

УДК 576.316.24

Теломераза: методы определения активности

Д. А. Скворцов*, М. Э. Зверева, О. В. Шпанченко, О. А. Донцова

Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ

*E-mail: skvorratd@mail.ru

Поступила в редакцию 02.11.2010 г.

РЕФЕРАТ Укорачивание концов хромосом (теломер), обусловленное полуконсервативным механизмом репликации ДНК, определяет возможное число делений клетки, играя роль «клеточных часов». Теломераза удлинит одну из цепей теломеры, компенсируя ее укорачивание, поэтому теломеразная активность служит маркером пролиферативной активности клеток. В подавляющем большинстве нормальных клеток человека теломераза неактивна, в отличие от эмбриональных тканей, стволовых клеток и репродуктивных органов. Теломераза активируется в большинстве злокачественных опухолей, что можно использовать для диагностики неопластической трансформации. Поэтому разработка методов определения теломеразной активности привлекает внимание исследователей. Тестирование теломеразной активности необходимо при поиске ингибиторов теломеразы – потенциальных противоопухолевых средств. Кроме того, активация теломеразы может играть положительную роль при регенерации тканей, к примеру, после частичного удаления печени или инфаркта миокарда.

Все методы определения активности теломеразы можно разделить на две большие группы: методы, основанные на прямом определении синтезированной теломеразой ДНК, и методы, использующие различные схемы усиления сигнала от ДНК, созданной теломеразой. Рассмотренные в представленном обзоре методы пригодны для тестирования теломеразной активности в клетках простейших, отдельных клетках клеточных линий, смешанных клеточных популяциях и тканях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА теломераза, методы определения активности, онкодиагностика, физико-химические методы, определение ДНК.

ЧТО ТАКОЕ ТЕЛОМЕРАЗА И ЗАЧЕМ ОПРЕДЕЛЯТЬ ЕЕ АКТИВНОСТЬ

В 1961 г. Хейфлик и Мурхиад показали, что культура соматических клеток имеет ограниченный период жизни (предел Хейфлика) [1]. В 1973 г. Оловников предположил, что возможное число делений клетки определяется укорачиванием концов хромосом – теломер [2], играющих роль «клеточных часов». Теломеры защищают геном клетки от деградации, участвуют в мейотическом спаривании хромосом и регуляции транскрипции генов прителомерной области [3, 4]. В клетках, способных размножаться бесконечно (бессмертных), существует механизм, компенсирующий укорачивание теломер. В 1985 г. Блекберн и Грейдер открыли теломеразу – фермент, удлиняющий одну из цепей теломеры [5].

Теломераза представляет собой РНК-белковый комплекс, основные компоненты которого – РНК-матрица для синтеза теломер (TERC), выполняющая также структурную функцию, и обратная транскриптаза (TERT) [6]. Теломеразный комплекс

(теломераза) связывается с теломерой или олигонуклеотидом, последовательность которого может не совпадать с теломерной последовательностью (теломеримитирующий олигонуклеотид), и синтезирует короткий фрагмент ДНК (GTTAGG у млекопитающих). Затем теломераза передвигается на конец теломеры (транслокация) и вновь синтезирует фрагмент ДНК (рис. 1). Активность теломеразы пропорциональна общему количеству синтезированной ею ДНК, а процессивность пропорциональна длине синтезированных фрагментов.

Теломеразная активность служит маркером пролиферативной активности клеток. Компоненты теломеразы могут выполнять функции, не зависящие от сборки активного комплекса. Например, hTERT (TERT человека) независимо от присутствия hTERC (TERC человека) может работать как РНК-зависимая РНК-полимераза [7]. Повышение экспрессии hTERC не всегда совпадает с появлением теломеразной активности [8]. hTERC ингибирует протеинкиназу ATR, мишенями которой являются

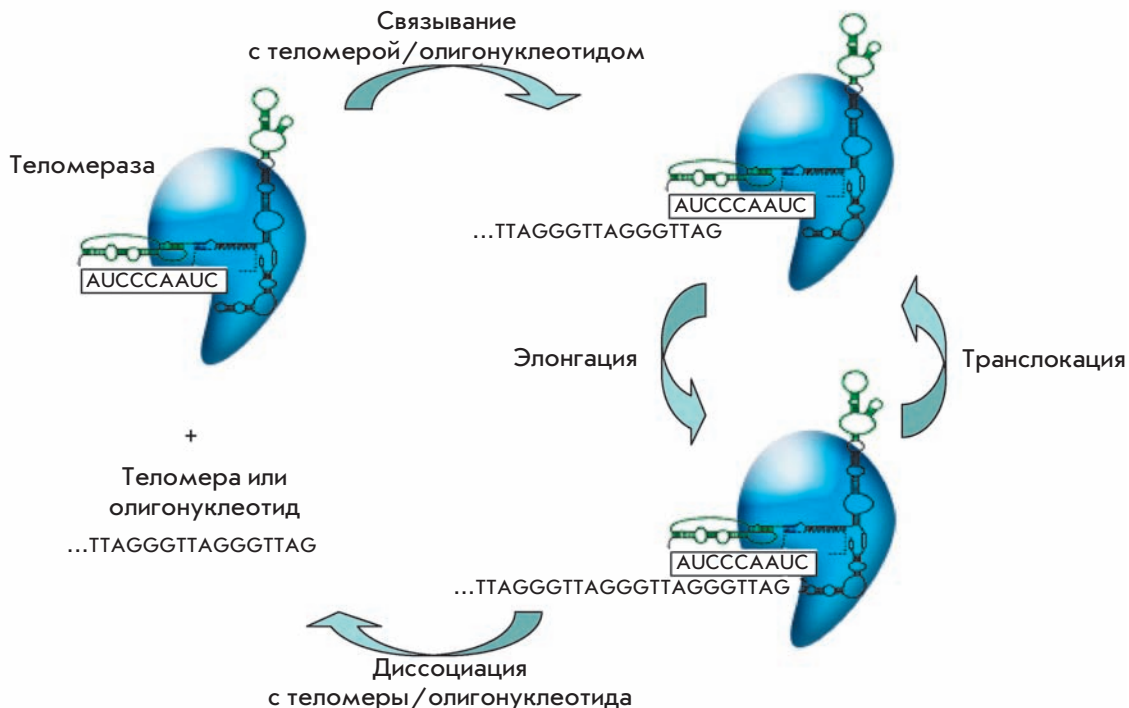


Рис. 1. Общая схема работы теломеразного комплекса.

известный супрессор опухолевого роста p53 и протеинкиназа контрольных точек CHK1, входящая в систему проведения сигналов от поврежденной ДНК. Снижение уровня hTERT приводит к остановке клеточного цикла в фазах G1 и G2 в результате активации белка p53 и протеинкиназы CHK1, но механизм этого остается неизвестным [9].

Активность теломеразы не выявляется в подавляющем большинстве нормальных клеток человека, но присутствует в репродуктивных органах и эмбриональных тканях. Этот фермент активен в стволовых клетках и некоторых быстро обновля-

ющихся тканях, например в эпителии кишечника, но в этом случае активность теломеразы, как правило, ниже, чем в опухолевых клетках (рис. 2). Теломеразная активность более характерна для злокачественных опухолей, в доброкачественных опухолях ее активность и частота обнаружения заметно ниже [10]. Определение теломеразной активности используется как для диагностики опухолей, так и для поиска потенциальных противоопухолевых средств – ингибиторов теломеразы. Кроме того, теломераза участвует в регенерации тканей после частичного удаления печени и инфаркта миокар-

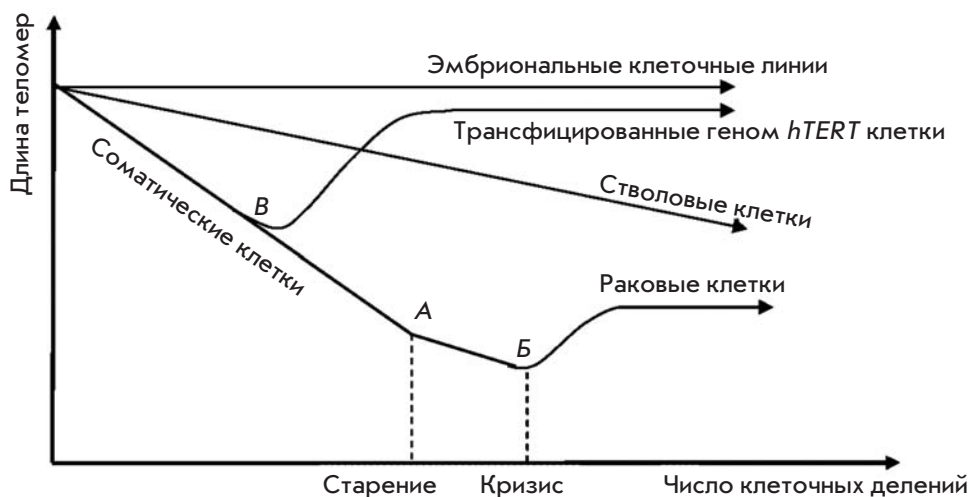


Рис. 2. Зависимость длины теломер от числа делений в различных типах клеток: эмбриональных клеточных линиях, соматических клетках и трансфицированных hTERT клетках. А – достижение клетками предела Хейфлика; В – кризис, сопровождающийся гибелью клеток и перерождением уцелевших в опухолевые; В – трансфекция клеток геном hTERT.

Таблица 1. Некоторые олигонуклеотиды, используемые в различных модификациях TRAP

Олигонуклеотид	Нуклеотидная последовательность
TS	5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'
CX	5'-(CCCTTA) ₃ CCCTAA-3'
ACX	5'-GCGCGG(CTTACC) ₃ СТААСС-3'
RP	5'-TAGAGCACAGCCTGTCCGTG-3'
RPC3	5'-TAGAGCACAGCCTGTCCGTG(СТААСС) ₃ -3'
TSG4	5'-GGGATTGGGATTGGGATTGGGTT-3'

да. Роль теломеразы в старении в связи с работой теломер как «клеточных часов» также привлекает внимание.

МЕТОДЫ С АМПЛИФИКАЦИЕЙ СИНТЕЗИРОВАННОЙ ТЕЛОМЕРАЗЫ ДНК (TRAP)

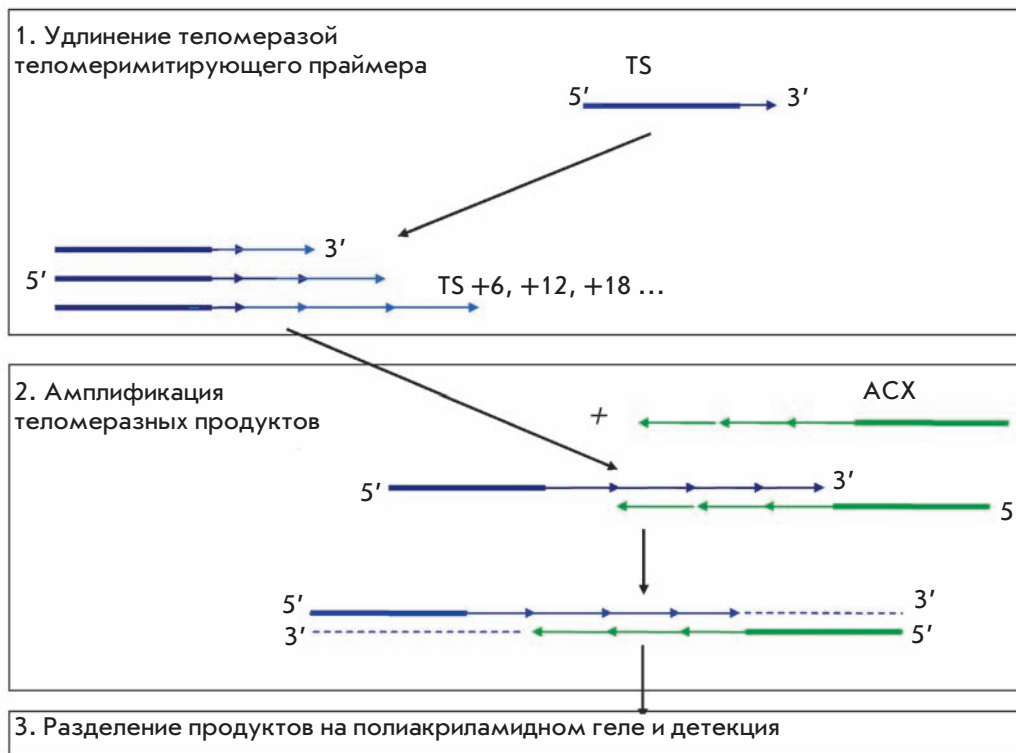
Среди методов определения активности теломеразы наиболее распространен TRAP (протокол амплификации теломерных повторов) [11], позволяющий, благодаря некоторым модификациям, проводить полуколичественный и количественный анализ. Существуют модификации, при которых повышается скорость анализа, радиоактивная метка заменяется немечеными соединениями, снижается количество побочных продуктов и т.д., например, методы сцин-

тилляционного анализа сближения, гибридизационной защиты, транскрипционной амплификации, экстракции магнитными шариками [12]. Некоторые модификации дают возможность определять активность теломеразы даже в одной клетке [13].

Протокол амплификации теломерных повторов можно разбить на три основных этапа: удлинение праймера, амплификация синтезированной теломеразой ДНК и детекция. На стадии удлинения теломерные повторы добавляются теломеразой, присутствующей в клеточном экстракте, к теломеримитирующему олигонуклеотиду (TS, см. табл. 1). После этого проводят ПЦР-амплификацию синтезированной теломеразой ДНК с использованием специфических праймеров (теломеримитирующего и обратного). На этом этапе в синтезированную теломеразой ДНК могут включаться различные метки: радиоактивная, флуоресцентная, аффинная. Затем следует детекция (в оригинальном методе с электрофоретическим разделением продуктов ПЦР и фотографиями) (рис. 3).

