

На правах рукописи

ДМИТРИЕНКО ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА

**ПОДХОДЫ К ПОВЫШЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ГЕТЕРОФАЗНОГО АНАЛИЗА БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ**

02.00.10 – биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2012

Работа выполнена в Институте химической
биологии и фундаментальной медицины СО РАН и
Новосибирском государственном университете

Научный руководитель:

к.х.н., доцент Пышный Дмитрий Владимирович

Официальные оппоненты:

Анненков Вадим Владимирович, д.х.н.
Лимнологический институт СО РАН, в.н.с.

Новопашина Дарья Сергеевна, к.х.н.
Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН, н.с.

Ведущая организация:

Институт биофизики СО РАН

Защита состоится « 16 » марта 2012 г. в 12.30 на заседании
диссертационного совета Д 003.045.01 при Институте химической
биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090,
Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Автореферат разослан « 14 » февраля 2012 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Для решения фундаментальных и практических задач современной науки в области молекулярной биологии, биотехнологии и молекулярной диагностики особое внимание уделяется исследованиям, направленным на создание простых в экспериментальном отношении, недорогих, чувствительных и селективных методов анализа, обеспечивающих быстрое выявление биомолекул-маркеров в образце.

Биосенсорные устройства – аналитические системы, сочетающие в себе перечисленные качества. Роль биосенсора – обеспечить платформу, позволяющую перевести факт обнаружения аналита (образования комплекса олигонуклеотидный зонд/мишень, антиген/антитело, лиганд/рецептор и др.) в регистрируемый сигнал. Для достоверной регистрации сигнала биосенсоры должны обладать высокой чувствительностью и специфичностью по отношению к определяемому компоненту. При этом чувствительность сенсора главным образом зависит от способа детекции аналита, а специфичность – от природы взаимодействия иммобилизованных на биосенсоре молекул с аналитом. Повышение эффективности гетерофазного анализа биомолекул возможно практически на каждом этапе создания и работы биосенсора, начиная с иммобилизации молекул на твердотельные носители до генерации сигнала анализа. Следует отметить, что не для всех молекул существуют природные аффинные агенты, обеспечивающие образование комплекса и выявление аналита. В таких случаях в качестве распознающего элемента биосенсора могут выступать искусственные конструкции, способные к специфичному молекулярному распознаванию. К таким конструкциям можно отнести молекулярно импринтированные полимеры (МИПы).

Цель работы – исследование перспектив использования различных типов материалов в качестве твердотельных подложек для гетерофазного анализа биомолекулярных объектов (главным образом, нуклеиновых кислот (НК) и белков), а также разработка и оптимизация подходов к их быстрому и специфичному выявлению.

В ходе данной работы необходимо было решить следующие **задачи**:

- провести скрининг быстрых и эффективных способов иммобилизации биомолекул (НК и белков) на твердотельные носители различной природы (кремниевые слайды и микроканальные матрицы (МКМ), микрочастицы из органических и неорганических полимеров, полимерные мембраны), основанных на использовании химически активированных или неактивированных подложек, в том числе с привлечением фотоиндуцируемых процессов;
- изучить процесс генерации сигнала гибридационного анализа ДНК в гетерофазном формате, проводимого при ограниченном удлинении олигонуклеотидов на ДНК-матрице с помощью ДНК зависимой ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* (Taq ДНК-полимеразы) в изотермических условиях (минисеквенирование);

- разработать перспективные ДНК-диагностические подходы к высоко-селективному гетерофазному анализу переменных сайтов в составе нуклеиновых кислот с помощью биочипов низкой плотности, создаваемых на основе капроновых мембран в качестве носителя и пригодных для генотипирования вирусных инфекций;
- разработать подход к получению молекулярно импринтированных полимеров (МИПов) на основе нейлона-6 (капрона) для специфичного связывания различных биомолекулярных маркеров, в том числе белковой и нуклеотидной природы.

Научная новизна и практическая ценность работы. Представленная работа является детальным и систематическим исследованием этапов, необходимых при разработке диагностических систем для селективного анализа биомолекулярных маркеров нуклеотидной и белковой природы.

В настоящей работе исследована эффективность иммобилизации биомолекул (нуклеиновых кислот, белков) на различные химически активированные или неактивированные твердотельные носители. Определен ряд факторов, влияющих на данный процесс и позволяющих значительно оптимизировать схему быстрого и эффективного получения гетерофазных носителей, несущих на поверхности иммобилизованные биомолекулы.

Детально изучен процесс генерации сигнала гибридационного анализа НК в реакциях ограниченного удлинения олигонуклеотидных зондов в составе комплементарных комплексов с анализируемой ДНК в изотемпературных условиях. Показана возможность амплификации сигнала анализа при сохранении его сиквенс-специфичности. Предложена кинетическая схема процесса мечения зонда в режиме минисеквенирования ДНК при постоянной температуре, позволяющая оценивать эффективность образования сигнального продукта в зависимости от условий гибридизации, длины и структуры зонда и продукта его ферментативного удлинения.

Предложен новый подход к получению молекулярно импринтированных полимеров (МИПов) из раствора капрона в 2,2,2-трифторэтанол, содержащем молекулы-шаблоны. Показано, что создаваемые МИПы способны к специфичному распознаванию различных низко- и высокомолекулярных шаблонов.

На основе результатов проведенного исследования предложены прото-типы диагностических платформ для селективного анализа биомолекулярных маркеров нуклеотидной и белковой природы с использованием различных методов генерации сигнала.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ. Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях, в том числе: Международная конференция «Физико-химическая биология», Новосибирск, 2006, 2011; 15th International symposium «Nanostructures: physics and technology», Novosibirsk, 2007; II Международный Молодежный Медицинский конгресс

«Санкт-Петербургские научные чтения-2007», Санкт-Петербург, 2007; IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск, 2008; The sixth international conference on bioinformatics of genome regulation and structure, Novosibirsk, 2008; Международный междисциплинарный симпозиум «От экспериментальной биологии к превентивной и интегративной медицине», г. Судак, Украина, 2008; Первый, Второй и Третий международные форумы по нанотехнологиям Rusnanotech, Москва, 2008, 2009, 2010; Международная конференция «Химическая биология – фундаментальные проблемы бионанотехнологии», Новосибирск, 2009; Медицинская геномика и протеомика, Новосибирск, 2009; 8th International Meeting on Recognition Studies in Nucleic Acids, Sheffield, UK, 2010.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 191 страницах, содержит 92 рисунок и 13 таблиц. Библиография включает 335 литературных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Оптимизация протоколов иммобилизации олигонуклеотидов на твердотельные носители

Иммобилизацию аминокислотсодержащих олигонуклеотидов, отличающихся по длине и составу, осуществляли на твердотельные носители, несущие на своей поверхности различные реакционно-способные группы (табл. 1).

Таблица 1. Твердотельные носители и активирующие агенты

<i>Тип носителя</i>		<i>Активирующий агент</i>	<i>Иммобилизуемый зонд 5'-3'</i>
S1	Стекло-C(O)Su*	–	Z1 pGCATCAAG-NH ₂ Z2 pATTGGGCGTGCCCC-NH ₂
S2	Стекло** -C(O)Su		
P1	ДМЭГ-C(O)Su		
P4	ДМЭГ*** -C(O)Su		
P2	ДМЭГ-NH ₂		
P3	ДМЭГ-NH ₂	1,4-фенилендиизоотиоцианат	
S3	Nucleosil 100-5-NH ₂	2,4,6-трихлор-1,3,5-триазин	Z3 pTCAGGCAGTACCA-CAAGGCC-NH ₂
P5	Латекс-C(O)H	–	

*Su – остаток N-оксисукцинимид; **стеклянный носитель с порами контролируемого размера разных производителей; *** разные партии полимерных микрочастиц на основе метакрилата (ДМЭГ).

