



УДК 577.151.35,577.113.4:577.2.08

СПОСОБ ЭМУЛЬСИОННОЙ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ ДНК-БИБЛИОТЕК С ВЫРОЖДЕННОЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЧАСТЬЮ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ АПТАМЕРОВ

© 2020 г. В. Е. Кузнецова*, В. Е. Шершов*, Р. А. Мифтахов*,
С. А. Лапа*, А. С. Заседателев*, Э. Н. Тимофеев*, А. В. Чудинов*.*

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

Поступила в редакцию 27.09.2019 г.

После доработки 07.10.2019 г.

Принята к публикации 05.11.2019 г.

Для эмульсионной ПЦР-амплификации комбинаторных библиотек олигонуклеотидов оптимизированы условия стабильной генерации эмульсий “вода-в-масле” с каплями оптимального размера при использовании 3% силиконового эмульгатора ABIL EM 180 с добавлением 0.5% Triton X100 в минеральном масле в режиме контролируемого механического перемешивания.

Ключевые слова: аптамеры, SELEX, эмульсионная ПЦР, ePCR, ABIL EM 180

DOI: 10.31857/S0132342320020128

Аптамерами называются короткие одноцепочечные олигонуклеотиды, обладающие определенной пространственной структурой и, благодаря этому, способные с высокой аффинностью и специфичностью связываться с молекулами-мишенями различной природы [1]. Аптамеры получают направленным отбором *in vitro* из комбинаторных библиотек олигонуклеотидов, содержащих вырожденные последовательности длиной 40 нт, фланкированные константными участками длиной около 20 нт, которые при селекции используют в качестве зон отжига праймеров для ПЦР-амплификации [2].

Важным этапом при селекции аптамеров из библиотеки олигонуклеотидов является проведение реакции амплификации после раунда отбора (SELEX) связавшихся с молекулой-мишенью вариантов аптамеров [3]. Применение традиционного метода ПЦР приводит к избирательному накоплению ампликонов, а также к появлению длинноцепочечных ПЦР-продуктов [4–6], образование которых можно минимизировать проведением ПЦР в водно-масляной эмульсии. Высокоэффективная ПЦР в эмульсии предполагает проведение процесса в миллионах изолирован-

ных микрореакторов и позволяет получить тысячи копий единственного фрагмента ДНК. Принцип проведения эмульсионной ПЦР заключается в добавлении водного раствора компонентов ПЦР в смесь минерального масла и эмульгатора с таким расчетом, чтобы каждая молекула ДНК оказалась в изолированной водной микрокапле [6]. Этот подход позволяет минимизировать потери отдельных исходных матриц [7]. Для того чтобы выполнять манипуляции с эмульсией, такие, как воспроизводимая генерация, амплификация при высокой температуре, перенос эмульсии, важно использовать эмульгаторы, дающие стабильные эмульсии воды в масле. В большинстве случаев такие эмульгаторы являются амфифильными молекулами с гидрофобными и гидрофильными группами [8]. Наиболее простым решением этих задач является использование высокоэффективных биосовместимых эмульгаторов (Span 80, Tween 20, Triton X100 [6, 9]; ABIL EM 90 и Triton X100 [6, 10, 11]; ABIL EM 180 [12]; Span 80 и brij 35 [13], Span 80 и brij L4 [14]) и минерального, а также синтетического (Tegosoft Dec, ABIL WE09) масла [15, 16]. Поверхностно-активные вещества (ПАВ) адсорбируются на границе раздела “масло–вода” и снижают поверхностное натяжение, что препятствует сливанию капель и придает им метастабильность [17]. Взаимодействие биологических молекул (белков, ДНК, РНК) с границей раздела “масло–вода” может привести к денатурации и локализации молекул на поверхности [18]. Диффузия молекул в масляную фазу может привести к

Сокращения: SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения); ПАВ – поверхностно-активные вещества; эПЦР – эмульсионная полимеразная цепная реакция.

* Автор для связи: (тел.: +7 (499) 135-98-00; факс (495) 135-14-05; эл. почта: chud@imbr.ru).

