



УДК 577.123

НОВЫЕ СПОСОБЫ ГЕНЕРАЦИИ СИГНАЛА ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ АНАЛИЗЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН С ПОМОЩЬЮ ХИМЕРНЫХ ГИБРИДИЗАЦИОННЫХ ЗОНДОВ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

© 2009 г. Р. Р. Гарафутдинов^{##}, Ю. М. Никоноров*, Д. А. Чемерис*, Б. Н. Постригань*, О. В. Чубукова*, Р. Ф. Талипов^{**}, В. А. Вахитов*, А. В. Чемерис*

*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, 450054, Уфа, просп. Октября, 71;

**Башкирский государственный университет, Уфа

Поступила в редакцию 16.12.2008 г. Принята к печати 25.03.2009 г.

Предложены новые варианты генерации и усиления сигнала флуоресценции при анализе однонуклеотидных замен в режиме реального времени. Для генерации флуоресценции использованы меченые ДНК-РНК-ДНК-химерные олигонуклеотидные зонды, которые отжигаются на ДНК-мишени, образующейся в ходе аллель-специфического лигирования “С-зонда” и последующей изотермической амплификации по методу “катящегося кольца”, и разрушаются в ходе реакций ферментативного и дезоксирибозимного расщепления.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм; химерные гибридационные зонды, дезоксирибозимы; технология циклического зонда; амплификация по методу “катящегося кольца”.

ВВЕДЕНИЕ

Обнаружение однонуклеотидных замен (SNP) *de novo* составляет важную часть исследований генома человека. Оно осуществляется в ходе секвенирования и сравнительного анализа геномной ДНК [1]. Значительная часть методов детекции SNP основана на использовании гибридационных зондов – олигонуклеотидов с ковалентно связанными репортерными группами. Особый интерес представляют ДНК-РНК-ДНК-химерные зонды, расщепляющиеся специфично по РНК-фрагменту. Они успешно функционируют в технологии циклического зонда (Cycling Probe Technology, СРТ), основанной на уникальном свойстве рибонуклеазы H (РНКаза H, КФ 3.1.26.4) разрушать гетеродуплексы РНК/ДНК, не затрагивая при этом ни одноцепочечные нуклеиновые кислоты, ни двуцепочечные структуры РНК/РНК или ДНК/ДНК [2–7]. Большинство разработанных вариантов метода СРТ рассчитано на применение линейных гибридационных зондов. Так, предложено использовать в ПЦР в качестве праймеров химерные РНК-содержащие олигонук-

леотиды, которые удлиняются специальной ДНК-полимеразой и затем расщепляются РНКазой H с образованием нового химерного праймера [8, 9].

Эффективными гибридационными зондами являются молекулярные маяки (molecular beacons) – олигонуклеотиды, образующие шпильчатую структуру и несущие по разным концам молекулы флуоресцентный краситель и тушитель флуоресценции [10–12]. Использование химерных молекулярных маяков в СРТ описано в двух работах. Авторами одной из них [13] были сконструированы шпильчатые структуры, в которых петля полностью или частично представляла собой рибоолигонуклеотид. Однако исследователи ограничились детекцией продуктов реакции методом гель-электрофореза. Зонд с ДНК/РНК-гетеродуплексом в стебле шпильки был использован для определения активности РНКазы H [14]. Предложенный авторами зонд не требовал проведения стадии молекулярной гибридации, но мог быть применен для решения лишь одной конкретной задачи.

Одним из способов расщепления РНК-содержащих зондов является использование дезоксирибозимов – молекул ДНК, обладающих ферментативной активностью [15, 16]. Некоторые дезоксирибозимы функционируют в кислых средах [17, 18], что немаловажно при использовании неустойчивых в щелочных средах РНК-содержащих структур. Одним из наиболее известных в настоящее время является дезоксирибозим 10–23, для которого подробно изу-

Сокращения: СРТ (Cycling Probe Technology) – технология циклического зонда; FAM – 5-карбоксифлуоресцеин; FRET (fluorescence resonance energy transfer) – резонансный перенос энергии флуоресценции; RCA (Rolling Circle Amplification) – амплификация по методу “катящегося кольца”; SNP (Single Nucleotide Polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм; ЛЦР – лигазная цепная реакция.

[#] Автор для связи (тел./факс: (347) 235-60-88; эл. почта: garafutdinovr@mail.ru).

чены последовательность каталитического домена и условия функционирования [19–21].

На сегодняшний день предложена целая группа методов детекции SNP, основанных на использовании ДНК-лигаз. Дискриминирующее лигирование олигонуклеотидов на мишени ДНК было предложено использовать для поиска мутаций еще в конце 80-х годов прошлого века, и с тех пор постоянно совершенствовалось [22, 23]. Позже была описана лигазная цепная реакция (ЛЦР) и ее модификации, в которых дискриминацию обеспечивали четыре олигонуклеотида, гибридирующихся встык на матрице и лигируемых далее термостабильными ДНК-лигазами [24–26].

Среди существующих способов детекции SNP, основанных на лигировании, можно выделить отдельную группу методов, базирующихся на изотермической амплификации по методу “катящегося кольца” (Rolling Circle Amplification, RCA) [27–29]. Данный способ заключается в образовании из линейного олигонуклеотида путем лигирования его концов на мишени кольцевой одноцепочечной ДНК, называемой “С-зондом” или зондом “висячий замок” (padlock) [30, 31]. Образующиеся циклические структуры служат матрицами для удлинения праймеров с помощью ферментов с функцией вытеснения цепи: фрагмента Клёнова [32], ДНК-полимераз $\phi 29$ и Bst [33]. Авторы [27] показали, что за 90 мин реакции количество копий колец увеличивается в 10^9 раз, что достаточно для детекции SNP в геномной ДНК. В ранних работах детекция образования продукта в ходе RCA осуществлялась электрофоретически. Позднее стали применять флуоресцентно меченные зонды, позволившие использовать эффект резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET-эффект) между красителями и проводить процесс в режиме реального времени [34–37].

