

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ И БЫСТРЫЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК-ФРАГМЕНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОТОПРОТЕИНА ОБЕЛИНА КАК РЕПОРТЕРА

© 2008 г. В. В. Борисова*, И. А. Пышная**, Д. В. Пышный**, Л. А. Франк**

*Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, Академгородок, стр. 50;

**Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Поступила в редакцию 11.01.2008 г. Принята к печати 05.02.2008 г.

Рекомбинантный Ca^{2+} -активируемый фотопротеин обелина использовали в качестве репортерного белка при проведении биолюминесцентного твердофазного анализа ДНК методом молекулярной гибридизации. Олигонуклеотидные зонды иммобилизовали на поверхности мелкодисперсного полимера или микробиологических планшет различных видов. В качестве выявляемой ДНК-матрицы использовали 30-звенный олигонуклеотид или его производное с остатком биотина на 3'-конце, а также денатурированный двухцепочечный ПЦР-фрагмент вируса гепатита С (ВГС), в состав которого входила последовательность 30-звенного олигонуклеотида. Мечение зонда в составе гибридизационного комплекса проводили ферментативным удлинением цепи с помощью *Taq*-ДНК-полимеразы в присутствии биотинилированного дезоксиурдинтрифосфата. Результаты биолюминесцентного анализа сравнивали с результатами колориметрического анализа, полученными при использовании в качестве репортера щелочной фосфатазы. Показано, что использование биолюминесцентной обелиновой метки позволяет существенно ускорить процедуру выявления ДНК, обеспечивая при этом высокую чувствительность анализа (не ниже 10^{-15} моль ДНК-матрицы), и дает возможность количественной оценки содержания ДНК-матрицы в анализируемом образце.

Ключевые слова: обелин; биолюминесцентный гибридизационный анализ; ПЦР.

ВВЕДЕНИЕ

Чувствительность детекции продуктов полимеразной цепной реакции является критически важным фактором при диагностике различных заболеваний. Существующие на сегодняшнем рынке диагностические системы основаны либо на качественном обнаружении ДНК-мишени методом гель-электрофореза, либо на колориметрическом определении с помощью репортерных ферментов (щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена и пр.). Данные методы обладают недостаточной высокой чувствительностью и большими временными затратами. Системы, основанные на анализе продуктов ПЦР в реальном времени (Real-time PCR assay), достаточно дороги. Разработка чувствительных и недорогих отечественных экспрессных тест-систем является чрезвычайно актуальной задачей для обеспечения нужд медицинской диагностики.

Целью данной работы было исследование возможности применения в качестве репортера Ca^{2+} -активируемого фотопротеина обелина из гидроида *Obelia longissima* для выявления продуктов гибридизации.

Молекула обелина представляет собой устойчивый комплекс, состоящий из одноцепочечного полипептида (22.2 кДа) и окисленного производного субстрата – пероксицелентеразина [1]. Присоединение ионов кальция осуществляется за счет трех центров связывания в составе полипептида и вызывает конформационные перестройки белка и мгновенное декарбоксилирование субстрата с выделением кванта света в голубой области. Благодаря высокому квантовому выходу реакции и наличию чувствительных современных фотометров обелин определяют в аттомольных количествах.

Создание эффективной технологии получения рекомбинантного обелина [2] открыло возможность для развития методов его использования в качестве метки в аналитических системах *in vitro*. Было показано, что рекомбинантный белок стабилен при химических и генетических модификациях, а также при хранении в растворе и в лиофильно высушенном виде [3–7]. Полученные производные обелина – конъюгаты с другими белками и гибридные с обелином рекомбинантные белки – были успешно использованы в иммуноанализе для определения гормонов щитовидной железы, онкомаркеров, инфекционных агентов.

Настоящая работа посвящена исследованиям по использованию конъюгата обелина с авидином или

Сокращения: ВСПР – 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат; ВГС – вирус гепатита С; ДМЭГ – диметакриловый эфир этиленгликоля.

* Автор для связи (тел.: (3912) 49-44-30; факс: (3912) 43-34-00; эл. почта: lfrank@yandex.ru).

