тромбина из протромбина. Мутация придает устойчивость активной форме фактора V к протеолитическому действию регулирующего фермента – активированного протеина C, что приводит к гиперкоагуляции. Носители варианта A обладают повышенной склонностью к развитию сосудистых тромбозов, являющихся фактором риска венозных и артериальных тромбозов, инфаркта миокарда и инсульта. Данный полиморфизм является диагностически значимым, широко анализируется в лабораторной диагностике.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования перспективности использования билюминесцентных репортеров на примере генотипирования однонуклеотидного полиморфизма гена *F5*, использовали образцы ДНК, специально отобранные и предварительно проанализированные другими методами. Геномную ДНК амплифицировали полимеразной цепной реакцией, используя праймеры, фланкирующие полиморфный сайт (dbSNP: rs6025). Продукты ПЦР размером 140 п.о. использовали как матрицу для двух PEХТ-реакций: N-PEХТ-реакции с праймером, 3'-концевой нуклеотид которого комплементарен нормальному аллелю (LeiN-праймер), и M-PEХТ-реакции с праймером, у которого 3'-концевой нуклеотид комплементарен мутантному аллелю (LeiM-праймер) (рис.1, слева). На 5'-концах обоих праймеров находится олигоденилатный фрагмент (A_{27}). Реакционные смеси содержали помимо стандартной смеси dNTP, биотинилированное производное дезоксиуридинтрифосфата (B-dUTP). В случае полного соответствия последовательностей матрицы и аллельспецифичного праймера происходит его удлинение ДНК-

полимеразой, и полученный продукт содержит биотин. Если праймер не соответствует нуклеотидной последовательности матрицы, синтеза не происходит.

Продукты РЕХТ-реакций анализировали, как показано на рис.1 справа. Поверхность лунок планшета активировали ковалентной пришивкой олигонуклеотида $\text{NH}_2\text{-T}_{30}$, который гибридизовался с oligo(A)-фрагментом удлиненного (или не удлиненного) ДНК-полимеразой праймера. Наличие продукта РЕХТ-реакции выявляли с помощью конъюгата стрептавидин-обелин, билюминесцентную реакцию которого инициировали внесением раствора хлористого кальция.

Для оптимизации условий РЕХТ-реакции мы тестировали такие параметры, как температура отжига аллель-специфичного праймера, соотношение вносимых в реакционную смесь В-dUTP и dTTP, а также соотношение праймер/ДНК-матрица. Эти исследования проводили на образце с нормальным (G/G) генотипом, с использованием Taq-ДНК-полимеразы.

Специфичность РЕХТ-реакции в значительной степени определяется температурой отжига праймера. Расчетная температура плавления дуплекса с LeIN-праймером составляет 71.1°C , а с LeIM-праймером – 69°C . При выборе оптимальной температуры отжига эксперименты проводили при 50 , 55 и 60°C . При этом дискриминационный фактор (DF, отношение билюминесцентных сигналов, полученных от РЕХТ-реакций с LeIN- и LeIM-праймерами) составил 2.3, 19.4 и 19.6, соответственно. Для последующих экспериментов нами была выбрана и использована температура отжига праймера 55°C , обеспечивающая эффективную дискриминацию аллелей.

Для определения оптимального соотношения нуклеозидтрифосфатов В-dUTP:dTTP в реакционной смеси РЕХТ-реакции, их соотношение варьировали в пределах 1:3, 1:1, 3:1 и 1:0. Дискриминационный фактор увеличивался с увеличением доли В-dUTP и составил 14.3, 18.1, 25.6 и 33.9, соответственно. То есть, даже в присутствии только 25% В-dUTP наблюдается хорошая дискриминация аллелей, а при полной замене dTTP на В-dUTP DF имеет максимальное значение. Однако, из соображений экономии, мы использовали эквимольное соотношение этих трифосфатов, обеспечивающее значение DF, равное 18.1.

Как видно из рис. 1, в последовательности анализируемой матрицы после мисматча находится аденозин, т.е. при удлинении праймера сразу встраивается В-dUTP. Известно, что В-dUTP в принципе встраивается в дуплексы хуже, чем TTP [9], что в нашем случае является дополнительным фактором дискриминации РЕХТ-реакции.

Так как продукты РЕХТ-реакции используются в гибридизационном анализе без очистки, то существует конкуренция между удлиненным и свободным праймерами за связывание на поверхности лунок с олиготимидилатом. Для определения оптимального молярного соотношения праймер/ДНК-мишень РЕХТ-реакцию проводили при постоянном количестве ДНК

(100 фмоль) и различных количествах праймера (от 50 до 1000 фмоль). Результаты эксперимента (рис. 2) показали, что наилучшая дискриминация аллелей ($BL_N/BL_M=21$) получается при использовании пятикратного молярного избытка праймера, что и было использовано для дальнейшей работы.

