

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОЧИСТКИ hex-ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДИФИЦИРОВАННОГО МЕТОДА ДЕБЛОКИРОВАНИЯ

А.Г. Мосина, аспирант, *А.Н. Чувиллин, старший научный сотрудник,
*И.П. Смирнов, старший научный сотрудник, **В.Ф. Травкин**, профессор,
*Г.Е. Позмогова, профессор

кафедра Аналитической химии им. И.П. Алимарина МИТХТ им. М.В. Ломоносова

*Научно-исследовательский институт физико-химической медицины

Федерального медико-биологического агентства России

e-mail: AlenaGMosina@yandex.ru

Новый способ деблокирования синтетических гексахлорфлуоресцеин-олигодезоксирибонуклеотидов (HEX-ODN) препятствует модификации метки и накоплению трудно отделяемого побочного продукта. Показано, что его применение увеличивает эффективность очистки HEX-ODN и чувствительность ДНК-диагностики.

A new way of deblocking of synthetic hexachlorofluorescein-oligodeoxyribonucleotides (HEX-ODN) prevents the modification of the label and the accumulation of difficult to separated by-product. It was shown that this method increases the efficiency of purification HEX-ON and the sensitivity of DNA diagnostics.

Ключевые слова: гексахлорфлуоресцеин, олигодезоксирибонуклеотиды, ВЭЖХ, ПЦР в режиме реального времени.

Key words hexachlorofluorescein label, oligodeoxyribonucleotides, HPLC, real time PCR.

Введение

Прогресс в области разработки и внедрения медицинских микроаналитических методов диагностики, например, в генодиагностике, в значительной мере обусловлен использованием олигодезоксирибонуклеотидов (ODN), снабженных флуоресцентными метками [1, 2]. Современные методы ДНК-анализа, в частности, полимеразная цепная реакция в реальном масштабе времени (РВ-ПЦР), подразумевает использование синтетических ODN-зондов. Зонд избирателен к определенному участку целевой ДНК и снабжен одновременно флуоресцентной меткой и гасителем флуоресценции так, что и в свободном состоянии, и в комплексе с ДНК флуоресценция погашена. В процессе ПЦР происходит расщепление зонда, а регистрируемый сигнал флуоресценции возрастает в зависимости от исходного содержания мишени. Использование нескольких зондов с различными флуорофорами в условиях одного опыта

(мультиплексная ПЦР) позволяет провести количественный анализ содержания различных ДНК, например, нескольких патогенов. Чувствительность и достоверность метода РВ-ПЦР во многом определяется качеством и надежностью работы зондов [3].

Гексахлорфлуоресцеиновая метка (HEX) широко используется в ПЦР-диагностике, в особенности, в мультиплексных вариантах [4]. Ранее нами было показано, что все ODN, несущие HEX-метку, содержат 20-30% примеси, обладающей искаженными флуоресцентными свойствами ($\lambda_{\text{em}} 516 \pm 2$ нм, а чистые HEX-производные имели $\lambda_{\text{em}} 553 \pm 1$ нм). Мы обнаружили, что в структуре HEX гетероциклический кислород замещается в процессе постсинтетического аммонолиза на азот с образованием акридинового (ACR-) производного (рис. 1) [5] и предложили удалять побочный продукт с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ).

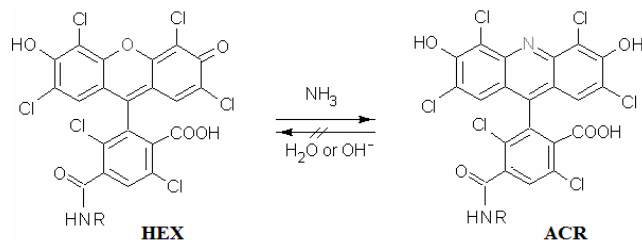


Рис. 1. Схема трансформации HEX-меченых олигонуклеотидов в акридиновые (ACR) производные (R – олигонуклеотид).

С помощью УФ-сканирования было установлено, что в ряде случаев удаление ACR-производного с помощью ВЭЖХ и электрофореза в ПААГ не было эффективным. Нами предложен модифицированный способ деблокирования, основанный на использовании

смесей аммиака с аминами, несущими разветвленный алифатический остаток.

Задача настоящей работы состояла в анализе эффективности применения ОФ-ВЭЖХ и электрофоретического разделения в ПААГ для очистки HEX-олигонуклеотидов, полу-

ченных с использованием нового метода деблокирования.