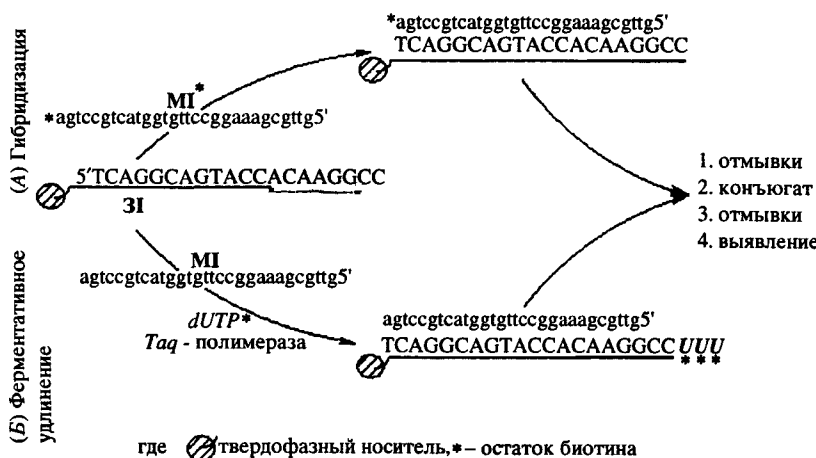


Рис. 1. Схема проведения гибридационного анализа. (А) Выявление биотинилированной ДНК-матрицы MI* с иммобилизованным зондом ZI; (Б) выявление немеченой ДНК-матрицы MI путем ферментативного удлинения иммобилизованного зонда ZI в составе гибридационного комплекса в присутствии биотинсодержащего нуклеотидтрифосфата dUTP-Bio и Taq-ДНК-полимеразы.

стрептавидином в качестве метки для твердофазного гибридационного анализа в модельных системах и на примере ПЦР-фрагментов вируса гепатита С (ВГС). В качестве твердого носителя использовали мелкодисперсный полимер, а также микропланшеты разного производства. Результаты биоломинесцентного анализа сравнивали с результатами колориметрического анализа, полученными при использовании в качестве репортера щелочной фосфатазы с различными субстратами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление ДНК-матрицы осуществляли методом молекулярной гибридации с помощью 20-звенного олигонуклеотида в качестве зонда, иммобилизованного на твердом носителе ZI (рис. 1). В качестве ДНК-матрицы использовали 30-звенный олигонуклеотид MI или MI*, несущий на 3'-конце остаток биотина (*), а также денатурированный двухцепочечный ПЦР-фрагмент, соответствующий участку 5'-нетранслируемой области вируса гепатита С. Последовательность всех ДНК-матриц содержала участок, полностью комплементарный зонду ZI. Введение биотина в состав правильного гибридационного комплекса осуществляли либо в результате гибридации (комплекс ZI/MI*, рис. 1А), либо в результате ферментативного удлинения иммобилизованного зонда ZI в составе комплекса ZI/MI с помощью Taq-ДНК-полимеразы в присутствии биотинилированного дезоксиридинтрифосфата dUTP* (рис. 1Б). В последнем случае метка оказывается ковалентно связанной с носителем, что позволяет, без потери специфичного сигнала выявления, применять более жесткие процедуры отмывки для снижения фонового сигнала.

После отмывок иммобилизованный биотинилированный продукт инкубировали с конъюгатами

щелочная фосфатаза–стрептавидин или обелинавидин (или стрептавидин). В случае использования в качестве репортера щелочной фосфатазы выявление конечного комплекса производили колориметрически (в результате инкубирования носителя с соответствующими субстратами происходит образование окрашенного продукта). В случае обелинового репортера конечный комплекс выявляли по количеству света, которое выделялось при добавлении раствора CaCl₂. Биоломинесцентный сигнал, генерируемый обелиновой меткой, имеет характер вспышки, длящейся 2–5 с, и его интенсивность при насыщающих концентрациях ионов кальция прямо пропорциональна содержанию обелина, поскольку он непосредственно участвует в реакции. Высокая чувствительность биоломинесцентного выявления возможна благодаря высокому квантовому выходу реакции обелина (около 40%).

Колориметрическое выявление предусматривает накопление окрашенного продукта во времени при инкубировании фермент-субстратной смеси. К сожалению, при продолжительном инкубировании накапливаются окрашенные продукты и в контрольной смеси (не содержащей мишени), очевидно за счет реакции самопроизвольного окисления субстрата, что уменьшает соотношение полезный сигнал/фон. Для сравнения этих способов выявления далее приведены значения оптической плотности в нескольких временных точках – в момент развития реакции, когда различия в окраске образцов с различными концентрациями матрицы максимальные, и в момент выхода количества окрашенного продукта реакции на плато.