Для проведения PEXТ-реакции нами исследована возможность использования двух ДНК-полимераз – Vent(ехо-) и Taq. На рис. 3 приведены результаты исследований 13 образцов ДНК. Генотип каждого из образцов геномной ДНК определяли по соотношению биолюминесцентного сигнала от удлинения LeiN-праймера (G-аллель, сигнал BL_N) и сигнала от удлинения LeiM-праймера (A-аллель, сигнал BL_M). В случае наличия обоих аллелей (G/A-генотип) отношение сигналов около 1. При наличии двух нормальных аллелей (нормальный G/G-генотип) сигналы отличаются более чем на порядок. При гомозиготной мутации (A/A-генотип) это соотношение должно быть существенно меньше 1. Среди проанализированных нами образцов 4 оказались нормальными по обоим аллелям (G/G), а 9 – обладали гетерозиготной мутацией (G/A). Образцов с гомозиготной мутацией в выборке не оказалось, так как такой генотип встречается крайне редко. Полученные результаты совпали с данными ПЦР-анализа в реальном времени для тех же образцов ДНК, проведенного сотрудниками гематологического научного центра РАМН (Красноярский филиал). Следует отметить, что соотношения сигналов BL_N/BL_M при проведении PEXТ-реакции ДНК-полимеразами Vent(ехо-) и Taq хорошо коррелируют.

Воспроизводимость метода оценивали по результатам трехкратного повторения анализа (ПЦР-амплификация геномной ДНК, PEXТ-реакция и биолюминесцентный анализ продуктов) двух образцов ДНК с G/A- и G/G-генотипами. Коэффициент вариации дискриминационного фактора (BL_N/BL_M), составил 14.1 % для гетерозиготного генотипа G/A и 19.8 % для нормального генотипа G/G.

Для минимизации стадий и повышения производительности генотипирования мы разработали метод одновременного выявления аллелей в одной лунке с использованием двух биолюминесцентных репортеров: фотопротеина обелина и целентеразин-зависимой люциферазы *R. muelleri* (рис. 4). Амплифицированный участок геномной ДНК размером 140 п.о. использовали как матрицу для двух PEXТ-реакций. Причем N-PEXТ-реакцию проводили с LeiN-праймером в присутствии смеси dNTP+ D-dUTP, а M-PEXТ-реакцию – с LeiM-праймером в присутствии смеси dNTP+B-dUTP. В случае полного соответствия последовательностей матрицы и праймера происходит его удлинение ДНК-полимеразой, и полученный продукт содержит дигоксигенин (N-PEXТ-реакция) или биотин (M-PEXТ-реакция). Смесь продуктов обеих PEXТ-реакций анализировали двойным биолюминесцентным гибридным анализом, как показано на рис. 4.

В отличие от фотопротеинового биолюминесцентного сигнала (короткая вспышка, не более 2 с) сигнал люциферазы более продолжителен [3]. Чтобы исключить засветку соседних лунок, мы использовали для твердофазного анализа непрозрачные планшеты. Поверхность лунок в этом случае активировали сорбцией конъюгата бычий сывороточный альбумин - политимидилат (BSA~T₃₀). Poly(A)-фрагмент удлиненного (или не удлиненного) ДНК-полимеразой праймера иммобилизовали на поверхности в результате образования гибридов. Наличие продуктов РЕХТ-реакции выявляли с помощью конъюгатов обелин-антитела к дигоксигенину и люцифераза-стрептавидин. Сначала внесением раствора хлористого кальция инициировали биолюминесценцию обелина и интегрировали сигнал в течение 5 с. Затем для инициации биолюминесценции люциферазы в эти же лунки вносили раствор рекомбинантного Ca²⁺-зависимого целентеразинсвязывающего белка (CBP). В присутствии ионов кальция целентеразин, иммобилизованный в этом белке, окисляется люциферазой с излучением света. Биолюминесценцию люциферазы интегрировали в течение 20 с. Биолюминесцентный сигнал обелина свидетельствует о наличии нормального аллеля, а биолюминесцентный сигнал люциферазы – о наличии мутантного аллеля. Соотношение сигналов обелина и люциферазы определяет генотип образца.

Предложенный вариант анализа сначала реализовали в модельном эксперименте. Для этого мы ввели в состав LeiN- и LeiM-праймеров дигоксигенин-меченный уридин или биотин-меченный уридин, соответственно, реакцией терминальной трансферазы в присутствии D-dUTP или B-dUTP. Меченые праймеры тестировали твердофазным анализом по схеме, представленной на рис. 4. В лунки вносили растворы праймеров по одному (раздельный анализ) либо в смеси (одновременный анализ) в концентрациях от 3 до 2000 пМ. Во всех случаях выявление гибридов, иммобилизованных на поверхности лунок, проводили смесью меток (конъюгатов обелин-антитела к дигоксигенину и люцифераза-стрептавидин). Полученные результаты модельных экспериментов показали хорошую корреляцию раздельного и одновременного анализов: коэффициенты корреляции составили 0.98 для LeiN-праймера и 0.99 для LeiM-праймера (рис. 5).