Исходный метод TRAP не свободен от ряда недостатков. При амплификации продуктов ПЦР первоначально применяли олигонуклеотид CX, имевший комплементарное перекрытие в несколько олигонуклеотидов с TS. Это приводило к образованию димеров праймеров и продуктов, возникающих из-за взаимодействия между праймерами. Даже при использовании оптимального праймера ACX

Рис. 3. Схема протокола амплификации теломерных повторов (TRAP).



с некоплементарным TS-концом при анализе концентрированных экстрактов опухолевых тканей может появляться фоновый сигнал [14]. Другая проблема состоит в том, что если использовать обратные праймеры, полностью соответствующие теломерным повторам, то праймеры отжигаются в ходе ПЦР не по краям матрицы (в силу периодичности теломер) и появляются ложные сигналы. Эту проблему решают, добавляя на края праймера дополнительные некоплементарные теломерам участки (табл. 1) с 5'-концевым нетеломерным «довеском» из 6 нуклеотидов. Может использоваться комбинация нескольких праймеров, используемых в качестве обратных, для уменьшения неспецифических сигналов (подробнее о двухпраймерной системе далее, праймеры RP и RPC3 приведены в табл. 1). В смесь TRAP для оценки влияния стабилизирующих квадруплексы ингибиторов может добавляться олигонуклеотид TSG4 (табл. 1), который не требует синтеза теломеразой нескольких повторов до начала действия ингибитора [15]. Более подробно преимущества и недостатки различных олигонуклеотидов, используемых в TRAP, рассмотрены в работе [12]. Кроме того, если использовать ПЦР для амплификации сигнала, то на результат определения теломеразной активности могут влиять ингибиторы ПЦР, содержащиеся в образце.

Первоначально в методе TRAP продукты ПЦР выявляли в полиакриламидном геле (ПААГ) по радиоактивной метке, которую вводили с помощью радиоактивно меченного праймера или встраивали в ДНК в ходе реакции. Метод позволяет качественно оценивать активность и процессивность теломеразы в экстрактах клеток и тканей, но, как уже сказано, нуждается в радиоактивных препаратах.

ПЦР второй стадии TRAP позволяет получить достаточно ДНК для окрашивания в геле, например бромидом этидия [16] (достаточно сильный мутаген, чувствительность невысокая), нитритом серебра [17] (чувствительность, как при использовании радиоактивной метки, но метод более трудоемкий и сравнительно дорогой), Sybr Green [18] и его аналогами (чувствительность, как при использовании радиоактивной метки [19], а мутагенность гораздо ниже, чем у бромида этидия, хотя он также является интеркалирующим красителем). Возможно также и флуоресцентное мечение олигонуклеотидов, используемых в TRAP [20].

Очистка синтезированной теломеразой ДНК и эффективность TRAP

Получить экстракты опухолевых клеток или клеточных линий и определить в них теломеразную активность достаточно просто, тогда как ткани состоят из нескольких типов клеток и могут содержать ве-

щества, влияющие на количественную и даже качественную оценку теломеразной активности. Поэтому возможны ложноположительные или ложноотрицательные результаты, которые могут повлиять на правильность диагноза и прогноз заболевания. Определение теломеразной активности могут затруднять и особенности биопсийных образцов: большие объемы жидкости (кровь и т.д.) или присутствие многочисленных нормальных клеток. В этих случаях возможна экстракция синтезированной теломеразой ДНК при помощи модифицированных магнитных шариков. При этой процедуре ингибиторы ПЦР удаляются или сильно разбавляются. Метод TRAP с такой экстракцией состоит из трех основных этапов: удлинение субстратимитирующего олигонуклеотида теломеразой, выделение синтезированной теломеразой ДНК с помощью модифицированных магнитных шариков, амплификация. На этапе экстракции синтезированную теломеразой ДНК гибридизуют с С-богатым биотинилированным праймером (СССТАА)₂ и выделяют ее из реакционной смеси с помощью покрытых стрептавидином магнитных шариков. Затем синтезированную теломеразой ДНК высвобождают из комплекса с помощью нагревания и проводят ПЦР. Эта модификация имеет на порядок меньшую чувствительность к ингибиторам ПЦР по сравнению со стандартным TRAP и несколько большую эффективность при анализе тканевых и других комплексных образцов [21]. Вместо биотинилированного праймера и магнитных шариков можно использовать экстракцию фенолом и хлороформом [16], хотя при этом хуже удаляются примеси, хорошо растворимые в воде, а не в органических растворителях.

Внутренние стандарты TRAP

Учесть возможное присутствие в образцах ингибиторов Taq-полимеразы (например, гемсодержащих соединений) и осуществить общий контроль ПЦР позволяют внутренние стандарты (амплифицируемые с теми же праймерами, что и синтезированная теломеразой ДНК), которые также могут служить для нормирования количества синтезированной теломеразой ДНК. Наиболее распространены два стандарта – длиной 36 и 150 п.н. Стандарт 36 п.н. избыточно амплифицируется, если образцы имеют низкую теломеразную активность, конкурируя с синтезированной теломеразой ДНК и давая ложноотрицательный сигнал [18]. Стандарт 150 п.н. более чувствителен к присутствию ингибиторов Taq-полимеразы в реакционной смеси. Стандарты можно использовать в TRAP с ПЦР в реальном времени с праймерами, флуоресцентная метка которых отличается от метки в праймерах для амплификации синтезированной теломеразой ДНК [22].

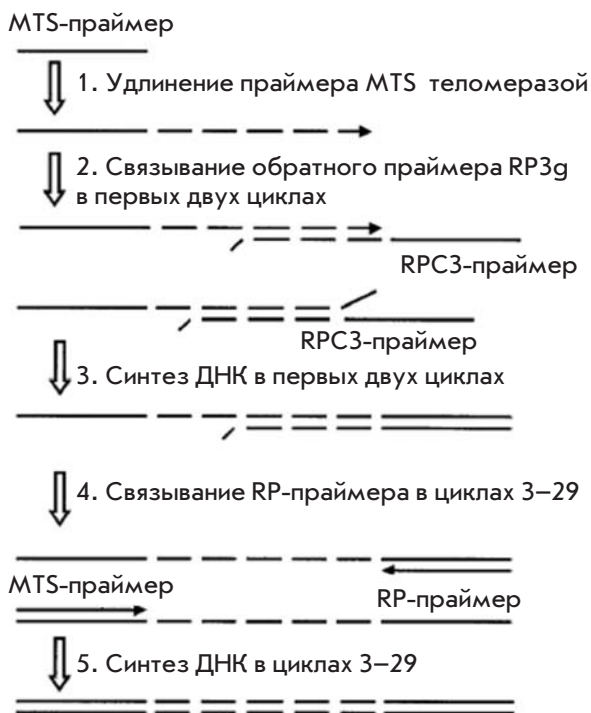


Рис. 4. Схема «двухпраймерного» TRAP [23, 24].

TRAP с дополнительным специфичным обратным праймером («двухпраймерный»)

«Двухпраймерный» TRAP – это модификация стандартного TRAP, предназначенная для уменьшения ложных сигналов (рис. 4).

В этом варианте TRAP отсутствует электрофоретический анализ продуктов ПЦР. В нем оценивается суммарная радиоактивность как критерий теломеразной активности. Синтезированная теломеразой ДНК амплифицируется с использованием двух обратных праймеров, длиной 20 (RP) и 38 нуклеотидов (RPC3) (табл. 1), в присутствии [³H]TTP или [α-³²P]dCTP, при этом длинного праймера добавляют в 50 раз меньше, чем короткого. После ПЦР двухцепочечную ДНК отделяют осаждением и фильтрацией. Преимущество этого метода состоит в том, что благодаря низкой концентрации праймера RPC3 уменьшается количество продуктов взаимодействия между праймерами, а присутствие стандартных количеств праймера RP обеспечивает значительную степень амплификации синтезированной теломеразой ДНК [23, 24]. Метод позволяет качественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

TRAP с праймерами с резонансным переносом энергии (FRET)

Один из вариантов окрашивания ДНК в методе TRAP – использование праймеров с энергопереносом (амплифлуоров). Амплифлуоры имеют уникальную шпильчатую структуру, содержащую донор (флуоресцеин) и акцептор (4'-диметиламинофенилазобензойная кислота). Флуоресценция появляется только в случае встраивания праймера в продукты ПЦР, т.е. отпадает необходимость в применении радиоизотопов и резко сокращается объем проводимого после ПЦР-анализа. Замена амплифлуорами субстрата теломеразы и обратного праймера позволяет добиться достаточно высокой интенсивности флуоресцентного сигнала. Праймеры, используемые для амплификации внутренних стандартов, должны иметь донорно-акцепторную пару с иной длиной волны флуоресценции, чем праймеры, используемые для амплификации синтезированной теломеразой ДНК [22].

Метод с использованием резонансного переноса энергии флуоресценции с временным разрешением (HTRF) сочетает стандартную технику FRET и флуорофоры с длительным временем затухания флуорес-

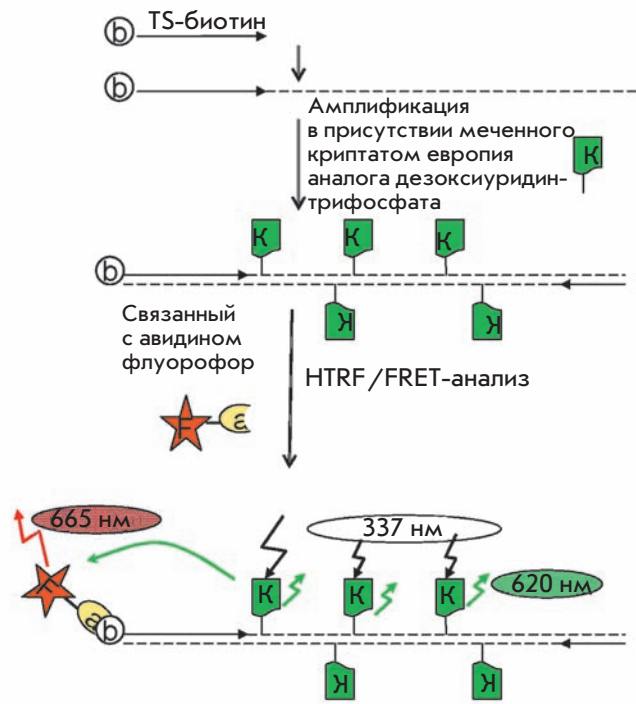


Рис. 5. Схема метода TRAP с использованием резонансного переноса энергии флуоресценции с временным разрешением [26]. F – флуорофор, а – авидин, b – биотин, К – меченный криптамом европия аналог дезоксиуридинтрифосфата.

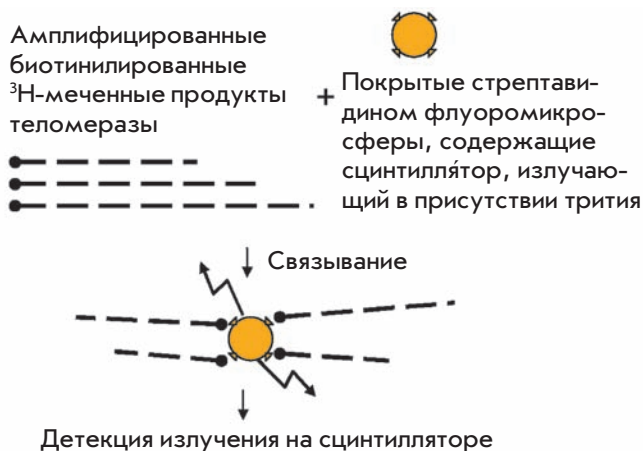


Рис. 6. Схема детекции в TRAP с помощью сцинтилляционного анализа сближения.

ценции. Метод основан на использовании криптаных комплексов европия или тербия. Данные лантаноиды обладают длительным периодом затухания флуоресценции, а комплексообразование с макроциклическими соединениями с образованием криптаных комплексов дополнительно увеличивает их стабильность [25]. Меченный криптаном европия аналог дезоксиуридинтрифосфата использовали для оценки количества ДНК в TRAP с биотинилированным олигонуклеотидом TS. После добавления конъюгата аллофикоцианин-стрептавидин ДНК в TRAP дает сигнал FRET [26] (рис. 5). Метод позволяет полуколичественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

TRAP с детекцией с помощью сцинтилляционного анализа сближения

Еще один вариант детекции амплифицированной в TRAP ДНК без ПААГ – сцинтилляционный анализ сближения. Используемый вместе с традиционным TRAP, он позволяет увеличить скорость анализа теломеразной активности. Субстратом в этом методе служат 5'-биотинилированные олигонуклеотиды, а амплификация происходит в присутствии [³H]ТТР. Биотинилированная ³H-меченная ДНК связывается с покрытыми стрептавидином флуоромикросферами, содержащими сцинтиллятор, излучающий в присутствии трития (рис. 6). Таким образом, вместо разделения ДНК в геле с последующей фотодетекцией выход продуктов ПЦР оценивают на сцинтилляционном счетчике, что позволяет сократить время анализа после ПЦР до 1 ч и полуколичественно определить

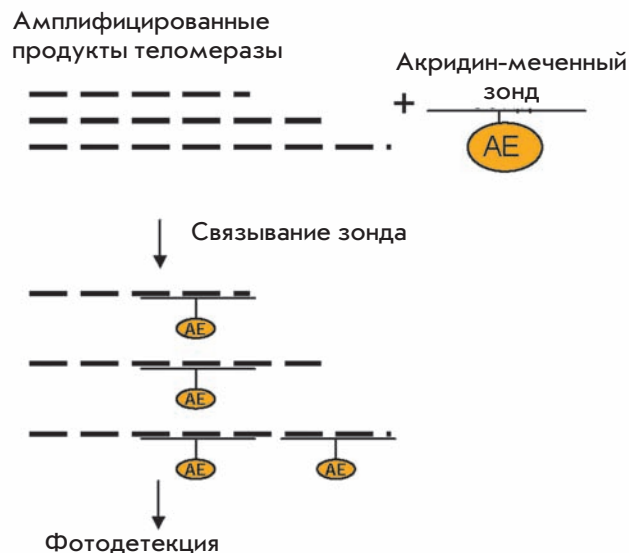


Рис. 7. Схема детекции в TRAP с детекцией методом «защиты гибридизацией».