В качестве твердофазного носителя были исследованы мелкодисперсный отечественный полимер на основе диметакрилового эфира этиленгликоля (ДМЭГ-7) и ряд коммерческих планшетов разных

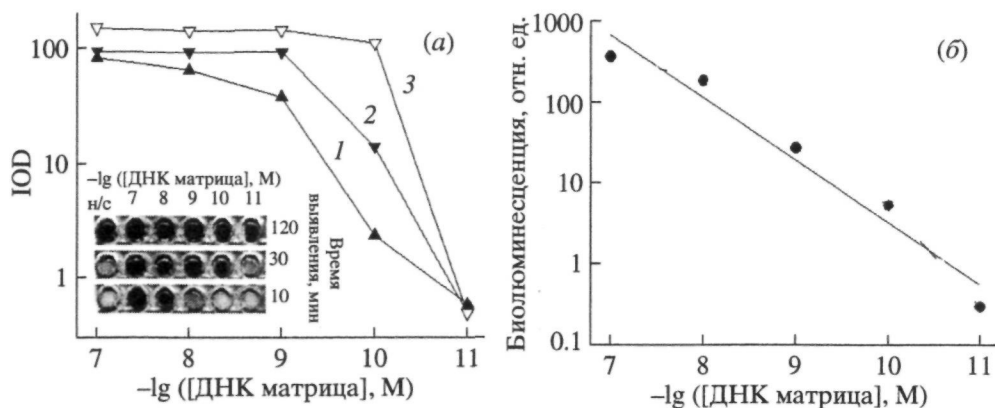


Рис. 2. Зависимость сигнала от концентрации выявляемой ДНК-матрицы при проведении анализа на поверхности полимерных частиц ДМЭГ. (а) Колориметрическое выявление: зависимость окраски полимера от концентрации ДНК-матрицы через 10 (1), 30 (2), 120 (3) мин после добавления ВСР + NBT (IOD – интенсивность оптической плотности в шкале серых тонов), на врезке – сканированное изображение частиц в лунках через те же промежутки времени, где н/с – неспецифический сигнал; (б) – биолюминесцентное выявление с использованием конъюгата обелин–авидин.

производителей с различными активированными поверхностями лунок.

На рис. 2 приведены результаты выявления ДНК-матрицы **МІ** на поверхности ДМЭГ с иммобилизованным олигонуклеотидным зондом **ЗІ**. Биотиновая метка была введена в последовательность зонда **ЗІ** с помощью *Taq*-ДНК-полимеразы (рис. 1, вариант Б) в течение 30 мин при 62°C [8]. Данная температура проведения реакции обеспечивает условия эффективного комплексообразования ($\alpha \geq 0.5$), поскольку температура плавления комплекса в условиях проведения реакций составляет 65.9°C [9] и близка к температурному оптимуму *Taq*-ДНК-полимеразы.

В случае колориметрического анализа после 10-минутного инкубирования с хромогенными субстратами для щелочной фосфатазы ВСР + NBT окрашивание полимера наблюдается только в случае концентрации анализируемой ДНК-матрицы **МІ** 10^{-7} и 10^{-8} М. Через 2 ч достоверный сигнал регистрируется в лунке с концентрацией **МІ** 10^{-10} М (рис. 2а). Окрашивание полимера в последней лунке (концентрация матрицы **МІ** 10^{-11} М) практически совпадает с неспецифическим фоновым окрашиванием полимера (н/с), которое накапливается за это же время.

При использовании обелиновой метки (рис. 2б), зависимость биолюминесцентного сигнала от концентрации матрицы линейна ($R^2 = 0.91$) во всем исследуемом диапазоне концентраций. Сигнал развивается практически мгновенно при внесении насыщающей концентрации ионов кальция и длится 1–2 с. Поскольку сканирование каждой лунки производили в течение 5 с, временные затраты на проведение анализа минимальны. При этом биолюминесцентная метка позволяет достоверно определять наличие матрицы **МІ** в концентрации 10^{-11} М. Полученную линейную зависимость сигнала от concentra-

ции **МІ** можно использовать как калибровочную кривую для определения содержания данной ДНК-матрицы в исследуемом растворе.

Для проведения твердофазного анализа весьма удобным является микропланшетный формат. В наших экспериментах были использованы три вида планшетов, содержащих на поверхности лунок различные реакционноспособные группы. Во всех случаях иммобилизацию олигонуклеотидного зонда **ЗІ** проводили ковалентной пришивкой в соответствии с протоколами фирм-производителей (см. “Эксперимент. часть”). На рис. 3 приведены результаты выявления матрицы гибридизацией на планшетах NucleoLink и CovaLink.

В целом результаты, полученные на планшетах и на полимерных частицах, коррелируют между собой. Для колориметрического анализа существенным фактором является время накопления окраски: его увеличение до 2–4 ч расширяет диапазон концентраций выявляемой матрицы как минимум на порядок. При одинаковой процедуре иммобилизации и анализа на планшетах NucleoLink не получился четкой зависимости концентрации матрицы/сигнал, особенно при длительной (120 мин) инкубации. Для планшетов CovaLink такая зависимость близка к линейной, и если при 10-минутной инкубации она перекрывает 2 порядка, то при 120-минутной – уже почти 4 порядка.