С помощью предлагаемого одновременного анализа нами было исследовано 8 образцов ДНК. Полученные при этом результаты представлены на рис. 6. Генотип каждого из образцов геномной ДНК представлен как отношение биолюминесцентного сигнала обелина (соответствует наличию нормального аллеля) к биолюминесцентному сигналу люциферазы (соответствует наличию мутантного аллеля). Среди проанализированных нами образцов 3 имели нормальный генотип G/G, а 5 – обладали гетерозиготной мутацией (G/A генотип), что совпадает с данными раздельного анализа на основе обелина (см. выше). Использование биолюминесцентных репортеров с разным квантовым выходом реакции отражается на значениях

дискриминационного фактора: в случае G/G-генотипа это в среднем 2.5, а для G/A-генотипа – 0.45.

Таким образом, полученные результаты показывают, что использование билюминесцентной детекции продуктов PEXТ-реакции представляет собой простой в исполнении, эффективный и относительно недорогой метод определения однонуклеотидного полиморфизма. Для проведения анализа с использованием стандартного 96-луночного микропланшета требуется 1.5-2 ч (суммарное время PEXТ-реакции и билюминесцентного анализа ее продуктов). Использование двух билюминесцентных репортеров (фотопротеина обелина в паре с целентеразин-зависимой люциферазой RMLuc) позволяет проводить анализ SNP выявлением обоих аллелей в одной лунке, и таким образом удвоить количество образцов, анализируемых на одном планшете. Применение СВР вместо свободного целентеразина для запуска билюминесценции люциферазы существенно упрощает процедуру анализа, поскольку он является стабильным реагентом при хранении в растворе, в замороженном и лиофилизированном виде. Отметим, что в работе [10] для генотипирования полиморфизма гена маннозосвязывающего лектина (MBL) был успешно использован другой фотопротеин – акворин медузы *Aequorea victoria*, что свидетельствует об эффективности применения билюминесцентных репортеров для выявления SNP.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В работе использовали высокоочищенные рекомбинантные белки: фотопротеин обелин D12C, целентеразин-зависимую люциферазу *R. muelleri*, кальций-связывающий белок *R. muelleri*, полученные по методам, описанным в работах [11, 12, 5, соответственно]. Рекомбинантный стрептавидин, 2-иминотиолан, сукцинимидный эфир 4-*N*-малеимидометилциклогексановой кислоты (SMCC) были получены от фирмы «Sigma» (США). Антитела к дигоксигенину от «Abcam» (Великобритания).

В работе использовали: набор dNTP, Taq-ДНК-полимеразу, Taq-ДНК-полимеразу Hot Start, (СибЭнзим, Новосибирск); dATP, dCTP, dGTP и dTTP (Медиген, Новосибирск); 5-[*N*-(*N*-биотинил-ε-аминокапроил)-3-аминоаллил]-2'-дезоксинуридин-5'-трифосфат (B-dUTP, YorBio, Великобритания); дигоксигенин-11-уридин-5'-трифосфат (Roche, Германия); Vent (exo-) ДНК-полимеразу, терминальную трансферазу, NEBuffer4 (New England Biolabs, Великобритания).

Политимидилат, несущий на 5'-конце аминокетильную группу – 5'-NH₂-(CH₂)₆-*P*-T₃₀ (NH₂-T₃₀), праймеры для амплификации геномной ДНК (5'-3'): CATCATGAGAGACATCGCCTC (LeiUp) и CATGTTCTAGCCAGAAGAAATTC (LeiDn), а также праймеры для PEXТ-реакции (A)₂₇AGCAGATCCCTGGACAGGCG (LeiN) и (A)₂₇AGCAGATCCCTGGACAGGCA (LeiM) были синтезированы фирмой «Биосан» (Новосибирск).

Образцы ДНК были предварительно отобраны другими методами и предоставлены сотрудниками Красноярского филиала гематологического научного центра РАМН.

Получение конъюгатов обелина с биоспецифическими белками (стрептавидином или антителами) проводили по методу, описанному в работе [13].

Конъюгат люциферазы со стрептавидином получали аналогично способу, разработанному для конъюгирования обелина с белками [13]. Для введения SH-группы в молекулу люциферазы использовали 2.5-кратный мольный избыток 2-иминотиолана. Реакцию проводили в буфере, содержащем 0.25 М NaCl, 1 мМ EDTA, 50 мМ BICINE (*N,N*-бис(гидроксиэтиленглицин)) pH 8.5 в течение 30 мин при комнатной температуре, избыток реагента отделяли гель-фильтрацией. Тионилированную люциферазу смешивали с SMCC-активированным стрептавидином в мольном соотношении 5:1 и инкубировали при 4°C в течение ночи. Полученные конъюгаты выделяли гель-фильтрацией на колонке Superdex 200, уравновешенной 20 мМ Трис-HCl pH 7.0, 0.25 М NaCl, 5мМ EDTA. Потери биолюминесцентной активности люциферазы после всех манипуляций составили 52-57%.