активность теломеразы в больших сериях экстрактов тканей и клеточных линий. Чувствительность данного метода ограничена примерно 10 клетками. Основной недостаток метода – использование трития, кроме того, как и большинство методов детекции продуктов TRAP без ПААГ, он чувствителен к артефактам ПЦР [27].

TRAP с детекцией методом «защиты гибридизацией»

Более безопасной является модификация TRAP, в которой используется метод «защиты гибридизацией» (Hybridization protection assay-TRAP). В этом методе для детекции ДНК после амплификации применяют зонды, меченные ковалентно связанным акридином [28] (рис. 7). Эта же схема детекции используется в транскрипционной схеме амплификации теломеразных повторов. Метод позволяет полуколичественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

TRAP в сочетании с иммуноферментным анализом (ИФА)

В методе TRAP-ИФА ДНК после амплификации определяют колориметрически, что позволяет качественно и полуколичественно оценивать теломеразную активность. Биотинилирование TS-праймера дает возможность связывать амплифицированную ДНК с покрытыми стрептавидином микропланшета-

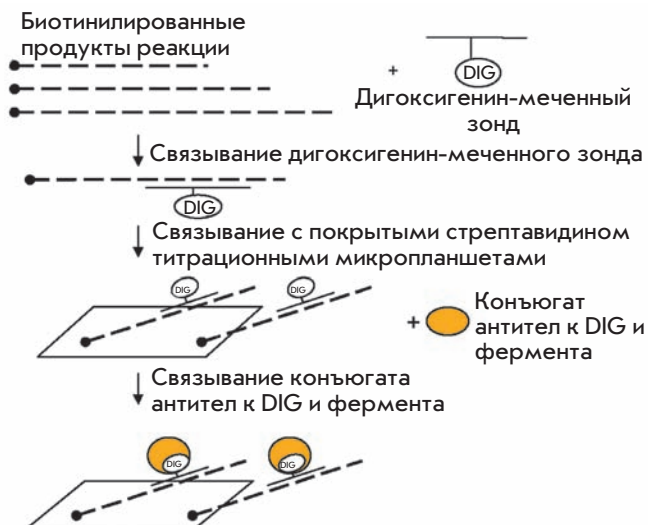


Рис. 8. Схема иммуноферментного определения продуктов ПЦР при TRAP-анализе (или продуктов теломеразной реакции при прямом ИФА).

ми (рис. 8). Амплифицированная ДНК денатурирует, гибридизуется с мечеными дигоксигенином (DIG) зондами, специфичными к теломерным повторам, и связывается с микропланшетами за счет взаимодействия стрептавидин–биотин. Этот комплекс выявляется с помощью поликлональных антител овцы к DIG, конъюгированных с пероксидазой хрена, активность которой определяют колориметрически [29, 30]. От гибридизационного варианта TRAP этот метод отличается появлением второго шага усиления сигнала за счет ферментативной реакции.

К недостаткам TRAP-ИФА можно отнести сложности с разделением теломераза-положительных и теломераза-отрицательных контролей, которые могут возникнуть из-за отсутствия внутренних контролей и двух шагов усиления сигнала. Тем не менее метод TRAP-ИФА более быстрый по сравнению с TRAP, основанным на разделении амплифицированной ДНК в геле, что позволяет использовать его в скрининговых исследованиях. Метод пригоден для полуколичественного определения активности теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

TRAP с электрохимической детекцией

После ПЦР в TRAP можно отделить непрореагировавшие нуклеотидтрифосфаты, а затем обработать оставшиеся продукты 3 M HCl. В рассматриваемом методе электрохимически определяют dGMP, один из продуктов полного гидролиза амплифицированной ДНК [31]. Метод позволяет полуколичественно опре-

делять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии. Метод не имеет особых преимуществ перед другими методами, в которых не используют гель-электрофорез и радиоактивное мечение, но при этом достаточно трудоемок.

TRAP с ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени используют для одновременной амплификации ДНК и измерения количества продуктов, получаемых после каждого цикла амплификации. Стандартный TRAP в комбинации с ПЦР в реальном времени позволяет получать количественные результаты [32, 33]. Этот метод применим для изучения ингибиторов теломеразы и анализа больших серий образцов [12]. Сравнение с традиционным TRAP показывает, что без оценки количества продуктов ПЦР в реальном времени возможно завышение теломеразной активности и сглаживание небольших различий в активности из-за насыщения ПЦР-реакции на последних циклах. Кроме того, дополнительную проблему представляет возможность образования димеров праймеров и появление вследствие этого ложноположительного сигнала. Остроту этой проблемы можно снизить, если использовать обратный праймер с «якорем», мешающим образованию димеров, уменьшить количество праймеров и число циклов, в результате чего праймер-димеры образуются преимущественно на поздних циклах программы (35–39 циклов), в то время как в стандартном TRAP таких циклов 28. Эта проблема уменьшается и при измерении флуоресценции в ранней экспоненциальной фазе ПЦР [32]. Метод позволяет количественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 10–50 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

Как и стандартный TRAP с гель-электрофорезом, TRAP с ПЦР в реальном времени имеет несколько вариантов детекции. Например, использование зондов, специфичных к амплифицированной в ПЦР синтезированной теломеразой ДНК, флуоресцирующих лишь в составе дуплекса, в противном случае эти зонды образуют нефлуоресцирующую шпильчатую структуру [34].

TRAP на микрочипах

Метод TRAP на микрочипах представляет собой сочетание двухпраймерного TRAP и связывания продуктов ПЦР на чипах с последующей гибридизацией зондов и детекцией. Для определения синтезированной теломеразой ДНК и внутреннего стандарта используют разные флуоресцентные метки: Су3

для амплифицируемой синтезированной теломеразой ДНК и $Cy5$ – для стандарта. К достоинствам этого метода можно отнести высокую скорость детекции синтезированной теломеразой ДНК при поточном анализе и повышенную специфичность за счет использования соответствующих зондов [35]. Метод позволяет полуколичественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

TRAP *in situ*

Теломеразную активность анализируют, как правило, в клеточном экстракте. Если клеточные линии однородные, то результат отражает активность теломеразы в клетках. Если же изучают экстракты образцов опухолевых тканей, то иногда имеет смысл рассматривать лишь сам факт наличия или отсутствия теломеразной активности, поскольку содержание опухолевых клеток в таких образцах варьирует от 3 до 90% и более. В этом случае результаты ничего не говорят об уровне теломеразной активности в клетках разного типа, составляющих ткань, а также о различиях между опухолевыми и нормальными клетками одной ткани (например, повышение активности теломеразы в крови связано с появлением активированных лейкоцитов или перерождением каких-то клеток крови). Чтобы преодолеть этот недостаток создан *in situ* TRAP, в котором используют FITC-меченные прямой и обратный праймеры [36]. В этом методе образцы в виде взвеси клеток иммобилизуют на покрытые силаном стекла и сушат холодным воздухом. Затем на каждый образец наносят реакционную смесь для TRAP, инкубируют, теломеразу инактивируют нагреванием, добавляют обратный праймер с полимеразой и проводят ПЦР *in situ*. По окончании реакции стекла анализируют на флуоресцентном микроскопе, типы клеток определяют с помощью окрашивания. По интенсивности флуоресценции и ее локализации (ядро/цитоплазма) определяют активность теломеразы в отдельных типах клеток в смеси. В уро- и бронхиальных смывах высокая теломеразная активность проявляется яркой флуоресценцией ядер злокачественных, но не доброкачественных клеток [37, 38]. Сравнение со стандартно окрашенными препаратами указывает на связь флуоресценции в ядре со злокачественными клетками, в то время как сигнал от цитоплазмы обнаруживается в гранулоцитах и макрофагах [39]. Сходная корреляция найдена при анализе плеврального выпота [40]. Более того, *in situ* TRAP успешно применяли не только к образцам клеточных суспензий, но и на срезах тканей, в частности для диагностики рака печени [41]. Метод позволяет полуколичественно

определять активность теломеразы и ее локализацию в отдельных клетках тканей и клеточных суспензий.

Транскрипционная амплификация синтезированной теломеразой ДНК

Для увеличения количества синтезированной теломеразой ДНК вместо ПЦР используют транскрипционную амплификацию. В комбинации с «защитой гибридизацией» этот метод позволяет измерять активность теломеразы всего за 4 ч. Праймер, служащий субстратом для теломеразы, содержит не только теломеримитирующую последовательность, но и сайт посадки T7-РНК-полимеразы. Синтезированная теломеразой ДНК служит субстратом для гибридизации обратного праймера, содержащего дополнительную последовательность, не комплементарную теломерным повторам, за счет которой обратный праймер присоединяется к концу синтезированной теломеразой ДНК, и на следующем этапе происходит достройка двухцепочечной ДНК. Используя эту ДНК как матрицу, T7-РНК-полимераза синтезирует РНК, по которой обратная транскриптаза синтезирует новую цепь ДНК. После этого РНК удаляется РНКазой, а по одноцепочечной ДНК с помощью прямого праймера достраивается вторая цепь ДНК (рис. 9).

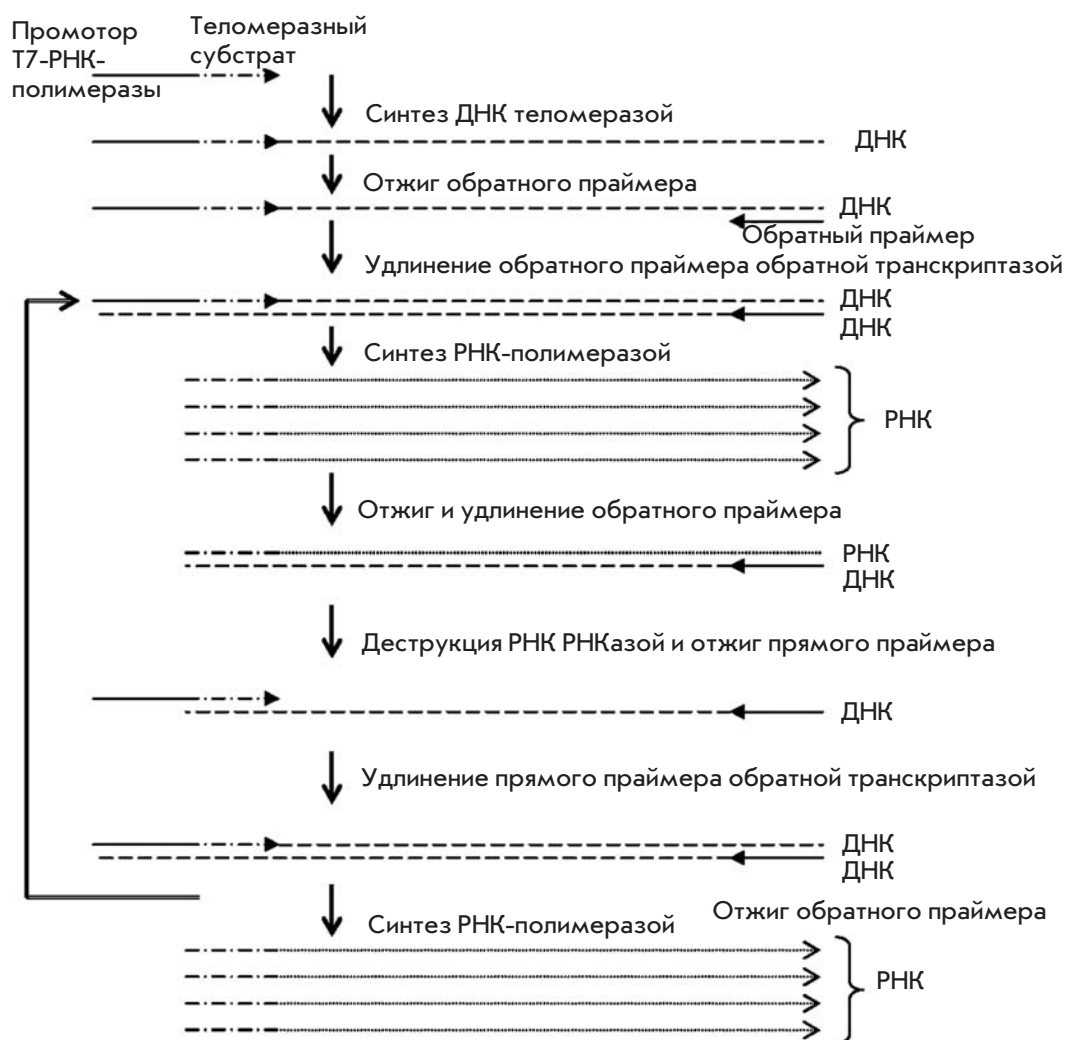
С помощью этой схемы можно за 75 мин при 40 °С амплифицировать синтезированную теломеразой ДНК в количествах, сопоставимых с ПЦР. Последующие реакции могут проводиться в той же пробирке, что и амплификация. Чувствительность метода позволяет выявлять теломеразную активность в образцах из 1–1000 клеток. Метод чувствителен к присутствию РНКаз [12, 42]. Основное преимущество метода перед TRAP с ПЦР-амплификацией – отсутствие прогревания образца при амплификации и игнорирование специфических ингибиторов Taq-полимеразы. Метод позволяет полуколичественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

ПРЯМАЯ ДЕТЕКЦИЯ СИНТЕЗИРОВАННОЙ ТЕЛОМЕРАЗЫ ДНК

Детекция теломеразной активности с помощью прямого включения радиоактивно меченного субстрата

Метод основан на способности теломеразы удлинять олигонуклеотиды в присутствии dNTP. Если олигонуклеотид или один из dNTP (как правило dGTP, так как синтезируемые теломеразой теломеры обогащены остатками гуанина) содержит радиоактивную метку, то по ее включению в ДНК можно элек-

Рис. 9. Схема детекции теломеразной активности с заменой ПЦР-амплификации теломеразных продуктов на транскрипционную амплификацию [12, 42].



трофоретически оценивать активность теломеразы [43]. Основные недостатки метода – использование больших количеств радиоактивных изотопов и недостаточная во многих случаях чувствительность, обусловленная низким содержанием теломеразы в клетках и тканях.

Метод с использованием радиоактивного мечения без дополнительного усиления сигнала был первым методом определения теломеразной активности. До сих пор он остается основным при изучении теломеразы организмов со слаборегулярными теломерами (например, *Saccharomyces cerevisiae*). Этот метод применяется и сейчас для детального исследования синтезированной теломеразой ДНК и количественных измерений. Метод позволяет количественно определять активность и процессивность теломеразы в экстрактах клеточных линий, но обладает низкой чувствительностью (10000 клеток теломеразоположительной клеточной линии).

Определение синтезированной теломеразой ДНК по изменению поверхностного плазмонного резонанса

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР) возникает на поверхности металла при условии полного внутреннего отражения и характеризуется специфическим углом отражения, а следовательно, показателем преломления. Этот эффект, возникая на поверхности металлической пленки, распространяется в глубь раствора, затухая экспоненциально как функция расстояния. Взаимодействия между молекулами изменяют затухающую волну, что влияет на характеристики поверхностного плазмона и что выражается в изменении резонансного угла и показателя преломления в поверхностном слое. По изменению показателя преломления судят о взаимодействии биомолекул (рис. 10А).

С помощью биосенсора методом ППР можно прямо измерять теломеразную активность как соответ-

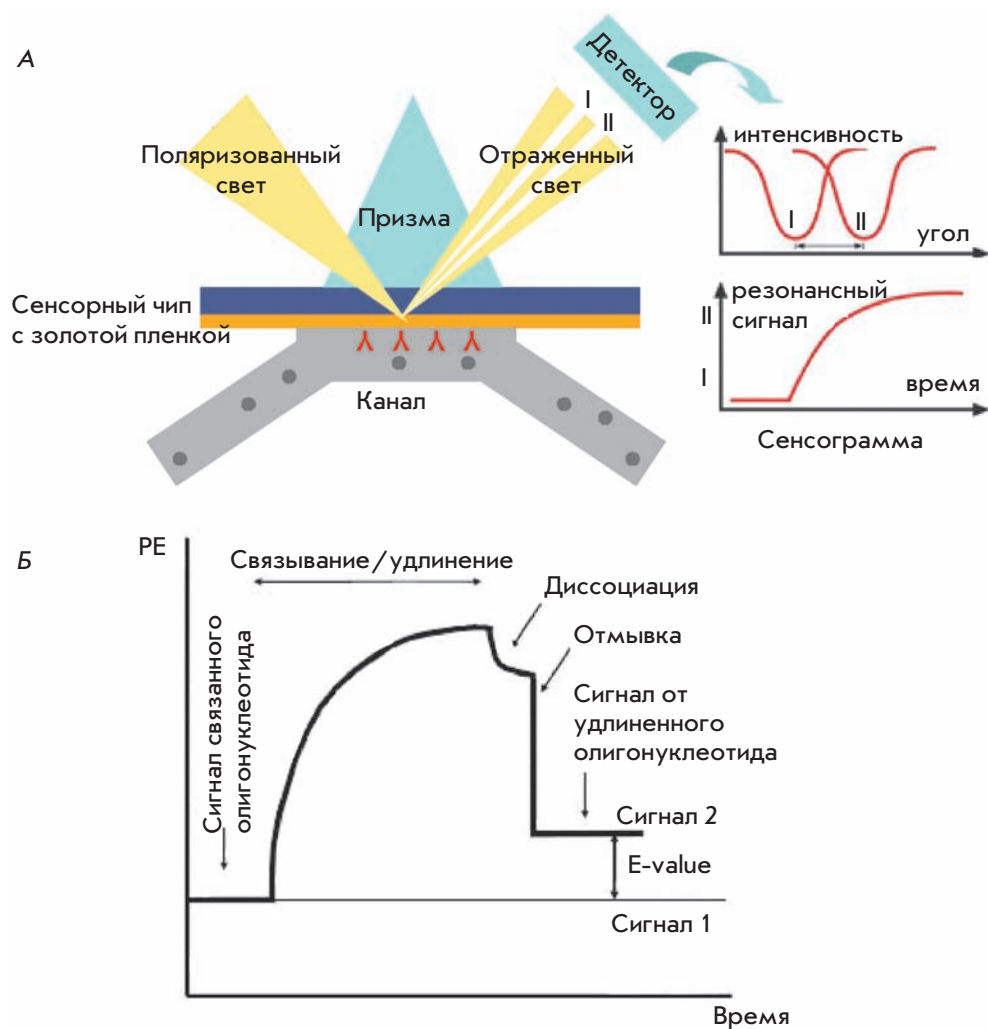


Рис. 10. Схема применения поверхностного плазмонного резонанса для детекции макромолекул и соответствующая общей схеме сенсограмма (А) и сенсограмма ППР-метода определения теломеразной активности (Б). РЕ – резонансные единицы. Разница между сигналами 1 и 2 отражает синтез ДНК теломеразой [44].

ствующее удлинение теломеримитирующего олигонуклеотида.

5'-Биотинилированные олигонуклеотиды, содержащие теломерные повторы, иммобилизуют на предобработанной стрептавидином поверхности декстранового сенсора *in situ* на аппарате BIACORE. После этого их обрабатывают клеточным экстрактом. Если экстракт содержит теломеразу, то происходит связывание теломеразы и удлинение олигонуклеотида, определяемое по ППР после отмывки от белков раствором додецилсульфата натрия (рис. 10Б). Степень удлинения олигонуклеотида зависит от концентрации препарата и времени реакции. Результаты анализа экстрактов опухолей и клеточных линий этим методом, а также тестирования ингибиторов теломеразы коррелируют с данными, полученными методом TRAP [44]. Интенсивность сигнала можно увеличить, обрабатывая сенсор с синтезированной теломеразой ДНК антисмысло-

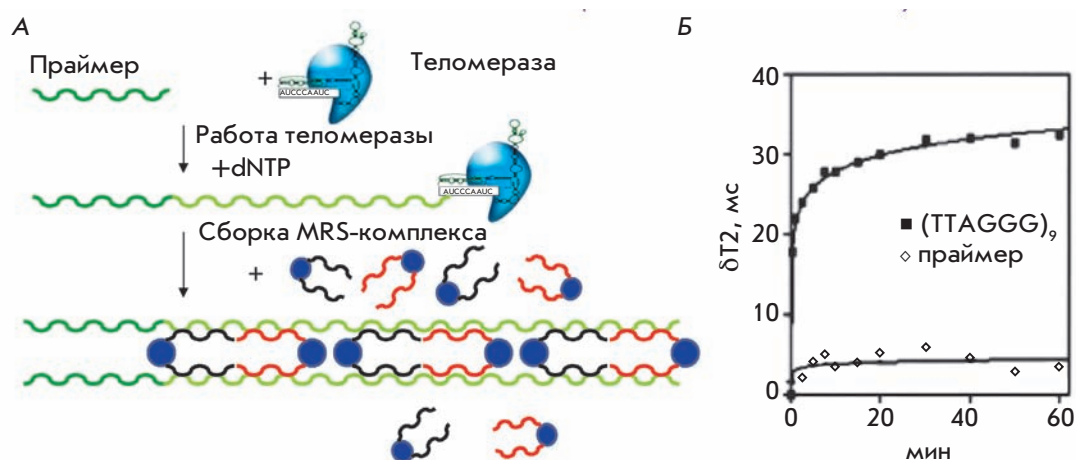
выми олигонуклеотидами к теломерам, ковалентно связанными со стрептавидином и наночастицами золота [45].

Метод позволяет количественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий, а также получать информацию о кинетике реакции, показывая связывание и диссоциацию теломеразы от субстрата. Предел чувствительности метода – экстракт 50 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

Определение теломеразной активности с помощью модифицированных олигонуклеотидами магнитных частиц и ЯМР

Метод основан на использовании магнитных частиц оксида железа, модифицированных олигонуклеотидами, комплементарными теломерным повторам. Эти частицы, связываясь за счет комплементарных взаимодействий с синтезированной теломеразой

Рис. 11. Магнитный наносенсор теломеразы. А – Схема образования MRS-комплекса. Б – Сравнение изменений T2 в присутствии праймера и теломерподобного 54-нуклеотидного олигонуклеотида [46].



повторами, образуют протяженные линейные структуры (MRS-комплексы) (рис. 11А). Эффект от этой гибридизации определяют по спин-спиновому времени релаксации. При образовании организованного ансамбля наночастиц время магнитной релаксации окружающих молекул воды заметно изменяется, что можно измерять в релаксметре (релаксметр измеряет времена спин-спиновой релаксации ядерной намагниченности протонсодержащих жидкостей в многокомпонентных системах и содержание компонентов с различными временами релаксации). Магнитное переключение происходит быстро, достигая половины максимального изменения через 30 с и выходя на плато через 40–60 мин (рис. 11Б). Магнитное переключение подтверждено методом магнитно-силовой микроскопии, а также корреляцией магнитного переключения и размера формируемых наночастиц. Локальное искажение магнитного поля возрастает на наночастицах в упорядоченных ансамблях, а неорганизованные наночастицы дают гораздо меньший магнитный эффект [46].

Время релаксации измеряли в объеме 200–500 мкл при магнитной индукции 0.47 Тл в ЯМР-спектрометре. Для магнитно-резонансного сканирования 384-лучных плашек с 50 мкл смеси при 1.5 Тл оценивали время не только спин-спиновой (T2), но и спин-решеточной релаксации (T1). Адаптация к поточной обработке с использованием магнитно-резонансного сканирования позволила с высокой чувствительностью анализировать сотни образцов за десятки минут [46]. Метод позволяет количественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий с использованием высокопроизводительного микропланшетного формата. Для таких анализов помимо распространенного оборудования и реактивов нужны планшетный ЯМР-спектрометр и проба из наночастиц, модифицированных олигонуклеотидами.

Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

Определение активности теломеразы с помощью метода микробаланса кварцевого кристалла

Для микрогравиметрического анализа теломеразной активности методом микробаланса кварцевого кристалла может использоваться Au-кварцевый резонатор. Кристаллы кварца обладают пьезоэлектрическим эффектом. Приложение переменного тока приводит к возникновению в кристалле кварца колебаний, причем в специально вырезанных кристаллах ток определенной частоты может приводить к образованию стоячей волны, резонансную частоту которой можно определить весьма точно и которая изменяется при связывании лигандов на поверхности кристалла. Метод микробаланса кварцевого кристалла в жидкостях используется при определении аффинного связывания молекул (в частности, белков) на поверхностях, содержащих соответствующие участки узнавания.

В этом методе теломеримитирующий олигонуклеотид связывают с поверхностью сенсора, удлиняют его теломеразой и проводят гибридизацию синтезированной цепи ДНК с биотинилированным олигонуклеотидом (рис. 12А). Альтернативный вариант – удлинение связанного с сенсором теломеримитирующего олигонуклеотида в присутствии биотин-меченного НТР (рис. 12Б). Затем поверхность сенсора обрабатывают конъюгатом авидина с щелочной фосфатазой и раствором субстрата щелочной фосфатазы – 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата, который гидролизует с образованием нерастворимого продукта на поверхности сенсора. При определении теломеразной активности по уменьшению частоты резонанса кристалла видны шаги удлинения олигонуклеотида, связывания с синтезированной теломеразой ДНК конъюгата ави-

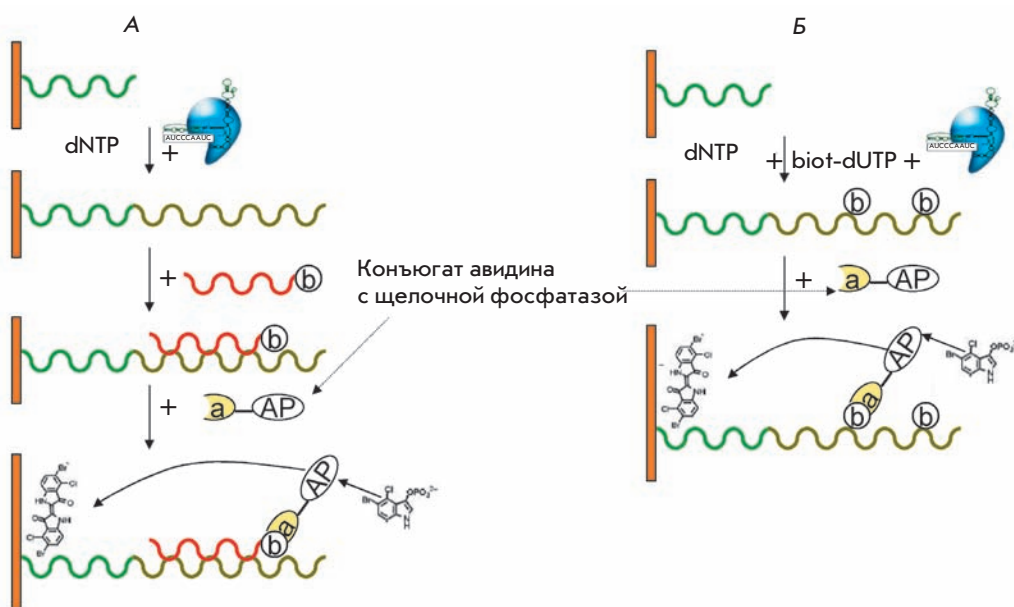


Рис. 12. Схема процессов на сенсоре в методах микробаланса кварцевого кристалла и электрохимического определения. b – биотин в составе олигонуклеотида, a-AP – конъюгат авидина с щелочной фосфатазой, dNTP – смесь нуклеозидтрифосфатов, biot-dUTP – меченный биотином dUTP. А – Встраивание биотин-меченного нуклеотида в синтезированную теломеразой ДНК. Б – Гибридизация биотин-меченного олигонуклеотида с синтезированной теломеразой ДНК [47].

дина с щелочной фосфатазой и осаждение на поверхности кристалла продуктов реакции, катализируемой щелочной фосфатазой [47]. Метод позволяет с высокой скоростью количественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий. Предел чувствительности метода – экстракт 3300 клеток теломераза-положительной клеточной линии. Для метода нужен частотный анализатор и Au-кварцевый кристалл. Кроме того, затруднена идентификация артефактных сигналов.