Биолюминесцентный сигнал для этих типов планшетов равномерно уменьшается в диапазоне концентрации матрицы 10^{-8} – 10^{-12} М. Природа обелиновой метки позволяет получить ответ от каждой лунки за несколько секунд и на измерение 96-луночного планшета требуется всего 10–15 мин.

На рис. 4а приведены результаты четырех независимых измерений при биолюминесцентном методе обнаружения модельных матриц **МІ*** и **МІ** на поверхности планшетов DNA-Bind. Видно, что сигналы

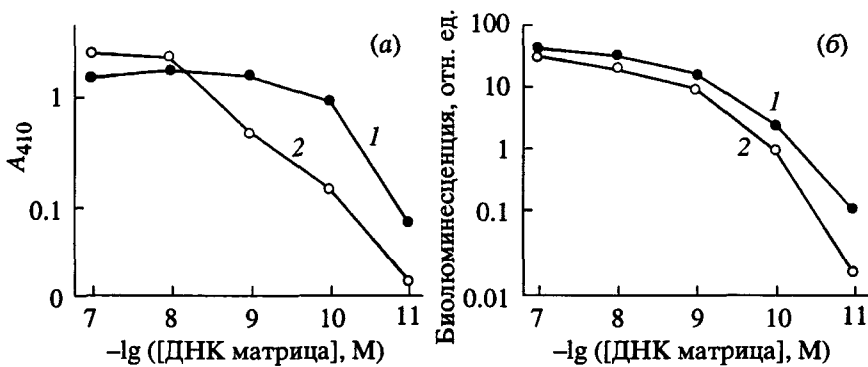


Рис. 3. Выявление матрицы гибридизацией на планшетах NucleoLink (1) и CovaLink (2) (а) колориметрическое (3-часовое инкубирование, субстрат NPP); (б) билюминесцентное с использованием конъюгата обелин-авидин.

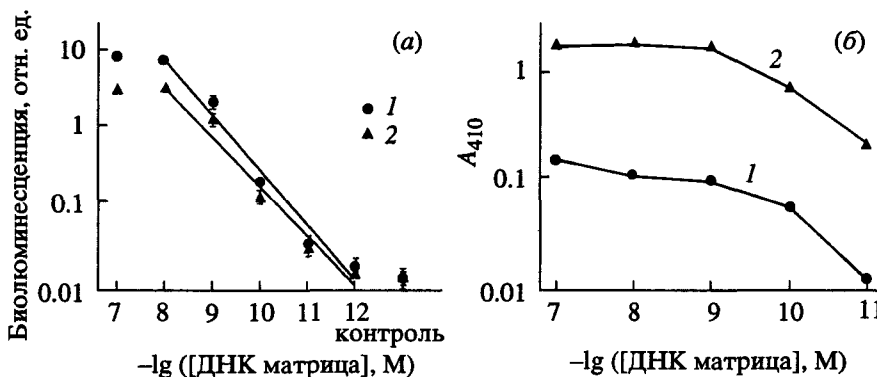


Рис. 4. Результаты выявления ДНК-матриц MI^* (1) и MI (2) на планшетах DNA-Bind: (а) билюминесцентное с использованием конъюгата обелин-стрептавидин, (б) колориметрическое (1 – через 15 мин, 2 – через 4 ч после внесения субстрата NPP).

имеют хорошую воспроизводимость (разброс в пределах 5–10%) и их величина линейно зависит от концентрации матрицы в диапазоне концентраций от 10^{-8} до 10^{-12} М (R^2 0.97). Предел обнаружения матрицы в обоих экспериментах соответствует 10^{-11} М. Этот предел мы определяли как концентрацию матрицы, при которой сигнал (0.03 и 0.026 для MI^* и MI соответственно) достоверно отличается от контрольного, плюс удвоенное значение его дисперсии (в нашем случае это 0.016 и 0.014).

Полученные данные показывают, что обелиновая метка независимо от формата, в котором проводится анализ, позволяет достоверно определять 10^{-15} моль матрицы. Колориметрическое выявление в аналогичном варианте после 4-часового инкубирования достоверно обнаруживает в образце 10^{-10} моль соответствующей ДНК-матрицы.

Для всех исследованных нами видов планшет, независимо от способов введения биотиновой метки и выявления сигнала, наблюдается слабая разница между сигналами в области высоких концентраций внесенной матрицы (10^{-6} – 10^{-8} М). Очевидно, это связано с насыщением поверхности лунок при данных концентрациях олигонуклеотидов в образцах.