Получение конъюгатов бычьего сывороточного альбумина с олигонуклеотидом NH₂-T₃₀. BSA инкубировали в присутствии 40-кратного избытка 2-иминотиолана 30 мин при комнатной температуре в буфере, содержащем 0.1 М NaCl, 50 мМ BICINE, pH 8.5; избыток реагента отделяли гель-фильтрацией. Аминосодержащий олигонуклеотид модифицировали 100-кратным избытком SMCC 2 ч при комнатной температуре в 0.1 М NaHCO₃, избыток реагента отделяли на Sephadex G-25 спин-колонке, уравновешенной водой. SMCC-активированный олигонуклеотид инкубировали с тионилированным BSA в молярном соотношении 2:1 в течение ночи. Высокомолекулярную фракцию выделяли из реакционной смеси гель-фильтрацией на колонке D-salt Dextran Desalting (Pierce, США), уравновешенной буфером, содержащим 20 мМ Трис-HCl pH 7.0, 0.1 М NaCl, и использовали без дополнительной очистки.

Удлинение PEXT-праймеров для модельного анализа проводили с помощью терминальной трансферазы в 10 мкл буфера, содержащего NEBuffer4, 0.25 мМ CoCl₂, 1.25 нмоль/мкл dTTP, 1.25 нмоль/мкл B-dUTP (в случае LeiM-праймера) или D-dUTP (в случае LeiN-праймера), 5 ед. акт. терминальной трансферазы и 4 пмоль LeiN- или LeiM-праймера. Реакцию проводили при 37°C в течение 1 ч и останавливали добавлением 1 мкл 0.5 М EDTA.

Аmplификацию геномной ДНК (50 нг) проводили в 25 мкл буфера, содержащего 67 мМ Трис-HCl pH 8.8, 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01 % Tween-20, 2 мМ MgCl₂, dNTP – в концентрации 0.2 мМ каждый, праймеры LeiUp и LeiDn – в концентрации 0.4 мкМ каждый, 2.5 ед. акт. Hot Start-Taq-ДНК-полимеразы. Условия ПЦР: денатурация при 95°C в течение 5 мин, далее 30 циклов (95°C – 30 с, 53°C – 30 с, 72°C – 40 с), с последующим прогреванием реакционной смеси при 72°C в течение 10 мин. Концентрацию продуктов ПЦР определяли денситометрически по

картинке электрофореза в 1% агарозном геле, окрашенным этидием бромидом с помощью программного обеспечения Alpha Easy™ (Alpha Innotech Corporation, США), в качестве калибровочных маркеров использовали 100 bp +1.5 Kb DNA Ladder (СибЭнзим, Новосибирск).

РЕХТ-реакцию проводили в 10 мкл буфера, содержащего 20 мМ Трис-НСl рН 8.8, 10 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 мМ КСl, 0.1 % Triton X-100, 2 мМ MgSO_4 , dАТФ, dСТФ, dGТФ в концентрации 2.5 мкМ каждый, dТТФ и В-dUТФ в концентрации 1.25 мкМ каждый, 0.2 пмоль амплифицированной ДНК-матрицы, 1 пмоль LeiN - или LeiM -праймера, 0.5 ед. акт. Vent (exo-) ДНК-полимеразы. Условия реакции: денатурация при 95°C в течение 5 мин, далее 3 цикла (95°C – 15 с, 55°C – 15 с, 72°C – 15 с), с последующим прогреванием реакционной смеси при 95°C в течение 5 мин.

В случае использования Таq-ДНК-полимеразы реакционная смесь содержала 10 мкл буфера, содержащего 60 мМ Трис-НСl рН 8.5, 1.5 мМ MgCl_2 ; 25 мМ КСl; 10 мМ 2-меркаптоэтанол; 0.1% Тритон X-100; dАТФ, dСТФ, dGТФ в концентрации 2.5 мкМ каждый; dТТФ, Вio-dUТФ в концентрации 1.25 мкМ каждый; 0.2 пмоль амплифицированной ДНК-матрицы, 1 пмоль LeiN - или LeiM -праймера, 0.5 ед. акт. Таq-ДНК-полимеразы. Условия реакции те же.