Результаты и их обсуждение

Для того чтобы провести анализ эффективности применения ОФ-ВЭЖХ для очистки HEX-олигонуклеотидов, было синтезировано три ДНК-зонда, несущих 5'-метку HEX и 3'-гаситель флуоресценции BHQ2 (Black hole quencher, 4'-(4-нитро-4-фенилдиазо)-2'-метокси-5'-метил-азобензол-4''-(N-этил)-N-этил-2-циано-этил-(N,N-диизопропил)) (таблица). Часть реакционной смеси обрабатывали концентрированным водным раствором аммиака (стандартный способ), а часть – смесью водного раствора аммиака с 20–25% *трет.*-бутиламина (модифицированный способ). На рис. 2 приведены хроматограммы трех

зондов, полученных с использованием разных способов деблокирования. Видно, что ВЭЖХ-очистка HEX-ODN, которая проходила в градиенте ацетонитрила в 0.1 М ацетате аммония, pH 6.7, при 40–50°C, позволяет полностью отделить акридиновую примесь (рис. 2 а, б, I). Однако некоторые HEX-производные не удается эффективно разделить в данных условиях, например, такие как HB28 (рис. 2 в, I), что подтверждается УФ-спектрами 3 и 4 (рис. 2). Новый способ деблокирования HEX-ODN минимизирует содержание АСР-производных и существенно упрощает хроматографическую очистку. Так, на приведенных хроматограммах HEX-зондам соответствуют индивидуальные пики 2 (рис. 2 а–в, II).

Формулы и условия ВЭЖХ-выделения олигодезоксирибонуклеотидов

Название	Формула	Условия ВЭЖХ	
		Градиент MeCN	Температура, °C
HB37	5'-HEX-d(A ₇ C ₁₂ G ₁₂ T ₆)-3'-BHQ2	30–55% / 25 мин	50
HB38	5'-HEX-d(A ₄ C ₁₇ G ₉ T ₈)-3'-BHQ2	12–20% / 25 мин	42
HB28	5'-HEX-d(A ₉ C ₅ G ₅ T ₉)-3'-BHQ2	25–32.5% / 20 мин	45

Безусловным преимуществом нового метода деблокирования является то, что он позволяет получать зонды, свободные от АСР-примесей, с помощью стандартного электрофоретического разделения в ПААГ, что особенно важно при проведении скрининговых исследований. Рисунок 3 на примере флуоресцентных кривых кинетики накопления продуктов амплификации ДНК (из клинического образца уrogenитального соскоба эпителиальных клеток) в процессе РВ-ПЦР иллюстрирует значительное увеличение чувствительности флуоресцентного анализа при использовании зонда HB38 (кривая накопления 1),

полученного новым способом (рис. 3А). Важно отметить, что этот эффект опосредован только качеством зонда, а не количественным содержанием в пробе амплифицированной ДНК (рис. 3Б).

Таким образом, исследования процесса деблокирования HEX-олигонуклеотидов позволили найти условия, предотвращающие образование примеси. Применение этого метода дало возможность значительно упростить очистку HEX-зондов и в результате получать достоверные результаты при работе в области высокой чувствительности метода ПЦР с детекцией в реальном масштабе времени.

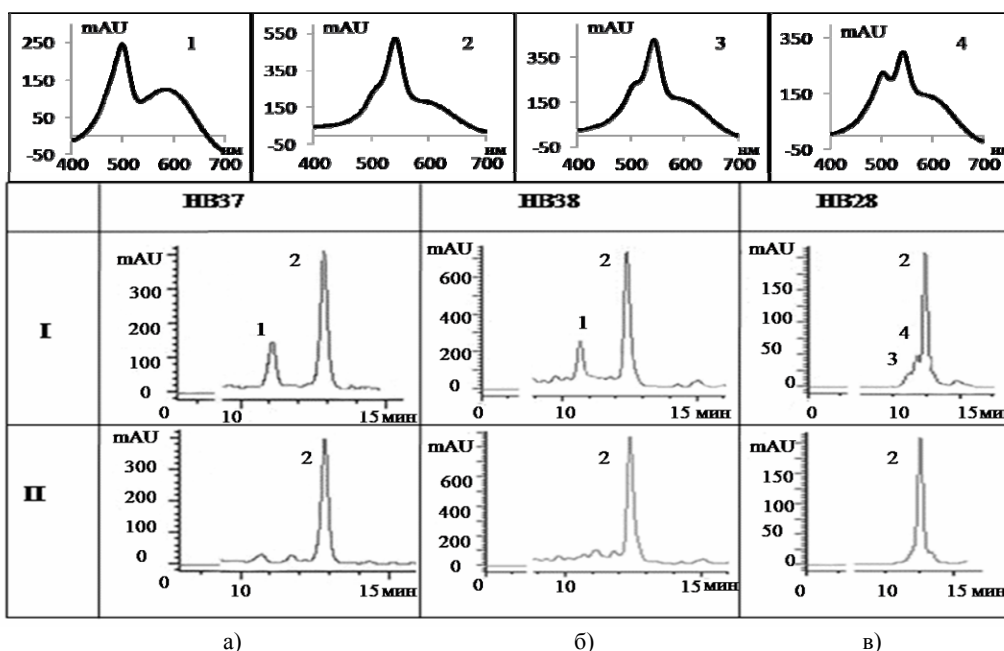


Рис. 2. УФ-спектры и хроматограммы HEX-олигонуклеотидов (0.2 мкмоль) HB37 (а), HB38 (б) и HB28 (в) после стандартного аммонизации (I) и после использования нового метода деблокирования (II).