По способу иммобилизации зонда на поверхность лунок наиболее удобными среди исследованных нами являются планшеты DNA-Bind, поскольку их поверхность активирована сукцинимидными группами, которые реагируют с 5'-аминосодержащим олигонуклеотидом при инкубировании раствора в течение 15–30 мин, тогда как процесс иммобилизации на поверхность планшет NucleoLink™ Strip и CovaLink™NH гораздо более сложный и занимает более суток (см. “Эксперимент. часть”).

Особый интерес для нас представляли эксперименты по выявлению ПЦР-продуктов ВГС, выделенных из разных клинических образцов. Двухцепочечный ПЦР-фрагмент длиной 230 п. о. был предварительно денатурирован. Биотиновую метку в последовательность зонда ЗI вводили с помощью *Taq*-ДНК-полимеразы (рис. 1, вариант Б). На рис. 5 приведены результаты определения одного из фрагментов на поверхности планшет DNA-Bind. На приведенных рисунках видно, что, как и в модельных экспериментах, для колориметрического анализа существенным параметром является возможность накопления сигнала, и, если в первые 30–60 мин интенсивность окраски в пробах практически не отличается от контрольной, то через 4 ч,

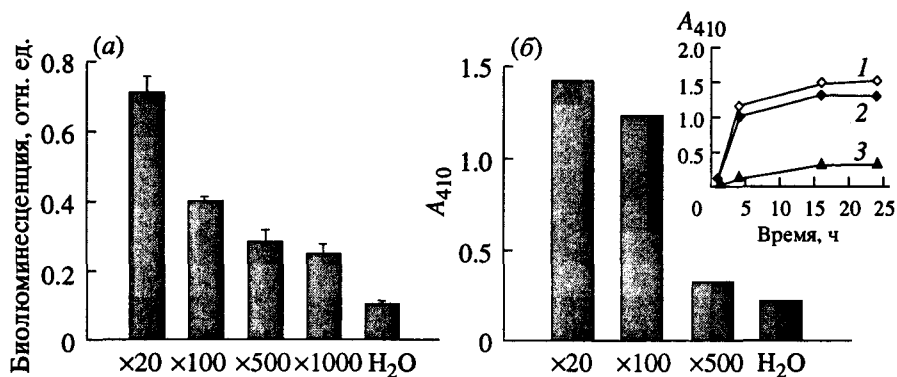


Рис. 5. Выявление ПЦР-фрагмента ВГС на планшетах DNA-Bind. По оси абсцисс указаны разбавления образца ПЦР-фрагмента, “H₂O” – контрольный образец (вода вместо ДНК). (а) биолуминесцентная метка (конъюгат обелин-стрептавидин; приведены средние значения и разбросы биолуминесцентных сигналов от трех независимых определений); (б) колориметрическая метка (приведены значения оптической плотности растворов через 4 ч после внесения субстрата NPP; на врезке – кинетика накопления колориметрического сигнала при внесении матрицы с разбавлением в 20 (1), 100 (2) и 500 (3) раз).

после выхода колориметрической реакции на плато, возможно выявить матрицу в образце с 500-кратным разбавлением. Для обелиновой метки ДНК-матрица выявляется непосредственно в момент внесения раствора CaCl₂ в лунки и, как показано на рис 5а, сигнал от образца с 1000-кратным разведением целевой ДНК достоверно (более чем в 2 раза) отличается от контрольной пробы.

Таким образом, в ходе проведенных экспериментов нами показано, что биолуминесцентная метка, представляющая собой химические конъюгаты Ca²⁺-активируемого фотопротейна обелина с авидином (рис. 2б и 3б) или стрептавидином (рис. 4а и 5а), может успешно использоваться для выявления ДНК-фрагментов методом молекулярной гибридизации. При этом биолуминесцентная метка обладает рядом преимуществ по сравнению с колориметрической – это высокая (более чем на порядок) чувствительность, простота запуска реакции (только добавить раствор CaCl₂) и регистрации сигнала (современные высокочувствительные фотометры в состоянии регистрировать супернизкие световые потоки), возможность получения результата практически сразу после проведения анализа. Величина биолуминесцентного сигнала фотопротейна линейно зависит от его количества, что позволяет строить соответствующие калибровочные кривые и не только определять наличие целевой ДНК-последовательности, но и оценивать ее количество. Высокая чувствительность данного метода предоставляет возможность проведения ПЦР-анализа с меньшим количеством циклов, что, в свою очередь, позволяет повысить его специфичность.