Гибридизационный анализ продуктов РЕХТ-реакции. Иммуобилизацию олигонуклеотида $\text{NH}_2\text{-T}_{30}$ на поверхность прозрачных планшетов DNA-Bind (Costar, США), активированную сукцинимидными группами, проводили в буфере, содержащем 0.5 М Na_2HPO_4 и 1 мМ EDTA (концентрация олигонуклеотида 0.5 мкМ, в лунки вносили по 50 мкл), при комнатной температуре в течение 15 мин. Лунки планшета трижды промывали промывочным буфером (PBS – 50 мМ фосфатный буфер рН 7.0, 0.15 М NaCl, содержащий 0.1% Tween 20, 5 мМ EDTA). Блокирование сайтов неспецифического связывания на поверхности планшетов проводили 1% BSA в TBS-буфере (10 мМ Трис-НСl рН 8.0, 0.15 М NaCl) в течение 30 мин при комнатной температуре. После промывки в лунки планшета вносили по 3 мкл продуктов РЕХТ-реакции в 47 мкл гибридизационного буфера (0.1 М малеиминовая кислота, 0.15 М NaCl, 5 мМ EDTA, 1% BSA) и инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Лунки промывали, вносили по 50 мкл раствора конъюгата обелина со стрептавидином (1 мкг/мл, в 20 мМ Трис-НСl рН 8.0, 0.1 М NaCl 5 мМ EDTA, 1% BSA), инкубировали при комнатной температуре 30 мин и снова промывали промывочным буфером. Биолюминесценцию сорбированного комплекса инициировали добавлением 50 мкл 0.1 М CaCl_2 , в 0.1 М Трис-НСl рН 8.8 и измеряли с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 (Berthold, Германия). Сигнал от каждой лунки интегрировали в течение 5 с. В контрольные лунки (3-6 повторов) вносили по 50 мкл гибридизационного буфера, полученный от них усредненный биолюминесцентный сигнал вычитали от сигналов рабочих лунок.

Одновременный анализ продуктов РЕХТ-реакции. Поверхность лунок непрозрачного планшета (Costar, США) активировали инкубированием конъюгата BSA- T_{30} (по 100 мкл

раствора, 10 мкг/мл, в 0.1 М NaHCO₃, 1 ч при 37°C). После промывки вносили по 100 мкл смеси биотинилированных LeіN- и LeіM-праймеров в гибридизационном буфере с концентрациями: 1.6, 8, 40, 200 и 1000 пМ (в случае модельного анализа). В случае клинических образцов ДНК в лунки вносили 6 мкл смеси продуктов PEXТ-реакций с LeіN-праймером и LeіM-праймером в 94 мкл гибридизационного буфера. Планшет инкубировали при комнатной температуре 30 мин. После промывки в лунки вносили по 100 мкл смеси меток (конъюгаты обелин–антитело к дигоксигенину и люцифераза–стрептавидин) в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСl рН 7.0, 5 мМ EDTA, 0.1 М NaCl, 1% BSA, инкубировали при комнатной температуре 30 мин и снова промывали. Биolumинесценцию обелина инициировали добавлением 100 мкл 0.1 М CaCl₂, в 0.1 М Трис-НСl рН 8.8. Сигнал интегрировали в течение 5 с, а затем инициировали биolumинесценцию люциферазы добавлением в те же лунки по 50 мкл раствора СВР (4.5 мкМ в 0.1 М Трис-НСl рН 8.8, 5 мМ EDTA), сигнал интегрировали в течение 20 с. В контрольные лунки (3-5 повторов) вносили по 100 мкл гибридизационного буфера, полученный от них усредненный биolumинесцентный сигнал вычитали от сигналов рабочих лунок.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы статьи выражают благодарность сотрудникам гематологического научного центра РАМН (Красноярский филиал) за предоставленные образцы ДНК.

Данная работа финансировалась из средств междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 76, а также Красноярским краевым фондом поддержки научной и научно-технической деятельности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Виноградова О.А., Пышный Д.В.* // Acta Naturae. 2010. Т. 2. С. 40–58.
2. *Hu Y.-W., Balaskas E., Kessler G., Issid C., Scully L.J., Murphy D.G., Rinfret A., Giulivi A., Scalia V., Gill P.* // Nucleic Acid Res. 1998. V. 26. P.5013–5015.
3. *Высоцкий Е.С., Маркова С.В., Франк Л.А.* // Молекулярная биология. 2006. Т. 40. С. 404–417.
4. *Frank L. A.* // Sensors. 2010. V. 10. P. 11287–1130.
5. *Titushin M.S., Markova S.V., Frank L.A., Malikova N.P., Stepanyuk G.A., Lee J., Vysotski E.S.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2008. V. 7. P.189–196.
6. *Wu A.M., Loening A.M., Fenn T.D., Gambhir S.S.* // Protein Eng. Des. Sel. 2006. V. 19. P. 391–400.
7. *Charbonneau H., Cormier M.J.* // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. P. 769–780.
8. *Stepanyuk G.A., Liu Z.-J., Markova S.S., Frank L.A., Lee J., Vysotski E.S., Wang B.-C.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2008. V. 7. P. 442–447.
9. *Longo M.C., Berningen M.S., Hartley J.L.* // Gene. 1990. V. 93. P. 125–128.
10. *Zerefos P.G., Ioannou P.C., Traeger-Synodinos J., Dimissianos G., Kanavakis E., Christopoulos T.K.* // Hum. Mutat. 2006. V. 27. P.279–285.
11. *Illarionov B.A., Frank L.A., Illarionova V.A., Bondar V.S., Vysotski E.S., Blinks J.R.* // Methods Enzymol. 2000. V. 227. P.223–249.
12. *Stepanyuk G.A., Unch G., Malikova N.P., Markova S.V., Lee J., Vysotski E.S.* // Anal. Bioanal. Chem. 2010. V. 398. P.1809–1817.
13. *Франк Л.А., Петунин А.И., Высоцкий Е.С.* // Биооргани. химия. 2004. Т. 30. С. 364–368. (L.A. Frank, A.I. Petunin and E.S. Vysotski // Russian Journal of Bioorganic Chemistry 2004. V. 30 P.364-368).

