

УДК 53.06; 57.088; 577.1

Подход к диагностике точечных мутаций в нативной ДНК с применением оксида графена

А. А. Кузнецов*, Н. Р. Максимова, В. С. Каймонов, Г. Н. Александров, С. А. Смагулова
Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, 677000, Республика Саха (Якутия), Якутск, ул. Белинского, 58

*E-mail: kuznecov.artem@mail.ru

Поступила в редакцию 19.11.2015

Принята к печати 02.02.2016

РЕФЕРАТ С целью диагностики точечных мутаций в нативной ДНК разработан новый подход к созданию тест-систем с применением оксида графена. Принцип нового подхода заключается в использовании оксида графена для сорбции и тушения флуоресцентно меченных праймеров в постаmplификационной ПЦР-смеси с последующей регистрацией флуоресцентно меченного продукта ПЦР. Благодаря различной аффинности одно- и двухцепочечных молекул ДНК к оксиду графена, а также способности оксида графена выступать в роли тушителя флуоресценции адсорбированных на его поверхности флуорофоров, существует возможность выявления флуоресцентно меченных ампликонов в присутствии избытка флуоресцентно меченных праймеров в продуктах ПЦР. Подход апробирован при создании тест-системы для ДНК-диагностики точечной мутации в гене *CUL7* (4582insT), ассоциированной с формированием ЗМ-синдрома у якутов. Разработанный подход позволяет создавать тест-системы с применением оксида графена, предназначенные для диагностики любых точечных мутаций в нативной ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА диагностика, оксид графена, точечные мутации, тест-система.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ТМ – точечная мутация; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПДРФ-анализ – анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов; FAM – 6-карбоксихлорофлуоресцеин; ROX – карбокси-X-родамин.

ВВЕДЕНИЕ

Диагностика точечных мутаций (замен, инсерций, делеций, далее – ТМ) чрезвычайно важна для современной медицины, так как позволяет судить о предрасположенности к различным заболеваниям, осуществлять правильный подбор лекарств и открывает путь к изучению функций генов. В современной медицинской генетике используют несколько основных методов диагностики ТМ в нативной ДНК [1]: ПЦР-ПДРФ-анализ, флуоресцентные методы детекции (ПЦР в реальном времени, ПЦР с регистрацией сигнала по конечной точке), технологии с применением биочипов и секвенирование. Однако все эти методы имеют определенные недостатки, поэтому актуальным остается поиск новых более быстрых, экономичных и эффективных подходов к диагностике ТМ в нативной ДНК [2].

В последние годы при поиске подходов к диагностике ТМ активно используется оксид графена, который обладает двумя уникальными свойствами – способностью к тушению флуоресценции находящихся вблизи него флуорофоров [3] и различной аффинно-

стью по отношению к одно- и двухцепочечным молекулам ДНК [4] при низкой стоимости и простоте синтеза. С применением этих свойств за последние 5 лет разработано большое число различных подходов к диагностике ТМ с применением оксида графена, например, [5–9]. Однако эти подходы эффективны в случае диагностики ТМ в небольших по длине одноцепочечных олигонуклеотидах, и ни один из них не позволяет диагностировать ТМ в нативной ДНК [10]. Целью данного исследования стала разработка подхода к диагностике ТМ в нативной ДНК с применением оксида графена.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

Оксид графена синтезировали из натурального порошка графита согласно модифицированному методу Hummers и соавт. [11]. Использовали реактивы для синтеза оксида графена компании «Востокреактив» (Россия), диализные мешки MFPI MF-1230-45 «Русбиолинк» (Россия), реактивы

Структуры использованных праймеров

Обозначение	Тип праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'–3'
R	Обратный	GATGAGGCAGTTCAGAAGATTCC
F-FAM	FAM-меченый прямой	FAM-CAGGGGTCTCAAGATTTCCG
F-ROX	ROX-меченый прямой	ROX-CAGGGGTCTCAAGATTTCCG

для проведения ПЦР (буфер для ПЦР, MgCl₂, dNTP, ДНК-полимераза) приобретены в компании «Евроген» (Россия). Использовали аллель-специфичную SNPdetect ДНК-полимеразу («Евроген»). Структура праймеров для ПЦР приведена в таблице.