Следует отметить, что перспективность применения Ca²⁺-активируемого фотопротейна как метки в гибридном анализе была показана ранее на примере другого фотопротейна – акворина из медузы *Aequorea victoria* [см. обзор 10]. В нашей работе показано, что биолуминесцентные метки на

основе обелина также эффективны для такого рода анализа. Литературные данные и полученные нами результаты по применению акворина и обелина позволяют надеяться, что биолуминесцентный гибридный анализ с применением фотопротейновых меток позволит обеспечить решение ряда задач высокочувствительной и экспрессной аналитики – от диагностики социально важных заболеваний до анализа генетически модифицированных продуктов и единичных нуклеотидных замен [11].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали высокоочищенный рекомбинантный обелин, полученный по методу, описанному в работе [2]. Конъюгаты обелина с авидином из белка куриных яиц (выделен нами по методу [12]) или с рекомбинантным стрептавидином (Sigma) получали по методу, разработанному нами для получения конъюгатов обелина с иммуноглобулинами [3]. Для введения SH-группы в молекулу обелина использовали 10-кратный молярный избыток 2-иминозола (Sigma), авидин или стрептавидин модифицировали 50-кратным молярным избытком сукцинимидного эфира 4-(*N*-малеидометил)циклогексановой кислоты – SMCC (Sigma), избытки реагентов отделяли гель-фильтрацией. Тионированный обелин и SMCC-активированные авидин или стрептавидин смешивали в молярном соотношении 10 : 1 и инкубировали при 4°C в течение ночи. Полученные конъюгаты выделяли гель-фильтрацией на колонке Superose12 (хроматографическая система AKTApurifier, GEHealthcare). Потери биолуминесцентной активности обелина после всех манипуляций не превышали 30%.

Taq-ДНК-полимераза, dNTP, 5-[*N*-(*N*-биотинил-ε-аминокапроил)-3-аминоаллил]-2'-дезоксирин-5'-трифосфат (Био-11-dUTP) получены от “Биосан”

(Новосибирск); конъюгат стрептавидин-щелочная фосфатаза – от “Sigma”; BCIP (5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат) и NBT (нитротетразолиевый синий) – от Molecular Probes; *n*-нитрофенилфосфат (NPP) – от ISN.

В качестве твердофазных носителей использовали мелкодисперсный полимер на основе метакрилата этиленгликоля (ДМЭГ-7) (Институт особо чистых препаратов, Санкт-Петербург) и микропланшеты NucleoLink™ Strip, CovaLink™NH (Nalge Nunc International, США) и DNA-Bind™ (Costar, США).

Олигонуклеотиды 3I, MI синтезировали фосфитамидным методом на ДНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Новосибирск), используя мономерные синтоны (Glen Research, США). Концентрацию олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически на приборе Shimadzu UV-2100, используя суммарные величины молярных коэффициентов поглощения (ϵ 260) моно- и динуклеотидов при длине волны 260 нм.

Аmplификацию фрагментов ДНК (230 п. о.) проводили, используя в качестве матрицы разбавленный в 500 раз препарат кДНК ВГС, любезно предоставленный Филиппенко М.Л. (ИХБФМ СО РАН), и праймеры ССАТGGCGTTAGTATGAGTGTCTG и АСТCGCAAGCACCCSTATCAGG. ПЦР проводили в 10–30 мкл буфера, содержащего 67 мМ Трис-НСl (рН 8.8 при 25°C), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 1.5 мМ MgCl₂, 0.085 мг/мл BSA, 0.01% Tween-20, 5 мМ дитиотреит, 2 ед. акт. *Taq*-ДНК-полимеразы, 10⁻⁶ М праймеры, 0.2 мМ каждый dNTP. Условия ПЦР: 95°C – 15 с, 60°C – 15 с, 70°C – 30 с, 25 циклов на амплификаторе Mastercycler 5330 plus (Eppendorf, Германия). Продукты амплификации длиной 230 п.о. разделяли с помощью электрофореза в 10% ПААГ и окрашивали красителем “Stains all” (Acros Organics, США). Нуклеотидную последовательность ПЦР-фрагментов определяли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 (Genetic Analyzer, США) в центре коллективного пользования ИХБФМ СО РАН и ИЦиГ СО РАН.

Иммобилизацию 5'-фосфатсодержащего олигонуклеотидного зонда на мелкодисперсном полимере ДМЭГ-7 проводили по методу, описанному в работе [13].