РИСУНКИ

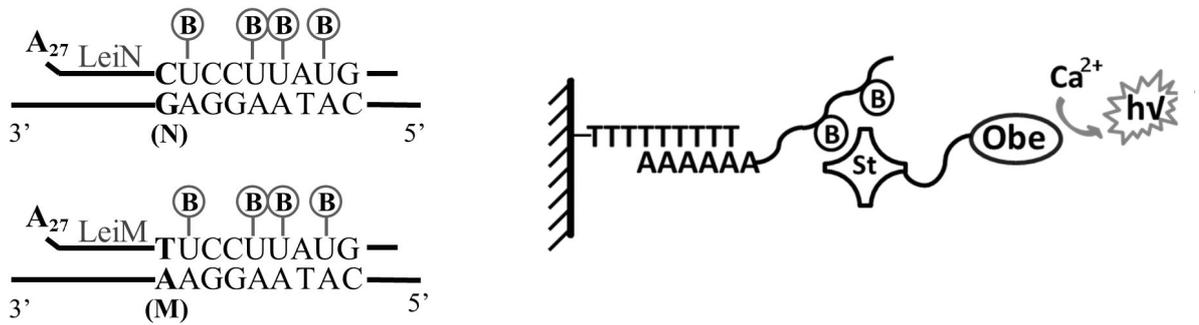


Рис. 1. Проведение генотипирования однонуклеотидного полиморфизма с использованием фотопротейна обелина. Слева – схема РЕХТ-реакции. Справа – анализ полученных продуктов. N – нормальный аллель, М – мутантный аллель.



Рис. 2. Биолуминесцентный анализ продуктов РЕХТ-реакции, проведенной при использовании различного молярного соотношения праймер/ДНК матрица (G/G генотип; Taq-ДНК-полимераза). Сигналы BL_N (1) и BL_M (2) получены при использовании LeiN- и LeiM-праймеров, соответственно; (3) – отношение сигналов BL_N/BL_M). Каждая точка – среднее от двух независимых определений.

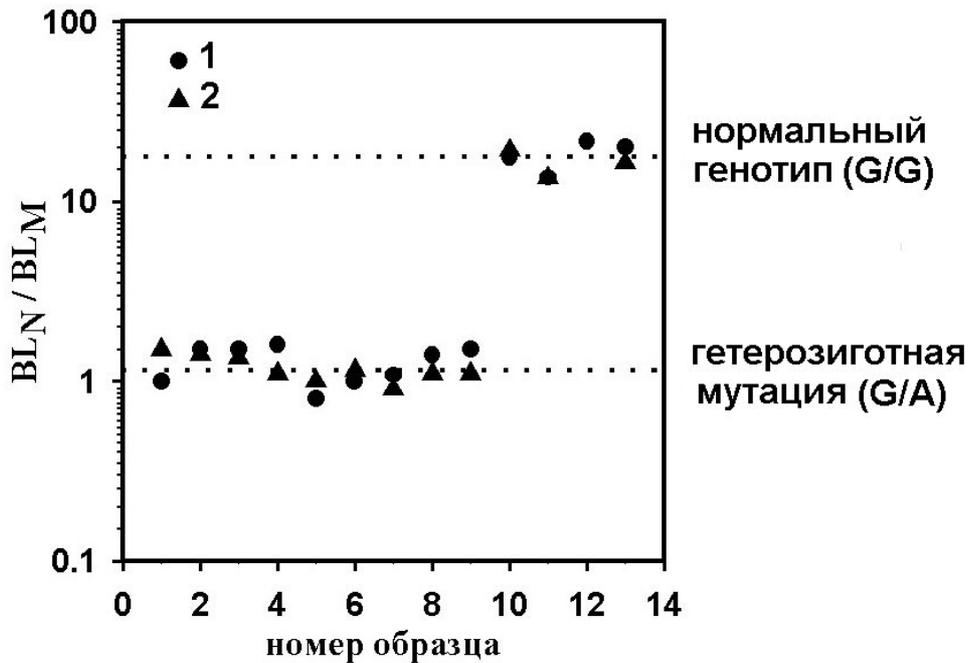


Рис. 3. Результаты генотипирования полиморфизма 1691 G→A гена FV (лейденская мутация). BL_N/BL_M – соотношение биолуминесцентных сигналов, полученных от удлиненных LeiN- и LeiM-праймеров с использованием Vent(exo-) ДНК-полимеразы (1) и Taq-ДНК-полимеразы (2). Каждая точка – среднее от двух независимых определений.