Электрохимическая детекция теломеразной активности с ферроценилнафталиндиимидом

Этот метод основан на способности теломерных повторов образовывать G-квадруплексы. Теломераза

удлиняет олигонуклеотид, закрепленный на электроде. Затем синтезированные теломерные повторы в присутствии высоких концентраций ионов калия образуют квадруплексы, а ферроценилнафталиндиимид в таких условиях может стехиометрически связываться с квадруплексами ДНК и стабилизировать их структуру (рис. 13). В свою очередь, связанный ферроценилнафталиндиимид можно определить электрохимическими методами. В этом методе оценивается число свернутых в квадруплекс фрагментов ДНК, которое зависит не только от общего числа повторов, но и непрогнозируемо от длины и расположения отдельных фрагментов ДНК, что можно считать недостатком. Чувствительность метода достаточна для определения синтезированной теломеразой ДНК

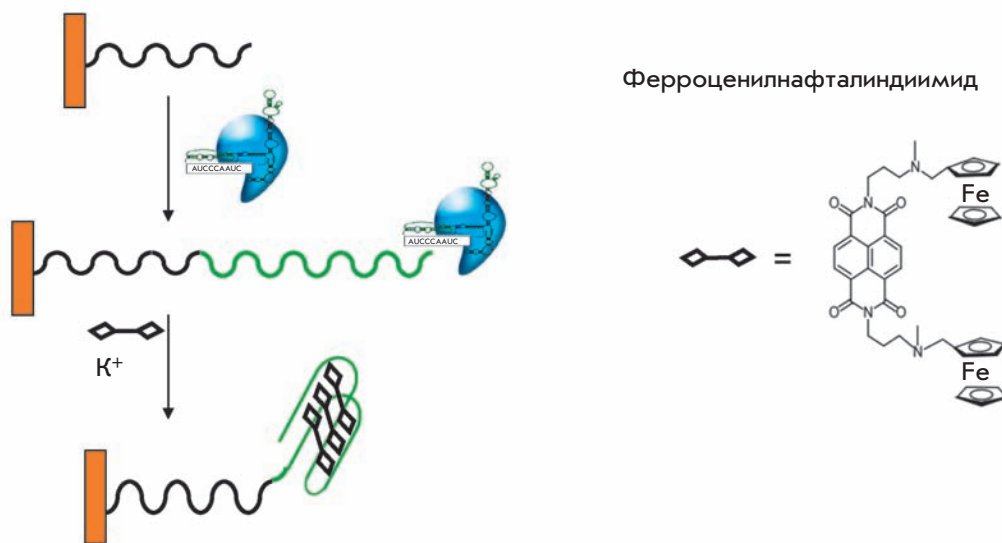
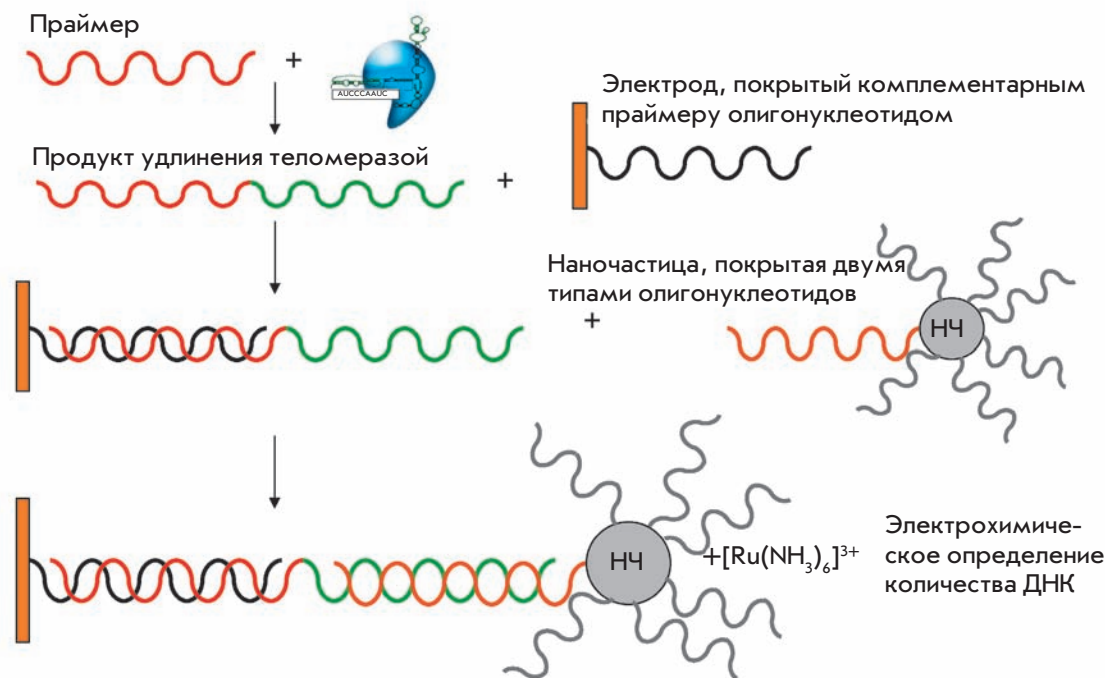


Рис. 13. Схема образования электрохимически определяемого комплекса при определении теломеразной активности с ферроценилнафталиндиимидом [48].

Рис. 14. Электрохимический метод для высокочувствительного определения теломеразной активности, основанный на усилении сигнала с помощью биобаркода [49]. НЧ – наночастицы.



без амплификации [48] (100–1000 клеток теломераза-положительной клеточной линии), но метод не апробирован на экстрактах опухолевых тканей.

Использование биобаркода для определения теломеразной активности

Наиболее чувствительный на сегодняшний день метод прямого измерения теломеразной активности без амплификации синтезированной теломеразой ДНК основан на системе биобаркода. В оригинальной системе биобаркода магнитные микрочастицы связываются с мишенью, которая затем за счет взаимодействий антиген-антитело связывается с наночастицами, ковалентно модифицированными олигонуклеотидом, играющим роль биологического баркода. Получившийся «бутерброд» отделяют от реакционной смеси в магнитном поле, денатурируют и по высвободившимся фрагментам ДНК определяют результат. В системе определения теломеразной активности синтезированную теломеразой ДНК узнают с использованием комплементарных фрагментов ДНК. ДНК-наночастицы состоят из наночастиц золота и олигонуклеотидов двух типов. Один образует дуплекс с синтезированной теломеразой ДНК, а второй – нет, что уменьшает вероятность связывания с одной и той же наночастицей второй ДНК-мишени (рис. 14). Для детекции используется электроактивный комплекс $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$, способный связываться с отрицательно заряженными цепями ДНК за счет электростатических взаимодействий

[49]. Метод позволяет количественно определять активность теломеразы в экстрактах клеточных линий, но не апробирован на экстрактах опухолевых тканей. Предел чувствительности метода – экстракт 10 клеток теломераза-положительной клеточной линии.

Определение активности теломеразы с использованием оптических биосенсоров

Принцип этого метода имеет определенное сходство с ППР: он основан на том, что при связывании мишени коэффициент преломления на поверхности сенсора изменяется пропорционально количеству связавшейся мишени. Избежать стерических затруднений помогает кассета из трех олигонуклеотидов, которые связываются с поверхностью сенсора. Фосфатные группы ковалентно взаимодействуют с поверхностью через 5'-конец олигонуклеотида. Затем с иммобилизованной ДНК комплементарно связывается олигонуклеотид, содержащий на 3'-конец короткий некомплементарный участок. Выступающий 3'-конец ДНК модифицирован фосфотиоатом, что в 10 раз увеличивает аффинность связывания теломеразы с праймером [50]. После обработки экстрактом, содержащим теломеразу, в присутствии dNTP фермент удаляли с поверхности сенсора протеиназой K (рис. 15А).

Активность теломеразы оценивали по сенсограмме поверхностной загрузки (нг/мм², определяемой по изменению коэффициента преломления) (рис. 15Б). Метод позволяет количественно определять активность теломеразы в экстрактах клеточных линий,

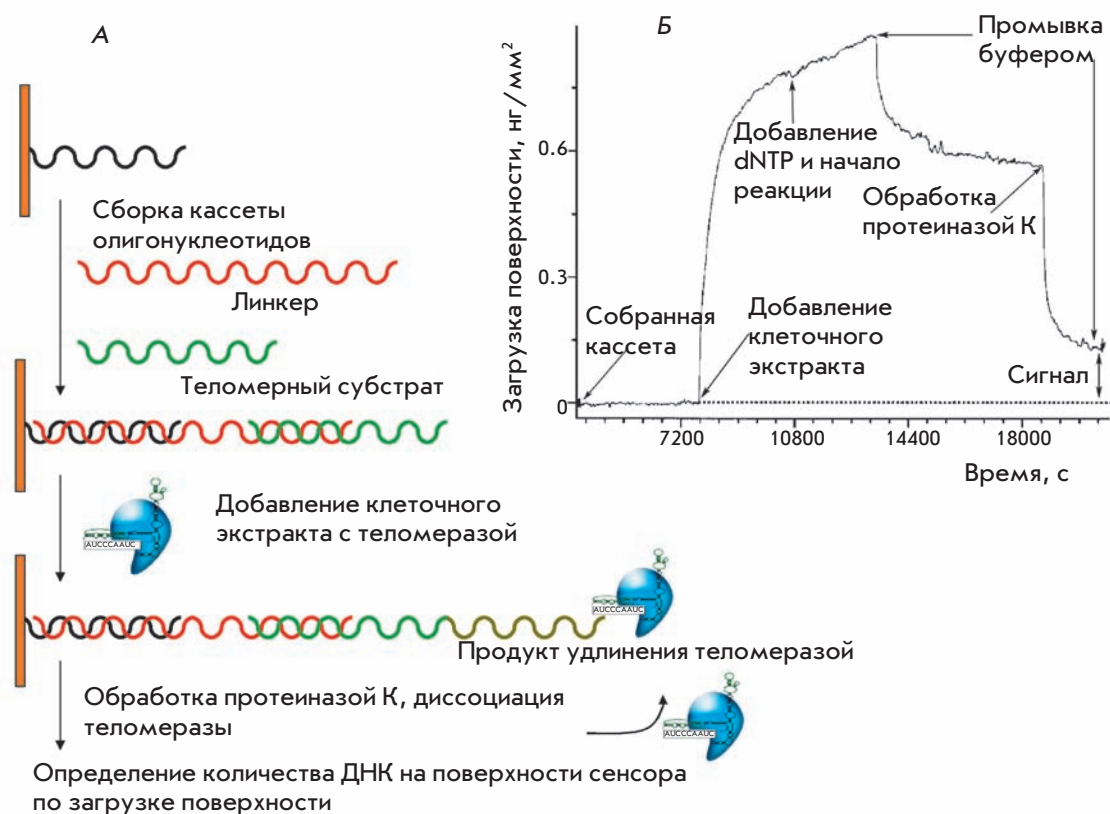


Рис. 15. А – Схема образования синтезированной теломеразой ДНК на поверхности сенсора. Б – Сенсограмма определения теломеразной активности на оптическом сенсоре [50].

но не пригоден для экстрактов опухолевых тканей, так как предел его чувствительности – экстракт 10^5 клеток теломераза-положительной клеточной линии. Кроме того, в этом методе используются фосфотиоатмодифицированные олигонуклеотиды и специальный оптосенсор.

Система определения активности теломеразы, основанная на квантовых точках

Квантовая точка – фрагмент проводника или полупроводника, ограниченный по всем трем пространственным измерениям и содержащий электроны проводимости. Точка должна быть настолько малой, чтобы квантовые эффекты были существенными. Это достигается, если кинетическая энергия электрона $E = \hbar^2/m_d$ (d – характерный размер точки, m – эффективная масса электрона на точке), обусловленная неопределенностью его импульса, будет заметно больше всех других энергетических масштабов, в первую очередь, больше температуры, выраженной в энергетических единицах. Квантовой точкой может служить любой достаточно маленький кусочек металла или полупроводника. Электрон в таком микрокристалле чувствует себя, как в трехмерной потенциальной яме, он имеет много стационарных уровней энергии с характерным расстоянием между

ними (точное выражение для уровней энергии зависит от формы точки). Как и при переходе между уровнями энергии атома, при переходе между энергетическими уровнями квантовой точки может излучаться фотон. При этом, в отличие от атомов, частотами переходов легко управлять, меняя размеры кристалла.

К наночастице (квантовой точке) присоединяют модифицированный на конце тио-группой теломеримитирующий олигонуклеотид. Такая квантовая точка способна флуоресцировать, поглощая квант с длиной волны λ_1 (400 нм) и излучая квант с длиной волны λ_1' (560 нм). Если при удлинении теломеразой присоединенного к квантовой точке олигонуклеотида в ДНК встраивается флуоресцирующий модифицированный нуклеотид TR-dUTP (dUTP, меченный текасским красным), то происходит перенос энергии флуоресценции (рис. 16А), что сопровождается уменьшением излучения с длиной волны λ_1' и появлением излучения с длиной волны λ_2 (610 нм) (рис. 16Б). Метод позволяет количественно оценивать активность теломеразы. Чувствительность метода равна примерно 10000 клеток линии Hela [51], что недостаточно для анализа клинических материалов.