С целью увеличения эффективности иммобилизации олигонуклеотидов на поверхность твердотельных носителей было исследовано влияние на этот процесс NaCl, различных четвертичных солей аммония, в том числе катионных детергентов цетилтриметиламмонийбромида (ЦТАБ) и додецилтриметиламмонийбромида (ДТАБ), а также анионного (SDS) и неионных (Твин-20 и Тритон X-100) детергентов. Было показано, что в водных средах эффективная иммобилизация (на любую из исследуемых поверхностей) олигонуклеотида, содержащего концевую аминогруппу, происходила только в присутствии ЦТАБ и ДТАБ (рис. 1). Влияние ЦТАБ и ДТАБ на протекание гетерофазной реакции, вероятнее всего, связано с экранированием активных групп на поверхности

носителя от контакта с водой и со способностью данных солей концентрировать (осаждать) олигонуклеотид на поверхность носителя (рис. 1А).

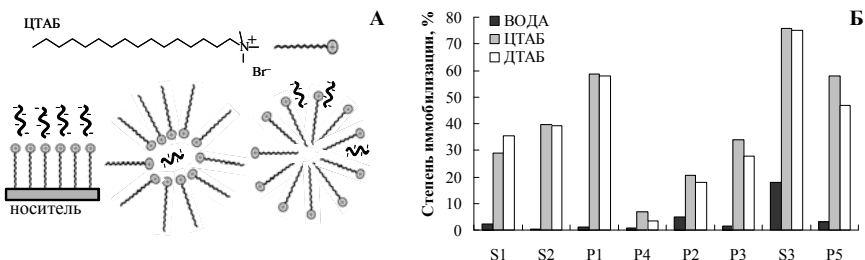


Рис. 1. Схема взаимодействия ЦТАБ с олигонуклеотидом и поверхностью твердотельного носителя (А). Эффективность иммобилизации олигонуклеотидов на разные носители в водном растворе при 25°C в присутствии 22 мМ ЦТАБ или ДТАБ (Б).

Таким образом, предложен простой подход к повышению эффективности ковалентной иммобилизации олигонуклеотидов на химически активированные твердотельные носители в водных условиях, основанный на введении в реакционную смесь катионных детергентов, например, ЦТАБ и ДТАБ.

Из рассмотренных активирующих агентов для дальнейшего использования при разработке сенсорных поверхностей был выбран 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазин, поскольку данный реагент позволяет проводить эффективную иммобилизацию как олигонуклеотидов, так и белков на широкий круг носителей, а активированная им поверхность стабильна в течение продолжительного времени. Предложенный подход к иммобилизации биомолекул использован при разработке систем селективного анализа биомолекулярных маркеров нуклеотидной и белковой природы. С использованием сканирующей эллипсометрии регистрировали увеличение толщины слоя при иммобилизации белков на кремниевую пластину. После обработки такой поверхности, несущей, например, иммобилизованные антивидоспецифичные антитела (кроличьи антитела против иммуноглобулинов мыши), видоспецифическим иммуноглобулином происходит усиление детектируемого сигнала (рис. 2), что свидетельствует о возможности использования сканирующей эллипсометрии для прямой детекции белок-белковых взаимодействий (label-free детекция).

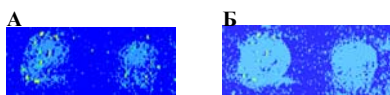


Рис. 2. Результаты эллипсометрического сканирования кремниевой пластины с иммобилизованными антителами до (А) и после (Б) обработки видоспецифическим иммуноглобулином.

УФ-иммобилизацию олигонуклеотидных зондов (ОЗ) на капроне исследовали с использованием в качестве базового протокола методику нанесения растворов олигонуклеотидов на капроновую мембрану, смоченную 5 М раствором NaCl, с последующим облучением ее УФ-светом (254 нм)

ртутных ламп низкого давления [Калачиков С.М. и др., 1992]. На данном этапе использовали нативный **O3 (Z4)** и модифицированные **O3 (Z5, $T_n^{\wedge}Z4$, $T_n^{\wedge}Z5$)**, содержащие в углеводно-фосфатном остове ненуклеотидную вставку на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля (мостиковые **O3**). Данную гибкую вставку использовали в качестве звена, модифицирующего сиквенс-специфическую часть **Z5**, и/или линкера, отделяющего олиготимидатный домен T_n ($n=3$ или 10) от основной части зонда (рис. 3).

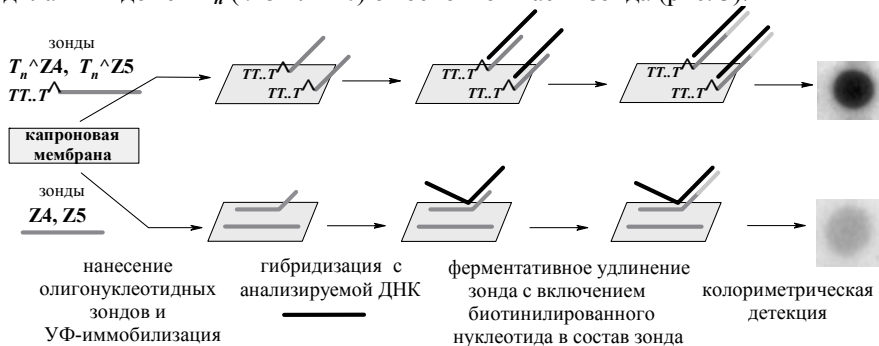


Рис. 3. Схема иммобилизации и ферментативного мечения **O3 Z4** (pTCAGGCAG-TACCACAAGGCC), **Z5** (pGGATCAACCCGCTCAATGC[^]CTGGAG), $T_n^{\wedge}Z4$ (T_n^{\wedge} TCAGGCAGTACCACAAGGCC), $T_n^{\wedge}Z5$ (T_n^{\wedge} GGATCAACCCGCTCAATGC[^]CTGGAG) в присутствии ДНК-матрицы, где [^] - ненуклеотидная вставка на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля (**pDEG**), $n=3$ или 10.

Максимальная длина T_n составила 10 звеньев (T_{10} -домен), поскольку, с нашей точки зрения, такое количество дополнительных пиримидиновых остатков, с одной стороны, незначительно увеличивает стоимость олигонуклеотида и, с другой стороны, превосходит число тимидиновых остатков в сиквенс-специфической части типичных **O3** длиной 20-30 звеньев. Последнее обстоятельство должно в значительной степени повысить вероятность иммобилизации зонда именно через тимидилатный домен, обеспечив при этом функциональную целостность и доступность сиквенс-специфической части олигонуклеотида для взаимодействия с НК (рис. 3).

Матрицу точек на поверхности капроновой мембраны формировали при нанесении растворов зондов в концентрациях от 10^{-4} до 10^{-7} М (рис. 4А). Для анализа эффективности УФ-зависимой иммобилизации в каждую точку был добавлен 5'-[γ - 32 P]-меченый аналог соответствующего **O3** в постоянной (10^{-8} М, не менее 250 Бк) концентрации. Дозу УФ-облучения мембраны варьировали от 0.088 до 1.33 Дж/см², что соответствовало выдерживанию мембраны под источником УФ-света (мощностью 30 Вт) в течение 2-30 минут. Эффективность иммобилизации **O3** рассчитывали как отношение необратимо связавшегося с мембраной зонда к общему количеству олигонуклеотида, нанесенному в каждую точку, а также на основании анализа интенсивности пятен на радиоавтографе мембраны (рис. 4А).

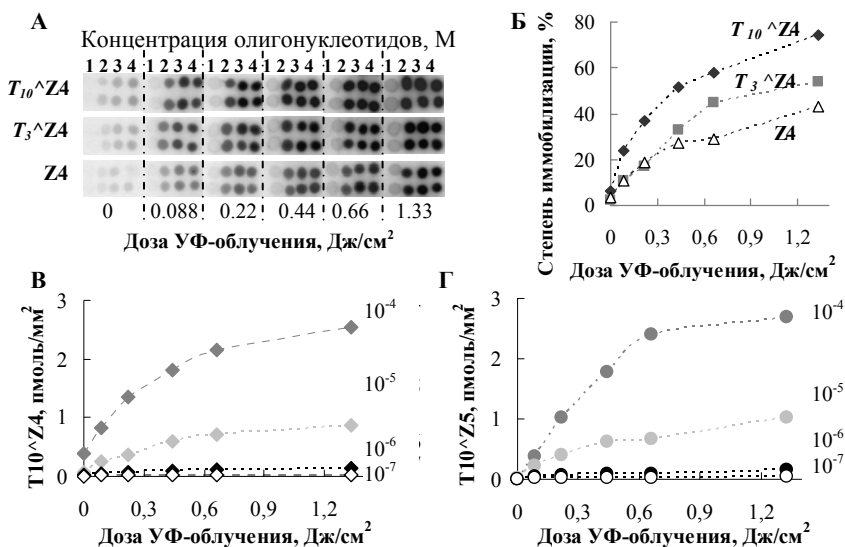


Рис. 4. Радиоавтографы капроновых мембран после иммобилизации *O3* T₁₀[^]AZA, T₃[^]AZA и ZA, нанесенных в концентрациях 10⁻⁴ (1), 10⁻⁵ (2), 10⁻⁶ (3), 10⁻⁷ (4) М (А). Зависимость степени иммобилизации T₁₀[^]AZA, T₃[^]AZA и ZA (10⁻⁶ М) от мощности УФ-облучения (Б). Влияние дозы УФ-облучения на количество иммобилизованных T₁₀[^]AZA (В) и T₁₀[^]AZ5 (Г) при нанесении их в соответствующих концентрациях.

Видно (рис. 4А,Б), что введение T₁₀-фрагмента в состав зондов увеличивает как скорость иммобилизации *O3* на капроновой мембране, так и степень их ковалентного связывания (до 2 раз) по сравнению с немодифицированным зондом. При нанесении на мембрану *O3* в низких концентрациях (10⁻⁷ М) наблюдаются высокие выходы иммобилизации (> 80%), в то время как только ~10% зонда, нанесенного в высокой концентрации (0.1 мМ), оказывается зафиксированным на мембране. Значение предельной ёмкости носителя по зонду составило 2.5 пмоль/мм², что сравнимо с таковым, достигаемым при фотоиммобилизации зонда, содержащего длинный T_n-домен (n~800 нт) [Saiki R.K. et al., 1989], и значительно превышает ёмкость иммобилизации зондов на химически активированные плоские стеклянные носители (0.3-0.5 пмоль/мм²) [Beaucage S.L. et al., 2001]. Следует отметить, что скорость иммобилизации и значения предельной ёмкости капрона по зонду при иммобилизации T₁₀[^]AZA (2.5 пмоль/мм²) и T₁₀[^]AZ5 (2.6 пмоль/мм²) практически совпадают, хотя длина адресных частей и содержание в них тимидилатных звеньев различаются (рис. 4В,Г). Таким образом, введение T₁₀-домена в состав зонда оказывается достаточным для выравнивания эффективности УФ-иммобилизации олигонуклеотидных зондов, различающихся как по длине, так и по нуклеотидному составу.

Кроме того, было установлено, что упразднение аминокрупп капрона путем их ацилирования не приводит к значимому снижению эффективности УФ-иммобилизации **O3** на данном носителе, хотя, по литературным данным, такая модификация поверхности [Church G.M. et al., 1984] должна исключить возможность фиксации ДНК на полиамидной подложке. Изучив влияние различных добавок, вносимых в смачивающий мембрану раствор, установлено, что амиды, содержащие алифатические остатки при атоме азота (например, тетраметилмочевина) эффективно ингибируют фотоиммобилизацию **O3** на капроне. Полученные данные указывают на то, что именно амидные составляющие капрона выступают в роли реакционных центров при УФ-индуцированной иммобилизации **O3**.

Исследование эффективности выявления специфической ДНК с помощью УФ-иммобилизованных зондов проводили, вводя остаток биотина в составе C5-модифицированного производного 2'-дезоксигуанидин 5'-трифосфата под действием *Taq* ДНК-полимеразы в состав **O3** в присутствии ДНК-матрицы **F***, как описано ранее [Пышная И.А. и др., 2009]. В результате такого фермент-зависимого ограниченного удлинения иммобилизованных **O3** метка фиксируется на поверхности подложки. Колориметрическое выявление остатка биотина проводили с использованием конъюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза и хромогенных субстратов (BCIP, NBT), регистрируя специфическое окрашивание мембраны после гибридизационного анализа ДНК. В экспериментах использовали мембраны, полученные на этапе анализа эффективности фотоиммобилизации **O3**.

Видно (рис. 5А), что интенсивность окрашивания пятен после проведения анализа зависит как от ёмкости носителя по зонду, так и от дозы УФ-облучения мембраны при иммобилизации. Наличие T_n -домена повышает эффективность выявления анализируемой ДНК с помощью **O3**, иммобилизованных на капроне. Повышение эффективности иммобилизации за счет увеличения дозы УФ-облучения до ~ 0.66 Дж/см² способствует возрастанию интенсивности колориметрического сигнала при выявлении ДНК. Дальнейшее повышение дозы облучения увеличивает ёмкость подложки по **O3**, но не приводит к повышению интенсивности сигнала анализа (рис. 5А-Г). Возможно, это является отражением УФ-индуцированной деградации **O3**, снижающей вероятность комплексообразования его с выявляемой ДНК и/или ферментативного мечения в составе дуплекса. Мы показали, что, как и следовало ожидать [Church G.M. et al, 1984], основными сайтами УФ-зависимой модификации **O3** **Z4** и T_{10} [^]**Z4** были пиримидиновые основания. Количественный анализ распределения продуктов деструкции **O3** свидетельствовал о том, что наличие T_{10} -домена приводило к снижению степени деградации адресной части **O3**.

***F** –продукт ПЦР (230 п.о.), соответствующий 5'-нетранслируемому участку РНК вируса гепатита С (-259 ÷ -30 нт от начала трансляции).

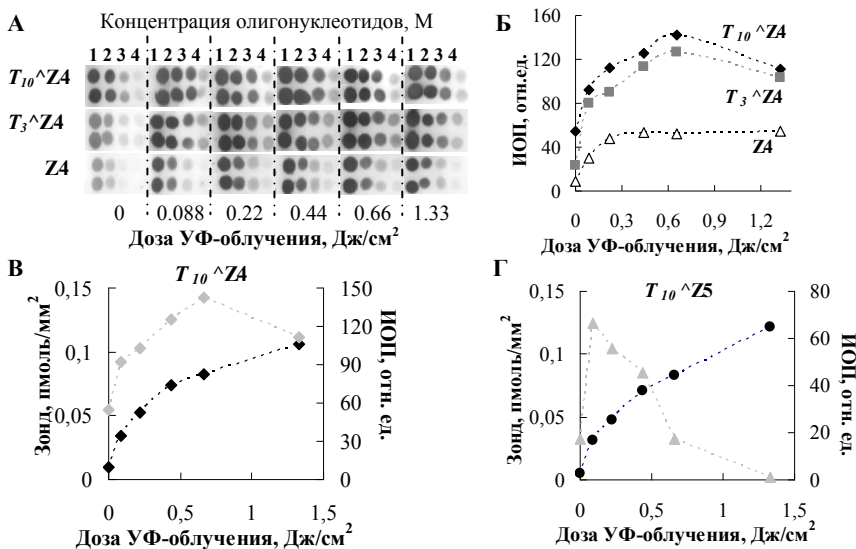


Рис. 5. Сканированное изображение капроновой мембраны, содержащей $OZ T_{10}^{\wedge}ZA$, $T_3^{\wedge}ZA$ и ZA , нанесенные в концентрациях 10^{-4} (1), 10^{-5} (2), 10^{-6} (3), 10^{-7} (4) М, после проведения реакции ферментативного мечения в присутствии матрицы **F** и колориметрического выявления продуктов хромогенными субстратами в течение 10 мин (**A**). Зависимость эффективности колориметрического выявления **F** в местах нанесения $OZ T_{10}^{\wedge}ZA$, $T_3^{\wedge}ZA$ и ZA (10^{-6} М) от мощности УФ-облучения (**Б**). Сравнение зависимостей степени иммобилизации (черные точки) $OZ T_{10}^{\wedge}ZA$ (**В**), $T_{10}^{\wedge}Z5$ (**Г**) и эффективности их колориметрического выявления в присутствии матриц (серые точки) от дозы УФ-облучения. IOП – интегральная оптическая плотность.

Таким образом, введение в структуру зонда T_n -домена приводит к повышению эффективности гибридационного анализа специфической последовательности ДНК с помощью OZ , УФ-иммобилизованных на капроне.