В основу подавляющего большинства способов обнаружения SNP заложено выявление некомплементарных нуклеотидов при образовании вторичной структуры между цепями анализируемой нуклеиновой кислоты и молекулами зонда. Отсутствие полной комплементарности обуславливает отличие формируемых дуплексов по устойчивости, что позволяет дискриминировать полиморфные варианты.

В настоящей работе нами описаны способы генерации флуоресцентного сигнала при детекции точечных полиморфизмов в режиме реального времени, базирующиеся на двух разных вариантах расщепления химерных гибридизационных зондов в системе, объединяющей реакции аллель-специфического лигирования “С-зонда”, амплификации по методу “катящегося кольца” и технологии циклического зонда.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дискриминирующее лигирование олигонуклеотидов является одним из наиболее чувствительных способов обнаружения точечных мутаций. Совмещенное с амплификацией по методу “катящегося кольца” оно позволяет с высокой точностью выявлять SNP в геномной ДНК [27–37]. Ранее были предложены варианты проведения данной реакции в режиме реального времени, однако использование в ней химерных гибридизационных зондов в литературе не описано.

С целью создания комплексной системы анализа полиморфизмов в ДНК нами исследовано два варианта расщепления химерных зондов – с помощью белка-фермента и дезоксирибозима. Для изучения первого варианта сконструирован зонд RB – шпильчатый ДНК-РНК-ДНК-олигонуклеотид, содержащий РНК-фрагмент в петле, тушителе флуоресценции Dabcyl на 3'-конце и флуоресцентный краситель FAM на 5'-конце (таблица). Известно, что фермент РНКазы H расщепляет ДНК/РНК-гетеродуплексы длиной свыше 6 нт. В зонде RB в последовательности петли содержится 7 рибонуклеотидов. Эксперименты показали, что этого количества достаточно для расщепления зонда. Увеличение длины РНК-фрагмента представляется нецелесообразным, поскольку приводит к значительному повышению стоимости зонда. Зонд для дезоксирибозимного расщепления – ChPr – представляет собой линейный олигонуклеотид, содержащий 4 рибонуклеотида в центральной части молекулы и флуоресцентный краситель FAM и тушитель флуоресценции BnQ-1 по разные стороны от РНК-участка (таблица). Предполагалось, что данный зонд будет расщепляться при действии каталитически активного олигонуклеотида DRZ с кором дезоксирибозима 10–23, имеющего полную гомологию фланкирующих фрагментов с ChPr.

Для сконструированных зондов RB и ChPr в модельных экспериментах была показана возможность их расщепления в ходе СРТ. Разрушение RB осуществлялось РНКазой H в изотермических условиях в режиме реального времени (рис. 1, вариант 1). В этом случае молекула RB отжигается на ДНК-мишени RS, являющейся фрагментом четырехаллельного SNP rs13280 человека *Homo sapiens* (хромосома 8). Образовавшийся ДНК/РНК-гетеродуплекс разрушается РНКазой H, и ДНК-фрагменты диссоциируют из комплекса с ДНК-мишенью, освобождая место для отжига новой молекулы. Содержание ДНК-мишени в растворе значительно меньше, чем зонда RB, поэтому для разрушения большого количества молекул процесс отжига и разрушения должен повториться многократно. Это достигается выдерживанием реакционной смеси при постоянной температуре. Расщепление молекул RB приводит к высвобождению их фрагментов из дуплекса; разъединение красителя и тушителя

Использованные в работе олигонуклеотиды

Шифр	Последовательность 5' → 3'	Длина, нт
RS	CAGATAGATGGTGACAA	17
RB	FAM-TCGCATGTC <i>Сaccauicu</i> ATCTTGCGA-Dabcyl	25
ChPr	TCCTT(FAM)G <i>Augua</i> AAT(BHQ-1)GCC	17
DRZ	GGCATTTAGGCTAGCTACAACGAATCAAGGA	31
ZaP	GTCAATGGCATTTACATCAA	20
Vst	AGCCTTAGGTATGGAATGTC	20
Vst-g	AGCCTTAGGTATGGAATGTG	20
M10	TTGCAACTGAGGGAGCCTTGAATACACCCAAAGACCACATTGGAATTCGCAATCCTA	57
M11	TTGCAACTGAGGGAGCCTTGAATACACGCAAAGACCACATTGGAATTCGCAATCCTA	57
M12	TTGCAACTGAGGGAGCCTTGAATACACGACATTCCATACCTAAGGCTCCAAAGACCACATTGGAATTCGCAATCCTA	77
M2	TGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCCAAT	40
PreCircle1	GTGTATTCAAGGCTCCCTCCTTGATGTAATGCCATTGACACTGTCACCATCTATCTGTAGA- ATTCCAATGTGGTCTTTGG	81
PreCircle2	GTTGCAGTTACCATATTCCTTTCCTTGATTCGTTGTAGCTAGCCTAAATGCCTTCTTGATGTA- AATGCCATGACTTTTGGAGTTTGACACTTGGT	96

- Рибонуклеотиды указаны строчным курсивом.
- Нуклеотиды, соответствующие точечной мутации, выделены жирным шрифтом.
- Коровья последовательность дезоксирибозима 10–23 указана прописным курсивом.
- Dabcyl, BHQ-1 – тушители флуоресценции.

обеспечивает постепенное увеличение интенсивности флуоресценции (рис. 2).