Вместо включения TR-dUTP можно использовать способность теломерных повторов сворачиваться

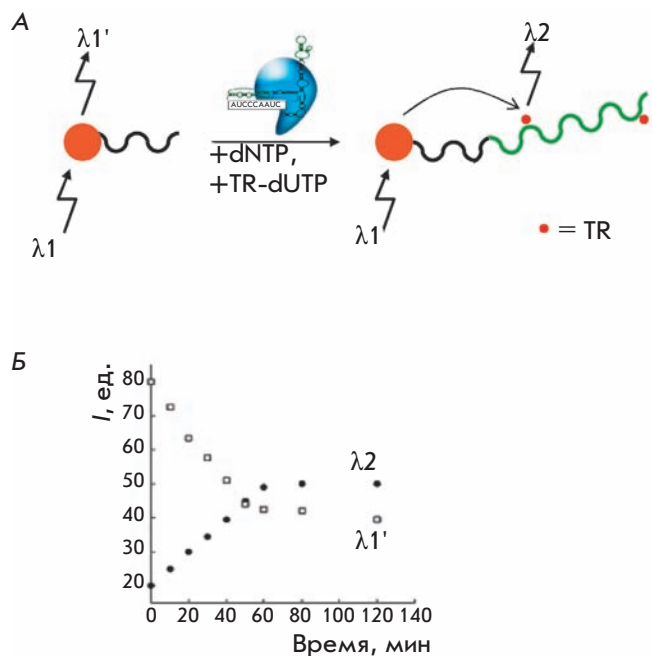


Рис. 16. Удлинение теломеразой олигонуклеотида, связанного с CdSe-ZnS квантовой точкой с включением TR-dUTP (А), и замена излучаемой длины волны квантовой точки (λ_1) на длину волны техасского красного (λ_2) при удлинении теломеразой олигонуклеотида, связанного с CdSe-ZnS квантовой точкой с включением TR-dUTP [51] (Б). TR – техасский красный.

в G-квадруплексы и связывать гемин. В этом случае перенос энергии происходит между квантовой точкой и комплексом G-квадруплекса с геминем с соответствующим тушением флуоресценции. Чувствительность метода – 270 клеток линии T293 [52].

Определение активности теломеразы с помощью сенсорного чипа на нанопроводе

Сенсорный чип представляет собой транзистор, включающий покрытые антителами кремниевые нанопровода, содержащие на поверхности альдегидные группы, к которым могут пришиваться моноклональные антитела. Проводимость покрытого антителами нанопровода изменяется при связывании антигенов, что и детектируется.

В случае сенсорного чипа для определения теломеразной активности нанопровод транзистора модифицируется не антителами, а теломеримитирующими олигонуклеотидами. При добавлении теломеразы и dNTP происходит удлинение связанных на поверхности олигонуклеотидов, что приводит к изменению проводимости транзистора, на котором связаны олигонуклеотиды [53]. Чувствительность метода – экстракт 100 клеток линии HeLa.

Сходный метод основан на использовании ион-селективного полевого транзистора. В присутствии определенных химических веществ на затворе таких транзисторов появляется потенциал, открывающий его канал проводимости, т.е. через него начинает течь ток, величина которого пропорциональна концентрации искомого компонента. Al_2O_3 -затвор транзистора модифицируется субстратом теломеразы. При удлинении праймера теломеразой меняется потенциал на затворе. Метод позволяет определять активность теломеразы в экстрактах клеточных линий (на клинических материалах метод не тестировался). Его чувствительность составляет 65 клеток линии T293 [54]. Основное преимущество метода – возможность проводить большое количество различных анализов одного образца на одном чипе, который может представлять собой набор сенсоров на разные маркеры. Кроме того, видны этапы связывания и диссоциации теломеразы.

Биоломинесцентный метод определения активности теломеразы

Определение теломеразной активности биоломинесцентным методом основано на том, что катализируемое теломеразой удлинение теломеримитирующего олигонуклеотида сопровождается отщеплением пирофосфата, количество которого определяют люцинометрическим методом. В присутствии аденозин-5'-фосфосульфата АТФ-сульфурилаза превращает пирофосфат в АТФ, содержание которого определяют люциферин-люциферазным методом. Чувствительность и специфичность метода сопоставима, согласно [55], с чувствительностью метода TRAP-ИФА. Метод позволяет количественно определять активность теломеразы в экстрактах клеточных линий и тканей (апробирован на опухолях легкого). Его преимуществом является линейная зависимость сигнала от количества синтезированной теломеразой ДНК в сочетании с высокой производительностью.

Электрохемилюминесцентный метод определения теломеразной активности

Определять теломеразную активность можно и с помощью электрохемилюминесценции (люминесценции при электролизе). В этом методе 5'-биотинилированный праймер удлиняют теломеразой, а затем инкубируют со взвесью магнитных шариков, модифицированных авидином. С иммобилизованной на магнитных шариках ДНК гибридизуют электрохемилюминесцентную пробу (ковалентно связанный с наночастицей золота олигонуклеотид, модифицированный рутений-бис(2,2'-бипиридин)(2,2'-бипиридин-4,4'-дикарбонат)-N-гидроксисукцинимидэфиром. Эти тройные комплексы (магнитный шарик – теломерная

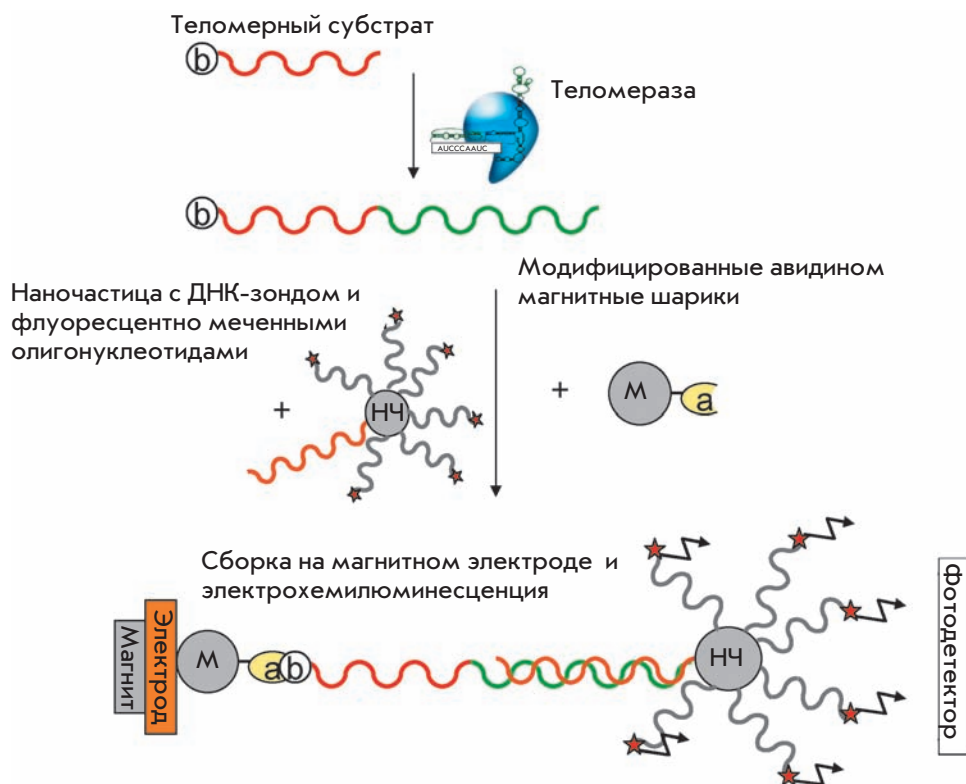


Рис. 17. Схема электрохемилюминесцентного метода определения теломеразной активности [54].

проба – электрохемилюминесцентная проба) промывают и впрыскивают в реакционную кювету, где они примагничиваются к рабочему электроду и при подаче напряжения начинают люминесцировать (рис. 17). Метод позволяет количественно определять активность теломеразы в пробах, содержащих не менее 500 клеток HeLa [56], он обеспечивает достаточно высокое соотношение сигнал/шум благодаря стадии экстракции модифицированными магнитными шариками, но не апробирован на клинических материалах.

Детекция теломеразной активности с помощью FRET и флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения

Метод на основе FRET предназначен для того, чтобы различить синтез одной буквы (непроцессивный метод синтеза) и начало синтеза второго повтора ДНК (условно процессивный метод синтеза) индивидуальными комплексами теломеразы *Tetrahymena thermophila*. FRET определяли с помощью флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения, основанной на явлении отражения электромагнитных волн от границы раздела двух прозрачных сред, которое возникает при условии, что волна падает из среды с более высоким показателем преломления под углом, превышающим угол полного отражения. Интенсивность излучения, проникаю-

щего во вторую среду, уменьшается по экспоненциальному закону, что позволяет выявлять флуоресцентные объекты, возбуждаемые этим излучением, в пограничном слое толщиной ~100 нм с разрешением до 10 нм.

Биотинилированные праймеры $(TG)_8T_2G_4T_2$ связывали на покрытых стрептавидином кварцевых слайдах и обрабатывали содержащим теломеразу экстрактом в присутствии dGTP и ddTTP, обрывающего синтез на втором повторе. В результате образуются детектируемые продукты двух типов. Слайды с продуктами реакции обрабатывали Cu^{3+} -меченым олигонуклеотидом $(Cu^{3+}-CA)_8$, чтобы окрасить Cu^{3+} каждый связанный на слайде праймер за счет комплементарного взаимодействия с нетеломерным участком олигонуклеотида $(TG)_8$. Затем систему обрабатывали комплементарным теломерной последовательности Cu^{5+} -меченым детектирующим олигонуклеотидом $(Cu^{5+}-C_2A_2C_3)$, который более эффективно связывается с более длинным продуктом теломеразы. Фиксируют сигнал FRET между Cu^{3+} и Cu^{5+} [57] (рис. 18). Метод позволяет идентифицировать индивидуальные сигналы от удлинения праймера теломеразой.

Для проверки и нормирования системы использовали меченные Alexa Fluor-488 праймеры трех типов: соответствующие позициям без синтеза, синтезу одной буквы, синтезу второго повтора $((TG)_8T_2G_4T_2$,

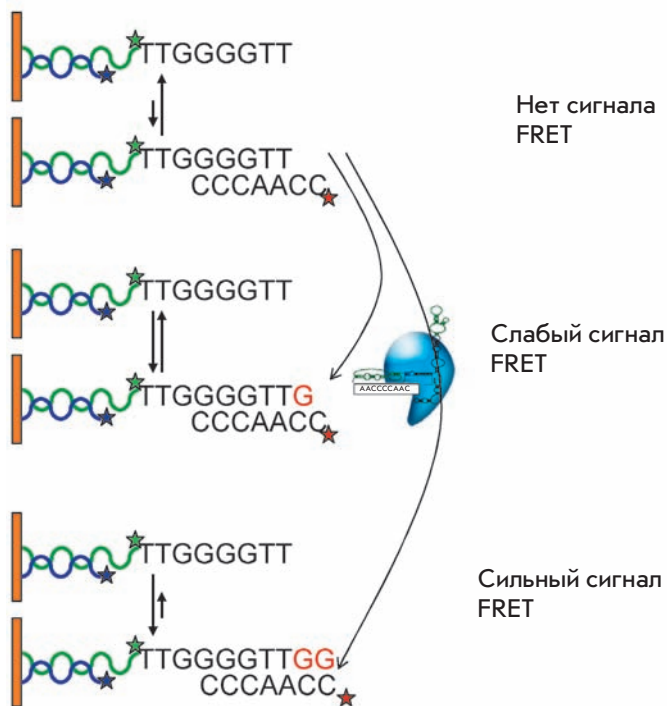


Рис. 18. Детекция теломеразной активности с помощью FRET и флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения [57].

(TG)₈T₂G₄T₂G, (TG)₈T₂G₄T₂G₄T) с 5'-концевым биотином, которые связывались с покрытыми стрептавидином кварцевыми слайдами. Наличие флуорофора Alexa Fluor-488 позволяет определить плотность и локализацию связанных на слайде праймеров [57].

Определение теломеразной активности с помощью FRET и флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения дает возможность детектировать удлинение теломеразой индивидуальных праймеров и может сочетаться с основанными на FRET методами изучения структуры теломеразы. Этим методом можно определить только первые полтора повтора, синтезированные теломеразой, т.е. он не отражает полной активности теломеразы. Метод апробирован только на теломеразе *T. thermophila* и предназначен пока только для решения исследовательских задач.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО УСИЛЕНИЯ СИГНАЛА

Определение активности теломеразы с использованием меченных дигоксигенином комплементарных теломерам олигонуклеотидов

Определение синтезированной теломеразой ДНК с помощью ИФА привлекательно тем, что это неизо-

топный метод. Метод основан на том, что синтезированную теломеразой ДНК гибридизуют с меченным дигоксигенином олигонуклеотидом и определяют полученный комплекс с помощью ИФА, используя конъюгат щелочной фосфатазы с антителом к дигоксигенину (рис. 8). Предел чувствительности метода – 10 аттомоль продукта, что типично для систем с дигоксигенином. При использовании экстрактов клеток линии T293 предел чувствительности составлял 37500 клеток [58], что недостаточно для анализа клинических материалов. Метод определения синтезированной теломеразой ДНК с помощью ИФА далеко не самый чувствительный, но он полностью автоматизирован и оптимизирован для поиска ингибиторов теломеразы.

Электрохимическое определение активности теломеразы с использованием конъюгатов авидина с щелочной фосфатазой

Метод основан на иммуноферментной амплификации сигнала с электрохимической детекцией. Тиолированный олигонуклеотид-субстрат, ковалентно присоединенный к золотому электроду, удлиняется теломеразой в присутствии NTP. Далее проводят ИФА, как и в методе с применением микробаласа кварцевого кристалла, с образованием нерастворимого продукта на поверхности электрода, что и определяют электрохимически (рис. 12). Для детекции используют хронопотенциометрию – метод, основанный на измерении изменения электродного потенциала *E* во времени при контролируемом (постоянном) значении тока электролиза. Чем больше осадка на поверхности электрода, тем сильнее изменение потенциала. Метод позволяет с высокой скоростью количественно определять активность теломеразы в экстрактах тканей и клеточных линий [47]. Чувствительность метода достаточна для определения теломеразной активности в экстракте, соответствующем 1000 клеток линии HeLa.