Продукты ПЦР инкубировали с оксидом графена с использованием разведенного деионизованной водой натрий-фосфатного буфера (10×, Gibco, США). Деионизованную воду (18.2 МΩ×см) получали с помощью системы очистки Milli-Q Advantage A10 (Merck Millipore, Германия).

Характеристики тест-системы определяли на трех группах образцов ДНК (по 16 в каждой группе – больные ЗМ-синдромом с подтвержденной мутацией 4582insT в гомозиготном состоянии, гетерозиготные носители мутации 4582insT, здоровые), выделенных из периферической крови пациентов, от которых получено информированное согласие. Также были использованы 16 отрицательных контролей. Все образцы ДНК генотипировали с помощью тест-системы компании «ТестГен» на основе метода ПЦР в реальном времени (рис. 1). Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом.

Оборудование

Для синтеза оксида графена использовали магнитную мешалку Intelli-Stirrer MSH-300i (Biosan, Латвия), а также ультразвуковой диспергатор ИЛ100-6/3 («ИНЛАБ», Россия) и центрифугу MiniSpin Plus (Eppendorf, Германия). ПЦР проводили с использованием термоциклера С1000 (Bio-Rad, США), интенсивность флуоресценции регистрировали с помощью флуориметра Джин-4 («ДНК-технология», Россия).

Синтез оксида графена

Порошок графита (0.1 г, Sigma Aldrich, США) и нитрата натрия (0.05 г, «х. ч.») добавляли в концентрированную серную кислоту («ос. ч.») объемом 14 мл. Далее мелкими порциями постепенно добавляли 0.4 г перманганата калия («ч.д.а.»). Полученную реакционную смесь перемешивали в химическом стакане в течение 3 недель на магнитной мешалке при температуре 75°C. После перемешивания смесь разбав-

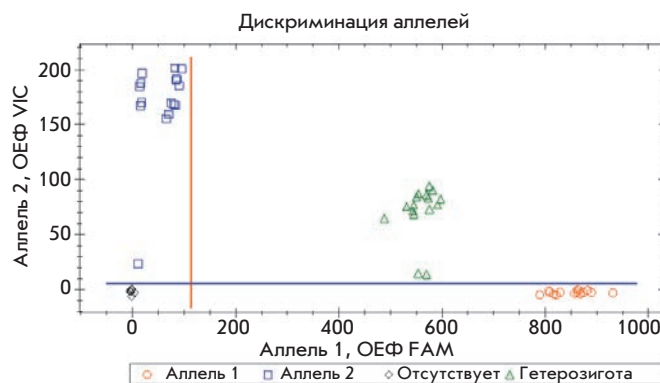


Рис. 1. Результаты генотипирования образцов ДНК с помощью тест-системы на основе метода ПЦР в реальном времени (канал FAM – мутация 4582insT, канал VIC – дикий тип)

ляли деионизованной водой в 2 раза по объему. Далее в смесь добавляли 5% раствор пероксида водорода (7 мл) до появления бриллиантово-желтой окраски. Бриллиантово-желтую смесь фильтровали на воронке Бюхнера с использованием обеззоленного фильтра (желтая лента) диаметром 70 мм и промывали 300 мл деионизованной воды до установления нейтральной среды в фильтрате. При этом получали коричневую гелеобразную массу, которую переносили с фильтра в химический стакан и разбавляли 50 мл воды с последующей ультразвуковой обработкой с объемной мощностью 750 Вт в течение 5 мин на диспергаторе ИЛ100-6/3. После диспергирования суспензию центрифугировали при 14500 об/мин (14.1 г) в течение 5 мин, частицы оксида графита, не расслоившиеся в результате УЗ-обработки, удаляли путем декантации раствора оксида графена над осадком. На последнем этапе проводили диализ раствора в диализных мешках (MWCO: 12000–14000) в течение 3 дней с трехкратной сменой деионизованной воды в стакане объемом 1 л с диализным пакетом. В результате получали однородную суспензию оксида графена темно-коричневого цвета, объемом ~ 50 мл. В высушенной суспензии оксида графена методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии определяли атомное содержание углерода и кисло-