Иммобилизацию на поверхности планшет NucleoLink™ Strip и CovaLink™NH проводили в соответствии с протоколом производителя: в лунки вносили по 100 мкл раствора 5'-фосфатсодержащего олигонуклеотида 3I (10⁻⁷ М) в смеси 10 мМ *N*-метилимидазола и 10 мМ 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида. Реакционную смесь выдерживали 24 ч при 50°C, промывали последовательно: 10 мин (3 × 100 мкл) раствором 0.4 М NaOH, 0.25% Tween-20, 5 мин (3 × 200 мкл) H₂O (б/д). Блокирование сайтов неспецифического связывания на поверхности планшет проводили 1% BSA в 20 мМ Трис-НСl рН 7.5, 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, 0.5% Tween-20, в течение 60 мин при 50°C.

Иммобилизацию на поверхности планшет DNA-Bind™ проводили также по протоколу производителя: в лунки добавляли по 100 мкл раствора 5'-аминосодержащего олигонуклеотида 3I (10⁻⁷ М) в 500 мМ Na₂HPO₄ (рН 8.5), 1 мМ EDTA, выдерживали 15 мин при комн. температуре, промывали TBS-буфером (10 мМ Трис-НСl рН 8.0, 150 мМ NaCl) (3 × 200 мкл). Блокирование сайтов неспецифического связывания на поверхности планшет проводили 1% BSA в TBS, содержащем 0.05% Tween-20, в течение 15–30 мин при комн. температуре.

Гибридизацию осуществляли в изотермическом режиме при 62°C в течение 30 мин. Биотиную метку вводили двумя способами: гибридизацией с биотинилированной матрицей (30-звенный олигонуклеотид, 10⁻⁶–10⁻¹² М) и с помощью *Taq*-ДНК-полимеразы. В качестве твердого носителя выступали 0.5 мг полимера или планшеты с иммобилизованным на поверхности зондом. Гибридизацию проводили в 10 мкл (для полимера) или 100 мкл (для планшет) 5xSSC-буфера. Ферментативное введение биотинилированной метки в молекулу зонда проводили в 10 мкл (для полимера) или 100 мкл (для планшет) буфера, содержащего 10 мМ Трис-НСl (рН 8.8), 50 мМ KCl, 0.1% Tween-20, 1.8 мМ MgCl₂, 1.5 ед. акт. *Taq*-ДНК-полимеразы, 10⁻⁵ М dUTP-Bio, 5 × 10⁻⁵ М dATP. Матрицами служили 30-звенный олигонуклеотид (10⁻⁶–10⁻¹² М) или разбавленный в 20, 100, 500 и 1000 раз ПЦР-фрагмент. В контрольном эксперименте реакцию проводили в отсутствие НК-матрицы.

После реакции полимер последовательно отмывали (3 × 500 мкл) раствором А следующего состава: 20 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, 20% этанола, 0.5% Tween-20, затем 1 раз – 500 мкл раствора Б: 20 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, 1% BSA, 0.5% Tween-20, в течение 10 мин при комн. температуре. Планшеты промывали TBS-буфером, содержащим 0.1% Tween-20 (TTBS) (3 × 200 мкл), повторно обрабатывали 1% BSA в TBS, в течение 30 мин при комн. температуре и промывали.

При колориметрическом выявлении биотинсодержащего продукта к полимеру добавляли 20 мкл раствора, содержащего конъюгат щелочная фосфатаза–стрептавидин в концентрации 1 мкг/мл, выдерживали 30 мин при комн. температуре и отмывали (4 × 500 мкл) буферным раствором А и 1 раз (500 мкл) раствором Б без BSA. К полимеру добавляли раствор хромогенных субстратов (60 мкл), содержащий 20 мМ Трис-НСl (рН 9.5), 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, 0.4 мг/мл BCIP, 0.3 мг/мл NBT, и выдерживали при комн. температуре, периодически регистрируя окраску полимерных частиц.

При работе на планшетах в лунки вносили по 100 мкл того же раствора конъюгата, выдерживали 30 мин при комн. температуре и промывали TTBS (3 × 100 мкл). Затем вносили по 100 мкл раствора, содержащего 10 мг/мл NPP в 10 М диэтанол-

амине, 1 мМ MgCl₂ и инкубировали при комнатной температуре, периодически регистрируя оптическую плотность растворов.

Окрашивание полимера регистрировали сканированием планшетов на приборе PowerLook 1000 (UMAX, Германия). Изображения анализировали с помощью программы Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, США), определяя интегральную оптическую плотность (IOD) в шкале серых тонов. Поглощение растворов NPP в лунках планшета измеряли при 410 нм с помощью планшетного фотометра ЭФЭС-9305 (Сапфир, Москва).

При билюминесцентном выявлении биотинсодержащего продукта использовали растворы конъюгатов обелин-авидин или обелин-стрептавидин (0.5–1 мкг/мл, 20 мМ Трис-НСl, рН 7.0, 5 мМ EDTA) так же, как это описано для конъюгата щелочная фосфатаза–стрептавидин. Для промывок использовали ТТBS-буфер, содержащий 5 мМ EDTA.