Расщепление зонда ChPr также осуществлено в изотермических условиях в режиме реального вре-

мени. После добавления к ChPr дезоксирибозима DRZ реакционную смесь помещали в ДНК-амплификатор и выдерживали при постоянной температуре, регистрируя изменение флуоресценции (рис. 3).

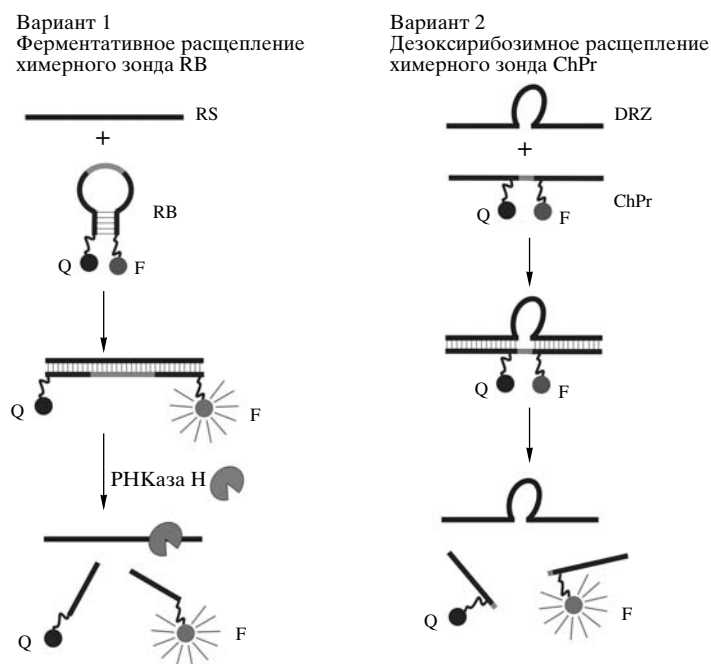


Рис. 1. Схема СРТ с ферментативным и дезоксирибозимным расщеплением химерных зондов (F – флуоресцентный краситель FAM, Q – тушитель флуоресценции Dabcyl или BHQ-1).

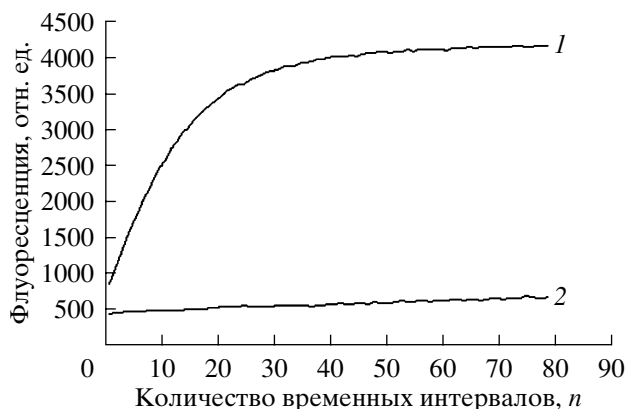


Рис. 2. Накопление флуоресцентного сигнала в ходе СРТ при расщеплении РВ РНКазой Н (37°C): 1 – наличие фермента, 2 – отсутствие фермента.

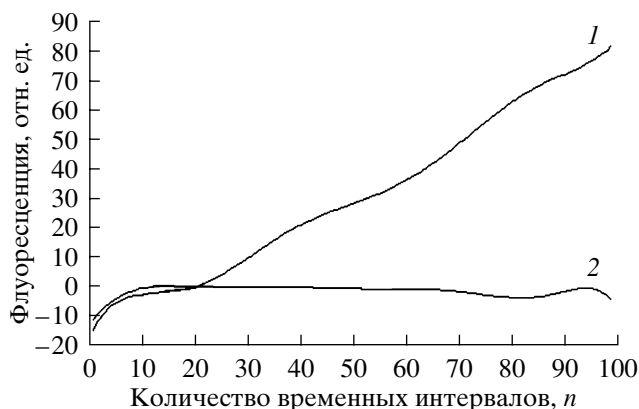


Рис. 3. Накопление флуоресцентного сигнала в ходе СРТ при дезоксирибозимном расщеплении ChPr (37°C): 1 – наличие дезоксирибозима, 2 – отсутствие дезоксирибозима.

Оказалось, что дезоксирибозим DRZ проявляет каталитическую активность, хотя резкого увеличения интенсивности флуоресценции нет.

С уменьшением концентрации ДНК-мишени наблюдается закономерное снижение чувствительности реакций как ферментативного, так и дезоксирибозимного расщепления химерных зондов (данные не приведены). При концентрации мишени менее 0.3 нМ эффективность процесса оказывается низкой. Очевидно, что при анализе малого количества геномной ДНК необходим этап предварительной амплификации. Однако, несмотря на данный недостаток, следует отметить принципиальную разницу между методами ПЦР и СРТ: в ПЦР накопление целевого продукта идет в геометрической прогрессии, в то время как для СРТ имеет место линейный прирост количества продукта реакции, поскольку концентрация ДНК-мишени остается постоянной и равной исходной. В то же время благодаря изотермичности СРТ искусственного сдерживания работы фермента не происходит, как в случае с ПЦР и другими реакциями, управляемыми сменой температуры.

Химерные олигонуклеотиды были опробованы далее в качестве гибридационных зондов в системе, в которой осуществлено дискриминирующее лигирование “С-зонда” с использованием образующегося кольца в качестве матрицы в RCA. Схема эксперимента представлена на рис. 4. Олигонуклеотиды-предшественники кольцевой структуры PreCircle1 и PreCircle2 предварительно фосфорилируются с помощью Т4-полинуклеотидкиназы, затем отжигаются на комплементарных участках ДНК-мишеней M10, M11 (PreCircle1) и M2 (PreCircle2) так, что их 3'- и 5'-концы гибридизуются встык. Добавление Т4-ДНК-лигазы приводит к замыканию олигонуклеотидов в кольца. Полученные кольцевые ДНК-матрицы имеют размер 80 и 96 нт соответственно (меньший размер кольца обуслов-

ливает низкую эффективность амплификации вследствие стерических затруднений) и служат для амплификации с помощью ДНК-полимеразы Bst exo⁺, обладающей функцией вытеснения цепи (strand displacement).

Амплификация по методу “катящегося кольца” теоретически может приводить к наработке бесконечно длинного одноцепочечного продукта с повторяющейся последовательностью. Олигонуклеотиды PreCircle1 и PreCircle2 имеют участки, обеспечивающие гибридизацию с ДНК-мишенью, место для отжига праймера ZaP и фрагменты, комплементарные последовательности петли зонда РВ или фланкирующих участков дезоксирибозима DRZ. В ходе амплификации по методу “катящегося кольца” происходит синтез цепи, на которой через равные промежутки образуются участки для отжига зондов РВ или ChPr. По мере удлинения продукта амплификации мест для отжига зондов становится больше, одновременно с этим процессом термостабильная РНКазы Н (вариант 1) или образующиеся на цепи фрагменты дезоксирибозима DRZ (вариант 2) расщепляют РВ и ChPr соответственно по их РНК-участку, освобождая места для связывания новых молекул. При использовании в ходе лигирования олигонуклеотида M11, имитирующего мишень с заменой нуклеотида, замыкания PreCircle1 в кольцо не происходит, что обуславливает отсутствие наработки продукта амплификации (рис. 5).

Расщепление зонда ChPr было осуществлено с использованием в качестве ДНК-мишени олигонуклеотида M2, представляющего собой фрагмент гена гемагглютинина вируса птичьего гриппа субтипа H5N1. Возрастание интенсивности флуоресценции свидетельствует об успешном расщеплении зонда (рис. 6). Очевидно, что дезоксирибозимы способны проявлять каталитическую активность в более широких интервалах температур и концентраций по сравнению с ферментами. Температурный

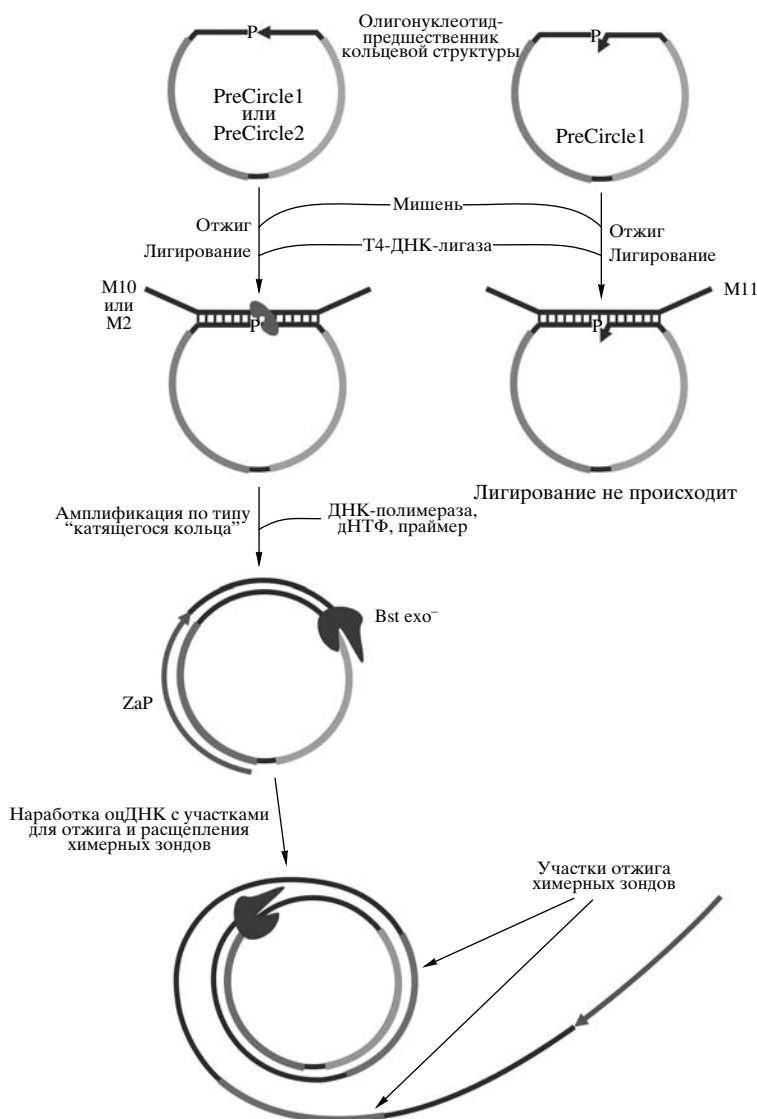


Рис. 4. Схема отжига и лигирования олигонуклеотидов в системе для выявления однонуклеотидных замен с помощью амплификации по методу "катящегося кольца", совмещенной с расщеплением химерных зондов.

диапазон определяется термодинамической устойчивостью двуцепочечной структуры. Нами было осуществлено дезоксирибозимное расщепление зонда при различных значениях температуры; вид кривых накопления сигнала характерен для всех опробованных условий (данные не приведены).

Для осуществления реакций по варианту 1 необходимо участие трех ферментов: ДНК-лигазы, обеспечивающей дискриминирующее лигирование кольцевой матрицы на анализируемом фрагменте ДНК, ДНК-полимеразы с функцией вытеснения цепи и РНКазы H, разрушающей молекулы зонда RB после их отжига на мишени. Значительное преимущество предлагаемого подхода по сравнению со стандартным методом СРТ заключается в увеличении копийности мишеней благодаря действию ДНК-полимеразы, что обеспечивает более высокую чув-

ствительность реакции. При этом мишенями служат участки одноцепочечной копии кольцевой матрицы, которая может быть сконструирована как практически произвольная последовательность, комплементарная анализируемой ДНК лишь на небольшом участке, что позволяет использовать одинаковые праймеры и гибридизационные зонды при выявлении разных нуклеотидов.

Использование дезоксирибозимов является альтернативой ферментативному расщеплению. Подобный подход с образованием в ходе ПЦР активного дезоксирибозима ранее был применен австралийскими авторами [38]. Замена РНКазы H дезоксирибозимом имеет ряд преимуществ. Во-первых, в случае энзиматического расщепления количество фермента в ходе реакции остается неизменным, более того, его активность может только па-

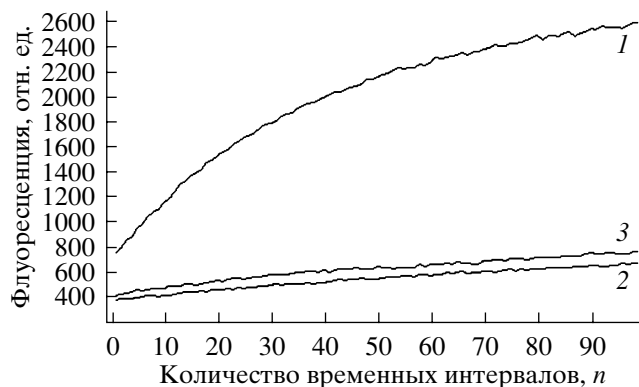


Рис. 5. Накопление флуоресцентного сигнала по варианту 1 в ходе амплификации по методу “катящегося кольца”: 1 – полная комплементарность 3'-конца (мишень M10), 2 – отсутствие комплементарности 3'-конца (мишень M11), 3 – нелигированная матрица PreCircle1.

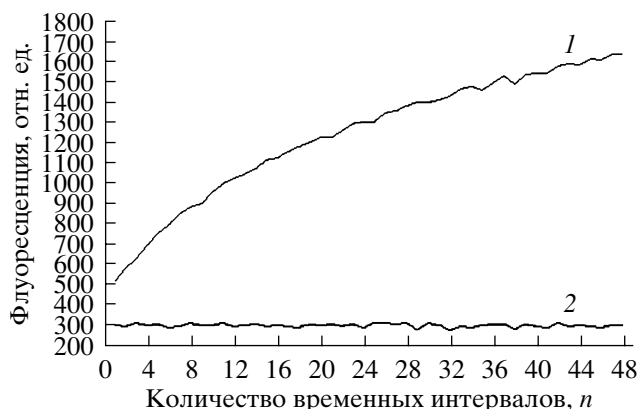


Рис. 6. Накопление флуоресцентного сигнала по варианту 2 в ходе амплификации по методу “катящегося кольца”: 1 – полная комплементарность 3'-конца (мишень M2), 2 – нелигированная матрица PreCircle2.

дать, в то время как при амплификации по методу “катящегося кольца” происходит постоянное увеличение количества дезоксирибозимных участков вследствие удлинения продукта. При этом линейный характер разрушения зондов на каждой мишени наряду с линейно увеличивающимся количеством самих мишеней теоретически должны приводить к более высокой скорости накопления сигнала флуоресценции. Во-вторых, РНКазы H для проявления активности требуют присутствия более шести рибонуклеотидов в ДНК/РНК-гетеродуплексе, тогда как для функционирования дезоксирибозима достаточно двух. Это обуславливает экономию средств (стоимость синтеза одного звена рибоолигонуклеотида существенно выше по сравнению с дезоксирибоолигонуклеотидом) и повышает стабильность химерного зонда (фосфодиэфирные связи между рибонуклеотидами гораздо менее прочны).

Недостатком рассматриваемого способа выявления полиморфизмов является необходимость синтеза комплекта длинных “С-зондов” с дискриминирующими нуклеотидами на 3'-концах. Для упрощения и удешевления данного подхода при сохранении его чувствительности и специфичности нами предлагается расположить дискриминирующие нуклеотиды на коротких дополнительных фрагментах, заполняющих промежуток между концами циклизующегося зонда и дающих две точки лигирования. Для проверки работоспособности данного подхода были синтезированы дополнительные олигонуклеотиды Vst и Vst-g с дискриминирующими нуклеотидами С и G на 3'-концах соответственно и новая ДНК-мишень M12. Она содержит последовательность, полностью комплементарную дополнительной вставке Vst. При отжиге на M12 олигонуклеотидов PreCircle1 и Vst либо Vst-g-лигирование протекает только в первом случае (рис. 7), что подтверждается успешной амплификацией и расщеп-

лением RB (рис. 8). Предлагаемый подход может позволить создавать динамичные тест-системы для детекции SNP благодаря возможности варьировать всего лишь один ее компонент, что существенно облегчает проведение анализа и расширяет область поиска, распространяя ее в том числе на четырехаллельные нуклеотидные замены.