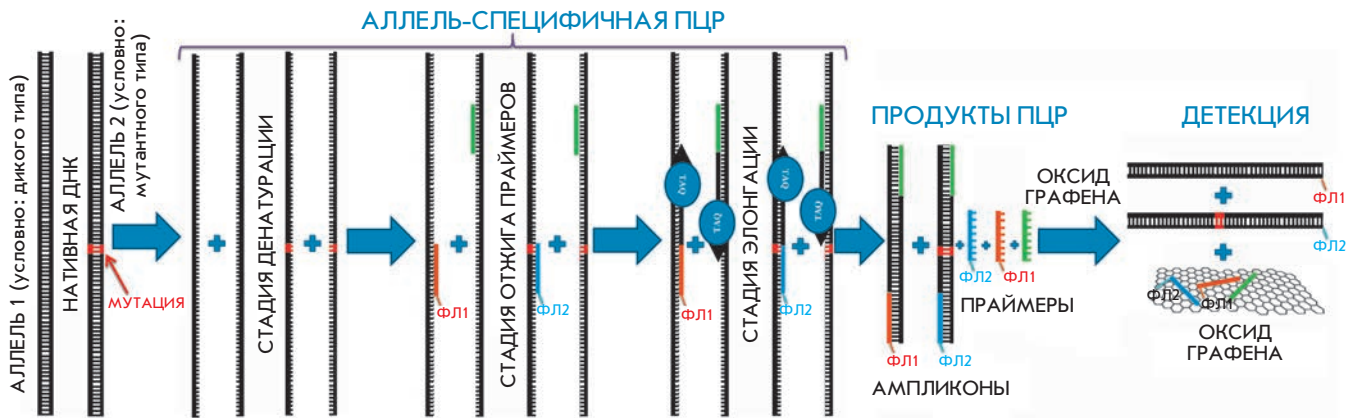


Рис. 2. Схема диагностики точечных мутаций в нативной ДНК с использованием разработанного подхода

рода, которое составило ~58 и ~42% соответственно. Концентрацию оксида графена в суспензии определяли весовым методом, взвешивая сухой остаток от 1 мл суспензии, высушенной при температуре 170°C в течение 5 мин.

Аллель-специфичная ПЦР

Для каждого образца ДНК готовили 25 мкл смеси, содержащей 1× ПЦР-буфер, 3 мМ MgCl₂, 0,28 мМ dNTP, 0,2 мкМ праймера R, 0,6 мкМ праймера F-FAM, 66,4 нМ праймера F-ROX, 2,5 ед. акт. SNPdetect ДНК-полимеразы и 1,2 нг/мкл ДНК. Температурный профиль ПЦР состоял из денатурации при 95°C в течение 3 мин, 38 циклов амплификации (30 с – денатурация при 95°C, 30 с – отжиг при 60°C, 1 мин – элонгация при 72°C), завершающей элонгации при 72°C в течение 5 мин. Верификацию прохождения амплификации осуществляли методом гель-электрофореза продуктов ПЦР в 3% агарозном геле без добавления бромистого этидия. Длина продукта амплификации составляла 149 п.н. (150 п.н. при амплификации с мутантного аллеля), GC-состав – 55,7%.

Добавление оксида графена к продуктам ПЦР и регистрация флуоресценции

Из каждой пробирки отбирали 15 мкл постамплификационной ПЦР-смеси и помещали в 0,6 мл прозрачную микроцентрифужную пробирку. Далее добавляли 3,6 мкл 5× натрий-фосфатного буфера (Gibco, США) и 4 мкл суспензии оксида графена (0,5 мг/мл) в 1× натрий-фосфатном буфере (Gibco, США), инкубировали при комнатной температуре на орбитальном шейкере в течение 20 мин (450 об/мин). Измеряли интенсивность флуоресценции по FAM- и ROX-каналам в каждой

пробирке с помощью флуориметра Джин-4 («ДНК-технология», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Описание разработанного подхода

На рис. 2 изображена схема разработанного подхода.

На первом этапе диагностики проводят аллель-специфичную ПЦР, которая отличается от обычной использованием аллель-специфичной ДНК-полимеразы и трех праймеров. Один из праймеров (обратный, выделен на рис. 2 зеленым цветом) способен комплементарно отжигаться на ДНК аллелей обоих типов (дикого и мутантного). Два других праймера (прямые, выделены синим и оранжевым цветом на рис. 2) содержат на 5'-конце разные флуорофоры – ФЛ1 и ФЛ2 с неперекрывающимися спектрами возбуждения/эмиссии. Каждый из прямых праймеров способен связываться с аллелем только одного типа, поскольку они комплементарны ДНК разных аллелей в области сайта мутации.