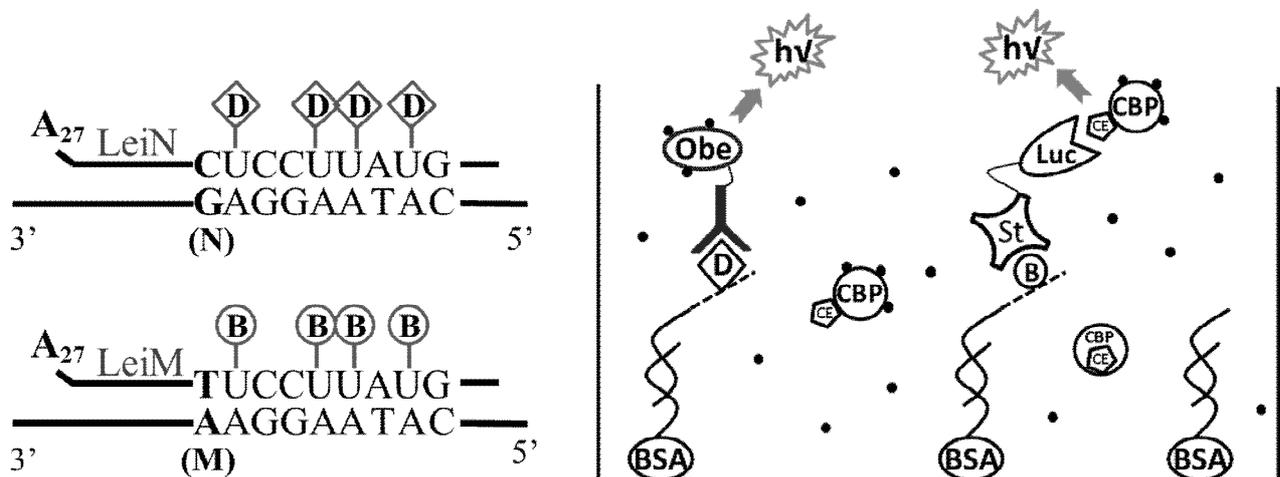


Рис. 4. Генотипирование однонуклеотидного полиморфизма с использованием фотопротейна обелина и люциферазы RMLuc. Слева – схема PEXE-реакций. Справа – схема одновременного анализа продуктов PEXE-реакций. CE - целентеразин; Y – антитела к дигоксигенину, черные точки – ионы кальция.