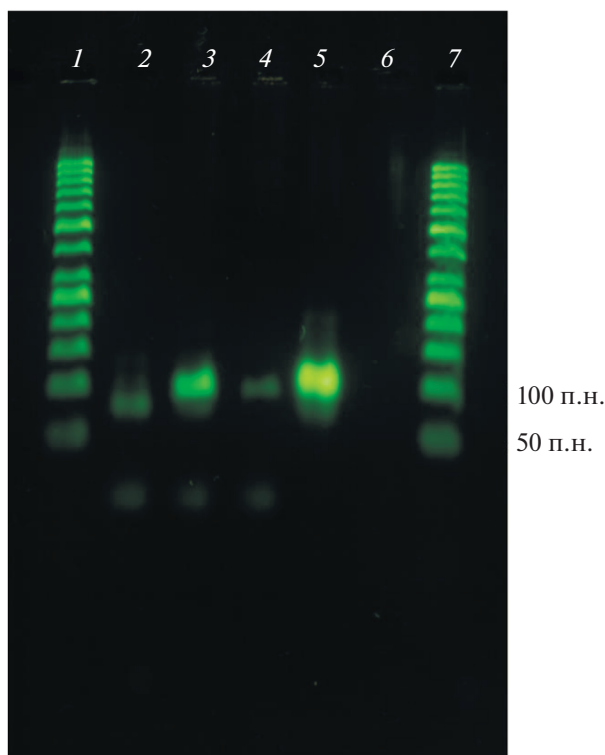


Рис. 1. Гель-электрофорез в 2% агарозном геле продуктов эмульсионной ПЦР-амплификации ДНК-библиотеки, полученных с добавлением BSA в концентрации 0, 0.5, 1 мг/мл (дорожки 2–4 соответственно). Положительный контроль, продукты традиционной ПЦР-амплификации ДНК-библиотеки (дорожка 5), отрицательный контроль – результаты эмульсионной ПЦР-амплификации ДНК-библиотеки, полученные при отсутствии матрицы (дорожка 6); маркеры длин дцДНК GeneRuler 50 п.н. (дорожки 1 и 7).

потере ПЦР-продукта и перекрестной контаминации в микрокаплях [19].

В качестве непрерывной фазы применяли минеральное масло (Sigma-Aldrich Corp., США) с добавлением ПАВ, представленных в табл. 1. ABIL EM 180 [12, 17] обладает хорошей термостабильностью и совместимостью с электролитами, а его применение в парфюмерной промышленности свидетельствует о хорошей биосовместимости. В качестве дисперсной фазы использовали раствор ПЦР-смеси постоянного состава. По результатам исследований определены режимы и условия стабильной генерации эмульсий с каплями оптимального размера, такие как температура, интенсивность перемешивания, концентрации ПАВ и дисперсной фазы.

Воспроизводимые результаты при формировании эмульсии получены при использовании ABIL EM 180 с концентрацией 3% с добавлением 0.5% Triton X100 в режиме механического перемешивания со скоростью 1400 об./мин. Было показано, что сочетание состава масляной фазы и раз-

ных видов магнитных перемешивающих элементов позволяет добиться устойчивой генерации эмульсии с микрокаплями оптимального размера (табл. 1).

Скорость перемешивания оказывает сильное влияние на размер микрокапель дисперсной фазы в эмульсиях, получаемых методом механического перемешивания. Экспериментально найдено, что при недостаточно высокой скорости перемешивания происходит коалесценция (слияние) капель в получаемой эмульсии, а увеличение интенсивности перемешивания (центрифуга – вортекс Микроспин FV-2400) приводит к уменьшению размера капель, что в свою очередь снижает выход продуктов амплификации ДНК в ходе эмульсионной ПЦР.

Нами изучено влияние концентрации эмульгатора и доли дисперсной фазы на эффективность амплификации комбинаторной библиотеки ДНК, которая непосредственно связана с размером микрокапель дисперсной фазы. С ростом концентрации ПАВ до определенного предела средний размер капель в эмульсиях уменьшается [20], в то время как низкая концентрация эмульгатора приводит к коалесценции капель. Такое же влияние оказывает высокая концентрация дисперсной фазы, при которой водные микрокапли находятся на более близком расстоянии друг от друга, что приводит к их слиянию и увеличению диаметра.

Для проведения эмульсионной ПЦР оптимизированы различные параметры, такие как начальная концентрация матрицы, температура отжига и концентрация праймеров, концентрация ДНК-полимеразы. Помимо температурной устойчивости капель начальная концентрация матрицы является наиболее важным параметром эмульсионной ПЦР. Слишком высокая концентрация ДНК-матрицы в реакционной смеси ингибирует ПЦР, а также приводит к неспецифической амплификации.

Другим важным параметром является концентрация бычьего сывороточного альбумина (BSA), который добавляют к дисперсной фазе [11, 16]. Присутствие глобулярного белка в водной микрокапле необходимо для предотвращения сорбции ДНК-полимеразы на поверхности раздела фаз “масло-вода” и ее денатурации. Экспериментально определена оптимальная концентрация BSA, составившая 0.5 мг/мл, для проведения ПЦР-амплификации с высокой эффективностью (рис. 1). Отсутствие BSA или его высокая концентрация в дисперсной фазе привела к резкому уменьшению эффективности ПЦР-амплификации.

Результаты исследований по изучению температурной стабильности эмульсии показали, что добавление 3% ABIL EM 180 и 0.5% Triton X100 в минеральное масло позволяет обеспечить температурную устойчивость эмульсии (72°C в течение,

Таблица 1. Условия получения водно-масляной эмульсии

Состав эмульсии	Емкость	Каталожный номер	Магнитный перемешивающий элемент, тefлон	Каталожный номер	Стабильность эмульсии после проведения ПЦР	ПЦР продукт				
3% ABIL EM 180— 0.5% Triton X100*	Пробирка 2 мл, типа Эппендорф, с замком Safe-Lock	Erpendorf-0030123344	Круглый цилиндрический, 2 × 7 мм	Brand, 137106	+	+/-				
							Эллиптический, 5 × 10 мм	Brand, 137300	+	+/-
3% ABIL EM 180— 0.05% Triton X100*	Пробирка 2 мл, с юбкой, с резьбой	SSI-2340-00	Круглый цилиндрический, 3 × 8 мм	Brand, 137104	+	+/-				
							Nunc (Thermo Scientific) NC TSI-3-D2	FV-2400	+	+/-
5% Span 80—0.5% brjij L4*	Пробирка 2 мл, типа Эппендорф, с замком Safe-Lock	Erpendorf-0030123344	Круглый цилиндрический, 3 × 8 мм	Brand, 137104	+	+/-				
							Nunc (Thermo Scientific) NC TSI-3-D2	Sigma-Aldrich, 23226	-	-
5% Span 80—0.5% brjij L4*	Пробирка 2 мл, с юбкой, с резьбой	SSI-2340-00	Круглый цилиндрический, 3 × 8 мм	Brand, 137104	+	-				
							Nunc (Thermo Scientific) NC TSI-3-D2	Sigma-Aldrich, 23226	-	-

* В минеральном масле; +/- — ПЦР продукт присутствует в незначительном количестве.

как минимум, 4 ч), что необходимо для реализации ПЦР-амплификации. Таким образом, в работе продемонстрированы преимущества и условия проведения ПЦР в водно-масляной эмульсии для амплификации комбинаторных библиотек олигонуклеотидов с высокой степенью эффективности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Библиотеку одноцепочечных ДНК (оцДНК-библиотеку) получали стандартными методами синтеза однонитевых олигонуклеотидов, при синтезе вырожденной части в реакцию добавляли смесь всех четырех производных дезоксирибонуклеотидов. Для ферментативного получения немодифицированной универсальной иницирующей ДНК-библиотеки сконструированы и синтезированы матричные олигонуклеотиды с вырожденной центральной частью и взаимно комплементарными фланкирующими частями (5'–3'):

матрица GCT CCT GAC GAT CGA CGA CCG AG-(N)₄₀-GCA ACT GCA GCA TGC TTC GCA TT;

прямой праймер GCT CCT GAC GAT CGA CGA CCG AG;

обратный праймер AAT GCG AAG CAT GCT GCA GTT GC.

Для создания органической фазы эмульсионной ПЦР использовали минеральное масло (Sigma-Aldrich, США), эмульгатор Abil EM 180 (Evonik, Германия), Triton X100 (Sigma Aldrich, США). Предварительно получали эмульсию ABIL EM 180 с концентрацией 3% с добавлением 0.5% Triton X100 в минеральном масле в режиме механического перемешивания со скоростью 1000 об./мин при 50°C в течение 8 ч. Полученную эмульсию хранили при 5°C, перед использованием тщательно перемешивали на магнитной мешалке в течение 15 мин при комнатной температуре. Водно-масляную эмульсию получали при использовании пробирки типа Эппендорф с замком объемом 2 мл и магнитного перемешивающего элемента (Sigma-Aldrich, 23226, США). Охлажденный до 5°C раствор ПЦР-смеси (100 мкл) в течение 2 мин добавляли порциями по 13 мкл к раствору масляной фазы (600 мкл) при перемешивании на магнитной мешалке (Heidolph MR Hai-tes, Германия) при 1400 об./мин на льду и продолжали перемешивание в течение 6 мин.

Водная фаза содержала 10-кратный ПЦР-буфер (Sibenzyme, США), 2.5 mM MgSO₄, dATP, dCTP, dGTP и dTTP (Thermo Scientific, США), каждый в концентрации 0.4 mM, праймеры прямой и обратный, каждый в концентрации 0.6 мкМ, матрицу в концентрации 0.01 нМ, 0.5 мг/мл BSA (Fermentas, США) и ДНК-полимеразу Taq (Sibenzyme, США) в концентрации 0.1 ед. акт./мкл.

Амплификацию проводили на автоматическом термоциклере (Bio Rad DNA Engine DYAD Thermal Cycler, США) с использованием активного точного режима регулирования температуры и следующего температурно-временного профиля: предварительный прогрев при 95°C в течение 5 мин, за которым следовали 30 циклов: 95°C – 30 с, 65°C – 30 с, 72°C – 1 мин. Завершающую элонгацию проводили при 72°C в течение 5 мин.

Полученные продукты ПЦР выделяли из водно-эмульсионной смеси последовательной экстракцией диэтиловым эфиром и н-бутанолом с переосаждением 2% раствором перхлората лития в ацетоне [6].

Для проведения электрофореза использовали 2% агарозный гель в буфере TBE (Sigma-Aldrich, США). Пробы смешивали с буфером для нанесения, содержащим краситель SYBRGreen (Sigma-Aldrich, США). Электрофорез проводили в буфере TBE при напряжении 110 В. По окончании электрофореза ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм на трансиллюминаторе (LKB, Швеция).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ МК № 18-29-09151\18.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vincent J.B. Ruigrok. Selection and characterization of DNA aptamers. 2013. 160 p.
2. Gold L., Ayers D., Bertino J., Bock C., Bock A., Brody E., Carter J., Dalby A., Eaton B., Fitzwater T., Flather D., Forbes A., Foreman T., Fowler C., Gawande B., Goss M., Gunn M., Gupta S., Halladay D., Heil J., Heilig J., Hicke B., Husar G., Janjic N., Jarvis T., Jennings S., Katilius E., Keeney T., Kim N., Koch T., Kraemer S., Kroiss L., Le N., Levine D., Lindsey W., Lollo B., Mayfield W., Mehan M., Mehler R., Nelson S., Nelson M., Nieuwlandt D., Nikrad M., Ochsner U., Ostroff R., Otis M., Parker T., Pietrasiewicz S., Resnicow D., Rohloff J., Sanders G., Sattin S., Schneider D., Singer B., Stanton M., Sterkel A., Stewart A., Stratford S., Vaught J., Vrkljan M., Walker J., Watrobka M., Waugh S., Weiss A., Wilcox S., Wolfson A., Wolk S., Zhang C., Zichi D. // PLoS One. 2010. V. 5. № 12. e15004.

3. *Sefah K., Shangguan D., Xiong X., O'Donoghue M.B., Tan W.* // *Nat. Protoc.* 2010. V. 5. № 6. P. 1169–1185.
4. *Nakano M., Komatsu J., Matsuura S., Takashima K., Katsura S., Mizuno A.* // *J. Biotechnol.* 2003. V. 102. № 2. P. 117–124.
5. *Musyanovych A., Mailänder V., Landfester K.* // *Bio-macromolecules.* 2005. V. 6. № 4. P. 1824–1828.
6. *Williams R., Peisajovich S.G., Miller O.J., Magdassi S., Tawfik D.S., Griffiths A.D.* // *Nat. Methods.* 2006. V. 3. № 7. P. 545–550.
7. *Антонова О.С., Рудницкая Г.Е., Тупик А.Н., Буляница А.Л., Евстапов А.А., Курочкин В.Е.* // *Научное приборостроение.* 2011. Т. 21. № 4. С. 5–21.
8. *Baret J.C.* // *Lab on a Chip.* 2012. V. 12. № 3. P. 422–433.
9. *Keke Shao, Weifeng Ding, Feng Wang, Haiquan Li, Da Ma, Huimin Wang* // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 9. e24910.
10. *Schaerli Y., Wootton R.C., Robinson T., Stein V., Dunsby C., Neil M., French P., Demello A., Abell C., Hollfelder F.* // *Analyt. Chem.* 2008. V. 81. № 1. P. 302–306.
11. *Murgha Yu. E., Rouillard J.-M., Gulari E.* // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 4. e94752.
12. *Terekhov S.S., Smirnov I.V., Stepanova A.V., Bobik T.V., Mokrushina Y.A., Ponomarenko N.A., Belogurov A.A., Jr., Rubtsova M.P., Kartseva O.V., Gomzikova M.O., Moskovtsev A.A., Bukatin A.S., Dubina M.V., Kostryukova E.S., Babenko V.V., Vakhitova M.T., Manolov A.I., Malakhova M.V., Kornienko M.A., Tyakht A.V., Vanyushkina A.A., Ilina E.N., Masson P., Gabibov A.G., Altman S.* // *PNAS.* 2017. V. 114. № 10. P. 2550–2555.
13. *Chang Y.T., Hung C.H., Chou H.L.* // *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 2014. V. 49. № 14. P. 1672–1684.
14. *Pandit K.R., Rueger P.E., Calabrese R.V., Raghavan S.R., White I.M.* // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2015. V. 126. P. 489–495.
15. *Diehl F., Li M., He Y., Kinzler K.W., Vogelstein B., Dressman D.* // *Nat. Methods.* 2006. V. 3. № 7. P. 551–559.
16. *Witt M., Phung N.L., Stalke A., Walter J.-G., Stahl F., von Neuhoff N., Scheper T.* // *Engineering in Life Sciences.* 2017. V. 17. P. 953–958.
17. *Белоусов К.И., Евстапов А.А., Кухтевич И.В., По-смитная Я.С.* Основы нанотехнологий. Часть 1, Часть 2. Учебное пособие. СПб: Университет ИТМО, 2015. 55 с.
18. *Roach L.S., Song H., Ismagilov R.F.* // *Analyt. Chem.* 2005. V. 77. № 3. P. 785–796.
19. *Derkach S.R.* // *Adv. Colloid and Interface Sci.* 2009. V. 151. № 1. P. 1–23.
20. *Liu W., Sun D., Li C., Liu Q., Xu J.* // *J. Colloid Interface Sci.* 2006. V. 303. P. 557–563.

Amplification of Random DNA Libraries in Aptamer Selection by Water-in-Oil Emulsion

V. E. Kuznetsova*, V. E. Shershov*, R. A. Miftahov*, S. A. Lapa*, A. S. Zasedatelev*,
E. N. Timofeev*, and A. V. Chudinov*, #

#Phone: +7(499)135-98-00; fax: +7(495)135-14-05; e-mail: chud@eimb.ru

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

The conditions of stable generation of emulsions with drops of optimal size were selected using ABIL EM 180 silicone emulsifier with concentration of 3% with addition of 0.5% Triton X100 in mineral oil in the mode of controlled mechanical mixing for amplification of combinatorial libraries of oligonucleotides.

Keywords: aptamer, SELEX, emulsion PCR, ePCR, ABIL EM 180