В зависимости от генотипа донора ДНК возможно образование трех типов постамплификационной смеси: с ампликонами, мечеными флуорофором ФЛ1 (гомозиготный дикий тип); мечеными флуорофором ФЛ2 (гомозиготный мутантный тип), и с ампликонами, мечеными обоими флуорофорами (гетерозиготный тип). В любом случае продукты ПЦР будут содержать избыток флуоресцентно меченных праймеров.

При добавлении водной суспензии оксида графена к постамплификационной ПЦР-смеси на поверхности наноллистов оксида графена будет происходить адсорбция одноцепочечных молекул ДНК – флуоресцентно меченных праймеров, вследствие чего флуоресценция от них будет потушена. Двухцепочечные

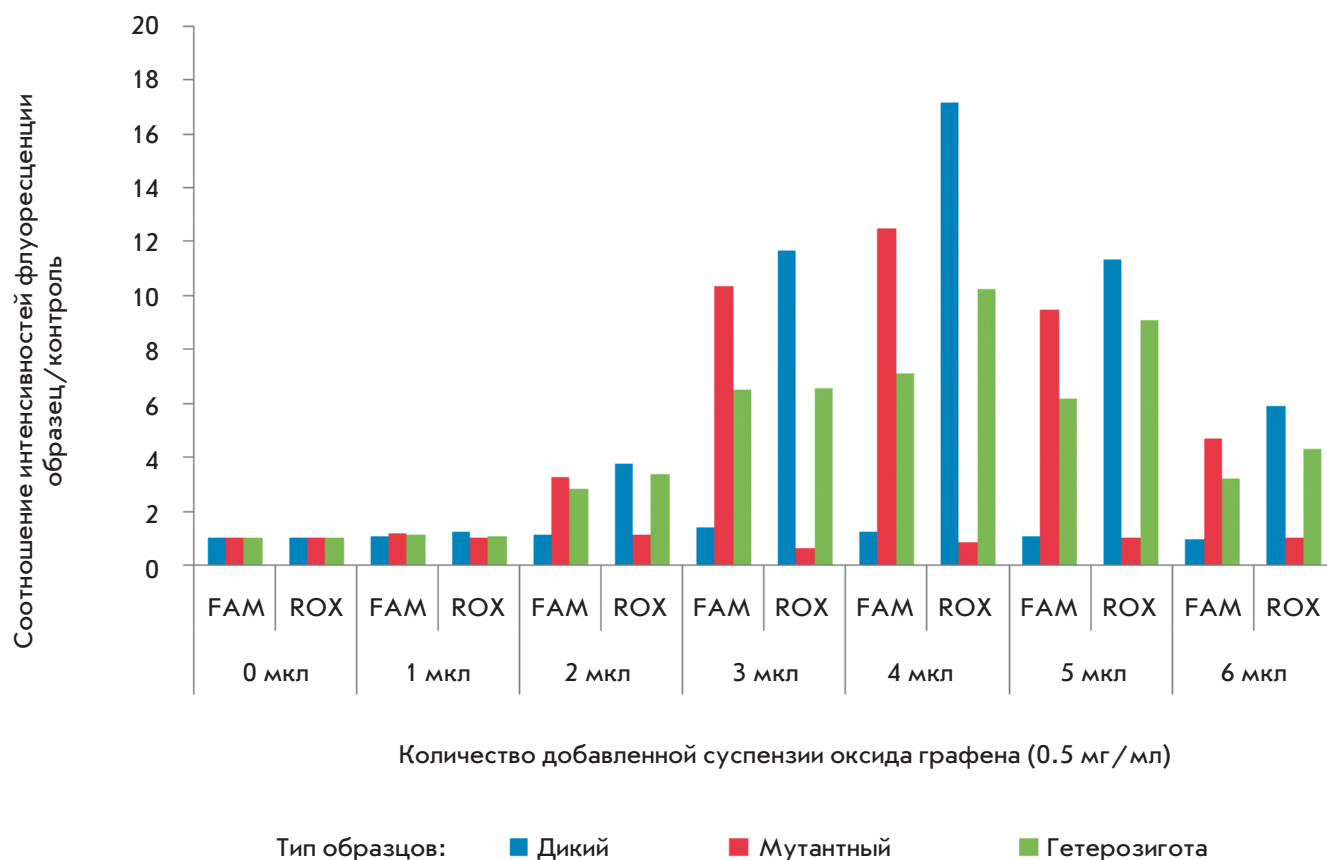


Рис. 3. Соотношение интенсивностей флуоресценции **N** образец/контроль в каждой клинической группе образцов по FAM- и ROX-каналам при добавлении разных объемов суспензии оксида графена к постаmplификационной смеси

молекулы ДНК (ампликоны) будут оставаться в растворе из-за их низкой аффинности к оксиду графена и могут генерировать флуоресцентный сигнал.

Если после добавления избытка оксида графена сравнить интенсивность флуоресценции каждого из флуорофоров в конечном растворе (для анализируемого образца ДНК) и интенсивность флуоресценции в отрицательном контроле, то можно установить генотип донора ДНК.

Апробация разработанного подхода

С применением этого подхода нами разработана тест-система, предназначенная для ДНК-диагностики мутации, ассоциированной с формированием ЗМ-синдрома у якутов. ЗМ-синдром – частое ауто-сомно-рецессивное наследственное заболевание, обусловленное мутацией 4582insT в экзоне 25 гена *CUL7* (KIAA0076, Куллин 7) [12]. Ввиду высокой частоты гетерозиготного носительства мутации, ассоциированной с формированием ЗМ-синдрома у якутов

(около 30 человек на 1000), это заболевание было выбрано для разработки тест-системы с применением оксида графена.

С помощью сервиса Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) к разным аллелям были подобраны FAM- и ROX-меченые праймеры, по 3'-концу комплементарные последовательности ДНК в области мутации (таблица).

На стадии добавления оксида графена к продуктам ПЦР использовали раствор оксида графена (0.5 мг/мл) в 1× натрий-фосфатном буфере, а также сам буфер, чтобы нивелировать влияние pH на интенсивности флуоресценции. После добавления оксида графена измеряли интенсивность флуоресценции каждого образца (в том числе отрицательных контролей) по FAM- и ROX-каналам, после чего рассчитывали средние интенсивности флуоресценции и соотношения интенсивностей образец/контроль в каждой клинической группе образцов по каждому каналу флуоресценции в отдельности. Условия проведения

аллель-специфичной ПЦР, состав ПЦР-смеси, длину амплифицируемого участка, количество оксида графена варьировали для достижения максимального соотношения интенсивностей флуоресценции образец/контроль по каждому каналу флуоресценции.

В ходе оптимизации тест-системы на выборке из шести образцов ДНК носителей мутации 4582insT и здоровых доноров (по два образца каждого типа) и двух отрицательных контролей в семи эквивалентных опытах с разными объемами добавляемой суспензии оксида графена определено количество оксида графена, позволяющее максимально эффективно интерпретировать результаты ДНК-диагностики – 4 мкл с концентрацией 0.5 мг/мл в 1× натрий-фосфатном буфере (рис. 3).

Испытание разработанной тест-системы при генотипировании контрольной выборки из 48 образцов ДНК носителей мутации 4582insT и здоровых людей (по 16 образцов каждого типа) дало хорошие результаты (рис. 4).

Доверительные интервалы на рис. 4 построены с применением стандартных отклонений, рассчитанных как сумма относительных стандартных отклонений для интенсивностей флуоресценции контрольных и известных образцов по каждому каналу.

Согласно приведенным на рис. 4 данным, разработанная тест-система позволяет достоверно диагностировать все три комбинации аллельных вариантов в гене *CUL7*. Использование оксида графена в качестве наноструктурного тушителя флуоресценции флуоресцентно меченных праймеров в постаmplификационной ПЦР-смеси позволило добиться практически полного тушения их флуоресценции. При этом флуоресценция от меченого продукта ПЦР в значительной степени сохранялась, что позволило статистически значимо анализировать постаmplификационную смесь по флуоресцентным свойствам. На протестированной выборке клинических образцов специфичность тест-системы составила 100% (так как все образцы можно однозначно отнести к клиническим группам), а чувствительность – не менее 1.2 нг ДНК, что позволяет говорить о пригодности предложенного подхода для генотипирования точечных мутаций в условиях классической генетической лаборатории. Несомненными достоинствами разработанного метода являются его простота (три стадии) и скорость (2 ч). При этом, теоретически, разработанный подход не ограничен типом детектируемых точечных мутаций (инсерций, делеций, замен), так как он основан на применении аллель-специфичной ПЦР, что позволяет адаптировать данный метод к диагностике любых точечных мутаций, если подобрать оптимальные структуры праймеров и условия