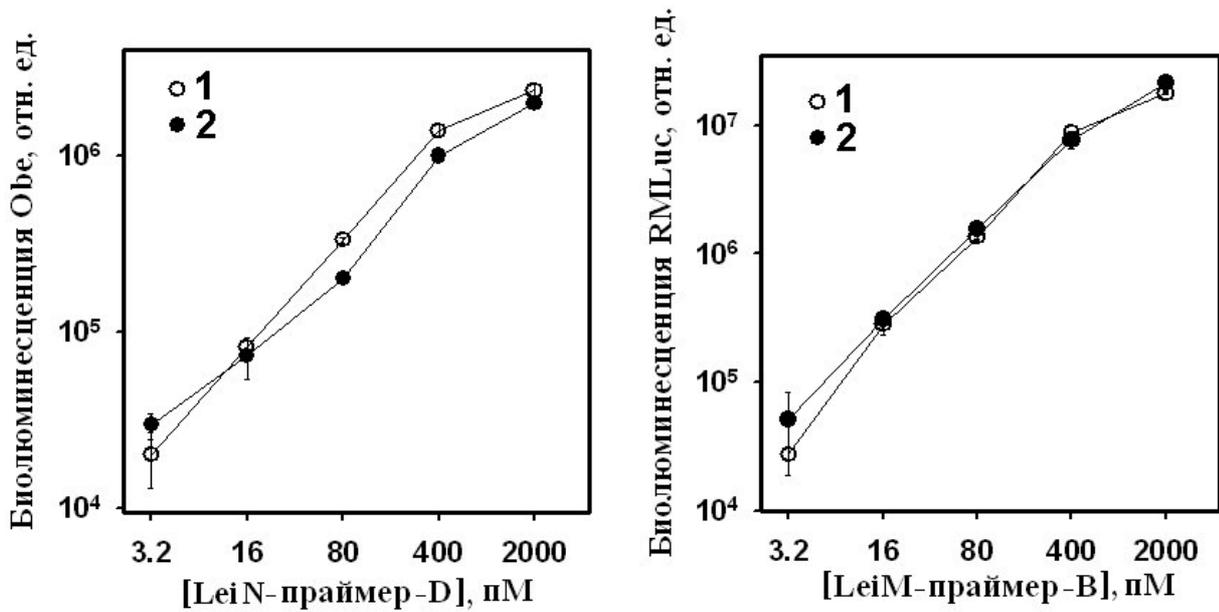


Рис. 5. Раздельное (1) и одновременное (2) определение дигоксигенин-меченных LeIN- (слева) и биотин-меченных LeIM- (справа) праймеров. Каждая точка – среднее от трех независимых определений \pm SD. Некоторые интервалы разбросов заслонены символами.

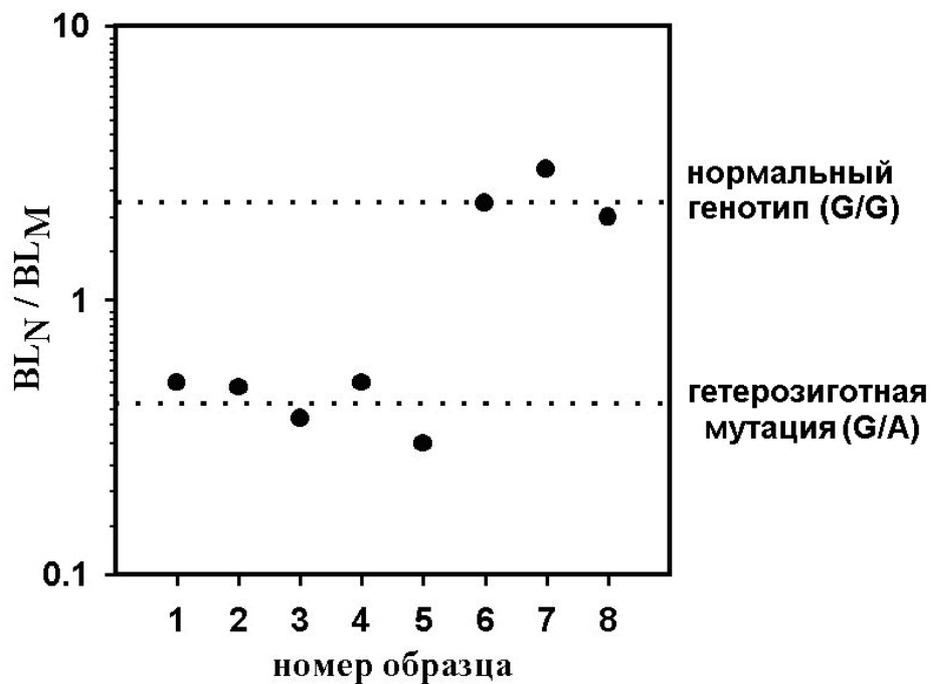


Рис. 6. Результаты генотипирования полиморфизма 1691 G→A гена FV (лейденская мутация) одновременным билюминесцентным анализом продуктов ПЕХТ-реакции (с использованием Vent (exo-) ДНК-полимеразы). Каждая точка – среднее от двух независимых определений.

BIOLUMINESCENT REPORTERS TO IDENTIFY GENE ALLELIC VARIANTS

V. V. Krasitskaya*, L. P. Burakova*, I. A. Pyshnaya**, L. A. Frank*#

#Phone +7 (391) 249-4430; fax: +7 (391) 243-3400; e-mail: lfrank@yandex.ru

*Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, str.50, Akademgorodok, 660036, Russia

**Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, 630090

The method of single nucleotide polymorphism identification based on primer extension reaction (PEXT) with the following bioluminescent solid-phase microassay was developed. The recombinant Ca^{2+} -regulated photoprotein obelin and coelenterazine-dependent luciferase *Renilla muelleri* were used as reporters. Factor V Leiden polymorphism 1691 G→A (R506Q) of human *F5* gene genotyping was used for investigation. Genomic DNA was amplified by PCR using primers, flanking polymorphic site of 140 base pairs. PCR products were used as a template for two PEXT reaction using two primers with 3'-end nucleotides, complementary either normal or mutant alleles.

At complementarity of template and allelic-typical primer its extension with DNA-polymerase takes place. The products carried biotin due to availability of biotinylated dUTP in the reactions mixture. The assay was carried out using obelin-streptavidin chemical conjugates. Optimal PEXT-reaction conditions providing high reliability of SNP genotyping were found. A new approach to determine both alleles in one well was developed applying two bioluminescent reporters. Availability of the proposed approach was shown in the study of clinical DNA samples.

Key words: SNP; PEXT-reaction; obelin; luciferase; bioluminescence microassay