Таким образом, нами предложены два варианта генерации флуоресцентного сигнала, которые потенциально могут использоваться при детекции SNP в геномах различных организмов. Основанные на совмещении реакций аллель-специфического лигирования, амплификации по методу “катящегося кольца” и технологии циклического зонда, они имеют ряд преимуществ перед традиционно используемыми. Во-первых, изотермический характер проводимых реакций обуславливает уменьшение скорости дезактивации ферментов и увеличение скорости анализа, поскольку не затрачивается время на этапы изменения температуры в реакционном блоке. Во-вторых, постоянное увеличение количества мишеней в ходе амплификации наряду с параллельно протекающим на них процессом разрушения зондов обеспечивают высокую скорость накопления продуктов и увеличение чувствительности процесса в целом по сравнению с отдельно взятыми реакциями. Использование химерных гибридных зондов позволяет проводить процесс в режиме реального времени. При этом выбор типа зондов и соответственно варианта его расщепления может определяться в зависимости от возможностей исследователя и решаемых им задач.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы реактивы: дитиотреит (DTT), додецилсульфат натрия (SDS), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$, KCl, акриламид, метилен-

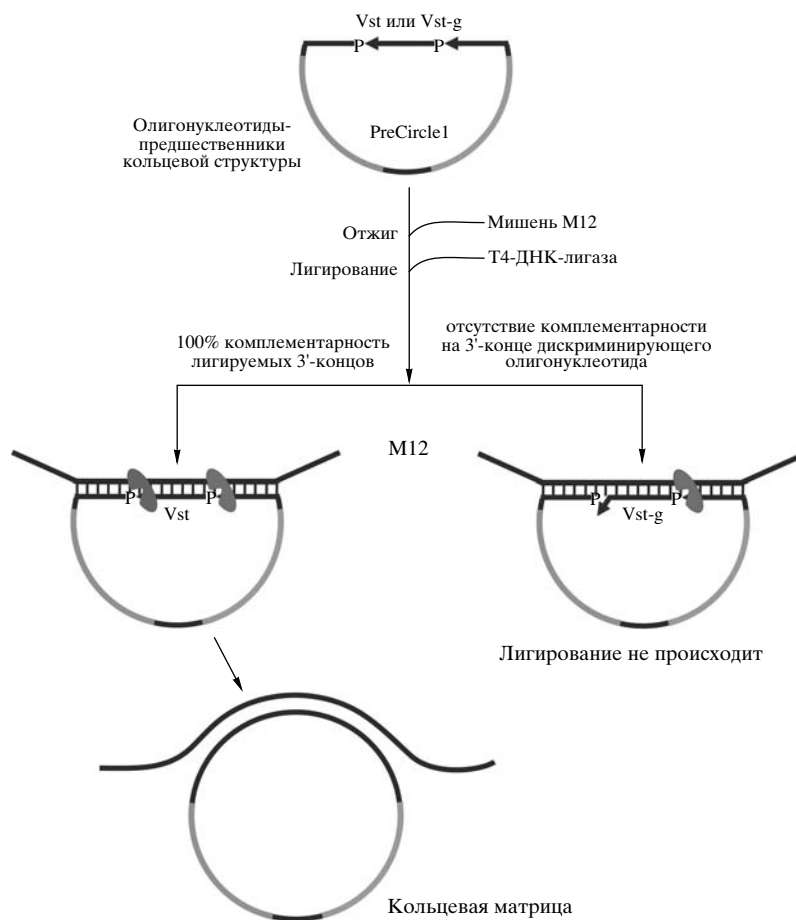


Рис. 7. Схема отжига и лигирования олигонуклеотидов в системе для выявления однонуклеотидных замен при использовании дополнительного дискриминирующего олигонуклеотида.

бисакриламид, АТФ, этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль (EDTA) (Serva, ФРГ); бычий сывороточный альбумин (BSA), Трис-НСl, Тритон X-100 (Sigma, США); ацетонитрил (Merck, ФРГ); 1*H*-тетразол, фосфорамидиты: dA-CE, dC-CE, dG-CE, dT-CE (Glen Research, США); dNTP (Pharmacia, Швеция); спермидин (ICN, США); тетраметилэтилендиамин (TEMED) (Fluka, Швейцария); ферменты: РНКаза Н (Fermentas, Литва), термостабильная РНКаза Н (Epicentre Technology, США), Т4-полинуклеотидкиназа (Fermentas, Литва), ДНК-полимераза Bst *exo*⁻ (New England BioLabs, Великобритания). Для приготовления растворов применяли воду высшей категории качества (Millipore, Франция).

Синтез олигонуклеотидов (таблица) RS, DRZ, ZaP, Vst, Vst-g осуществлен на автоматическом ДНК-синтезаторе ASM-102U (Биоссет, Россия) амидофосфитным способом, очистка проводилась с помощью гель-электрофореза в 15%-ном денатурирующем ПААГ в приборе Mini-PROTEAN 3 (BioRad, США). Концентрацию всех олигонуклеотидов определяли по оптической плотности водного раствора, измеренной при 260 нм, на спектрофотомет-

ре BioSpec-Mini (Shimadzu, Япония). Зонды RB, ChPr, длинноцепочечные олигонуклеотиды PreCircle1, PreCircle2, M10, M11, M12, M2 синтезированы ЗАО

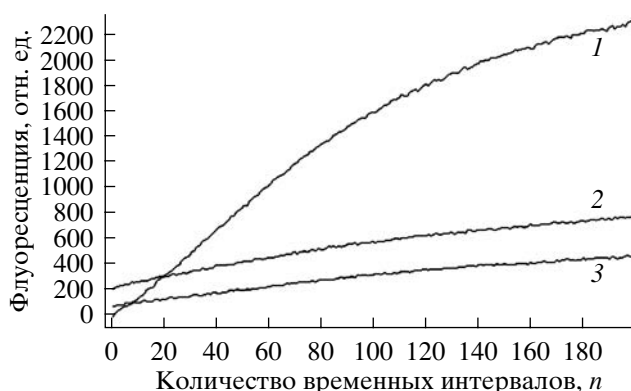


Рис. 8. Накопление флуоресцентного сигнала по варианту 1 при использовании дополнительного дискриминирующего олигонуклеотида: 1 – олигонуклеотид Vst, 2 – олигонуклеотид Vst-g, 3 – нелигированная матрица PreCircle1.

