

PACS: 81.70.FY; 87.85.FK
УДК 681.586 + 577.113

ФОРМУВАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ БІОСЕЛЕКТИВНОГО ЕЛЕМЕНТУ СЕНСОРА ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ ДЛЯ РОЗПІЗНАВАННЯ СПЕЦИФІЧНИХ ОЛІГОНУКЛЕОТИДНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

О. Е. Рачков, Ю. В. Холодова, М. В. Дибков, Г. Д. Телегеев, О. П. Солдаткін

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Київ 03680, вул. Заболотного, 150, тел. (044) 526-4397, факс (044) 526-0759,
e-mail: oleksandr_rachkov@yahoo.com

ФОРМУВАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ БІОСЕЛЕКТИВНОГО ЕЛЕМЕНТУ СЕНСОРА ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ ДЛЯ РОЗПІЗНАВАННЯ СПЕЦИФІЧНИХ ОЛІГОНУКЛЕОТИДНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

О. Е. Рачков, Ю. В. Холодова, М. В. Дибков, Г. Д. Телегеев, О. П. Солдаткін

Анотація. Біоселективний елемент сенсора поверхневого плазмонного резонансу (ППР) для розпізнавання олігонуклеотидних послідовностей, пов'язаних з гібридним геном *bcr-abl*, створено шляхом іммобілізації на сенсорній поверхні тіольованих одноланцюгових олігонуклеотидів та 6-меркапто-1-гексанолу. Олігонуклеотид з 24 основ, який репрезентує ділянку стикування гібридного гена і складається з однакових за довжиною фрагментів обох вихідних генів, був використаний як проба для іммобілізації на сенсорній поверхні. Відбір послідовності цього олігонуклеотиду базувався на GC складі та здатності до внутрішньо- та міжмолекулярних взаємодій, теоретично передбаченої за допомогою веб-сервера DINAMelt. Формування біоселективного елементу і наступні етапи гібридизації з комплементарними олігонуклеотидами контролювали в режимі реального часу, користуючись експериментальним макетом спектрометра "Плазмон ППР-4м", розробленого в Інституті фізики напівпровідників НАН України. Було показано, що тіольовані одноланцюгові олігонуклеотиди **mod-Ph** успішно іммобілізуються на золотій поверхні вимірювальної комірки спектрометра ППР у 0,5 М KH_2PO_4 (рН 3,8). Між іммобілізованими **mod-Ph** та комплементарними олігонуклеотидами **P1** відбувалася специфічна гібридизація, в той час як введення некомплементарних олігонуклеотидів сенсорного відгуку не викликали. Експериментальні сенсорні відгуки, отримані при взаємодіях досліджуваних олігонуклеотидів на сенсорній поверхні досить добре узгоджуються з теоретичними розрахунками термодинамічних параметрів цих взаємодій.

Ключові слова: поверхневий плазмонний резонанс, гібридизаційний ДНК-сенсор, біоселективний елемент, ген *bcr-abl*

FORMATION AND INVESTIGATIONS OF BIOSELECTIVE ELEMENT OF SURFACE PLASMON RESONANCE SENSOR FOR RECOGNITION OF SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE SEQUENCES

A. E. Rachkov, Yu. V. Holodova, M. V. Dybkov, G. D. Telegeev, A. P. Soldatkin

Abstract. A bioselective element of the surface plasmon resonance (SPR) sensor for recognition of oligonucleotide sequences related to the hybrid gene *bcr-abl* was prepared by immobilization of thiol-derivatized single-stranded oligonucleotides and 6-mercapto-1-hexanol on the sensor surface. The 24-mer oligonucleotide that represents a junction region of the hybrid gene and consists of equal fragments of both initial genes was used as a probe for immobilization on the sensor surface. Selection

of the oligonucleotide was based on GC content, and abilities to interact intra- and intermolecularly, which were theoretically predicted using web server DINAMelt. Formation of the bioselective element and subsequent stages of hybridization with complementary oligonucleotides were monitored in real time by the experimental prototype of the surface plasmon resonance spectrometer “Plasmon SPR-4m” developed by Ukrainian researchers. The thiol-derivatized single-stranded oligonucleotides **mod-Ph** are shown to be immobilized efficiently on a gold surface of the measuring cell of the SPR spectrometer in 0.5 M KH_2PO_4 (pH 3.8). Specific hybridization between immobilized **mod-Ph** and complementary oligonucleotides **P1** was demonstrated, whereas no sensor response was observed to non-complementary targets injection. The experimental sensor responses obtained at the interactions between the analysed oligonucleotides on the sensor surface are in good agreement with the theoretical calculations of thermodynamic parameters of these interactions.

Keywords: surface plasmon resonance, hybridization DNA sensor, bioselective element, *bcr-abl* gene

ФОРМИРОВАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЯ БИОСЕЛЕКТИВНОГО ЭЛЕМЕНТА СЕНСОРА ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА ДЛЯ РАСПОЗНАВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

А. Э. Рачков, Ю. В. Холодова, М. В. Дыбков, Г. Д. Телегеев, А. П. Солдаткин

Аннотация. Биоселективный элемент сенсора поверхностного плазмонного резонанса (ППР) для распознавания олигонуклеотидных последовательностей, относящихся к гибриднему гену *bcr-abl*, приготовлен путем иммобилизации на сенсорной поверхности тиолированных одноцепочечных олигонуклеотидов и 6-меркапто-1-гексанола. Олигонуклеотид из 24 оснований, представляющий участок стыковки гибридного гена и состоящий из равных по длине фрагментов обоих исходных генов, использовали в качестве пробы для иммобилизации на сенсорной поверхности. Выбор последовательности этого олигонуклеотида основывался на GC составе и способности к внутри- и межмолекулярным взаимодействиям, предсказанной теоретически с использованием веб-сервера DINAMelt. Формирование биоселективного элемента и последующие стадии гибридизации с комплементарными олигонуклеотидами контролировали в режиме реального времени, пользуясь экспериментальным макетом спектрометра “Плазмон ППР-4м”, разработанного украинскими исследователями. Как было показано, тиолированные одноцепочечные олигонуклеотиды **mod-Ph** успешно иммобилизуются на золотой поверхности измерительной ячейки спектрометра ППР в 0,5 М KH_2PO_4 (рН 3,8). Между иммобилизованными олигонуклеотидами **mod-Ph** и комплементарными к ним **P1** происходила специфическая гибридизация, в то время как введение некомплементарных олигонуклеотидов сенсорного отклика не вызывало. Экспериментальные сенсорные отклики, полученные при взаимодействиях исследуемых олигонуклеотидов на сенсорной поверхности, достаточно хорошо согласуются с теоретическими расчетами термодинамических параметров этих взаимодействий.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс, гибридизационный ДНК-сенсор, биоселективный элемент, ген *bcr-abl*

Вступ

В багатьох випадках такі неопластичні захворювання як лейкомії супроводжуються хромосомними транслокаціями. Результатом реципрокної транслокації між 9 та 22 хромосомами людини є утворення філадельфійської хромосоми (Ph' chromosome), названої

так за місцем її виявлення [1,2]. Така транслокація призводить до утворення гібридного гена *bcr-abl* і відповідного білку BCR-ABL, який і є головним фактором розвитку захворювання [3]. Своєчасна діагностика сприяє поліпшенню результатів терапевтичного втручання і підвищує якість життя даної категорії хворих.

Вирішення таких завдань потребує надійних методів детектування та відносно недорогих реагентів та обладнання. Молекулярною біологією розроблені численні методи аналізу відповідних послідовностей нуклеїнових кислот. В багатьох із них використовуються радіоактивні, флуоресцентні або інші молекулярні мітки. На жаль, поряд з позитивними рисами таким підходам притаманні і суттєві недоліки. Багатообіцяючою альтернативою таким методам є методичні прийоми, що не потребують молекулярних міток. До переваг прямого детектування взаємодій між біологічними молекулами можна назвати відсутність впливу (перешкод) з боку мітки, зменшення часу, трудових витрат і коштів на підготовку зразків до аналізу. Одним з таких підходів є використання явища поверхневого плазмонного резонансу (ППР) [4-6]. Аналітичні прилади, принцип дії яких базується на цьому явищі, розробляють в декількох країнах світу. Найбільш відомими, незважаючи на їхню високу вартість і досить великі розміри, є спектрометри ППР шведської фірми "Biacore International AB" (нещодавно вона стала підрозділом "GE Healthcare"). Експериментальний макет спектрометра ППР "Плазмон ППР-4м", розроблений в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України, не поступаючись закордонним аналогам в чутливості, вигідно відрізняється від них не тільки меншими розмірами та вартістю, а й ширшими можливостями для вибору умов та параметрів вимірювань. Принцип дії спектрометра ППР полягає у реєстрації змін діелектричних властивостей тонкого шару середовища (100-200 нм), що прилягає до робочої поверхні сенсорного чипа. Якщо на цій поверхні іммобілізувати одноланцюгові олігонуклеотиди обраної послідовності, то при наявності комплементарних послідовностей у зразку нуклеїнових кислот, який аналізується, на поверхні сенсорного чипа буде проходити процес гібридизації. Формування дволанцюгових структур ДНК має змінити діелектричні властивості поверхні сенсорного чипа і викликати відгук сенсора у режимі реального часу.

Іммобілізацію олігонуклеотидів на сенсорній поверхні можна здійснювати багатьма методами, наприклад, досить простим (але не дуже ефективним) методом фізичної сорбції та більш складними методами:

а) формування комплексу між попередньо

іммобілізованим на поверхні авідином (стрептавідином або екстравідином) та модифікованим біотином олігонуклеотидом-пробою [7,8];

б) непряме ковалентне приєднання олігонуклеотиду-проби до поверхні золота через попереднє формування моношару різноманітних сірковмісних молекул (наприклад, тіолів, сульфідів, дисульфідів) з відповідними функціональними групами (цим способом, наприклад, ковалентно приєднують олігонуклеотиди-проби до моношару 3-меркаптопропіонової кислоти або цистаміну, використовуючи N-гідроксисукцинімід та водорозчинний карбодіімід) [9,10];

в) пряме самозбирання модифікованих тіолом олігонуклеотидів-проб на поверхні золота [10 -12].

В даній роботі для формування біоселективного елементу оптичного біосенсора ми обрали саме пряму іммобілізацію тіольованих одноланцюгових олігонуклеотидів на золотій поверхні як один з найбільш надійних та ефективних підходів.

Метою нашої роботи було формування специфічного до нуклеотидної послідовності гена *bcr-abl* біоселективного елементу сенсора ППР та дослідження можливості його взаємодії з відносно короткими олігонуклеотидами різної послідовності.

Для досягнення цієї мети було потрібно: 1) вибрати фрагмент нуклеотидної послідовності гена *bcr-abl*, яку можна було б використати як пробу для формування біоселективного елементу біосенсора ППР, тобто як іммобілізований на сенсорній поверхні олігонуклеотид для ефективного розпізнавання комплементарних послідовностей нуклеїнових кислот; 2) іммобілізувати тіольовані одноланцюгові олігонуклеотиди обраної послідовності на сенсорній поверхні; 3) дослідити можливість багаторазового використання сформованого біоселективного елементу сенсора ППР; 4) порівняти сенсорні відгуки, викликані взаємодією біоселективного елементу з комплементарними, некомплементарними та частково комплементарними олігонуклеотидами.

Експериментальна частина

Реактиви. Тіольований на 5'-кінці одноланцюговий олігонуклеотид **mod-Ph** (5'-GCTGAAGGGCTTTTGAACCTCTGCT-3'), повністю комплементарний до **mod-Ph** олігонуклеотид

P1 (5'-AGCAGAGTTCAAAGCCCTTCAGC-3'), частково комлементарні олігонуклеотиди **BA190** (5'-ATGGAGACG-CAGAAGCCCTTCAGC-3') та **Brex14** (5'-CCACTGGATTAAAGCAGAGTTCAA-3') та некомплементарний олігонуклеотид **npt02** (5'-GATCTTCGTCCAGATCATCC-3') були синтезовані "Sigma-Genosys" (Німеччина). В роботі використовували 6-меркапто-1-гексанол та формамід ("Fluka", Швейцарія), цитрат натрію, сечовина, KH_2PO_4 , NaOH , NaCl , H_2O_2 , H_2SO_4 та HCl – реагенти вітчизняного виробництва, всі "х.ч." Для приготування розчинів використовували дейонізовану воду Milli Q (тип I, $R = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), отриману за допомогою установки "Simplicity Water Purification" ("Millipore", США).

Електрофоретичну перевірку чистоти і цілісності олігонуклеотидів проводили з використанням апарату для вертикального електрофорезу VE-10 ("Хелікон", Росія) та блоку живлення для електрофорезу "Ельф-4" ("ДНК-Технологія", Росія). Електрофорез олігонуклеотидів проходив у 20 %-ному поліакриламідному гелі (ПААГ) у денатуруючих умовах відповідно до методичних рекомендацій [13], а саме — використовували 45 мМ трис-боратний буфер (pH 8,2), який містив 1 мМ ЕДТА та 7 М сечовину; попередній електрофорез проводили протягом 40 хв при 150 В. Після цього наносили по 0,5-1,0 мкг олігонуклеотидів на доріжку. Сам електрофорез тривав 2-2,5 години при 400 В. Гелі фарбували 0,05 %-ним розчином метиленового синього.

Дослідження іммобілізації модифікованих олігонуклеотидів та їхньої гібридизації з іншими олігонуклеотидами проводили за допомогою експериментального макету спектрометра "Плазмон ППР-4м", розробленого в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України. Це контрольований комп'ютером оптично-електронний прилад, в якому використовується явище поверхневого плазмонного резонансу в оптичній конфігурації Кречмана. Золота плівка завтовшки 45 нм, що формує сенсорну поверхню, нанесена на скляну пластинку. У цій плівці поляризований промінь від напівпровідникового лазерного діода ($\lambda = 650\text{nm}$) збуджує коливання електронної плазми (поверхневий плазмон). Необхідні умови для збудження плазмону створюються спеціальною призмою, яка може обертається на

контрольований комп'ютером кут. Оптичний контакт між пластинкою та призмою забезпечує імерсія. Збудження плазмонних резонансних коливань реєструється приладом як різкий спад інтенсивності відбитого від межі розділу середовищ лазерного випромінювання. Графік залежності енергії відбитого світла від кута його падіння називається кривою ППР. В разі відсутності збудження поверхневого плазмону в діапазоні кутів падіння така крива ППР являє собою лінію, на якій відсутні чітко виражені екстремуми. При збудженні поверхневого плазмону на кривій ППР з'являється мінімум, положення якого на осі абсцис відображає стан електричної поляризованості робочої поверхні на даний момент. Зміни цього стану, наприклад, при іммобілізації макромолекул або їх комплексів на робочій поверхні викликають зсув мінімуму кривої ППР. Графік залежності положення мінімуму ППР кривої від часу називається сенсограмою.

Безпосередньо перед дослідом золоту поверхню скляної пластинки очищували інкубацією в суміші "піранья" (суміш 30%-ного перекису водню та концентрованої сірчаної кислоти у співвідношенні 1:3) протягом 2 хв., після чого багаторазово промивали дистильованою та дейонізованою водою і висушували на повітрі.

Пластинку встановлювали на призму приладу, використовуючи імерсію. Золота поверхня цієї пластинки слугувала дном вимірювальної комірки, стінки якої створювало кільце з силіконової гуми. Кришка з оргскла, що притискається, містила в собі отвори для з'єднання з вхідною та вихідною трубками, через які у комірку надходять робочий буферний розчин та дослідні зразки (Рис. 1). Швидкість потоку рідини (в основному 40 мкл/хв.) контролювали за допомогою перистальтичного насоса "Ismatec" ("Idex", Швейцарія).

На наступних стадіях досліду в робочу комірку вводили розчини різноманітних зразків в залежності від конкретної експериментальної задачі. Для коректної оцінки рівня взаємодії досліджуваного зразку з поверхнею або з попередньо іммобілізованим компонентом обов'язково після введення зразку промивали комірку тим самим розчином, що використовували до введення зразку. І тільки після такого промивання порівнювали величини відгуку ППР.

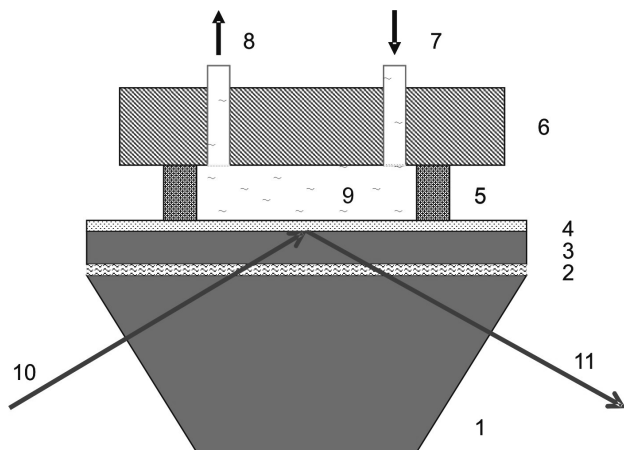


Рис. 1. Схема вимірювальної комірки у розрізі: 1 — скляна призма ($n = 1,61$); 2 — імерсія ($n = 1,61$); 3 — скляна пластинка ($n = 1,61$); 4 — шар золота, нанесений на скляну пластинку; 5 — бокові стінки вимірювальної комірки; 6 — кришка вимірювальної комірки, що містить отвори для входу (7) та виходу (8) розчинів; 9 — внутрішній об'єм вимірювальної комірки; 10 — промінь світла, що падає на сенсорну поверхню; 11 — промінь світла, що відбивається від сенсорної поверхні

Результати та обговорення

Як вже згадувалося, головним фактором розвитку Ph⁺-позитивних лейкозів є поява білків BCR-ABL [3]. Тому діагностика захворювання має базуватись не стільки на виявленні специфічних послідовностей у геномній ДНК, скільки на визначенні відповідних мРНК, що безпосередньо забезпечують синтез білків BCR-ABL. У нормі ген *bcr* знаходиться на 22 хромосомі людини і складається з 23 екзонів, а ген *abl* знаходиться на 9 хромосомі і складається з 11 екзонів. Розрив гена *abl* відбувається завжди в одній ділянці довжиною 300 кб. Ген *bcr* має три різні області, в яких можуть відбуватись розриви. В 95% випадків захворювань на хронічну мієлогенну лейкоз і 25-30% випадків захворювань на гострий лімфобластний лейкоз ген *bcr* має розрив в ділянці довжиною 5,8 кб, яку було названо M-*bcr* (major breakpoint cluster region) [14]. Цей фрагмент містить п'ять екзонів, які спочатку назвали b1-b5, що по іншій класифікації (з початку гена) відповідає ексонам e12-e16. Більшість розривів відбуваються в інтроні після екзона e14 (b3). В результаті перебудови e14a2 (b3a2) зріла мРНК BCR-ABL містить фрагмент гена *bcr*, що закінчується екзоном e14, і фрагмент гена *abl*, що починається з екзона a2. Ми обрали саме цю ділянку стику-

вання для детектування експресії гібридного гена *bcr-abl*.

Для ефективної гібридизації дуже важливим є вибір оптимальної довжини та послідовності олігонуклеотиду-проби і, відповідно, комплементарного олігонуклеотиду-мішені. В основі такого вибору можуть бути підходи, що широко використовують при підборі праймерів для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для ПЛР оптимальна довжина праймерів складає від 18 до 30 нуклеотидних основ. Теоретично олігонуклеотид з 18 основ являє собою унікальну послідовність (тобто таку, що не повторюється) для ДНК довжиною $4^{18} = 7 \times 10^{10}$ нуклеотидів і буде гібридуватися тільки в одному місці більшості еукаріотичних геномів [15]. Коротші праймери мають шанс знайти більше однієї комплементарної послідовності в геномі, тобто вони можуть виявитися неспецифічними. І навпаки, чим довшим є праймер, тим він більш специфічний. