



УДК 577.213.3 : 577.113.5 : 577.323.23

ГИБРИДИЗАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ. II. ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ СИГНАЛА ПРИ АНАЛИЗЕ ДНК МЕТОДОМ МИНИ-СЕКВЕНИРОВАНИЯ

© 2010 г. Е. В. Дмитриенко*, **, Е. А. Хомякова**, И. А. Пышная*, А. Г. Брагин***, ****, В. Е. Ведерников***, ****, Д. В. Пышный**

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8;

**Новосибирский государственный университет;

***Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;

****ЗАО "Вектор-Бест", Кольцово промзона, 36, Новосибирская обл.

Поступила в редакцию 12.02.2010 г. Принята к печати 16.02.2010 г.

Исследовано явление амплификации гибридационного сигнала в реакциях ограниченного удлинения олигонуклеотидных зондов в составе комплементарных комплексов с анализируемой ДНК (мини-секвенирование) в изотермических условиях. Показано повышение интенсивности регистрируемого сигнала в ходе реализации данной схемы за счет многократного ферментативного мечения олигонуклеотидных зондов в составе субстратных дуплексов с одной молекулой ДНК-матрицы как в гомо-, так и в гетерофазном формате анализа, при использовании различных способов детекции (радиоизотопное, флуоресцентное мечение или ферментопосредованное выявление). Предложена схема процесса и определены основные кинетические параметры каждой стадии. Установлена взаимосвязь между интенсивностью сигнала и физико-химическими характеристиками комплексов зонд/ДНК и продукт/ДНК. Максимальная интенсивность сигнала достигается при минимальной разнице в термодинамической стабильности комплексов зонд/ДНК и продукт/ДНК, при этом температура реакции должна быть близка к температуре плавления дуплексов; отклонения как в большую, так и в меньшую сторону ведут к уменьшению количества сигнального продукта. Показано, что интенсивность сигнала гибридационного анализа в системе с многократным мечением олигонуклеотидных зондов на матрице анализируемой ДНК существенно снижается при наличии в исследуемой последовательности однонуклеотидных несоответствий. Анализ ДНК в режиме мини-секвенирования позволяет проводить не только выявление, но и количественную характеристику анализируемой ДНК.

Ключевые слова: гибридационный анализ ДНК, изотермическая амплификация сигнала, мини-секвенирование, олигонуклеотидные зонды.

ВВЕДЕНИЕ

Эффективность анализа нуклеиновых кислот с помощью подходов, основанных на их гибридационной с олигонуклеотидными зондами, в значительной степени зависит от способа генерации и интенсивности регистрируемого сигнала. В общем случае интенсивность гибридационного сигнала определяется либо количеством анализата (НК-матрицы), либо способом генерации сигнала и типом сигналь-

ного продукта, формируемого в результате сиквенс-специфического взаимодействия.

Появление полимеразной цепной реакции (ПЦР) и других методов амплификации НК обеспечили возможность увеличения копийности любой интересующей нуклеотидной последовательности(ей) до уровня, достоверно регистрируемого различными методами. Разработано множество приемов усиления гибридационного сигнала за счет использования меченых зондов или продуктов их сиквенс-специфического превращения. Наиболее часто для увеличения интенсивности сигнала (амплификации) используют системы, позволяющие: реализовать резонансные процессы (например, поверхностное резонансное комбинационное рамановское рассеяние (SERRS, Surface Enhanced Resonance Raman Scattering) [1]), накапливать сигнал во времени

Сокращения: BCP – 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат динатриевая соль; Bio – остаток биотина; Fam – остаток флуоресцеина с аминлинкером; NBT – нитротетразолиевый синий; RFU – относительная интенсивность флуоресценции; Tm – остаток тетраметилродамина, ИОП – интегральная оптическая плотность.

Автор для связи (тел./факс: (383) 335-62-23; эл. почта: pyshnyi@niboch.nsc.ru).

(например, радиоизотопы [2], флуорофоры [3], квантовые точки [4], ферменты [5]), увеличивать число вторичной метки (дендримеры [6], конкатемеры [7], разветвляющаяся амплификация ДНК (Branched DNA Amplification) [8, 9], металлы [10], наночастицы [11, 12]).

Альтернативным вариантом усиления сигнала специфического сигнала гибридационного анализа НК является обеспечиваемое (“катализируемое”) НК-аналитом накопление меченого продукта превращения олигонуклеотидного зонда. В такой схеме на одну копию анализируемой последовательности НК возможно образование значительно большего количества молекул продукта.

Аналитические приемы такого типа хорошо известны. Они реализованы при использовании как ферментативных систем с участием, например, РНК-азы H [13], ДНК-лигаз [14, 15], ДНК-полимераз [16, 17], так и ДНК-зимов [13]. В ряде случаев НК-зависимое многократное мечение (превращение) олигонуклеотидных зондов требует проведения циклических изменений температурного режима реакции или формирования специфической структуры – молекулярного маяка в виде продукта реакции [18, 19]. Однако наиболее привлекательным для разработчиков отдельных типов ДНК-диагностиком является создание систем амплификации сигнала, действующих в изотермическом режиме. Именно изотермические схемы анализа ДНК часто используют в гетерофазных системах при работе с биочипами, обеспечивающими параллельное выявление набора специфических последовательностей ДНК (например, [20]).

Например, при анализе однонуклеотидных полиморфизмов в ДНК проводят мечение зондов путем так называемой процедуры мини-секвенирования [21–23]. Данный прием позволяет осуществлять ограниченное удлинение олигонуклеотидного зонда в составе комплекса с анализируемой ДНК с помощью ДНК-полимеразы: строго на одно звено при работе с терминирующими нуклеозидтрифосфатами [21] или на несколько звеньев, число которых ограничено типом используемых трифосфатов и последовательностью матричной цепи [24]. Показано, что в ходе реакции мини-секвенирования ДНК возможно усиление гибридационного сигнала. Включение в иммобилизованный зонд меченого нуклеотида под действием ДНК-полимеразы в изотермических условиях приводит к аналитзависимому возрастанию во времени флуоресценции специфической зоны биочипа [21]. Очевидно, что амплификация гибридационного сигнала в таком случае возможна при согласовании, по крайней мере, двух условий: 1) стабильность комплексов, формируемых НК-матрицей с исходным зондом и с соответствующим продуктом превращения, различается незначительно и 2) температурный режим обеспечивает эффективный обмен олигонуклеотидной цепи в со-

ставе специфического дуплекса зонд (продукт)/ДНК-матрица.

В данной работе исследованы физико-химические закономерности амплификации гибридационного сигнала в реакциях ограниченного удлинения олигонуклеотидного зонда на матрице анализируемой ДНК в изотермических условиях; и показана возможность реализации предложенной схемы выявления спДНК в различных форматах гибридационного анализа ДНК (гомофазном и гетерофазном) и при использовании различных типов генерации специфического сигнала (радиоизотопное, флуоресцентное мечение или ферментопосредованное выявление).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование закономерностей изотемпературного накопления сигнального продукта при проведении гибридационного анализа ДНК методом мини-секвенирования (рис. 1) проводили с использованием трех типов модельных систем (табл. 1). Две модельные системы (I и II) предназначены для анализа ферментативного мечения зондов в гомофазном варианте ограниченной достройки олигонуклеотида на матрице ДНК под действием *Taq*-ДНК-полимеразы. Система III разработана для исследования гетерофазных процессов, протекающих с использованием олигонуклеотидного зонда, иммобилизованного на твердотельном носителе (микрочастицах).

Схема изотермического накопления сигнального продукта (рис. 1) предполагает, что при выборе оптимальных условий проведения эксперимента установившееся в системе динамическое равновесие может привести к “катализируемому” ДНК-матрицей ферментативному превращению олигонуклеотидного зонда. В таком случае одна молекула анализируемой ДНК может обеспечить мечение значительно большего количества молекул зонда, что приводит к усилению гибридационного сигнала. В соответствии со схемой процесса очевидно, что интенсивность регистрируемого сигнала напрямую зависит от эффективности удлинения зонда, которая, в свою очередь, определяется временем и температурой проведения ферментативной реакции, стабильностью комплексов ДНК-матрицы (зонд/ДНК и продукт/ДНК), концентрацией нуклеотидных компонентов в системе и эффективностью ферментативного мечения зонда.

Описание модельных систем

Исследование изотермического накопления сигнального продукта реакции удлинения цепи олигонуклеотидного зонда с помощью *Taq*-ДНК-полимеразы осуществляли в гомофазном варианте (модельные системы I и II), используя радиоизотопную и флуоресцентную метки, соответственно. В гетеро-

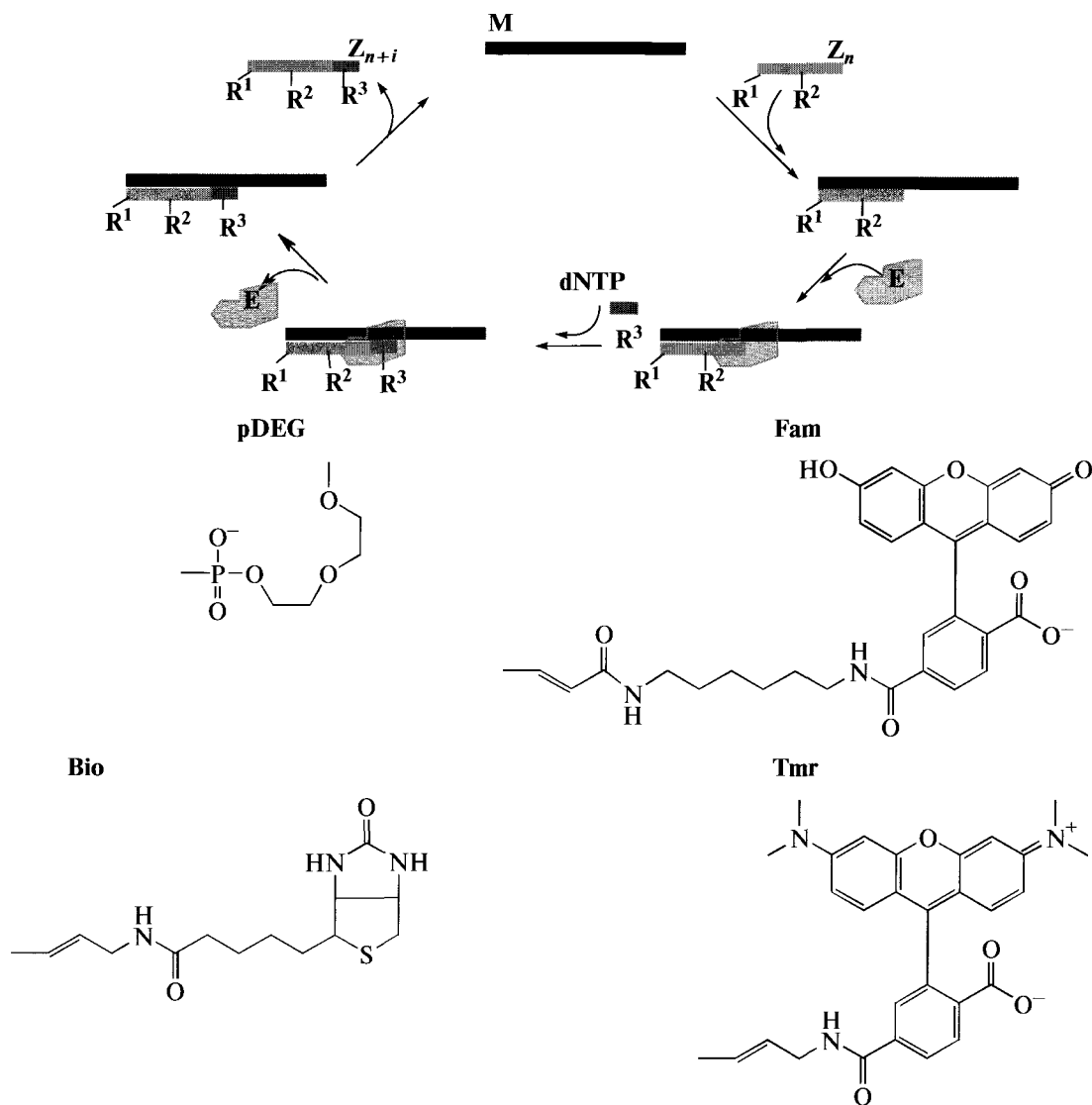


Рис. 1. Схема изотермического ферментативного удлинения зонда, где **M** – ДНК-матрица, **Z_n** – олигонуклеотидный зонд, **Z_{n+1}** – продукт ферментативной реакции, **E** – *Taq*-ДНК-полимераза, **dNTP** – меченый нуклеозидтрифосфат, **R¹** – 5'-ОН-группа или твердотельный носитель, **R²** – остаток dUMP, меченный флуоресцеином (**Fam**) или нуклеотидная вставка на основе фосфоэфира диэтиленгликоля (**pDEG**), **R³** – остатки [³²P]фосфата, биотина (**Bio**) или тетраметилродамина (**Tmr**) в составе встраиваемого полимеразой нуклеотидного звена. Остатки красителей введены по С5-положению 2'-деоксирибозидина.

фазном варианте анализ изотемпературной схемы генерации сигнала проводили с помощью модельной системы III, предполагающей колориметрическое выявление вводимой в иммобилизованный зонд биотиновой метки (табл. 1).

Гомофазные модельные системы. Использованы два варианта системы первого типа I.1 и I.2, различающиеся нуклеотидной последовательностью ДНК-матрицы в части, определяющей первоначально встраиваемые нуклеотиды при ферментативном удлинении зонда. При использовании нуклеозидтрифосфата только одного типа (dTTP) в системе I.1 (матрица MI.1) возможно

только минимальное удлинение зонда (+1 нт); в системе I.2 (матрица MI.2) – возможно встраивание трех нуклеотидных остатков. Во всех системах I в качестве зонда использовали нативный 20-звенный олигонуклеотид ZI или его модифицированные аналоги ZI[^], ZI^{^^}, содержащие, соответственно, одну или две нуклеотидные вставки на основе фосфоэфира диэтиленгликоля. Введение нуклеотидных вставок в состав зондов обеспечивало контролируемое снижение стабильности формируемых ими комплексов с ДНК при полном сохранении сиквенс-специфичности [25]. Длина зонда в результате ферментативного удлинения в системах первого типа может возрастать

Таблица 1. Модельные системы[#]

Структура модели	Используемый dNTP	Длина продукта, нт	Код модели
MI.1 3'AGTCCGTCATGGTGTCCGGACTGCGTTG5'	dTTP*	21	I.1
ZI 5'TCAGGCAGTACCACAAGGCC3'	dTTP*, dNTP N=A, G, C	29	I.1N4
MI.1 3'AGTCCGTCATG-GTGTCCGGACTGCGTTG5'	dTTP*	21	I.1^
ZI^ 5'TCAGGCAGTAC^CACAAGGCC3'			
MI.1 3'AGTCCGTCAT-TGGT-GTTCGGACTGCGTTG5'	dTTP*	21	I.1^^
ZI^^ 5'TCAGGCAGT^ACCA^CAAGGCC3'			
MI.2 3'AGTCCGTCATGGTGTCCGGAAAGCGTTG5'	dTTP*	23	I.2
ZI 5'TCAGGCAGTACCACAAGGCC3'			
MI 3'GTCGA--GGTCCGTAGTAGTTC5'	dU ^{Tmr} TP	13	II
ZII 5'CAGCT ^{Fam} CCAGGCA3'	dU ^{Tmr} TP, dGTP	14	II.N2
	dU ^{Tmr} TP, dNTP N=G, A	16	II.N3
	dU ^{Tmr} TP, dNTP N=G, A, C	20	II.N4
MI-1 3'GTCGA--GGTCCGcAGTAGTTC5'	dU ^{Tmr} TP	13	II-1
ZII 5'CAGCT ^{Fam} CCAGGCA3'			
MI-6 3'GTCGA--GaTCCGCAGTAGTTC5'	dU ^{Tmr} TP	13	II-6
ZII 5'CAGCT ^{Fam} CCAGGCA3'			
F 3'...AGTCCGTCATGGTGTCCGGTAAA...5'	dU ^{Bio} TP, dATP	24	III
ZIII 5'TCAGGCAGTACCACAAGGCC3'	dU ^{Bio} TP, dNTP N=G, A, C	214	III.N4

[#] Звездочкой обозначен dNTP с ³²P в α-положении трифосфатного остатка, ^ – нуклеотидная вставка pDEG в составе олигонуклеотида.

ти согласно структуре матрицы на 9 нт при наличии полного набора нуклеозидтрифосфатов в реакционной смеси (система I.1N4). За ходом ферментативных превращений олигонуклеотидов в системах первого типа следили с помощью радиоактивной метки, вводимой в зонд с помощью меченого трифосфата [α -³²P]dTTP.

В системе II в качестве матрицы использовали 20-звенный олигонуклеотид (MII), а в качестве зонда – додекануклеотид (ZII), несущий внутри олигонуклеотидной цепи остаток флуоресцеина с аминоклином (Fam). Наличие флуорофора обеспечивает возможность детекции ферментативных реакций в режиме реального времени. Встраивание тетраметилродаминсодержащего (Tmr) нуклеотида (dU^{Tmr}TP) в структуру такого зонда позволяет регистрировать тушение флуоресценции Fam-остатка [26, 27]. Исследование в системе II проводили как в режиме ограниченной достройки зонда (II, II.N2, II.N3), так и при использовании полного набора нуклеозидтрифосфатов (II.N4). Таким образом, задавали различную степень удлинения зонда и, тем самым, изменяли стабильность комплекса продукта реакции с ДНК-матрицей.

Кроме того, с использованием модельной системы второго типа проводили исследование специфичности превращения зонда в реакции мини-секвенирования ДНК, используя набор матриц, одна из которых полностью комплементарна олигонуклеотидному зонду, а две других содержали замены в положении, соответствующем 3'-концу зонда (MI-1), или же в положении, удаленном на 6 звеньев от его 3'-конца (MI-6).

Гетерофазные модельные системы. В системе III в качестве зонда (ZIII) использовали 5'-фосфорилированное производное олигонуклеотида ZI, иммобилизованное на мелкодисперсный полимер на основе полиметакрилата ("ДМЭГ-7", 30–60 мкм), а в качестве ДНК-матрицы (F) – продукт ПЦР (230 п.о.), соответствующий участку 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) РНК вируса гепатита С (субтип 2a) (–259...–30 нт от начала трансляции [28]). Гибридационный анализ ДНК-ампликона в этом случае проводили как в варианте ограниченной ферментативной достройки зонда (система III), так и при использовании полного набора нуклеозидтрифосфатов (система III.N4). Мечение продукта реакции осуществляли, используя ана-

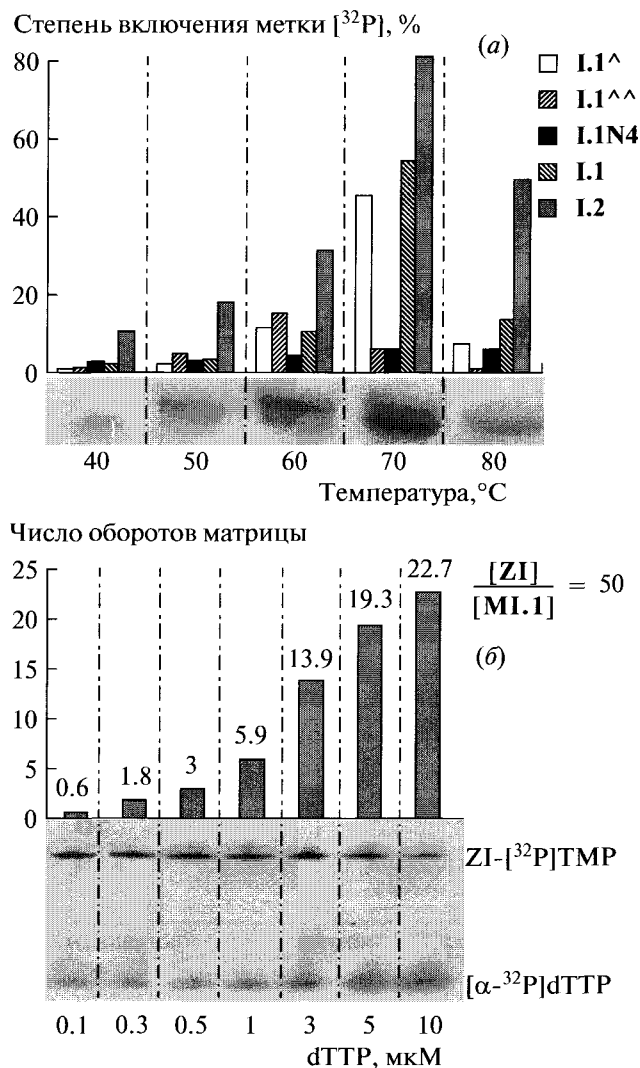


Рис. 2. Зависимость эффективности включения метки в олигонуклеотидный зонд от температуры реакции по данным электрофоретического анализа (20% денатурирующий ПААГ) реакционной смеси после удлинения зондов в системах: **I.1** (штрих, наклон влево), **I.1[^]** (белые столбцы), **I.1^{^^}** (штрих, наклон вправо), **I.2** (серые столбцы), **I.1N4** (черные столбцы) (а). Число актов мечения зондов в комплексе с одной матричной последовательностью в реакции мини-секвенирования в оптимальных температурных условиях, при варьировании концентрации и удельной радиоактивности dTTP (б).

лог dTTP, несущий в C5-положении пиримидинового основания остаток биотина (dU^{Bio}TP). Структура матричной цепи ампликона обеспечивала в системе **III** достройку зонда максимум на четыре нуклеотидных звена (один аденилат и до трех dU^{Bio}-монофосфатных остатков), а в системе **III.N4**, то есть при превращении зонда в полноразмерный продукт, — включение до 37 остатков биотина в удлиненную цепь. Визуализацию продуктов гетерофазного удлинения зонда проводили колориметрически,

используя конъюгат стрептавидин-щелочная фосфатаза и хромогенные субстраты BCIP и NBT.

Изотермическая амплификация сигнала гибридационного анализа в гомофазном варианте

Влияние температуры реакции на эффективность ферментативного мечения зонда. Влияние температуры реакции и стабильности формируемых дуплексов зонд/ДНК-матрица на эффективность ферментативного превращения олигонуклеотидного зонда исследовали с использованием систем **I** и **II**.

Было показано, что температура реакции существенно влияет на эффективность удлинения зонда, взятого в 50-кратном избытке по отношению к ДНК-матрице (рис. 2). Для всех зондов существует температура, при которой наблюдается максимальная степень их превращения. Для немодифицированных зондов изотермическое мечение наиболее эффективно протекает при 70°C (рис. 2а). Данная температура близка к оптимуму действия *Taq*-ДНК-полимеразы [29] и совпадает с температурой плавления комплекса **MI.1/ZI** ($T_{пл} = 70^\circ\text{C}$) в условиях, аналогичных используемым в ферментативной реакции.

Дестабилизация комплекса зонд/ДНК, наблюдающаяся при использовании мостиковых олигонуклеотидов **ZI[^]** и **ZI^{^^}** ($T_{пл}$ 63.5 и 53.5°C, соответственно), приводит к снижению общей эффективности реакции накопления меченого продукта. Смещение температурного оптимума реакции с 70 до 60°C наблюдается лишь при использовании зонда **ZI^{^^}**, обладающего наименьшей стабильностью дуплекса. Однако при этом даже в оптимальных условиях степень мечения резко снижается. Наиболее существенное снижение эффективности ферментативного мечения олигонуклеотидов в изотемпературном режиме происходит в случае, когда в результате действия полимеразы образуется полноразмерный продукт реакции (система **I.1N4**), формирующий прочный комплекс с ДНК-матрицей. Важно отметить, что в данной системе выраженный температурный оптимум реакции отсутствует, и наблюдаемая степень мечения зонда монотонно возрастает с повышением температуры до 70–80°C.

Наибольшая эффективность мечения зонда среди рассмотренных систем в диапазоне температур 40–80°C наблюдается в системе **I.2** (максимум при 70°C, рис. 2а), предполагающей возможность встраивания трех меченых нуклеотидов. Это логично, поскольку, с одной стороны, встраивание трех меченых остатков существенно увеличивает интенсивность регистрируемого сигнала и, с другой стороны, согласно расчетам, три дополнительные А/Т-пары лишь незначительно повышают температуру плавления (+1.5°C) ДНК-дуплекса длиной 20 п.о. и более [30, 31], позволяя системе существовать в динамическом равновесии и осуществлять последова-

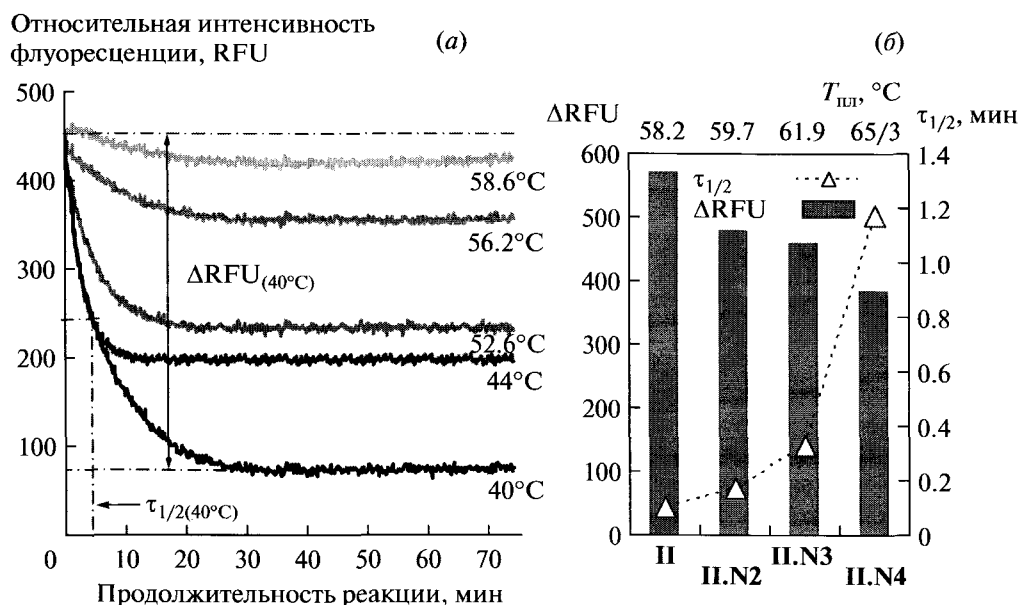


Рис. 3. Зависимость от температуры интенсивности и скорости тушения флуоресценции при реакции удлинения зонда в системе II, где $\tau_{1/2}$ — время полуреакции, ΔRFU — интенсивность флуоресценции (например, $\tau_{1/2(40^\circ\text{C})}$ и $\Delta\text{RFU}_{(40^\circ\text{C})}$ для реакции при 40°C) (а). Сопоставление изменения относительной флуоресценции со временем полуреакции и расчетной температурой плавления комплексов для разных систем (б).

тельное мечение многих молекул зонда в комплексе с одной и той же молекулой матрицы, т.е. реализовать принцип изотермической амплификации сигнала.

С использованием системы I.2 оценили число актов мечения зонда при проведении реакции мини-секвенирования в оптимальных температурных условиях. Анализ данных экспериментальной серии с варьированием концентрации и удельной радиоактивности dTTP выявил, что ДНК-матрица выступает своего рода “катализатором” ферментзависимого мечения зонда. На одну молекулу ДНК-матрицы, при начальном 50-кратном избытке зонда, зафиксировано образование до 22.7 молекул меченого продукта за 1 мин. Такая скорость ограниченного удлинения зонда достигалась при использовании максимальной концентрации нуклеозидтрифосфата (10 мкМ) (рис. 2б).

Таким образом, показано, что представленная на рис. 1 схема множественного мечения зондов на матрице анализируемой ДНК в процессе мини-секвенирования справедлива. Для оценки ее универсальности был исследован вариант, основанный на анализе изменения флуориметрического сигнала в режиме реального времени при проведении гибридационного анализа. За ходом реакции следили по снижению уровня флуоресценции Fam-содержащего зонда ZII в процессе встраивания в его структуру нуклеотида, несущего остаток производного тетраметилпролами (Tmг) в качестве тушителя. Результаты флуориметрических измерений представлены на рис. 3а. В некоторых экспериментах данной се-

рии реакционные смеси анализировали с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях, подтверждая глубину превращения зонда. Выделенный продукт дополнительно характеризовали спектрофотометрически и флуориметрически (данные не приводятся).

Включение нуклеотида с тушителем вызывает снижение уровня флуоресценции в системе II (рис. 3а). Профиль кинетических кривых хорошо описывается экспоненциальной зависимостью. Интервал изменения флуоресценции (ΔRFU) меняется в зависимости от температуры проведения реакции мини-секвенирования. Наибольшее тушение флуоресценции наблюдается при 40°C . Повышение температуры реакции приводит к снижению величины ΔRFU , что, по-видимому, отражает совокупность двух факторов. С ростом температуры происходит падение интенсивности флуоресценции остатков органических красителей в составе олигонуклеотидных производных [32, 33] и снижение степени мечения зонда. Следует учитывать, что зондом в модельной системе II выступает не 20-звенный олигомер, как в системе I, а модифицированный додекануклеотид с температурой плавления комплекса около 56°C и объемным остатком флуоресцеина, мешающим действию полимеразы. Объемный остаток флуоресцеина в составе зонда ZII расположен на границе сайта связывания *Taq*-ДНК-полимеразы [34–36]. Температура реакции, кроме того, сказывается на наблюдаемой скорости процесса превращения зонда. Время $\tau_{1/2}$, за которое уровень флуоресценции достигает половины от предельного значе-

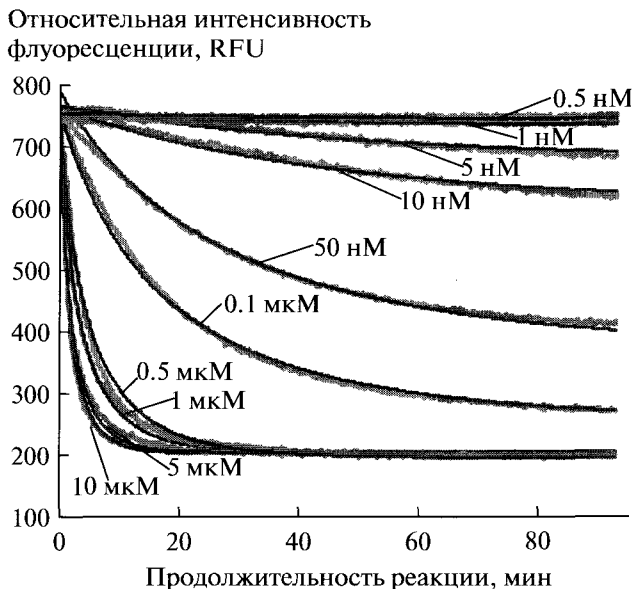


Рис. 4. Кинетические кривые реакции ферментативного мечения зонда **ZII** на матрице **MII**, введенной в реакцию мини-секвенирования в разных концентрациях (указаны над кривыми, мкМ) при температуре 45°C.

ния, отражает скорость реакции в системе. Оно показывает, что скорость реакции мини-секвенирования в системе **II** максимальна при 44°C, лишь незначительно снижается по достижению 53°C и резко падает при дальнейшем повышении температуры.

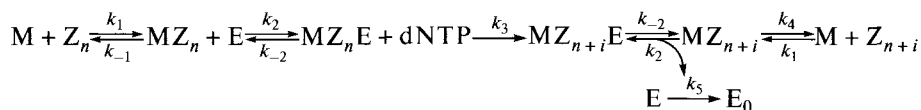
Влияние стабильности комплекса продукт/ДНК-матрица на интенсивность регистрируемого сигнала также было исследовано с помощью флуориметрического подхода. Реакции удлинения зонда проводили в присутствии различных наборов дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, встраивание которых в соответствии со структурой матричной цепи обеспечивало накопление продуктов различной длины и, следовательно, различной стабильности формируемых ими дуплексов. Исследования проводили при температуре 45°C. Сопоставляли параметры кинетических кривых, полученных при использовании модельных систем **II** (+1 нт), **II.N2** (+2 нт), **II.N3** (+4 нт), **II.N4** (+8 нт). Из рис. 3б видно, что удлинение продукта реакции, т.е. повыше-

ние его температуры плавления, приводит к снижению наблюдаемой глубины превращения зонда, характеризуемой величиной ΔRFU , и, одновременно с этим, падением скорости реакции, т.е. возрастанием величины $\tau_{1/2}$.

Таким образом, данные, полученные с использованием радиоизотопной и флуоресцентной меток, согласуются между собой, подтверждая справедливость представленной на рис. 1 схемы изотермического мечения зонда на матрице ДНК. Для каждой системы, определяемой структурой субстратного комплекса зонд/ДНК, существует температура, при которой происходит наиболее эффективное мечение зонда в результате реализации обмена матричной цепи между различными дуплексными формами. Низкая температура реакции или повышенная стабильность дуплексов анализируемой ДНК с исходным зондом и/или продуктом его удлинения снижают эффективность изотермической амплификации сигнала. Температура реакции выше температуры плавления субстратного комплекса также негативно сказывается на эффективности мечения зонда в реакции мини-секвенирования.

Анализ кинетической схемы изотермической амплификации сигнала. Детальный анализ процесса изотермической амплификации сигнала, т.е. накопления сигнального продукта при ограниченном удлинении зонда на матрице ДНК с помощью ДНК-полимеразы, может быть проведен только при подробном исследовании его кинетики. В этом случае становится возможным прогнозировать поведение системы и оптимизировать ее компоненты и экспериментальные условия. Для исследования кинетических закономерностей была детально изучена зависимость тушения флуоресценции в системе **II** от концентрации ДНК-матрицы **MII** при температуре 45°C. Следует отметить, что данная система предполагает удлинение флуоресцентно меченного зонда на один нуклеотид, несущий остаток тушителя. Концентрацию матрицы варьировали в диапазоне 10^{-5} – 5×10^{-10} М при сохранении начальных концентраций зонда **ZII** (50 мкМ) и меченого производного dU^{Tmr}TP (100 мкМ). Таким образом, соотношение зонд/ДНК-матрица в начальный момент времени составляло от 0.1 до 100000. Наблюдаемые профили зависимости флуоресценции от времени

Таблица 2. Кинетическая схема мечения зонда в ходе мини-секвенирования ДНК и полученные величины констант скоростей реакций



$k_1/10^6, M^{-1}c^{-1}$	k_{-1}, c^{-1}	$k_2/10^6, M^{-1}c^{-1}$	k_{-2}, c^{-1}	$k_3/10^6, M^{-1}c^{-1}$	k_4, c^{-1}	$k_5/10^{-4}, c^{-1}$
0.219 ± 0.001	7.72 ± 0.01	52.63 ± 0.06	7.49 ± 0.02	0.719 ± 0.001	3.45 ± 0.02	3.04 ± 0.01

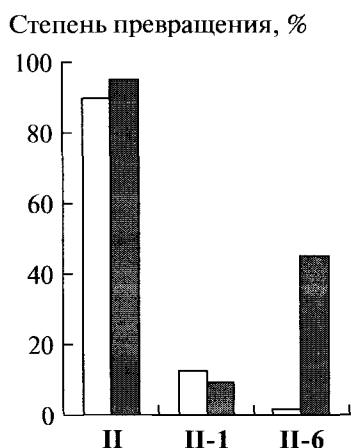


Рис. 5. Эффективность флуоресцентного (белые столбцы) и радиоизотопного (серые столбцы) мечения зонда **II** в составе дуплекса с комплементарной ДНК-матрицей (**МII**) или ДНК-матрицами, содержащими нуклеотидные несоответствия в первом (**МII-1**) и шестом (**МII-6**) положениях относительно 3'-конца зонда.

реакции при различных концентрациях **МII** и кривые, полученные в результате обработки кинетической схемы процесса ферментативного мини-секвенирования ДНК, представлены на рис. 4. Обработку кинетических кривых осуществляли с помощью пакета программ Dynafit 3.28.

На основании полученных данных предложена детальная схема процесса, достаточно хорошо описывающая наблюдаемые кинетические зависимости. Величины кинетических констант отдельных реакций (обратимых и необратимых) представлены в табл. 2. Достоверность полученных величин, определенных в результате анализа полного набора кинетических зависимостей, проверяли в серии дополнительных расчетов с использованием усеченных выборок экспериментальных данных. Следует отметить, что рассмотренная детализованная кинетическая схема учитывает возможность дезактивации полимеразы в ходе реакции мини-секвенирования. Без учета данной стадии, дополняющей схему относительно первоначального варианта (рис. 1), зарегистрированные флуориметрические кривые описывались со значительно большей ошибкой (данные не приведены).

Анализ полученных характеристик (табл. 2) показал, что эффективность наиболее успешной системы мечения зонда **II**-типа обусловлена тремя основными факторами: незначительными различиями величин равновесных констант ассоциации комплексов (в 2.2 раза) ДНК-матрицы с зондом

($K_{Z_n} = \frac{k_1}{k_{-1}} = 2.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) и продуктом его удлине-

ния ($K_{Z_{n+1}} = \frac{k_1}{k_4} = 6.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), высокой эффектив-

ностью ферментативного удлинения зонда и низкой скоростью инактивации фермента ($k_5 = 3 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$). Определенная величина константы скорости ассоциации для комплексов зонд/ДНК и продукт/ДНК достаточно хорошо совпадает с соответствующим значением для дуплекса близкого нуклеотидного состава, полученным в работе [31] методом "остановленной струи".

Таким образом, доказана правомерность изложенных представлений о реализации схемы множественного мечения зондов на матрице анализируемой ДНК в реакции ограниченного удлинения зонда в гомофазном варианте. Представленная схема справедлива как для радиоизотопного, так и флуоресцентного мечения зонда.

Анализ сиквенс-специфичности превращения зонда в реакции мини-секвенирования ДНК

Одним из наиболее сложных тестов в ДНК-диагностике, использующих гибридационный анализ является выявление точечных мутаций. Мы проанализировали чувствительность метода, основанного на многократном матричном мечении зондов, к наличию в анализируемой ДНК однонуклеотидных несоответствий. Для этого исследовали системы **II**-типа, содержащие матрицы с заменой в положении, соответствующем 3'-концевому нуклеотиду зонда (**МII-1**) или же в положении, удаленном на 6 нуклеотидов от его 3'-конца (**МII-6**).

Из данных, представленных на рис. 5, видно, что наличие однонуклеотидных несоответствий в субстратном дуплексе существенно снижает эффективность превращения зонда в реакции мини-секвенирования. Сильное замедление скорости тушения флуоресценции, сопряженное с удлинением зонда в модельной системе **II**-типа, наблюдается даже при наличии внутреннего мисматча, расположенного вблизи **Fam**-меченного нуклеотида и в положении, отстоящем на 5 п.о. от сайта ферментативного превращения зонда. Наличие некомплементарной пары оснований непосредственно на 3'-конце субстратного дуплекса также значительно ингибирует данный процесс, хотя и в меньшей степени.

Селективность мечения модифицированных олигонуклеотидов была также подтверждена с использованием радиоизотопного мечения зондов в аналогичной модельной системе, за исключением того, что в качестве зонда выступал нативный олигонуклеотид **II** (не содержащий **Fam**-остатка), а детекцию осуществляли с использованием радиоактивного [α - ^{32}P]нуклеозидтрифосфата, встраиваемого в зонд в процессе ферментативной реакции [34]. В этом случае эффективность дискриминации концевого мисматча оказывается выше, чем внутреннего, и в обоих случаях является достаточной

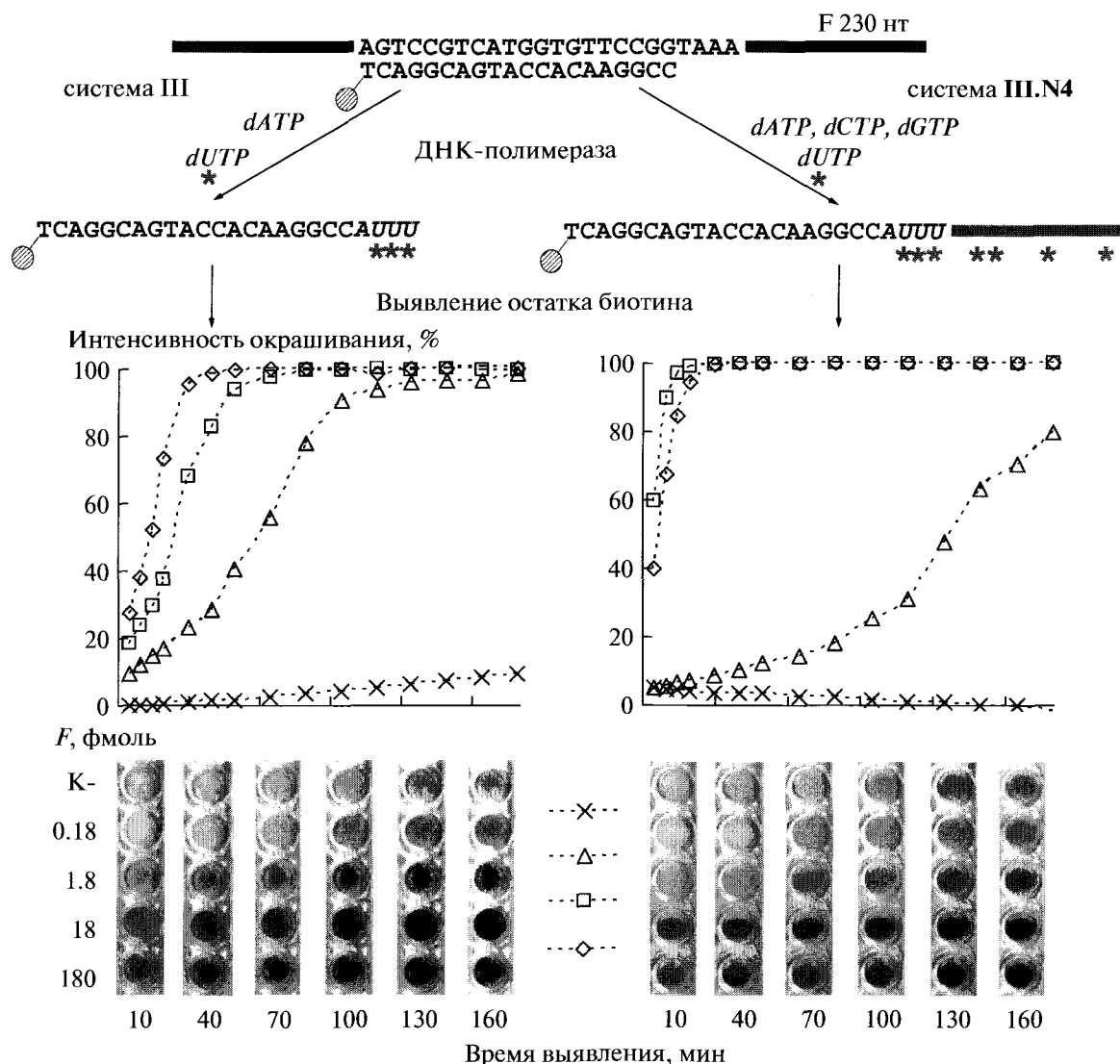


Рис. 6. Схемы гетерофазного ферментативного мечения зонда (вверху). Кривые развития колориметрического сигнала и сканированные изображения планшетов с полимером после реакции ферментативного мечения иммобилизованных зондов ZIII в присутствии различного количества фрагмента F (60 мин) в вариантах мини-секвенирования (система III) (слева) и полноразмерной достройки зондов (система III.N4) (справа).

для достоверного выявления совершенной ДНК-матрицы.

Таким образом, системы анализа, основанные на мини-секвенировании ДНК, обеспечивают не только значительное усиление сигнала, но и высокий уровень сиквенса-специфичности гибридационного анализа.

Изотермическая амплификация сигнала в гетерофазном варианте

Предложенный метод усиления сигнала гибридизации при выявлении специфической последовательности ДНК может быть использован в гетеро-

фазных диагностических системах. Данный подход предполагает, что олигонуклеотидный зонд, иммобилизованный на твердотельный носитель, при взаимодействии с анализируемой ДНК подвергается мечению. Возможность амплификации сигнала позволяет значительно повысить чувствительность систем гетерофазного анализа ДНК. Преимуществом таких систем анализа ДНК является ковалентная фиксация сигнального продукта на носителе, существенно упрощающая процедуру его достоверного выявления.

Была проанализирована возможность реализации представленной на рис. 1 схемы мечения зонда в варианте гетерофазного анализа. Вместо гидроге-

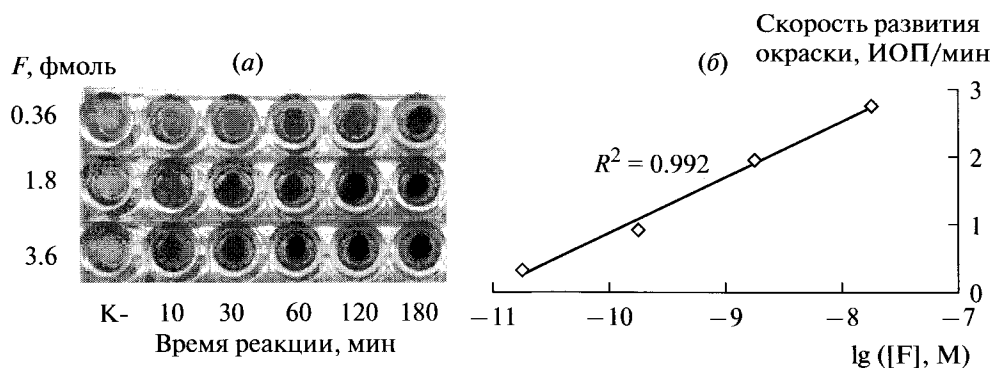


Рис. 7. Сканированное изображение планшетов с полимерами, несущими иммобилизованный олигонуклеотид **ZIII**, после реакции ферментативного мечения зондов в присутствии ДНК-фрагмента (**F**) в течение 10–180 мин и выявления остатков биотина в течение 30 мин (*a*). Зависимость начальной скорости развития окраски полимера после проведения реакции мечения зонда в **системе III** (60 мин) от концентрации анализируемой ДНК (*b*). К – реакция проводилась без ДНК-анализа (отрицательный контроль), R^2 – коэффициент корреляции полученных экспериментальных данных и линейной функции, ИОП – интегральная оптическая плотность.

левой подложки, с использованием которой впервые продемонстрирована возможность амплификации сигнала в реакции мини-секвенирования [21], были использованы полимерные микрочастицы. Анализ ДНК проводили, используя в качестве матрицы ДНК-ампликон (**F**), соответствующий специфическому участку гена вируса гепатита С (ВГС). Гетерофазный анализ осуществляли в двух вариантах (рис. 6). В первом случае мечение зонда в комплексе с предварительно денатурированным фрагментом ДНК проводили в режиме ограниченной достройки: не более четырех нуклеотидов, три из которых несут остаток биотина. Во втором – полный набор трифосфатов, включая меченый, позволяет встроить в состав зонда до конца матричной цепи 37 звеньев, меченных биотином (**III.N4**).

Было установлено, что оптимальной температурой анализа в данном формате является 62°C (данные не приводятся). После проведения реакции удлинения зонда полимер тщательно отмывали, а фиксированный на микрочастицах биотин выявляли колориметрически с помощью конъюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза и хромогенных субстратов. Из данных, представленных на рис. 6, видно, что в обоих вариантах происходит усиление сигнала при увеличении времени реакции колориметрического выявления и концентрации анализируемой ДНК. Скорость развития колориметрического сигнала зависит от концентрации фрагмента **F** в системе. При относительно высоком содержании анализируемой ДНК эффективность окрашивания полимера в **системе III** оказывается несколько ниже, чем в случае **III.N4**, но при низких концентрациях ПЦР-фрагмента ситуация кардинально меняется. При низком содержании выявляемой ДНК возможность мечения нескольких зондов в комплексах с одной молекулой ДНК-матрицы на поверхности, происходящее в варианте мини-секвенирования (**система III**), обеспечивает включение большего

числа биотиновых остатков на поверхности частицы по сравнению со случаем значительного удлинения отдельных зондов с включением заданного числа репортерных групп (**система III.N4**). Следовательно, система выявления спДНК, основанная на реакции мини-секвенирования, более прогнозируемо реагирует на содержание анализируемой ДНК в реакционной смеси и обеспечивает повышенную чувствительность при ее выявлении.

Отметим, что данная схема выявления спДНК предполагает двойное усиление сигнала: первичное усиление реализуется в процессе множественного мечения иммобилизованных зондов при мини-секвенировании и позволяет накапливать сигнальный продукт с увеличением времени реакции (рис. 7*a*); вторичное – на этапе ферментзависимого проявления биотиновых остатков с помощью хромогенных субстратов, обеспечивающих специфическое окрашивание полимера (рис. 6). С использованием ^{32}P -меченного ампликона, позволяющего строго определить количество вносимого в систему фрагмента ДНК, было показано, что при увеличении времени реакции мечения зонда накопление сигнального продукта зависит исключительно от эффективности мини-секвенирования при разных концентрациях анализируемой ДНК (рис. 7*a*).

Из данных, представленных на рис. 7*a*, видно, что интенсивность окрашивания микрочастиц после мечения зондов на начальном этапе (до 30–60 мин) строго коррелирует с количеством анализируемого фрагмента в системе. Зависимость начальной скорости развития окраски полимера от логарифма концентрации ампликона носит выраженно линейный характер (в исследованном концентрационном диапазоне) (рис. 7*b*). Наличие такой зависимости позволяет определить порог чувствительности обнаружения ДНК в варианте **III** и в перспективе создавать способы количественного анализа на основе

предложенного подхода. Созданная гетерофазная система анализа ДНК позволяет надежно выявлять анализируемую последовательность в количестве около 0.2 фмоль, что достаточно для анализа предварительно подготовленных ДНК-фрагментов. Данный уровень чувствительности достигается при изотермических условиях, то есть без использования стандартных протоколов амплификации, предполагающих циклическую смену температурных режимов. Такой протокол анализа несколько увеличивает общую продолжительность процесса, однако существенно снижает скорость дезактивации фермента (ДНК-полимеразы), в значительной степени проявляющейся при использовании стандартной схемы амплификации ДНК в гетерофазной системе (данные не приводятся).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе исследовано явление амплификации сигнала гибридизационного анализа НК в реакциях ограниченного удлинения олигонуклеотидных зондов в составе комплементарных комплексов с анализируемой ДНК в изотемпературных условиях, близких к температуре плавления формируемого дуплекса. С целью усиления сигнала реакцию мини-секвенирования необходимо проводить при температуре, которая обеспечивает максимальное количество актов меченых зондов в результате обмена матричной цепи между различными дуплексными формами. Исследование изотемпературной амплификации сигнала проводили как в гомофазном варианте с использованием радиоизотопной и флуоресцентной системы детекции, так и в гетерофазном варианте с колориметрической детекцией сигнала с использованием системы биотин-стрептавидин. В результате исследования предложена схема процесса и определены кинетические параметры каждой стадии. Показано, что процесс ограниченного изотемпературного ферментативного удлинения олигонуклеотидных зондов обеспечивает не только высокий уровень усиления сигнала, но и специфичность гибридизационного анализа ДНК. Данный факт позволяет применять предложенный вариант амплификации сигнала как в гомогенных системах детекции однонуклеотидных несоответствий в ДНК, так и в гетерофазных. Показано использование предложенного подхода для количественной оценки содержания ДНК в анализируемых биологических препаратах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали *Taq*-ДНК-полимеразу, Т4-полинуклеотидкиназу, dNTP, 5-[*N*-(*N*-биотинил-ε-аминокапроил)-3-аминоаллил]-2'-дезоксиринидин-5'-трифосфат (dU^{Bi}TP), тетраметилродамин-5(6)-[5-(3-карбоксаминоаллил)-2'-дезоксиринидин-5'-трифосфат] (Биосан, Новосибирск);

конъюгат стрептавидин-щелочная фосфатаза (Sigma, США); хромогенные субстраты BCIP и NBT (Molecular Probes, США). В качестве твердофазного носителя использовали микрочастицы на основе полиметакрилата, поперечно-сшитого с использованием диметакрилового эфира этиленгликоля "ДМЭГ-7" (3060 мкм) (ИОЧП, Санкт-Петербург).

Олигонуклеотиды и их модифицированные аналоги синтезировали фосфитамидным методом на ДНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Новосибирск) с использованием коммерческих фосфитамидных мономеров (Glen Research, США) и предварительно синтезированного синтона на основе диэтиленгликоля, полученного по описанному ранее методу [37]. **Концентрацию олигонуклеотидов** определяли спектрофотометрически на приборе CARY 300 BioMelt (Varian, Австралия), используя суммарные величины молярных коэффициентов поглощения (ϵ_{260}) моно- и динуклеотидов при длине волны 260 нм [38]. **5'-³²P-Меченные олигонуклеотиды** получали, используя 3.7×10^6 Бк [γ -³²P]ATP ($\sim 1.5 \times 10^{14}$ Бк/моль, ИХБФМ СО РАН) [39].

Термическую денатурацию комплексов олигонуклеотидов проводили согласно [40] при суммарной концентрации стехиометрической смеси взаимодействующих олигонуклеотидов 2.6×10^{-5} М, в буфере, содержащем 10 мМ фосфат натрия pH 7.3, 1 М NaCl, 1 мМ EDTA. Температуру плавления комплексов рассчитывали на основании величин термодинамических параметров, полученных при анализе профилей кривых термической денатурации дуплексных структур.

Иммобилизацию олигонуклеотидных зондов на мелкодисперсный полимер проводили по методу, предложенному ранее [41]. Емкость полимера по иммобилизованному зонду составляла не менее 0.5 мкмоль/г.

ОТ-ПЦР-продукты, соответствующие участку 5'-нетранслируемой области РНК вируса гепатита С (ВГС), получали с использованием тест-системы "Амплисенс HCV" (ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ, Москва) [42] в соответствии с методическими указаниями производителя и были любезно предоставлены Н.П. Пичко (лаборатория генодиагностики ИХБФМ СО РАН).

Реакцию удлинения олигонуклеотидных зондов [24] ZI, ZI[^], ZI^{^^} (5 мкМ) в комплексе с 29-звенной матрицей MI.1 или MI.2 в концентрации 0.1 мкМ (если не оговорено отдельно) проводили в течение 30 мин (если не оговорено отдельно) при постоянной температуре в 10 мкл буфера, содержащего 10 мМ Трис-НСl pH 8.9, 50 мМ KCl, 1.8 мМ MgCl₂, 0.1% Твин-20, 10 мкМ dTTP или dNTP, в том числе и [α -³²P]dTTP и *Taq*-ДНК-полимеразу (2 ед. акт.).

Реакцию удлинения в режиме флуориметрической детекции сигнала осуществляли с помощью амплификатора iQ4 Bio-Rad Laboratories (Bio-Rad,

США). Реакцию проводили в присутствии 20-звенной матрицы (МII) 1 мкМ (если не оговорено отдельно) в течение 90 мин при постоянной температуре 45°C (если не оговорено отдельно) в 20 мкл буфера, содержащего 67 мМ Трис-НСI рН 8.9, 17 мМ (NH₄)₂SO₄, 4.5 мМ MgCl₂, 0.01% Твин-20, набор нуклеозидтрифосфатов (см. табл. 1) по 10 мкМ каждого, флуоресцеинсодержащий зонд (ZII) (0.5–2 мкМ), *Taq*-ДНК-полимеразу (2 ед. акт.). Измерение флуоресценции каждые 10 с (фильтр возбуждения 490/20, фильтр детекции 530/30). Каждая кинетическая кривая является результатом усреднения данных трех независимых экспериментов.

Продукты ферментативных реакций анализировали гель-электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ. В качестве маркеров длины использовали олигонуклеотиды, полученные химическим путем. После автордиографирования геля на рентгеновскую пленку Curix (Agfa, Бельгия) сканировали на UMAX PowerLook 1000 (Германия). Количественную оценку результатов проводили с помощью программы Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, США), определяя выходы продуктов реакции, исходя из относительного распределения интегральной оптической плотности (ИОП) в дорожках.

Кинетические параметры рассчитывались с помощью пакета программ Dynafit 3.28 с проверкой данных на устойчивость путем попеременного исключения экспериментальных кривых.

Гибридационный анализ с ферментативным введением репортерной группировки в структуру иммобилизованного на твердофазный носитель зонда ZIII проводили в течение 30 мин при 62°C (если не оговорено отдельно) в 30 мкл буфера, содержащего 10 мМ Трис-НСI рН 8.85, 50 мМ KCl, 0.1% Твин-20, 1.8 мМ MgCl₂, 0.1 мМ dU^{Bio}TP, 50 мкМ dATP или dNTP, полимер с иммобилизованным 20-звенным зондом (ZIII) (0.5 мг) и *Taq*-ДНК-полимеразу (2 ед. акт.). В качестве матриц использовали разбавленную в 20 раз ПЦР-смесь, содержащую ДНК-ампликон, соответствующий участку 5'-нетранслируемой области РНК вируса гепатита С (F). Подробно условия проведения гибридационного анализа на полимере описаны в работе [24].

Детекцию осуществляли колориметрически, окрашивание полимера регистрировали сканированием планшетов на приборе PowerLook 1000 (UMAX, Германия). Анализ изображений проводили с помощью программы Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, США), определяя интегральную оптическую плотность (ИОП) в шкале серых тонов. Все эксперименты по выявлению ДНК повторяли 2–3 раза.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.А. Ломзову за помощь при анализе термической стабильности олигонуклеотидных комплексов.

Работа выполнена при финансовой поддержке программами Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и “Основа фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов”, грантами РФФИ (№ 10-04-01492-а), СО РАН (№ 76 и 39) и частично государственным контрактом (ГК 02.512.11.2226).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stevenson R., Ingram A. Leung H., McMillan D.C., Graham D.* // *Analyst*. 2009. V. 134. P. 842–844.
2. *Бадашкеева А.Г., Кнорре Д.Г.* // Молекулярн. биол. 1991. Т. 25. С. 309–324.
3. *Котова Е.Ю., Крейдлин Э.Я., Барский В.Е., Мирзабеков А.Д.* // Молекулярн. биол. 2000. Т. 34. С. 237–245.
4. *Peng H., Soeller C., Cannell M.B., Bowmaker G.A., Cooney R.P., Travas-Sejdic J.* // *Biosens. Bioelectron.* 2006. V. 21. P. 1727–1732.
5. *Langer P.R., Waldrop A.A., Ward D.C.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. P. 6633–6637.
6. *Benters R., Niemeyer C.M., Drutschmann D., Blohm D., Wöhrle D.* // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. P. e10.
7. *Robert M.D., Pierce N.A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 15275–15278.
8. *Urdea M.S.* // *Nature Biotechnology*. 1994. V. 12. P. 926–928.
9. *Collins M.L., Irvine B., Tyner D., Fine E., Zayati C., Chang C., Horn T., Ahle D., Detmer J., Shen L., Kolberg J., Bushnell S., Urdea M.S., Ho D.D.* // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 2979–2984.
10. *Wang J., Liu G., Merkoci A.* // *Anal. Chim. Acta*. 2003. V. 482. P. 149–153.
11. *Wang M.J., Sun C.Y., Wang L.Y., Ji X.H., Bai Y.B., Li T.J., Li J.H.J.* // *Pharm. Biomed. Anal.* 2003. V. 33. P. 1117–1123.
12. *He L., Musick M.D., Nicewarner S.R.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. V. 122. P. 9071–9077.
13. *Garafutdinov R.R., Nikonorov Yu.M., Chemeris D.A., Posttrigan B.N., Chubukova O.V., Talipov R.F., Vakhitov V.A., Chemeris A.V.* // *Russ. J. Biorgan. Chemistry*. 2009. V. 35. P. 599–606 (*Гарафутдинов Р.Р., Никонов Ю.М., Чемерис Д.А., Постригань Б.Н., Чубукова О.В., Талипов Р.Ф., Вахитов В.А., Чемерис А.В.* // *Биоорг. химия*. 2009. Т. 35. С. 665–673).
14. *Wu D.Y., Wallace R.B.* // *Genomics*. 1989. V. 4. P. 560–569.
15. *Barany F.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 189–193.
16. *Newton C.R., Graham A., Heptinstall L.E., Powell S.J., Summers C., Kalsheker N., Smith J.C., Markham A.F.* // *Nucleic Acids Res.* 1989. V. 17. P. 2503–2516.
17. *Huang M.M., Arnheim N., Goodman M.F.* // *Nucleic Acids Res.* 1992. V. 20. P. 4567–4573.
18. *Tobe V.O., Taylor S.L., Nickerson D.A.* // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 3728–3732.
19. *Tang Z., Wang K., Tan W., Li J., Liu L., Guo Q., Meng X., Ma C., Huang S.* // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. e148.

20. Schuler T., Nykytenko A., Csaki A., Moller R., Fritzsche W., Popp J. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2009. V. 395. P. 1097–1105.
21. Dubiley S., Kirillov E., Mirzabekov A. // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. e19.
22. Chen X., Zehnbauser B., Gnirke A., Kwok P.Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 10756–10761.
23. Hu Y.W., Balaskas E., Kessler G., Issid C., Scully L.J., Murphy D.G., Rinfret A., Giulivi A., Scalia V., Gill P. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. P. 5013–5015.
24. Виноградова О.А., Пышная И.А., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Пышный Д.В. // *Молекулярн. биол.* 2007. Т. 41. С. 163–172.
25. Ломзов А.А., Пышная И.А., Иванова Е.М., Пышный Д.В. // *Докл. АН.* 2006. Т. 409. С. 266–270.
26. Bassler H.A., Flood S.J.A., Litvak K.J., Marmaro J., Knorr R., Batt C.A. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. P. 3724–3728.
27. Yamane A. // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. e97.
28. Bukh J., Purcell R.H., Miller R.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. P. 4942–4946.
29. Lawyer F.C., Stoffel S., Saiki R.K., Myambo K., Drummond R., Gelfand D.H. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 6427–6437.
30. SantaLucia J., Hicks D. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2004. V. 33. P. 415–440.
31. Pyshnyi D.V., Lomzov A.A., Pyshnaya I.A., Ivanova E.M. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2006. V. 23. P. 567–579.
32. Котова Е., Крейндин Э., Барский В., Мирзабеков А. // *Молекулярн. биол.* 2000. Т. 34. С. 304–309.
33. Liu W., Wu J., Li E., Selamat E. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 6453–6457.
34. Пышная И.А., Виноградова О.А., Кабилов М.Р., Иванова Е.М., Пышный Д.В. // *Биохимия.* 2009. Т. 74. С. 123–125.
35. Eom S.H., Wang J., Steitz T.A. // *Nature.* 1996. V. 382. P. 278–281.
36. Li Y., Korolev S., Waksman G. // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 7514–7525.
37. Durand M., Chevrie K., Chassignol M., Thuong N.T., Maurizot J.C. // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 6353–6359.
38. Richards E.G. // *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Nucleic Acids* / Ed. Fasman G.D. Cleveland: CRC Press, 1975. V. 1. P. 589.
39. Maxam A., Gilbert W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. P. 560–564.
40. Lokhov S.G., Pyshnyi D.V. // *FEBS Lett.* 1997. V. 420. P. 134–138.
41. Дегтярев С.Х., Белавин П.А., Шишкина И.Г., Зарытова В.Ф., Гаврюченкова Л.П., Морозов С.Н. // *Биоорг. химия.* 1989. Т. 15. С. 358–362.
42. Бектимиров Т.А., Волкова Р.А., Эльберт Е.В., Шалунова Н.В., Чуланов В.П., Горбунов М.А., Никитюк Н.М., Шипулин Г.А., Шипулина О.Ю., Бочарова Н.Г., Мусина Е.Е. // *Вопросы вирусологии.* 2002. Т. 5. С. 12–16.

Oligonucleotide Derivatives in the Nucleic Acid Hybridization Analysis. II. Isothermal Signal Amplification in Process of DNA Analysis by Minisequencing

E. V. Dmitrienko^{*,*}, E. A. Khomyakova^{2*}, I. A. Pyshnaya^{*}, A. G. Bragin^{3*,4*},
V. E. Vedernikov^{3*,4*}, D. V. Pyshnyi^{*,#}

[#]Phone/fax: (383) 335-62-23; e-mail: pyshnyi@niboch.nsc.ru

^{*}Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Lavrentiev Ave. 8, Novosibirsk 630090, Russia

^{2*}Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

^{3*}Institute of Cytology and Geneticist, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

^{4*}JSC "Vector-Best", Novosibirsk region, Koltsovo

The isothermal amplification of reporter signal via limited probe extension (minisequencing) upon hybridization of nucleic acids has been studied. The intensity of reporter signal has been shown to increase due to enzymatic labeling of multiple probes upon consecutive hybridization with one DNA template both in homophase and heterophase assays using various kinds of detection signal: radioisotope label, fluorescent label, and enzyme-linked assay. The kinetic scheme of the process has been proposed and kinetic parameters for each step have been determined. The signal intensity has been shown to correlate with physicochemical characteristics of both complexes: probe/DNA and product/DNA. The maximum intensity has been observed at minimal difference between the thermodynamic stability of these complexes, provided the reaction temperature has been adjusted near their melting temperature values; rising or lowering the reaction temperature reduces the amount of reporting product. The signal intensity has been shown to decrease significantly upon hybridization with the DNA template containing single-nucleotide mismatches. Limited probe extension assay is useful not only for detection of DNA template but also for its quantitative characterization.

Key words: nucleic acid hybridization analysis, isothermal amplification of reporter signal, minisequencing, oligonucleotide probes.