2. Исследование эффективности выявления специфической последовательности ДНК с помощью реакции минисеквенирования

Важным аспектом при разработке методов анализа биомолекул и конструировании сенсорных поверхностей является обеспечение высокой чувствительности анализа. Одним из перспективных подходов к повышению чувствительности анализа НК может быть многократное ограниченное удлинение зондов в составе комплекса с анализируемой ДНК с помощью ДНК-полимеразы в изотермических условиях [Dubiley S. et al., 1999]. Схема изотермического накопления сигнального продукта (рис. 6) предполагает, что при выборе оптимальных условий может происходить «катализируемое» ДНК-матрицей ферментативное превращение OZ . В этом случае одна молекула анализируемой ДНК может обеспечить мечение значительно большего числа молекул зонда, что приводит к усилению гибридационного сигнала.

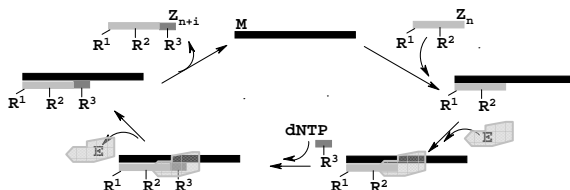


Рис. 6. Схема изотермического ферментативного удлинения зонда, где **М** – ДНК-матрица, **Z_n** – **OЗ**, **Z_{n+1}** – продукт ферментативной реакции, **Е** – *Taq* ДНК-полимераза, **dNTP** – меченый нуклеозидтрифосфат, **R₁** – 5'-ОН-группа или твердотельный носитель, **R₂** – остаток dUMP, меченный флуоресцином (**Fam**) или ненуклеотидная вставка на основе фосфоэфира диэтиленгликоля (**pDEG**), **R₃** – остатки [³²P]-меченого фосфата, биотина (**Bio**) или тетраметилродамина (**Tmr**) в составе встраиваемого полимеразой нуклеотидного звена. Остатки красителей и биотина введены по С5-положению 2'-дезоксисуридина.

Установлено, что усиление гибридизационного сигнала анализа в ходе реакции минисеквенирования ДНК в изотермических условиях возможно при согласовании двух основных условий: 1) стабильности дуплексов **OЗ/ДНК-матрица** и **продукт удлинения OЗ/ДНК-матрица** различаются незначительно; 2) температура реакции находится вблизи температуры плавления (**T_{пл}**) этих комплексов, обеспечивая эффективный обмен олигонуклеотидных цепей зонда(продукта) в дуплексе с ДНК-матрицей.

Исследование изотермического накопления сигнального продукта реакции удлинения **OЗ** с помощью *Taq* ДНК-полимеразы проводили в гомофазном варианте (**I**, **II**), используя радиоизотопную и флуоресцентную метки, и в гетерофазном – с помощью модельной системы **III**, предполагающей колориметрическое выявление вводимой в иммобилизованный **OЗ** биотиновой метки (табл. 2).

Таблица 2. Модельные системы в реакциях минисеквенирования.

Структура модели	Используемый dNTP	Продукт [§]	Код
MI.1 3'AGTCCGTCATGGTGTCCGGACTGCGTTG ^{5'} ZI 5'TCAGGCAGTACCACAAGGCC ^{3'}	dTTP [*]	21	I.1
	dNTP, N=A, G, C, T [*]	29	I.1.N4
MI.1 3'AGTCCGTCATG-GTGTCCGGACTGCGTTG ^{5'} ZI[^] 5'TCAGGCAGTAC^CACAAGGCC ^{3'}	dTTP [*]	21	I.1[^]
MI.1 3'AGTCCGTCATG-TGGT-GTCCGGACTGCGTTG ^{5'} ZI^{^^} 5'TCAGGCAGT^ACCA^CACAAGGCC ^{3'}	dTTP [*]	21	I.1^^
MI.2 3'AGTCCGTCATGGTGTCCGGAAGCGTTG ^{5'} ZI 5'TCAGGCAGTACCACAAGGCC ^{3'}	dTTP [*]	23	I.2
MI.1 3'GTCTGA--GGTCCGTCAGTAGTTC ^{5'} ZII 5'CAGCT ^{Fam} CCAGGCA ^{3'}	dU ^{I^{mr}} TP	13	II
	dNTP, N=U ^{I^{mr}} , G	14	II.N2
	dNTP, N=U ^{I^{mr}} , G, A	16	II.N3
	dNTP, N=U ^{I^{mr}} , G, A, C	20	II.N4
MI.1-1 3'GTCTGA--GGTCCGTCAGTAGTTC ^{5'} ZII 5'CAGCT ^{Fam} CCAGGCA ^{3'}	dU ^{I^{mr}} TP	13	II.-1
MI.1-6 3'GTCTGA--GaTCCGTCAGTAGTTC ^{5'} ZII 5'CAGCT ^{Fam} CCAGGCA ^{3'}	dU ^{I^{mr}} TP	13	II.-6
F 3'...AGTCCGTCATGGTGTCCGGTAAA...5' ZIII 5'TCAGGCAGTACCACAAGGCC ^{3'} ∅	dU ^{Bio} TP, dATP	24	III
	dU ^{Bio} TP, dNTP N=G, A, C	230	III.N4

^{*}[α-³²P]-изотоп в α-положении трифосфатного остатка, [§]длина в нт, [^] - **pDEG**,

Влияние температуры реакции и стабильности формируемых дуплексов зонд/ДНК-матрица на эффективность ферментативного превращения *ОЗ*, исследовали, используя системы **I** и **II**. Было показано, что температура реакции существенно влияет на эффективность удлинения *ОЗ*, взятого в 50-кратном избытке по отношению к ДНК-матрице (рис. 7А). В ряде случаев накопление продукта удлинения *ОЗ* подтверждали с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях.

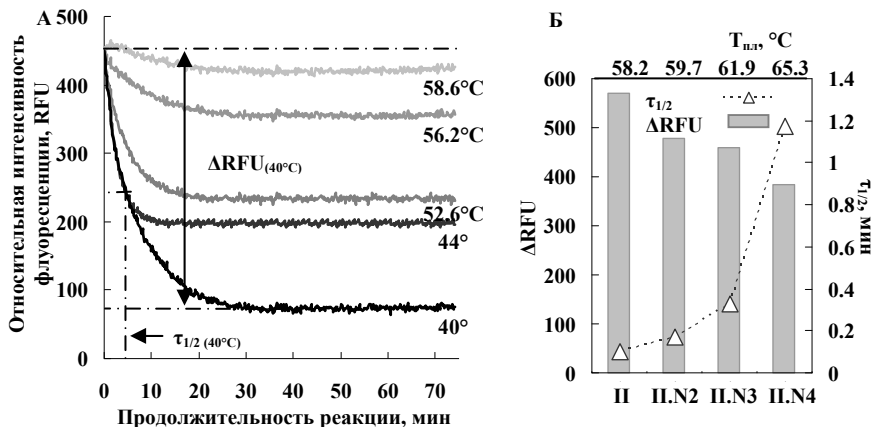


Рис. 7. Температурные зависимости эффективности и скорости тушения флуоресценции в реакциях удлинения зонда в системе **II**, где $\tau_{1/2}$ – время полуреакции, ΔRFU – изменение интенсивности флуоресценции (например, $\tau_{1/2}(40^\circ\text{C})$ и $\Delta RFU_{(40^\circ\text{C})}$ при 40°C) (А). Сопоставление изменения относительной флуоресценции со временем полуреакции и расчетной $T_{\text{пл}}$ дуплексов продукт/ДНК-мишень для разных систем **II**-серии (Б).

Влияние стабильности комплекса продукт/ДНК-матрица на интенсивность регистрируемого сигнала также исследовали с помощью флуориметрического подхода. Реакции удлинения *ОЗ* (при 45°C) проводили в присутствии различных наборов dNTP (см. табл. 2), встраивание которых (в соответствии со структурой матричной цепи) обеспечивало накопление продуктов различной длины, а следовательно, и стабильности формируемых ими дуплексов. Сопоставляли параметры кинетических кривых, полученных при использовании модельных систем **II** (удлинение на 1 нт), **II.N2** (+2 нт), **II.N3** (+4 нт), **II.N4** (+8 нт). Видно (рис. 7Б), что удлинение продукта реакции приводит к снижению наблюдаемой глубины превращения *ОЗ*, характеризующей величиной ΔRFU , и одновременно с этим падением скорости реакции – возрастанием величины $\tau_{1/2}$.

Аналогичные данные получены и при использовании радиоизотопной метки, что подтверждает справедливость схемы (рис. 6) изотермического мечения *ОЗ* на матрице ДНК. Для каждой системы, определяемой структурой комплекса зонд/ДНК, существует температура, при которой происходит наиболее оптимальное мечение *ОЗ* в результате реализации обмена

матричной цепи между различными дуплексами. Низкая температура реакции или повышенная стабильность дуплексов зонд/ДНК и/или продукт/ДНК снижают эффективность изотермической амплификации сигнала. Температура реакции выше температуры плавления субстратного комплекса также негативно сказывается на эффективности мечения зонда в реакции минисеквенирования.

Детальный анализ процесса накопления сигнального продукта, а именно изотермической амплификации сигнала, при ограниченном удлинении **ОЗ** на матрице ДНК с помощью ДНК-полимеразы может быть проведен только при наличии кинетической схемы многостадийного превращения **ОЗ**. Была детально изучена зависимость тушения флуоресценции Fam-содержащего зонда **ZII** (50 мкМ) в системе **II** от концентрации ДНК-матрицы **MII** ($10^{-5} \div 5 \times 10^{-10}$ М) при удлинении **ОЗ** на один нуклеотид, несущий остаток тушителя (**Tmr**).

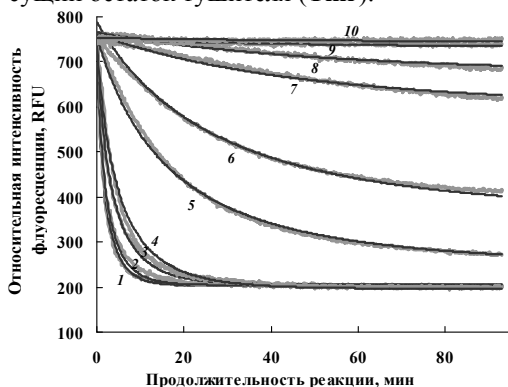


Рис. 8. Кинетические кривые реакции ферментативного мечения зонда **ZII** (50 мкМ) на матрице **MII**, введенной в реакцию минисеквенирования в концентрации: **1** – 10, **2** – 5, **3** – 1, **4** – 0.5, **5** – 0.1, **6** – 0.05, **7** – 0.01, **8** – 0.005, **9** – 0.001, **10** – 0.0005 мкМ, соответственно. Температура проведения реакции 45°C. Концентрация $dU^{Tmr}TP$ – 100 мкМ.

В результате анализа наблюдаемых профилей зависимости флуоресценции от времени реакции при различных концентрациях **MII** (рис. 8) была предложена кинетическая схема процесса, хорошо описывающая экспериментальные данные. С помощью пакета программ Dynafit 3.28 (BioKin, Ltd., США) определены величины кинетических констант отдельных реакций (табл. 3).

Таблица 3. Кинетическая схема мечения зонда в ходе реакции минисеквенирования ДНК и полученные величины констант скоростей реакций.

$M + Z_n \xrightleftharpoons[k_1]{k_1} MZ_n + E \xrightleftharpoons[k_2]{k_2} MZ_n E + dNTP \xrightarrow{k_3} MZ_{n+1} E \xrightleftharpoons[k_2]{k_2} MZ_{n+1} \xrightleftharpoons[k_1]{k_4} M + Z_{n+1}$ $E \xrightarrow{k_5} E_0$					
$k_1/10^6, M^{-1}c^{-1}$	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}
0.219 ± 0.001	7.72 ± 0.01	52.63 ± 0.06	7.49 ± 0.02	0.719 ± 0.001	3.45 ± 0.02
					$k_5/10^4, c^{-1}$
					3.04 ± 0.01

Кроме того, было показано, что предложенный способ усиления сигнала гибридационного анализа при выявлении специфической последовательности ДНК может быть использован и в гетерофазных системах.

3. Разработка прототипов тест-систем для гетерофазного анализа НК

С использованием разработанного способа получения ДНК-чипов на основе капроновых мембран и явления увеличения чувствительности гибридизационного анализа ДНК в ходе реакции минисеквенирования разработан прототип тест-системы для выявления и генотипирования вируса гепатита С (ВГС, генотипы: 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b). В качестве генотип-специфичного участка генома вируса была выбрана 5'-нетранслируемая область (5'-НТО). Проведен анализ 5'-НТО генома различных субтипов ВГС, опубликованных в международной базе данных [<http://hcv.lanl.gov>], и выбраны **ОЗ**, обеспечивающие высокую эффективность и селективность выявления не только соответствующих синтетических 30- и 70-звенных матриц, но и протяженных ДНК-фрагментов (**F**), полученных методом ОТ-ПЦР с использованием вирусной РНК, выделенной из препаратов крови пациентов.

Известную проблему снижения эффективности анализа при увеличении длины анализируемой ДНК мы преодолевали путем химического и ферментативного способов статистического фрагментирования полученного после ПЦР ДНК-фрагмента [Виноградова О.А. и др., 2007]. Химическое фрагментирование осуществляли в кислых условиях (рН 2) с образованием апуриновых сайтов с дальнейшим гидролизом ДНК при термической обработке. Для ферментативного гидролиза ДНК-образец, содержащий остатки дезоксиуридина, обрабатывали ферментом урацил-ДНК-гликозилазой *E. Coli*.

Показано, что в оптимизированных условиях (62°C) использование фрагментированной ДНК-пробы приводит к увеличению интенсивности сигнала гибридизационного анализа по сравнению с нативным ДНК-образцом (рис. 9). При этом повышение таким способом чувствительности гибридизационного анализа не приводит к снижению его селективности.

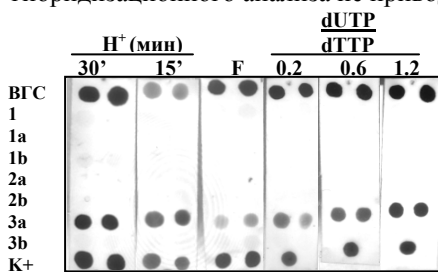


Рис. 9. Сканированное изображение капроновых мембран после проведения ферментативного мечения иммобилизованных олигонуклеотидов в присутствии нативного и фрагментированного путем кислотного и ферментативного гидролиза ПЦР-фрагментов. **F** – дцДНК-ампликон, соответствующий типоспецифическому участку гена ВГС.

В результате проведенных исследований был сконструирован чип, содержащий 10 зондов (рис. 10): 1 константный ВГС-специфичный, 7 генотип-специфичных и 2 **ОЗ**, обеспечивающих внутренний контроль тест-системы (K₁+, K₂+). Показано, что разработанный ДНК-чип позволяет достоверно различать генотип ВГС. Появление окрашивания в ВГС-специфичной и генотип-специфичной областях мембраны позволяет отнести к соответствующему генотипу генетический материал ВГС (рис. 10).

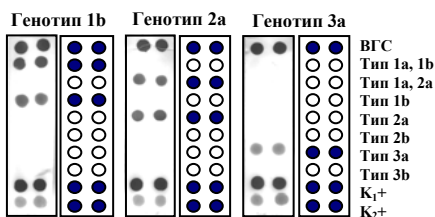


Рис. 10. Шаблоны окрашивания капроновой мембраны (справа для каждого типа) и типичные изображения сканированных мембран после проведения генотипирования, где K_1^+ - контроль работы в системе конъюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза, а K_2^+ - контроль работы *Taq* ДНК-полимеразы.

Система анализа была апробирована более чем на 70 клинических образцах ВГС. Достоверность получаемых нами результатов подтверждена референс-методами (секвенирование, типоспецифичная ПЦР). Таким образом, разработанная тест-система позволяет надежно выявить и отнести к соответствующему субтипу генетический материал ВГС.

Анализ значимых нуклеотидных замен в составе высоковариабельных участков ДНК. Как правило, **ОЗ** являются высокоспецифичными, т.е. способными выявлять только определенные фрагменты ДНК, различающиеся одним или несколькими нуклеотидными остатками. Однако в генетическом материале, например, вирусов и бактерий, наряду с мутациями, определяющими в частности лекарственную устойчивость патогенов, могут возникать мутации, не влияющие на данный признак. Таким образом, возникает задача эффективного и селективного выявления конкретной нуклеотидной замены, приводящей к значимой мутации, в присутствии дополнительных диагностически незначимых замен в сайте связывания **ОЗ**.

Для решения этой задачи использовали предложенную гетерофазную платформу на основе капроновой мембраны с УФ-иммобилизованными **ОЗ**, а также схему выявления анализируемой ДНК с введением метки в состав иммобилизованных зондов путем ферментативного лигирования с биотинсодержащим олигонуклеотидным компонентом. Ферментативное лигирование осуществляли с использованием ДНК-лигазы фага T4 или термостабильных ДНК-лигаз [Закабунин А.И. и др., 2011].

Каждая система (табл. 4) состояла из двух **ОЗ** (3'-биотинилированного фосфатного компонента, иммобилизованного ОН-компонента) и матрицы – олигонуклеотида, соответствующего последовательности гена *pol* ВИЧ-1 и содержащего один из кодонов (62, 184, 70 и 215), мутации в котором приводят к возникновению лекарственной устойчивости. Анализ участков фрагмента кДНК гена *pol* ВИЧ-1 в непосредственной близости от исследуемых кодонов выявил, что помимо мутации в самом кодоне, приводящей к лекарственной устойчивости штамма вируса, в сайтах связывания **ОЗ** присутствуют дополнительные замены. Были проанализированы последовательности фрагмента кДНК гена *pol* ВИЧ-1 с использованием базы данных Стенфордского университета [http://hiv.lanl.gov]. Часто встречаемые мутации (>5%) учитывали при выборе структур **ОЗ**, вводя в них вырожденные нуклеотидные

звенья (табл. 4). Таким образом, при синтезе **ОЗ** получали не одну последовательность, а набор, содержащий все необходимые комбинации.

Таблица. 4. Модельные системы для выявления значимых нуклеотидных замен в составе полиморфных участков ДНК на примере гена *pol* ВИЧ-1.

Система	Матрица/ тандем зондов	Последовательности олигонуклеотидов	
		bio	ДНК-лигаза → bio
62L	62L ⁿ / ^62L ⁿ +62Lbio	5' TACAATACTCCAGTATTTG	TyATAAAGAAAAARGAYAGYA ^{3'}
	62L ^m / ^62L ^m +62Lbio	5' TACAATACTCCAGTATTTG	CyATAAAGAAAAARGAYAGYA ^{3'}
70L	70L ⁿ / ^70L ⁿ +70Lbio	5' ATAAAGAAAAAGRAYAGYACTA	ARTGGAGRAAATTAGTAGAT ^{3'}
	70L ^m / ^70L ^m +70Lbio	5' ATAAAGAAAAAGRAYAGYACTA	GRTGGAGRAAATTAGTAGAT ^{3'}
184L	184L ⁿ / ^184L ⁿ +184Lbio	5' TCYYACATAMMARTCATCCA	TGTATWGRTAGATRWCTATNT ^{3'}
	184L ^m / ^184L ^m +184Lbio	5' TCYYACATAMMARTCATCCA	CGTATWGRTAGATRWCTATNT ^{3'}
215L	215L ⁿ / ^215L ⁿ +215Lbio	5' TGAKGYTTTTTRTC	KGGKTRTAAADRTCCCCANCTCAACAGAT ^{3'}
	215L ^m / ^215L ^m +215Lbio	5' TGAKGYTTTTTRTC	KGGKTRTAAADRTCCCCANCTCAACAGAT ^{3'}

Выврожденные звенья подчеркнуты и обозначены, согласно принятой номенклатуре (**R** = A, G; **Y** = C, T; **M** = A, C; **K** = G, T; **S** = C, G; **W** = A, T; **H** = A, C, T; **B** = C, G, T; **N** = A, G, C, T). Значимые несоответствия выделены **крупным** шрифтом. Обозначения ⁿ и ^m отражают отсутствие (ⁿ) или наличие (^m) значимого несоответствия.

При анализе смеси матриц реакционная смесь на носителе содержала одновременно биотинилированные компоненты для **всех** систем. Поставленная задача будет решена, если продукт ферментативного лигирования образуется **только** в случае **максимального** соответствия между последовательностями зондов и матриц. На рисунке 11 приведены типичные результаты анализа смеси четырех синтетических матриц. Видно, что специфический сигнал наблюдается только в случае реализации максимально полного соответствия. Значимые однонуклеотидные замены в модельных ДНК достоверно выявляются.

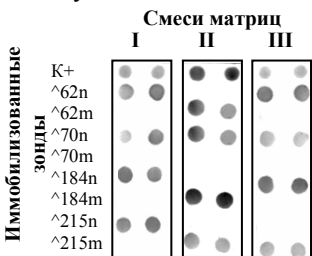


Рис. 11. Сканированное изображение ДНК-чипа после проведения параллельного анализа смесей матриц:

- I** – (62Lⁿ+70Lⁿ+184Lⁿ+215Lⁿ),
- II** – (62L^m+70Lⁿ+184L^m+215L^m),
- III** – (62Lⁿ+70Lⁿ+184Lⁿ+215L^m)

путем мультиплексного лигирования термостабильной ДНК-лигазой *Methanobacterium thermoautotrophicum*.
K+ – положительный контроль системы выявления.

Таким образом, на модельных системах показано, что методом мультиплексного лигирования олигонуклеотидных тандемов удастся точно определить состояние анализируемого полиморфного сайта при использовании капроновых ДНК-чипов, при этом наличие незначимых несоответствий в структуре ДНК, учтенное в последовательностях зондов, не препятствует проведению анализа. Использование такого подхода может быть крайне полезно при исследовании высоковариабельных геномов.

4. Молекулярно импринтированные полимеры

Гибридизационный анализ НК основан на их способности образовывать дуплексы с комплементарными последовательностями и на переводе акта образования комплекса в аппаратно-регистрируемый сигнал. Аналогично возможно выявление других биомолекул, имеющих собственные специфичные рецепторы. Однако в случае отсутствия природного рецептора или при сложности его получения и использования возможно создание синтетических материалов, способных специфично связываться с анализируемой молекулой и являться основой биосенсорного устройства. Молекулярно импринтированные полимеры (МИПы) – полимеры, способные к специфическому распознаванию молекул-шаблонов, в присутствии которых они были получены.

Мы предложили простой и оригинальный подход к формированию структурированных капроновых матриц, способных к молекулярному распознаванию. В основе предложенного подхода лежит предположение, что при переходе, например, полимерных цепей капрона из растворенного в твердотельное состояние и при наличии в исходном растворе молекулярного шаблона в формируемом полиамидном матриксе могут образоваться сайты, специфически удерживающие шаблон, т.е. способные к специфическому распознаванию. Для реализации предложенного подхода выбран растворитель для полиамидов – 2,2,2-трифторэтанол (ТФЭ), обеспечивающий высокую растворимость капрона и сохранность молекулы-шаблона.

Строение полимерного матрикса – важный аспект исследования при получении МИПов, т.к. пространственная организация капронового каркаса оказывает существенное влияние на доступность сайтов специфического связывания молекулы-шаблона, расположенных во внутренних участках МИПа.

Для формирования капроновых пленок раствор капрона (1-10% по массе) в ТФЭ наносили на различные плоские твердотельные подложки (стекло, кремний и т.д.) и высушивали. Характеризацию структуры полимеров проводили с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Видно (рис. 12А), что полученная из 1% раствора капрона в чистом ТФЭ полимерная пленка имеет непористую, гладкую структуру. В таких пленках недоступна внутренняя часть полимерного каркаса, следовательно, для получения МИПов необходимо использовать дополнительные компоненты, способствующие порообразованию.

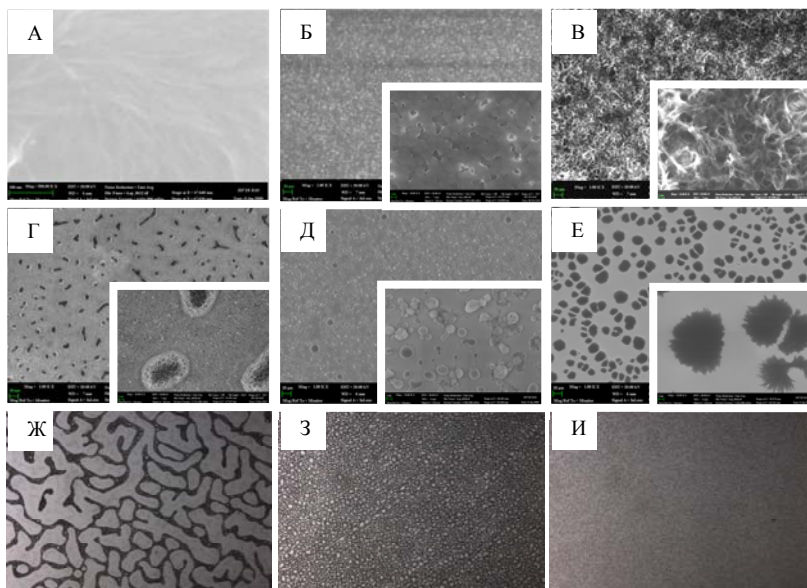


Рис. 12. СЭМ-изображения пленок капрона, полученных после высушивания из 1% раствора капрона в: ТФЭ (А); ТФЭ в присутствии: 33% воды (Б); 5% ДМФА, 10 % воды (В); 10% глицерина (Г); 0.1% ПЭГ, 10 % воды (Д); 0.1% ПВП, 10 % воды (Е). Изображения пленок капрона, сформированных при 4, 20 и 50 °С из 1% раствора капрона в 90% ТФЭ, 10% воды, полученные с помощью оптической микроскопии (Ж-И). СЭМ-изображения получены в ЦКП «Наноструктуры» ИФП СО РАН.

В качестве порообразующих добавок использовали объёмные соединения, обладающие большой молекулярной массой (рис. 12Д,Е), например, биополимеры (бычий сывороточный альбумин (BSA) $M=66.4$ КДа) или синтетические полимеры (полиэтиленгликоль (ПЭГ) $M=6$ КДа, поливинилпирролидон (ПВП) $M=360$ КДа), и соразтворители, скорость испарения которых отличается от скорости испарения основного растворителя (рис. 12Б-Г), а именно: протонные (вода, глицерин, бутанол), апротонные (пиридин, диметилсульфоксид, диметилформамид) или комбинация добавок (например, вода/ДМФА, вода/глицерин). Видно, что структура полимера значительно изменяется при смене порообразующего агента.

Температура формирования полимера также является значимым параметром, влияющим на скорость испарения растворителя и, следовательно, на структуру самоорганизующегося капронового каркаса, что было подтверждено с помощью оптической микроскопии (рис. 12Ж-И).

Получение МИПов на основе капрона проводили в двух форматах: в *объемном*, в виде суспензий микрочастиц, и *на поверхности*, в результате высыхания раствора полиамида с шаблоном на плоских носителях (стеклянные слайды) или на пористых подложках (фильтры на основе стекловаты). В

качестве шаблонов использовали как низкомолекулярные соединения (нуклеотиды, рибофлавин), так и высокомолекулярные (белки). Эффективность вторичного связывания МИПа с шаблоном оценивали с помощью спектрофотометрического, радиоизотопного или флуориметрического методов детекции. Во всех случаях в качестве контрольных выступали неимпринтированные полимеры (НИПы), которые получали в отсутствие шаблона.

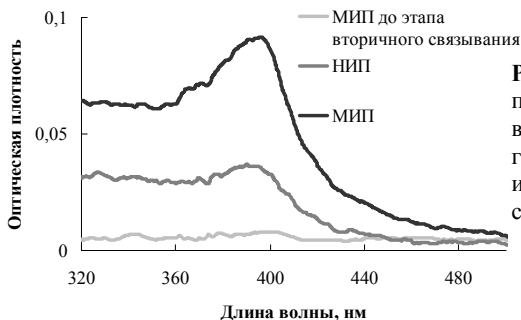


Рис. 13. Электронные спектры поглощения растворенного в ТФЭ МИПа и НИПа на гемоглобин, после удаления шаблона и проведения этапа вторичного связывания.

Видно (рис. 13), что раствор МИПа после удаления шаблона (гемоглобин (Hb)) в жестких условиях (5% SDS, 5% CH₃COOH) не содержит Hb, что подтверждает полное вымывание шаблона из полимерного каркаса. При контакте с раствором Hb МИП способен связывать шаблон, что подтверждается появлением оптического поглощения ($\lambda_{\max}=395$ нм), характерного для гем-содержащего белка. Поглощение раствора НИПа в этой области спектра после инкубации с раствором Hb отражает уровень неспецифической сорбции шаблона на капрон, однако его интенсивность существенно ниже. Ёмкость МИПа составила 28.3 ± 9 мг Hb на 1 г капрона, а средний коэффициент селективности ($A_{395}(\text{МИП})/A_{395}(\text{НИП})$) – 2.6 ± 0.3 .

При использовании низкомолекулярного шаблона нуклеотидной природы – аденозинтрифосфата (гАТФ) – детекцию связывания шаблона с МИПом и НИПом осуществляли с помощью радиоизотопной метки [γ -³²P].

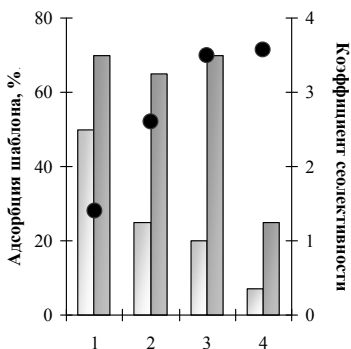


Рис. 14. Специфическое связывание [γ -³²P]гАТФ с капроновыми МИПами (темные столбцы) и НИПами (светлые столбцы). Условия получения полимеров: **1** – 8% капрон в присутствии 5% воды; **2** – 6% капрон в присутствии 10% воды и 5% ДМФА, двумерный формат; **3** – 4% капрон в присутствии 10% воды и 5% ДМФА; **4** – 2% капрон в присутствии 10% воды и 5% ДМФА. Черными точками обозначен коэффициент селективности, рассчитанный как отношение эффективности связывания анализируемой молекулы с МИПом и НИПом.

Варьируя как состав раствора полиамида (содержание капрона в растворе, присутствие соразтворителей), так и условия формирования твердотельного каркаса (пленки, микрочастицы), получен ряд гАТР-специфичных МИПов (рис. 14). Максимальный коэффициент селективности – отношение значений эффективности связывания $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{гАТР}$ с МИПом и НИПом, полученных в одинаковых условиях, – составил 3.6.

Флуоресцентную детекцию осуществляли с использованием в качестве молекул-мишеней флуоресцентно меченных белков (яичный (ОА) и бычий сывороточный альбумин (BSA) и др.).

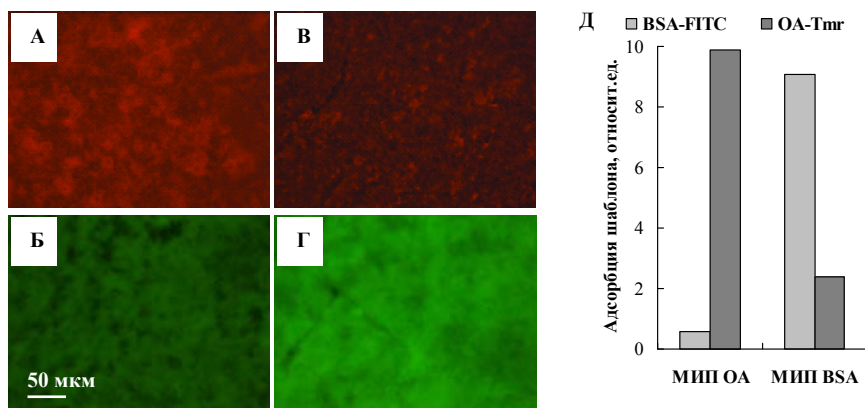


Рис. 15. Изображения, полученные с помощью флуоресцентной микроскопии, капроновых МИПов для яичного (А, Б) и бычьего сывороточного (В, Г) альбумина после этапа молекулярного распознавания в присутствии флуоресцентно меченных белков: BSA-FITC (А, В), ОА-Тmr (Б, Д). Относительная интенсивность флуоресценции (за вычетом неспецифического связывания с НИПом) полимеров (МИП-BSA, МИП-ОА) после связывания с BSA-FITC (светлые столбцы) и ОА-Тmr (темные столбцы) по оценки с помощью программы ImageJ (Д).

Визуализацию связывания белка с МИПом и НИПом, а также полимером, полученным в присутствии другого белка, осуществляли с помощью флуоресцентной микроскопии в индивидуальных системах и при добавлении смеси белков (рис. 15А-Г). Во всех случаях максимальную эффективность связывания регистрировали при взаимодействии меченого белка и соответствующего МИПа. Коэффициент селективности относительно НИПа составил 1.4 ± 0.1 для ОА и 1.8 ± 0.3 для BSA. Селективность МИПов при распознавании шаблона из смеси белков относительно конкурирующего белка, с учетом неспецифического связывания шаблона с НИПом, составила 16 и 4 для МИП BSA и ОА, соответственно (рис. 15Д).

В результате на данном этапе продемонстрирована возможность формирования структурированных капроновых носителей, способных к молекулярному распознаванию как низкомолекулярных шаблонов, так и высоко-

коорганизованных биополимеров. Универсальность предложенного подхода позволяет легко применить предложенную схему для приготовления МИПов к широкому спектру биомолекулярных шаблонов.

5. Заключение

Таким образом, в ходе данной работы исследованы различные этапы разработки подходов к анализу биомолекул. Высокая эффективность иммобилизации олигонуклеотидных зондов на твердотельный носитель, а также чувствительная и специфичная схема фермент-опосредованного выявления заданной последовательности ДНК позволила создать удобные системы анализа точечных мутаций.

Предложен простой и удобный подход к формированию капроновых МИПов, способных к специфичному связыванию различных молекул-шаблонов.

ВЫВОДЫ

1. Предложены новые подходы к повышению эффективности иммобилизации олигодезоксирибонуклеотидов на твердотельные носители различной природы, содержащие и не содержащие на поверхности химически активные группы.

➤ Показано, что в водных условиях эффективность ковалентной иммобилизации олигонуклеотидов на микрочастицы, несущие на поверхности химически активные остатки активированных эфиров, изотиоционатов, дихлортриазина и др., повышается от 3 до 40 раз при наличии в реакционной смеси катионных поверхностно активных веществ цетил- или додецил-триметиламмония бромидов в концентрациях от 0.8 до 22 мМ.

➤ Продемонстрировано, что введение в структуру олигонуклеотидов короткого концевой декатимидилатного домена значительно повышает эффективность их УФ-индуцированной иммобилизации на нейлоне-6 (капроне), а также их фермент-зависимого мечения при гетерофазном выявлении специфических последовательностей ДНК. Представлены данные, свидетельствующие о том, что амидные, а не алифатические аминогруппы в структуре капрона являются центрами УФ-индуцированной фиксации олигонуклеотидных зондов.

2. Исследовано накопление продуктов ограниченного удлинения (мечения) олигодезоксирибонуклеотидов с помощью *Taq* ДНК-полимеразы в составе комплексов с анализируемой ДНК в изотемпературных условиях (реакция минисеквенирования).

➤ Установлено, что наиболее эффективное накопление продукта такой реакции вне зависимости от её формата (гомофазная или гетерофазная) происходит при температуре, близкой к температуре плавления комплексов олигонуклеотидный зонд/ДНК и продукт/ДНК. Предложена кинетическая схема процесса мечения зонда при минисеквенировании ДНК, позволяющая проводить количественный анализ эффективности образования сиг-

нального продукта в зависимости от условий гибридизации, структуры зонда и продукта его ферментативного удлинения.

3. Предложены прототипы аналитических тест-систем для диагностики молекулярных маркеров белковой и нуклеотидной природы.

➤ Продемонстрирована перспективность использования эллипсометрического анализа для прямой (label-free) визуализации нативных белков и белок-белковых комплексов, иммобилизованных на поверхности кремниевых пластин в отсутствие или при наличии поверхностного монослоя наночастиц золота.

➤ Разработаны подходы к получению ДНК-чипов низкой плотности на основе капроновых мембран, несущих УФ-иммобилизованные олигонуклеотидные зонды. Предложены прототипы тест-систем для выявления и генотипирования вируса гепатита С с помощью реакции минисеквенирования ДНК и для анализа высоковариабельных участков ДНК на наличие значимых нуклеотидных замен, обуславливающих, например, лекарственную устойчивость ВИЧ-1, с помощью ферментативного лигирования олигонуклеотидов.

4. Предложен удобный оригинальный подход к получению молекулярно импринтированных полимеров (МИПов) на основе капрона, основанный на переводе полиамидных цепей из растворенного в твердотельное состояние в присутствии молекулы-шаблона. С использованием 2,2,2-трифторэтанола в качестве основного растворителя получены МИПы, проявляющие способность к специфическому связыванию различных низко- и высокомолекулярных шаблонов, в том числе нуклеотидной и белковой природы, с коэффициентами селективности от 1.4 до 4.6.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. Пышная И.А., Дмитриенко Е.В., Пышный Д.В. Способ получения ДНК-чипа // Патент РФ № 2340677, дата приоритета 07.05.2007.
2. Дмитриенко Е.В., Пышная И.А., Пышный Д.В. Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот с помощью олигонуклеотидных производных. I. Ковалентная иммобилизация олигонуклеотидных зондов на капроне // Биоорган. химия. – 2010. – Т. 36. – С. 700–713.
3. Дмитриенко Е.В., Хомякова Е.А., Пышная И.А., Брагин А.Г., Ведерников В.Е., Пышный Д.В. Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот с помощью олигонуклеотидных производных. II. Изотермическая амплификация сигнала при анализе ДНК методом минисеквенирования // Биоорган. химия. – 2010. – Т. 36. – С. 802–814.
4. Дмитриенко Е.В., Пышная И.А., Рогоза А.В., Пышный Д.В. Способ получения молекулярно-импринтированных полимеров // Патент РФ № 2385889, дата приоритета 25.08.2008.
5. Дмитриенко Е.В., Булушев Р.Д., Ломзов А.А., Косолобов С.С., Латышев А.В., Пышная И.А., Пышный Д.В. Наноструктурированные полимерные матрицы для селективного распознавания биомолекул // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2011. – Т. 9. – С. 100-108.
6. Дмитриенко Е.В., Булушев Р.Д., Пышная И.А., Пышный Д.В. Наноструктурированные полимерные матрицы для селективного распознавания биомолекул // Наука из первых рук. – 2011. – Т. 37. – С. 86-93.
7. Власов В.В., Синяков А.Н., Пышный Д.В., Рыхлицкий С.В. Дмитриенко Е.В. и др. всего 9 человек. Эллипсометрический мониторинг в микрочиповых label-free биотехнологиях // Автометрия. – 2011. – Т. 47. – С. 67-77.
8. Дмитриенко Е.В., Шопаева Г.А., Бейсембаева Ш.А., Пышная И.А., Зарытова В.Ф., Пышный Д.В. Способ диагностики вирусного гепатита С и определение генетического типа вируса // Патент Республики Казахстан № 22681, дата приоритета 19.05.2009.
9. Дмитриенко Е.В., Пышная И.А., Зарытова В.Ф., Пышный Д.В. Разработка новых подходов к параллельному анализу ДНК // Ученые записки СПбГМУ им. ак. Павлова. – 2008. – Т. 15. – С. 73-75.
10. Дмитриенко Е.В., Шопаева Г.А., Пышная И.А., Зарытова В.Ф., Пышный Д.В., Бейсембаева Ш.А. Анализ вируса гепатита С с использованием ДНК-биочипов // Терапевтический вестник. – 2010. – Т. 1. – С. 30-32.