УФ-спектры: 1 – АСР-производное; 2 – HEX-ODN; 3 – 20% АСР-производного HB28; 4 – 50% АСР-производного HB28. mAU – оптические единицы УФ-поглощения при 260 нм.

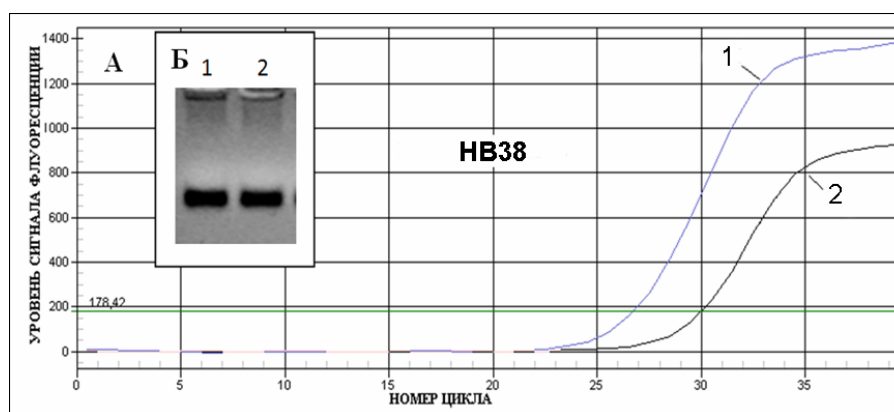


Рис. 3. Кривые кинетики накопления продуктов амплификации ДНК (из клинического образца урогенитального соскоба эпителиальных клеток) в процессе РВ-ПЦР (А) и электрофоретический анализ (2% агароза, бромистый этидий) их результирующего содержания (Б).

Данные получены с использованием набора Флуоропол-Chl.tr EP (ООО «НПФ Литех», Россия), содержащего зонд HB38, очищенный в стандартных условиях электрофореза в ПААГ.

1 – при получении зонда использовался модифицированный метод деблокирования;

2 – при получении зонда использовался стандартный аммонолиз.

Экспериментальная часть

ODN-зонды синтезировали твердофазным амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе ДНК АСМ 800 («Биоссет», Россия) с использованием стандартных коммерческих реагентов (все реактивы Glen Research, США). После завершения синтеза носитель с меченым ODN выдерживали 24 ч при комнатной температуре в концентрированном водном растворе аммиака (стандартный метод) или его смесью с 20–25% *трет.*-бутиламина (модифицированный метод). Формулы и условия выделения олигодезоксирибонуклеотидов перечислены в таблице.

ВЭЖХ проводили на хроматографе Agilent Chemstation 1100 Series, колонка Macherey-Nagel Nucleosil 300 C18, 4.6×250 мм. HEX-зонды выделяли в градиенте ацетонитрила в 0.1 М водном

растворе ацетата аммония. Детектирование олигонуклеотидов, снабженных полиненасыщенными заместителями, проводилось при длине волны максимума поглощения 260 нм (Agilent UV-VIS matrix 45 detector G1315B).

ПЦР-анализ осуществляли на приборе iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Амплификационные смеси объемом 20 мкл составлялись на основе 10× буфера (0.5 М Tris, 0.5 М KCl, 30 мМ MgCl₂), 1000 мкМ каждого из dNTP, по 200 нМ каждого из ПЦР-праймеров, 100 нМ зонда и 10 ед. Taq-полимеразы (ООО «НПФ Литех», Россия). К реакционной смеси добавляли 5 мкл анализируемого образца. ПЦР начинали с предварительной денатурации при 94°C (90 с) и далее проводили 40 циклов по программе: 94°C (10 с), 64°C (10 с), 72°C (40 с), 50°C (считывание флуоресцентного сигнала).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Yeung A.T., Holloway B.P., Adams P.S. Evaluation of dual-labeled fluorescent DNA probe purity versus performance in real-time PCR // *Biotechniques*. 2004. V. 36. P. 266–270.
2. Wilkening S., Bader A. Quantitative real-time polymerase chain reaction: Methodical analysis and mathematical model // *J. Biomol. Tech.* 2004. V. 15. P. 107–111.
3. Juskowiak B. Nucleic acid-based fluorescent probes and their analytical potential // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 399. P. 3157–3176.
4. Marras S.A., Tyagi S., Kramer F.R. Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes // *Clin. Chim. Acta*. 2006. V. 363. P. 48–60.
5. Chuvilin A.N., Serebryakova M.V., Smirnov I.P., Pozmogova G.E. Byproduct with altered fluorescent properties is formed during standard deprotection step of hexachlorofluorescein labeled oligonucleotides // *Bioconjugate Chem.* 2009. V. 20. P 1441–1443.