“Синтол” (Москва) с использованием реактивов фирмы “Glen Research” (США).

Фосфорилирование олигонуклеотидов PreCircle1, PreCircle2, Vst и Vst-g проводили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей буфер (50 мМ Трис-НСl, рН 7.8, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит, 0.1 мМ спермидин, 0.1 мМ EDTA), 35 фмоль олигонуклеотида, 10 мМ АТР, 10 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы. Выдерживали 1 ч при 37°C, затем прогревали 10 мин при 65°C и помещали в холодильник на -20°C.

Ферментативное (вариант 1) и дезоксирибозимное (вариант 2) расщепление химерных зондов осуществляли в ДНК-амплификаторе iCycler iQ (BioRad, США).

Для варианта 1: Образцы, объемом 30 мкл каждый, содержали буфер для РНКазы Н (20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 8 мМ MgCl₂, 40 мМ KCl, 0.1 мМ DTT, 0.03 мг/мл BSA, 4% глицерина), 0.3–30 фмоль ДНК-мишени (олигонуклеотид RS), 0.01 ед. акт. РНКазы Н и 6.0 фмоль зонда RB. Фермент вносили в реакционную смесь при 5°C, далее нагревали до 37°C, поддерживали эту температуру в течение 50 мин. Регистрацию изменения флуоресценции раствора вели каждые 10 с.

Для варианта 2: Образцы, объемом 30 мкл каждый, содержали буфер для Taq-ДНК-полимеразы (40 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 2.5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl), 6.0 фмоль зонда ChPr, 30 фмоль дезоксирибозима DRZ. Дезоксирибозим вносили в реакционную смесь при 5°C, далее нагревали до 37°C, выдерживали при этой температуре в течение 50 мин. Изменение флуоресценции раствора регистрировали каждые 10 с.

Для проведения амплификации по методу “катыщегося кольца”, совмещенной с расщеплением химерных зондов, реакционные смеси после фосфорилирования PreCircle1, PreCircle2, Vst и Vst-g дополнительно прогревали при 80°C в течение 20 мин для денатурации и инактивации Т4-полинуклеотидкиназы, затем добавляли в эквимольном количестве M10, M11 (для PreCircle1), M12 (при использовании наряду с PreCircle1 дополнительных олигонуклеотидов Vst и Vst-g) или M2 (для PreCircle2) и проводили отжиг при постепенном понижении температуры смеси с 95 до 25°C. Вносили по 5 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы и выдерживали при 12°C в течение 18 ч. Полученные таким образом циклические ДНК-матрицы использовали в дальнейшем без очистки.

Амплификацию по методу “катыщегося кольца” и расщепление зондов осуществляли “в одной пробирке” в ДНК-амплификаторе iCycler iQ (BioRad, США). Реакционная смесь объемом 30 мкл содержала буфер для ДНК-полимеразы Bst exo⁻ (20 мМ Трис-НСl, рН 8.8, 2 мМ MgSO₄, 10 мМ KCl, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1% Тритон X-100), 1 ед. акт. ДНК-полимеразы, 5.0 фмоль праймера ZaP, по 2 пмоль каж-

дого dNTP, 1 мкл раствора кольцевой ДНК-матрицы, а также: *для варианта 1:* буфер для термостабильной РНКазы Н (50 мМ Трис-НСl, рН 7.1, 100 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂), 0.07 ед. акт. термостабильной РНКазы Н, 6.0 фмоль зонда RB; *для варианта 2:* 6.0 фмоль зонда ChPr.

Зонды вносили в реакционную смесь при 5°C, далее задавали последовательность шагов, в каждом цикле снимая показания интенсивности свечения флуоресцентной метки:

Для варианта 1	Для варианта 2
1. 40°C – 30 с } 3 цикла 64°C – 10 с }	1. 40°C – 30 с } 3 цикла 64°C – 10 с }
2. 40°C – 20 с } 50 циклов 52°C – 10 с } 64°C – 20 с }	2. 40°C – 20 с } 50 циклов. 64°C – 20 с }

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чемерис А.В., Ахунов Э.Д., Вахитов В.А. Секвенирование ДНК. М.: Наука, 1999. 429 с.
2. Duck P., Alvarado-Urbina G., Burdick B., Collier B. // BioTechniques. 1990. № 9. P. 142–148.
3. Bekkaoui F., Poisson I., Crosby W., Cloney L., Duck P. // BioTechniques. 1996. V. 20. P. 240–248.
4. Fong W.K., Modrusan Z., McNevin J.P., Marostenmaki J., Zin B., Bekkaoui F. // J. Clin. Microbiol. 2000. V. 38. P. 2525–2529.
5. Warnon S., Zammattéo N., Alexandre I., Hans C., Remacle J. // BioTechniques. 2000. V. 28. P. 1152–1156, 1159–1160.
6. Laing T.D., Mah D.C.W., Poirier R.T., Bekkaoui F., Lee W.E., Bader D.E. // Mol. Cell. Probes. 2004. V. 18. P. 341–348.
7. Harvey J.J., Lee S.P., Chan E.K., Kim J.H., Hwang E.S., Cha C.Y., Knutson J.R., Han M.K. // Anal. Biochem. 2004. V. 333. P. 246–255.
8. Mukai H., Uemori T., Takeda O., Kobayashi E., Yamamoto J., Nishiwaki K., Enoki T., Sagawa H., Asada K., Kato I. // J. Biochem. 2007. V. 142. P. 273–281.
9. Uemori T., Mukai H., Takeda O., Moriyama M., Sato Y., Hokazono Sh., Takatsu N., Asada K., Kato I. // J. Biochem. 2007. V. 142. P. 283–292.
10. Tyagi S., Kramer F.R. // Nat. Biotechnol. 1996. V. 14. P. 303–308.
11. Marras S.A.E., Kramer F.R., Tyagi S. // Single nucleotide polymorphism: methods and protocols. Methods in molecular biology / Ed. Kwok P.-Y. Totowa, N.J.: Humana Press Inc., 2001. V. 212. P. 111–128.
12. Mhlanga M.M., Malmberg L. // Methods. 2001. V. 25. P. 463–471.
13. Efimov V.A., Chakhmakhcheva O.G., Choob M.V., Archdeacon D. // Abstr. XIIth Symp. “Chemistry of Nucleic Acids Components”. Spindleruv Mlyn, Czech Republic. 2002. V. 5. P. 308–311.
14. Rizzo J., Gifford L.K., Zhang X., Gewirtz A.M., Lu P. // Mol. Cell. Probes. 2002. V. 16. P. 277–283.

15. Li Y., Breaker R.R. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999. V. 9. P. 315–323.
16. Sun L.Q., Cairns M.J., Saravolac E.G., Baker A., Gerlach W.L. // *Pharmacol. Rev.* 2000. V. 53. P. 325–347.
17. Liu Z., Mei S.H., Brennan J.D., Li Y. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. P. 7539–7545.
18. Kandadai S.A., Li Y. // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. P. 7164–7175.
19. Breaker R.R. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1997. V. 1. P. 26–31.
20. Sugimoto N., Okumoto Y., Ohmichi T. // *J. of Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* 1999. V. 999. P. 1381–1386.
21. Zaborowska Z., Furste J.P., Erdmann V.A., Kurreck J. // *J. of Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 40617–40622.
22. Landegren U., Kaiser R., Sanders J., Hood L. // *Science.* 1988. V. 241. P. 1077–1080.
23. Пышный Д.В., Кривенко А.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Дымищ Г.М., Зарытова В.Ф. // *Биоорг. химия.* 1998. Т. 24. С. 32–37.
24. Varany F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 189–193.
25. Abravaya K., Carrino J.J., Muldoon S., Lee H.H. // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. P. 675–682.
26. Чемерис А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Гарифутдинов Р.Р., Романенкова М.Л., Матниязов Р.Т., Гималов Ф.Р., Малеев Г.В., Вахитов В.А. // *Вестн. биотехнологии и физико-химической биологии.* 2005. Т. 1. С. 5–13.
27. Lizardi P.M., Huang X., Zhu Z., Bray-Ward P., Thomas D.C., Ward D.C. // *Nat. Genet.* 1998. V. 19. P. 225–232.
28. Thomas D.C., Nardone G.A., Randall S.K. // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1999. V. 123. P. 1170–1176.
29. Bakht S., Qi X. // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2005. V. 5. P. 111–116.
30. Nilsson M., Malmgren H., Samiotaki M., Kwiatkowski M., Chowdhary B.P., Landegren U. // *Science.* 1994. V. 265. P. 2085–2088.
31. Zhang D., Wu J., Ye F., Feng T., Lee I., Yin B. // *Clin. Chim. Acta.* 2006. V. 363. P. 61–70.
32. Baner J., Nilsson M., Mendel-Hartvig M., Landegren U. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. P. 5073–5078.
33. Voisey J., Hafner G.J., Morris C.P., van Daal A., Giffard P.M. // *BioTechniques.* 2001. V. 31. P. 1122–1124, 1126, 1128–1129.
34. Qi X., Bakht S., Devos K.M., Gale M.D., Osbourn A. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. e116.
35. Faruqi A.F., Hosono S., Driscoll M.D., Dean F.B., Alsmadi O., Bandaru R., Kumar G., Grimwade B., Zong Q., Sun Z., Du Y., Kingsmore S., Knott T., Lasken R.S. // *BMC Genomics.* 2001. V. 2. P. 4.
36. Rosler A., Bailey L., Jones S., Briggs J., Cuss S., Horsley I., Kenrick M., Kingsmore S., Kent L., Pickering J., Knott T., Shipstone E., Scozzafava G. // *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids.* 2001. V. 20. P. 893–894.
37. Pickering J., Bamford A., Godbole V., Briggs J., Scozzafava G., Roe Ph., Wheeler C., Ghouze F., Cuss S. // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. e60.
38. Todd A.V., Fuery C.J., Impey H.L., Applegate T.L., Haughton M.A. // *Clin. Chem.* 2000. V. 46. P. 625–630.

New Approaches to the Real-Time Detection of Nucleotide Mismatches by Means of Chimeric Hybridization Probes

**R. R. Garafutdinov^{a, #}, Yu. M. Nikonorov^a, D. A. Chemeris^a, B. N. Postrigan^a, O. V. Chubukova^a,
R. F. Talipov^b, V. A. Vakhitov^a, and A. V. Chemeris^a**

[#]Phone/fax +7-347-2356088; e-mail: garafutdinovr@mail.ru

^a Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
Pr. Oktyabrya 71, Ufa, 450054 Russia

^b Bashkir State University, Ufa, 450074 Russia

New approaches to the detection of impaired nucleotides based on the allele specific ligation of a “C probe” followed by rolling circle amplification have been developed. The detection of amplification products was realized by using enzymatic and deoxyribozyme digestion of fluorescently-labeled DNA–RNA–DNA chimeric oligonucleotide structures in cycling probe technology (CPT) in real-time mode.

Key words: single nucleotide polymorphism, chimeric hybridization probes, deoxyribozymes, cycling probe technology, rolling circle amplification