Определение активности теломеразы с использованием флуориметрического оптосенсора

Этот оптический сенсор основан на флуориметрии (фактически – флуориметр с использованием оптоволокна в системах возбуждения и детекции). Олигонуклеотид, субстрат теломеразы, модифицируется на 3'-конце фосфотиоатом для увеличения аффинности теломер-(олигонуклеотид)связывающего участка hTERT и соответственно скорости теломеразной реакции. Этот праймер ковалентно связывается на поверхности оптического биосенсора, и его удлинение теломеразой отслеживается в реальном времени по включению dUTP, меченного изотиоцианатным производным флуоресцеина (FITC), или уд-

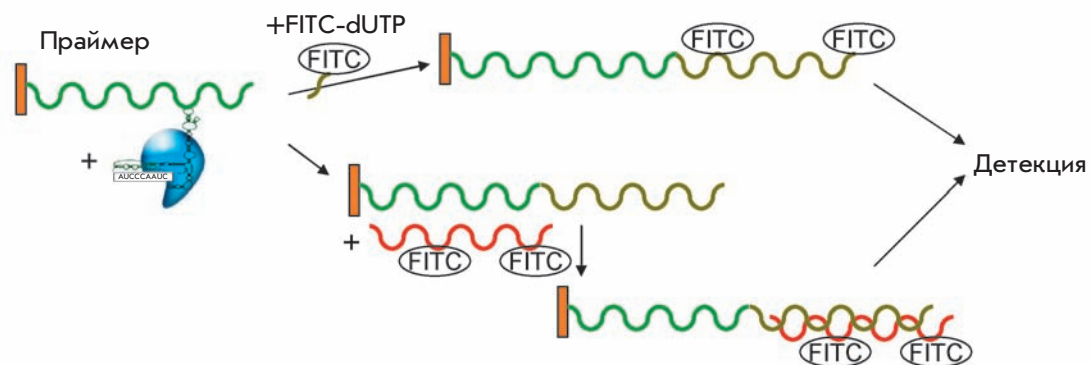
Таблица 2. Краткое сравнение методов определения теломеразной активности

Метод определения теломеразной активности	Чувствительность*	Преимущества	Недостатки**	Ссылка
С помощью прямого включения радиоактивно меченного субстрата	$10^5 - 10^6$	Отсутствие связанных с ПЦР артефактов. Синтезированная теломеразой ДНК видна непосредственно в теле, можно оценивать ее размер и количество.	Низкая чувствительность, необходимость работы с большими количествами радиоактивной метки, длительное время экспозиции.	[43]
Определение синтезированной теломеразой ДНК по изменению поверхностного плазмонного резонанса	20–100	Отсутствие связанных с ПЦР артефактов, без радиоактивной метки, без ПААГ. Информация о кинетике реакции. Возможность детекции сигнала на фоне 1000х избытка теломераза-негативных клеток. Видны связывание и диссоциация теломеразы.	Необходимость в системе BIACORE и биотинилированных праймерах.	[44, 54]
С помощью модифицированных олигонуклеотидов магнитных частиц и ЯМР	10	Отсутствие связанных с ПЦР артефактов, без радиоактивной метки, без ПААГ, очень высокопроизводительный микропланшетный формат.	Нужен ЯМР-спектрометр и проба из наночастиц, ковалентно связанных с олигонуклеотидами.	[46]
С помощью метода микробаланса кварцевого кристалла	3300	Отсутствие связанных с ПЦР артефактов. Высокая чувствительность. Быстрая процедура.	Нужен частотный анализатор и Au-кварцевый кристалл, сложность идентификации артефактных сигналов в случае появления.	[47]
Электрохимически с использованием ферроценинафталиндимиды	100–1000	Отсутствие связанных с ПЦР артефактов. Высокая чувствительность. Быстрая процедура.	Оценивается число свернутых в квадруплекс структур, зависящее не только от общего числа повторов, но и непротонизируемо от длины и расположения отдельных фрагментов ДНК.	[48]
С использованием биобаркода	10	Один из наиболее чувствительных на сегодняшний день методов непосредственного измерения теломеразной активности без амплификации синтезированной теломеразой ДНК.	Нужен модифицированный электрод и наночастицы, покрытые олигонуклеотидами двух типов.	[49]
С использованием оптических блосенсоров	10^5	Без радиоактивности, без ПААГ, без ПЦР.	Нужны фотодиодомодифицированные олигонуклеотиды и специальный оптосенсор. Недостаточная для клинических материалов чувствительность.	[50]
Основанный на квантовых точках	10000/270	Без радиоактивности, без ПААГ, без ПЦР.	Нужны олигонуклеотиды, ковалентно связанные с квантовыми точками. Недостаточная для клинических материалов чувствительность.	[51]
С помощью сенсорного чипа на нанопроводе	100	Возможность проводить большое количество разных анализов образца на одном чипе. Видны связывание и диссоциация теломеразы.	Нужен нанотранзисторный чип и оборудование для его анализа.	[53]
Биоломинесцентный	5	Линейная зависимость сигнала от количества синтезированной теломеразой ДНК. Без радиоактивности, без ПААГ, без ПЦР, высокопроизводительный формат.	Нужны люциферазная система детекции биоломинесценции и люминометр.	[55]
Электрохемилюминесцентный	500	Высокое соотношение сигнал/шум благодаря очистке экстракцией модифицированными магнитными шариками. Высокая чувствительность.	Сложность синтеза пробы, требования к оборудованию.	[56]
С помощью FRET и флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения	1	Высочайшая чувствительность – возможность детектировать удлинение теломеразой индивидуальных праймеров. Возможность сочетания метода с основанными на FRET методами исследования структуры теломеразы.	Метод определяет только первые полтора повтора, синтезированные теломеразой. Апробация сделана только для теломеразы <i>Tetrahymena thermophila</i> .	[57]
С использованием дитоксинин-меченных комплектарных теломерам олигонуклеотидов (ИФА)	37500	Количественность, метод автоматизирован.	Недостаточная для клинических материалов чувствительность.	[58]
Электрохимически с использованием конъюгатов авидин-щелочная фосфатаза	3300	Отсутствие связанных с ПЦР артефактов. Высокая чувствительность. Быстрая процедура.	Нужен специально подготовленный электрод, сложность идентификации артефактных сигналов в случае появления.	[47]
С использованием флуориметрического оптосенсора	$10^6 - 10^7$	Без радиоактивности, без ПААГ, без ПЦР.	Нужны фотодиодомодифицированные олигонуклеотиды и опволоконная система детекции флуоресценции. Недостаточная для клинических материалов чувствительность.	[59]

С использованием ДНК-зондов меченых олигонуклеотидов	1000	Без радиоактивности, без ПААГ, без ПЦР. Простая процедура и короткое время анализа.	Не очень высокая специфичность метода, есть фоновый сигнал.	[61]
По пересорачивающемуся в ДНК-зонд теломеразному субстрату	10000	Без радиоактивности, без ПААГ, без ПЦР. Очень простая процедура и короткое время анализа.	Не очень высокие чувствительность и специфичность метода, есть фоновый сигнал.	[60]
TRAP	10	Видны амплификации синтезированной теломеразой ДНК. ПААГ позволяет определить часть артефактов ПЦР. Высокая специфичность метода.	Работа с радиоактивной меткой, необходимость ПААГ. Возможность артефактов ПЦР.	[11]
TRAP с одной клетки	1	Высокая чувствительность. ПААГ позволяет определять часть артефактов ПЦР и качественно судить о процессивности.	Работа с радиоактивной меткой, работа с отдельными клетками, необходимость ПААГ. Возможность артефактов ПЦР.	[13]
TRAP с флуоресцентными праймерами	100	Без радиоактивной метки, ПААГ позволяет определять часть артефактов ПЦР и качественно судить о процессивности.	Необходимость в флуоресцентно меченых праймерах, необходимость ПААГ. Возможность артефактов ПЦР.	[20]
TRAP с флуоресцентным окрашиванием ДНК в теле	10	Без радиоактивной метки. ПААГ позволяет определять часть артефактов ПЦР и качественно судить о процессивности.	Необходимость ПААГ. Возможность артефактов ПЦР. Большинство интеркалирующих флуоресцентных красителей мутагенны.	[16, 18]
TRAP с окрашиванием ДНК в теле нитритом серебра	10	Без радиоактивной метки. ПААГ позволяет определять часть артефактов ПЦР и качественно судить о процессивности.	Необходимость ПААГ. Возможность артефактов ПЦР. Увеличенная трудоемкость.	[17]
TRAP с анализом методом сцинтилляционного сближения	10	Без радиоактивности, без ПААГ, высокопроизводительный микропланшетный формат. Легкая оценка количества.	Необходимость в ³ H-TTP и биотинилированных праймерах. Работа с тритием. Возможность артефактов ПЦР.	[27]
TRAP с детекцией методом «защиты гибридизации»	10	Без радиоактивности, без ПААГ, высокопроизводительный микропланшетный формат. Легкая оценка количества.	Требуются акридин-меченные пробы. Возможность артефактов ПЦР.	[28]
TRAP с праймерами-амплифлуорами	10-50	Без радиоактивности, без ПААГ, высокопроизводительный формат. Различное мечение амплификатов синтезированной теломеразой ДНК и ПЦР-контроля.	Возможность артефактов ПЦР. Требуются амплифлуоры.	[22]
TRAP в сочетании с иммуноферментным анализом	10	Без радиоактивности, без ПААГ, высокопроизводительный микропланшетный формат.	Возможность артефактов ПЦР и ИФА.	[29]
TRAP с праймерами с резонансным переносом энергии (FRET)	10	Без радиоактивности, без ПААГ, высокопроизводительный микропланшетный формат.	Неодинаковый учет при количественной оценке первых и последующих повторов, построенных теломеразой. Возможность артефактов ПЦР. Требуются специальные флуорофоры.	[26]
TRAP на микрочипах	10	Без радиоактивности, без ПААГ, малые реакционные объемы, высокопроизводительный микропланшетный формат. Легкая оценка количества.	Нужны чипы и прибор для их чтения.	[35]
TRAP с ПЦР в реальном времени	50	Без радиоактивности, без ПААГ, высокопроизводительный микропланшетный формат. Легкая оценка количества. Возможно различное мечение амплифлуорами амплификатов синтезированной теломеразой ДНК и ПЦР-контроля.	Нужен амплификатор для ПЦР в реальном времени. Возможность артефактов ПЦР. Сложность определения артефактов ПЦР.	[32, 33]
In situ TRAP	1	Метод дает информацию о активности теломеразы в отдельных клетках и некоторую информацию о внутриклеточной локализации активности.	Сложная процедура, низкопроизводительная, нужен флуоресцентный микроскоп. Метод оптимизирован только для анализа клинических препаратов и клеточных линий.	[36]
TRAP с транскрипционной амплификацией	10	Изотермическая амплификация, отсутствие артефактов ПЦР, детекция без ПААГ, высокопроизводительный формат.	Требуются акридин-меченные пробы. Возможность артефактов транскрипционной амплификации. Повышенные требования к чистоте (отсутствию РНК-аз) из-за транскрипционной амплификации.	[42]

*Минимальное число клеток теломеразы-положительных клеточных линий, в котором возможно определение активности.
 **Все методы без ПААГ (кроме определения теломеразной активности с помощью FRET и флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения) оценивают активность, но не процессивность теломеразы.

Рис. 19. Схема получения флуоресцентно меченной синтезированной теломеразой ДНК для детекции флуориметрическим оптосенсором [59].



линенную цепь определяют с помощью гибридизации FITC-меченной комплементарной ДНК-пробы ((ССААТС)₄-FITC) (рис. 19). Этот метод не требует ПЦР-амплификации и дополнительных шагов очистки [59]. Кроме того, сравнили эффективность работы теломеразы в присутствии обычных dNTP и в присутствии FITC-меченного dUTP. Для этого синтезированную теломеразой ДНК в присутствии FITC-меченного dUTP метили FITC-меченной комплементарной ДНК-пробой. Оказалось, что теломераза хуже работает в присутствии FITC-меченного dUTP [59]. Метод позволяет количественно определять активность теломеразы, но его чувствительность не превышает 10⁶–10⁷ клеток, что недостаточно для анализа клинических материалов. Кроме того, в этом методе используется несерийная система детекции флуоресценции.

Определение активности теломеразы с использованием ДНКзимов

ДНКзимы – фрагменты ДНК, обладающие ферментативной активностью.

Существует несколько вариантов использования ДНКзимов при анализе теломеразы. Во-первых, субстрат теломеразы может иметь на 5'-конце шпильку, которая при удлинении субстрата пересворачивается, образуя каталитическую структуру (рис. 20А). При этом одна цепь исходной шпильки образует дуплекс с *de novo* синтезированными теломерными повторами, а вторая, в присутствии молекулы гемина, формирует квадруплекс с включенной в него молекулой гемина, обладающий пероксидазной активностью. Этот комплекс катализирует окисление 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин)-6-сульфоновой кислоты (ABTS) в присутствии H₂O₂, что приводит к накоплению цветного продукта (рис. 20). Чувствительность этого метода составляет примерно 10000 клеток линии HeLa при продолжительности анализа около 8 мин [60]. Следует отметить медленное изменение цвета экстракта контрольных клеток после

термической обработки, что, по мнению авторов, связано с неспецифической сорбцией гемина на компонентах реакционной смеси. Этот метод отражает число удлинённых молекул субстрата, но не учитывает длину создаваемой теломеразой цепи.