Билюминесцентный сигнал измеряли с помощью планшетного люминометра Luminoscan Ascent (ThermoElectron Co., Финляндия) сразу после внесения 100 мкл 100 мМ раствора CaCl₂ в 50 мМ Трис-НСl, рН 8.8. Время интегрирования сигнала от одной лунки 5 с, 1 отн. ед. соответствует 10⁷ квантам.

Результаты, приведенные на рисунках, представляют средние значения двух измерений, с учетом контрольной пробы, если не указано иначе.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке программы “Молекулярная и клеточная биология” (проект 10.6), интеграционных грантов СО РАН (73 и 55), CRDF и РФФИ № 06-04-49263-а, РФФИ 06-04-08076-офи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu Z.J., Vysotski E.S., Chen C.J., Rose J.P., Lee J., Wang B.C. // *Protein Sci.* 2000. V. 9. P. 2085–2090.
2. Illarionov B.A., Frank L.A., Illarionova V.A., Bondar V.S., Vysotski E.S., Blinks J.R. // *Methods in Enzymology.* 2000. V. 305. P. 223–249.
3. Frank L.A., Petunin A.I., Vysotski E.S. // *Russ. J. Bioorgan. Chemistry.* 2004. V. 30. P. 327–331 (Франк Л.А., Петунин А.И., Высоцкий Е.С. // *Биоорган. химия.* 2004. Т. 30. С. 364–368).
4. Frank L.A., Petunin A.I., Vysotski E.S. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 325. P. 240–246.
5. Frank L.A., Illarionova V.A., Vysotski E.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 219. P. 475–479.
6. Frank L.A., Vysotski E.S. // *Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons/Eds J.W. Hastings, L.J. Kricka, P.E. Stanley.* Chichester: John Wiley & Sons, 1997. P. 435–438.
7. Frank L., Markova S., Rimmel N., Vysotski E., Gitelson I. // *Luminescence.* 2007. V. 22. P. 215–220.
8. Виноградова О.А., Пышная И.А., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Пышный Д.В. // *Молекуляр. биология.* 2007. Т. 41. С. 163–172.
9. Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. // *J. B. S. D.* 2007. V. 24. Issue Number 6. P. 679–680.
10. Высоцкий Е.С., Маркова С.В., Франк Л.А. // *Молекуляр. биология.* 2006. Т. 40. С. 410–417.
11. Zerefos P.G., Ioannou P.C., Traeger-Synodinos J., Dimissianos G., Kanavakis E., Christopoulos T.K. // *Hum. Mutat.* 2006. V. 27. P. 279–285.
12. Гололобов Г.В., Шустер А.М., Залите И.К., Габиров А.Г., Рабинков А.Г. // *Биоорган. химия.* 1991. Т. 17. С. 353–358.
13. Дегтярев С.Х., Белавин П.А., Шишкина И.Г., Зарытова В.Ф., Гагрюченкова Л.П., Морозов С.Н. // *Биоорган. химия.* 1989. Т. 15. С. 358–362.

A Highly Sensitive and Rapid Method for the Detection of DNA Fragments Using the Photoprotein Obelin as a Reporter

V. V. Borisova^a, I. A. Pyshnaya^b, D. V. Pyshnyi^b, and L. A. Frank^{a, #}

[#] Phone: (3912) 49-44-30; fax: (3912) 43-34-00; e-mail: lfrank@yandex.ru

^a Institute of Biophysics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, str. 50, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia

^b Institute of Chemical Biology and Experimental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

The recombinant Ca²⁺-activated photoprotein obelin was used as a reporter protein in a solid-phase bioluminescent hybridization DNA assay. Oligonucleotide probes were immobilized on the surface of a fine-grained polymer or microbiological plates of different types. A 30-mer oligonucleotide or its derivative with a biotin residue on the 3'-terminus, as well as a denatured double-stranded PCR fragment of the hepatitis C virus with the sequence of the 30-mer oligonucleotide, was used as a DNA template. The probe in the hybridization complex was labeled by elongation of the chain using *Taq* DNA polymerase in the presence of biotinylated deoxyuridine triphosphate. The results of the bioluminescent assay were compared with the results of colorimetric analysis obtained with alkaline phosphatase as a reporter protein. It was shown that the use of the bioluminescent obelin label substantially accelerates the DNA detection procedure, ensures a high sensitivity of the assay (no less than 10⁻¹⁵ mol of DNA template), and enables quantitative determination of the amount of DNA template in the tested sample.

Key words: obelin, bioluminescent hybridization assay, PCR