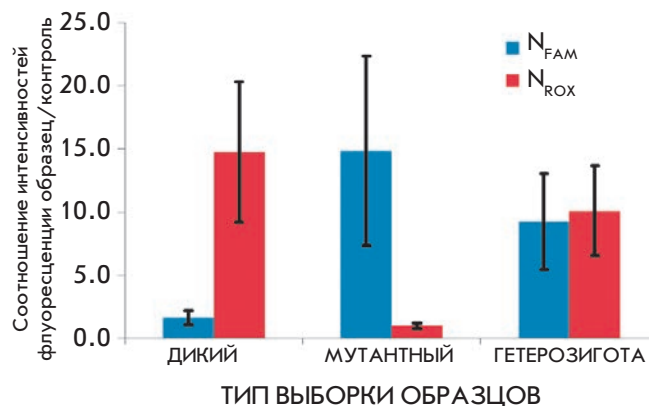


Рис. 4. Соотношение интенсивностей флуоресценции N образец/контроль в каждой клинической группе образцов по FAM- и ROX-каналам

диагностики. С учетом простоты метода, низкой стоимости коммерческого оксида графена, доступности используемого для ДНК-диагностики оборудования метод может быть интересен генетическим лабораториям, занимающимся фармакогенетическими исследованиями, а также диагностикой наследственных заболеваний, обусловленных точечными мутациями в ДНК.

ВЫВОДЫ

Нами разработан подход, который предполагает использование оксида графена в качестве наноструктурного тушителя флуоресценции для проведения диагностики ТМ с применением аллель-специфичной ПЦР. Метод может быть интересен диагностическим лабораториям, в которых для диагностики точечных мутаций (замен, инсерций, делеций) в нативной ДНК используется недорогое оборудование типа ПЦР-флуориметров. Достоверность, специфичность и хорошая чувствительность подхода подтверждены при разработке тест-системы для ДНК-диагностики носительства мутации, ассоциированной с формированием ЗМ-синдрома у якутов. Разработанный подход позволяет создавать тест-системы для диагностики любых точечных мутаций. ●

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (уникальный идентификатор проекта: RFMEFI57514X0015).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mamotte C.D.S. // *Clin. Biochem. Rev.* 2006. V. 27. № 1. P. 63–75.
2. Ye S., Dhillon S., Ke X., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. № 17. P. e88.
3. Li F., Pei H., Wang L., Lu J., Gao J., Jiang B., Zhao X., Fan C. // *Adv. Funct. Mater.* 2013. V. 23. № 33. P. 4140–4148.
4. Huang P.-J., Liu J. // *Nanomaterials.* 2013. V. 3. № 2. P. 221–228.
5. Lu C.H., Yang H.H., Zhu C.L., Chen X., Chen G.N. // *Angew. Chemie. Int. Ed.* 2009. V. 48. № 26. P. 4785–4787.
6. He S., Song B., Li D., Zhu C., Qi W., Wen Y., Wang L., Song S., Fang H., Fan C. // *Adv. Funct. Mater.* 2010. V. 20. № 3. P. 453–459.
7. Li J., Huang Y., Wang D., Song B., Li Z., Song S., Wang L., Jiang B., Zhao X., Yan J., et al. // *Chem. Commun. (Camb).* 2013. V. 49. № 30. P. 3125–3127.
8. Li Z., Zhu W., Zhang J., Jiang J., Shen G., Yu R. // *Analyst.* 2013. V. 138. № 13. P. 3616–3620.
9. Xiang D., Zheng A.H., Luo M., Ji X.H., He Z.K. // *Sci. China Chem.* 2013. V. 56. № 3. P. 380–386.
10. Kuznetsov A.A., Maksimova N.R., Alexandrov G.N., Smagulova S.A. // *Yakut Med. J.* 2014. V. 4. № 48. P. 142–149.
11. Hummers W.S., Offeman R.E. // *J. Am. Chem. Soc.* 1958. V. 80. № 6. P. 1339–1339.
12. Maksimova N., Hara K., Miyashia A., Nikolaeva I., Shiga A., Nogovicina A., Sukhomyasova A., Argunov V., Shvedova A., Ikeuchi T., et al. // *J. Med. Genet.* 2007. V. 44. № 12. P. 772–778.