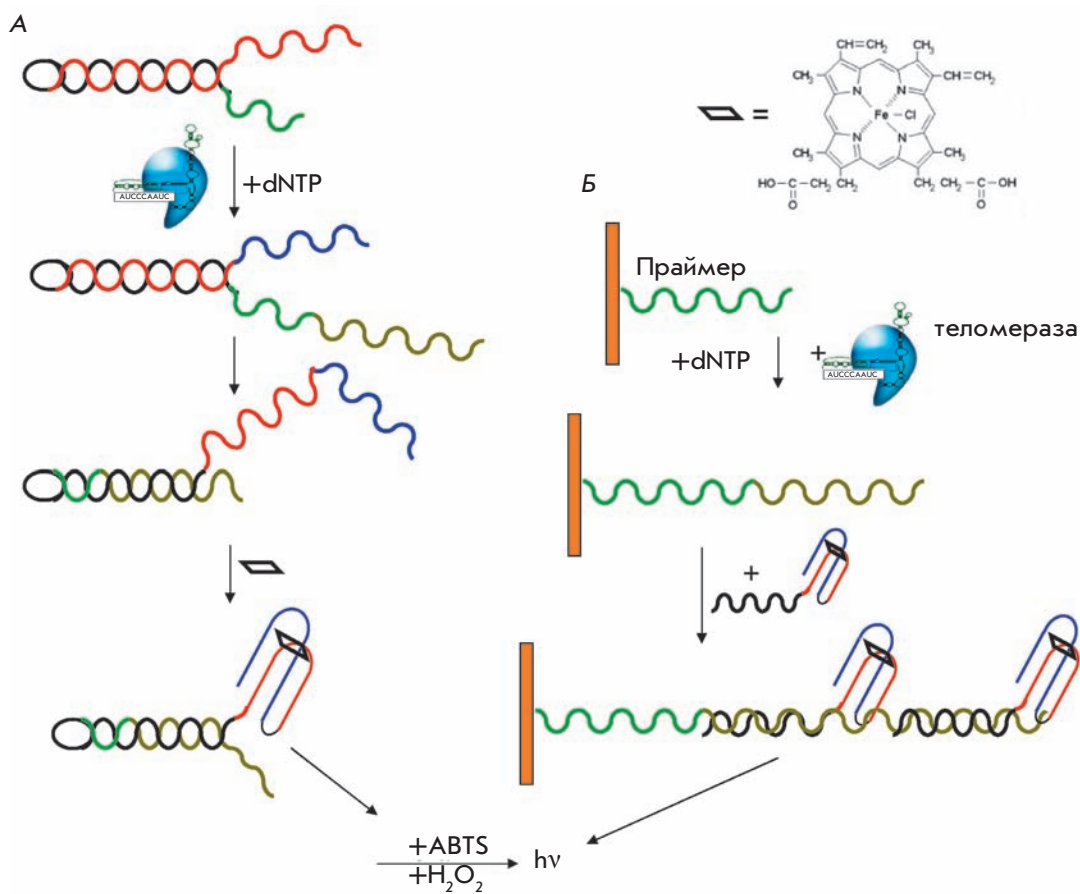
Аналогично можно использовать ДНКзим, ковалентно связанный с антисмысловым олигонуклеотидом к синтезированной теломеразой ДНК [61] (рис. 20Б). Фактически это ИФА, где к зонду уже ковалентно присоединен фермент. Чувствительность этой модификации составляет около 1000 клеток линии HeLa при меньшем фоне. К недостаткам этих методов можно отнести невысокую чувствительность и специфичность, а также наличие фонового сигнала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время существует ряд методов определения теломеразной активности в самых разных образцах: экстрактах клеток, тканей, смешанных популяций клеток. Все методы можно разбить на две группы – методы с непосредственной детекцией синтезированной теломеразой ДНК и методы с различными схемами усиления, каждый из которых обладает своими преимуществами и недостатками. Сравнение всех этих методов приведено в табл. 2.

Если рассмотреть все методы, то можно выделить ряд новых систем, сопоставимых по чувствительности с наиболее распространенным на сегодня методом TRAP. Они избавлены от артефактов, связанных с амплификацией, и обладают высокой скоростью анализа при высокой чувствительности. При этом они имеют ряд недостатков, в том числе и высокие требования к специфическим расходным материалам и оборудованию, так что выбор методики в каждом конкретном случае может определяться доступностью оборудования и реактивов. В ряде методов сложно отделить специфические сигналы от неспецифических. В большинстве методов оценивается только активность, но не процессивность теломеразы. Зачастую они не дают информации о распределении

Рис. 20. Схема двух вариантов определения активности теломеразы с использованием ДНКзимов [60, 61] (А, Б).



синтезированной теломеразой ДНК по длине. Некоторые методы узкоспециализированные. Например, метод с определением синтезированной теломеразой ДНК с использованием дигоксигенин-меченных комплементарных теломерам олигонуклеотидов (ИФА) без ПЦР далеко не самый чувствительный, но полностью автоматизированный и оптимизированный для поиска ингибиторов теломеразы. Определение теломеразной активности с помощью FRET и флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения дает возможность детектировать удлинение теломеразой индивидуальных праймеров, может со-

четаться с основанными на FRET методами исследования структуры теломеразы, но при этом позволяет детектировать только первые полтора повтора, синтезированные теломеразой, и предназначено для решения исследовательских задач. ●

Работа поддержана государственным контрактом № 02.740.11.0706, Российским фондом фундаментальных исследований (грант 08-04-01220-а) и Федеральным агентством по образованию (государственные контракты П1390 и П800).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hayflick L., Moorhead P.S. // Exp. Cell Res. 1961. V. 25. P. 585–621.
- Olovnikov A.M. // J. Theor. Biol. 1973. V. 41(1). P. 181–190.
- Blackburn E.H. // Cell. 2001. V. 106(6). P. 661–673.
- Pandita T.K., Hunt C.R., Sharma G.G., Yang Q. // Cell Mol. Life Sci. 2007. V. 64(2). P. 131–138.
- Greider C.W., Blackburn E.H. // Cell. 1985. V. 43(2). P. 405–413.
- Blackburn E.H. // Nature. 1991. V. 350(6319). P. 569–573.
- Maida Y., Yasukawa M., Furuuchi M., Lassmann T., Possemato R., Okamoto N., Kasim V., Hayashizaki Y., Hahn W.C., Masutomi K. // Nature. 2009. V. 461(7261). P. 230–235.
- Pasrija T., Srinivasan R., Behera D., Majumdar S. // Eur. J. Cancer. 2007. V. 43(9). P. 1476–1482.
- Kedde M., le Sage C., Duursma A., Zlotorynski E., van Leeuwen B., Nijkamp W., Beijersbergen R., Agami R. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281(52). P. 40503–40514.
- Скворцов Д.А., Рубцова М.П., Зверева М.Э., Киселев Ф.Л., Донцова О.А. // Acta Naturae. 2009. V. 1(1). С. 51–67.
- Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W. // Science. 1994. V. 266(5193). P. 2011–2015.

12. Saldanha S.N., Andrews L.G., Tollefsbol T.O. // *Anal. Biochem.* 2003. V. 315(1). P. 1–21.
13. Wright W.E., Shay J.W., Piatyszek M.A. // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23(18). P. 3794–3795.
14. Скворцов Д.А., Гаспарьян Н.М., Рубцова М.П., Зверева М.Э., Федорова М.Д., Павлова Л.С., Богданов А.А., Донцова О.А., Киселев Ф.Л. // *ДАН.* 2006. Т. 408(4). С. 556–559.
15. Gomez D., Mergny J.L., Riou J.F. // *Cancer Res.* 2002. V. 62(12). P. 3365–3368.
16. Gan Y., Lu J., Johnson A., Wientjes M.G., Schuller D.E., Au J.L. // *Pharm. Res.* 2001. V. 18(4). P. 488–493.
17. Dalla Torre C.A., Maciel R.M., Pinheiro N.A., Andrade J.A., De Toledo S.R., Villa L.L., Cerutti J.M. // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002. V. 35(1). P. 65–68.
18. Holt S.E., Norton J.C., Wright W.E., Shay J.W. // *Methods Cell. Sci.* 1996. V. 18. P. 237–248.
19. Скворцов Д.А., Зверева М.Э., Павлова Л.С., Петренко А.А., Киселев Ф.Л., Донцова О.А. // *Вестник МГУ.* 2010. Т. 65(3). С. 165–169.
20. Aldous W.K., Grabill N.R. // *Diagn. Mol. Pathol.* 1997. V. 6(2). P. 102–110.
21. Gollahon L.S., Holt S.E. // *Cancer Lett.* 2000. V. 159(2). P. 141–149.
22. Uehara H., Nardone G., Nazarenko I., Hohman R.J. // *Bio-techniques.* 1999. V. 26(3). P. 552–558.
23. Szatmari I., Tokes S., Dunn C.B., Bardos T.J., Aradi J. // *Anal. Biochem.* 2000. V. 282(1). P. 80–88.
24. Szatmari I., Aradi J. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29(2). P. E3.
25. Bazin H., Preaudat M., Trinquet E., Mathis G. // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2001. V. 57(11). P. 2197–2211.
26. Gabourdes M., Bourguine V., Mathis G., Bazin H., Alpha-Bazin B. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 333(1). P. 105–113.
27. Savoysky E., Akamatsu K., Tsuchiya M., Yamazaki T. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24(6). P. 1175–1176.
28. Hirose M., Abe-Hashimoto J., Ogura K., Tahara H., Ide T., Yoshimura T. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1997. V. 123(6). P. 337–344.
29. Mayfield M.P., Shah T., Flannigan G.M., Hamilton Stewart P.A., Bibby M.C. // *Int. J. Mol. Med.* 1998. V. 1(5). P. 835–840.
30. Hoos A., Hepp H.H., Kaul S., Ahlert T., Bastert G., Wallwieser D. // *Int. J. Cancer.* 1998. V. 79(1). P. 8–12.
31. Chen L., Huang J., Meng F., Zhou N. // *Anal. Sci.* 2010. V. 26(5). P. 535–538.
32. Hou M., Xu D., Bjorkholm M., Gruber A. // *Clin. Chem.* 2001. V. 47(3). P. 519–524.
33. Elmore L.W., Forsythe H.L., Ferreira-Gonzalez A., Garrett C.T., Clark G.M., Holt S.E. // *Diagn. Mol. Pathol.* 2002. V. 11(3). P. 177–185.
34. Kong D., Jin Y., Yin Y., Mi H., Shen H. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. V. 388(3). P. 699–709.
35. Heller-Uszynska K., Kilian A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 323(2). P. 465–472.
36. Ohyashiki K., Ohyashiki J.H., Nishimaki J., Toyama K., Ebihara Y., Kato H., Wright W.E., Shay J.W. // *Cancer Res.* 1997. V. 57(11). P. 2100–2103.
37. Yahata N., Ohyashiki K., Ohyashiki J.H., Iwama H., Hayashi S., Ando K., Hirano T., Tsuchida T., Kato H., Shay J.W., et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1998. V. 90(9). P. 684–690.
38. Ohyashiki K., Yahata N., Ohyashiki J.H., Iwama H., Hayashi S., Ando K., Aizawa T., Ito T., Miki M., Ebihara Y. // *Cancer.* 1998. V. 83(12). P. 2554–2560.
39. Dejmek A., Yahata N., Ohyashiki K., Kakihana M., Hirano T., Kawate N., Kato H., Ebihara Y. // *Cancer.* 2000. V. 90(2). P. 117–125.
40. Dejmek A., Yahata N., Ohyashiki K., Ebihara Y., Kakihana M., Hirano T., Kawate N., Kato H. // *Diagn. Cytopathol.* 2001. V. 24(1). P. 11–15.
41. Youssef N., Paradis V., Ferlicot S., Bedossa P. // *J. Pathol.* 2001. V. 194(4). P. 459–465.
42. Hirose M., Abe-Hashimoto J., Tahara H., Ide T., Yoshimura T. // *Clin. Chem.* 1998. V. 44(12). P. 2446–2452.
43. Blackburn E.H., Greider C.W., Henderson E., Lee M.S., Shampay J., Shippen-Lentz D. // *Genome.* 1989. V. 31(2). P. 553–560.
44. Maesawa C., Inaba T., Sato H., Iijima S., Ishida K., Terashima M., Sato R., Suzuki M., Yashima A., Ogasawara S., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31(2). P. E4–4.
45. Rad'ko S.P., Voronina S.A., Gromov A.V., Gnedenko O.V., Bodoev N.V., Ivanov A.S., Yarygin K.N. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009. V. 147(6). P. 746–749.
46. Grimm J., Perez J.M., Josephson L., Weissleder R. // *Cancer Res.* 2004. V. 64(2). P. 639–634.
47. Pavlov V., Willner I., Dishon A., Kotler M. // *Biosens. Bioelectron.* 2004. V. 20(5). P. 1011–1021.
48. Sato S., Kondo H., Nojima T., Takenaka S. // *Anal. Chem.* 2005. V. 77(22). P. 7304–7309.
49. Li Y., Liu B., Li X., Wei Q. // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 25(11). P. 2543–2547.
50. Schmidt P.M., Matthes E., Scheller F.W., Bienert M., Lehmann C., Ehrlich A., Bier F.F. // *Biol. Chem.* 2002. V. 383(10). P. 1659–1666.
51. Patolsky F., Gill R., Weizmann Y., Mokari T., Banin U., Willner I. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125(46). P. 13918–13919.
52. Sharon E., Freeman R., Willner I. // *Anal. Chem.* 2010. V. 82(17). P. 7073–7077.
53. Zheng G., Patolsky F., Cui Y., Wang W.U., Lieber C.M. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23(10). P. 1294–1301.
54. Sharon E., Freeman R., Riskin M., Gil N., Tzfati Y., Willner I. // *Anal. Chem.* 2010. Sep 17. [Epub ahead of print]
55. Xu S.Q., He M., Yu H.P., Wang X.Y., Tan X.L., Lu B., Sun X., Zhou Y.K., Yao Q.F., Xu Y.J., et al. // *Clin. Chem.* 2002. V. 48(7). P. 1016–1020.
56. Zhou X., Xing D., Zhu D., Jia L. // *Anal. Chem.* 2009. V. 81(1). P. 255–261.
57. Wu J.Y., Stone M.D., Zhuang X. // *Nucl. Acids Res.* V. 38(3). P. e16.
58. Kha H., Zhou W., Chen K., Karan-Tamir B., San Miguel T., Zeni L., Kearns K., Mladenovic A., Rasnow B., Robinson M., et al. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 331(2). P. 230–234.
59. Schmidt P.M., Lehmann C., Matthes E., Bier F.F. // *Biosens. Bioelectron.* 2002. V. 17(11–12). P. 1081–1087.
60. Xiao Y., Pavlov V., Niazov T., Dishon A., Kotler M., Willner I. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126(24). P. 7430–7431.
61. Pavlov V., Xiao Y., Gill R., Dishon A., Kotler M., Willner I. // *Anal. Chem.* 2004. V. 76(7). P. 2152–2156.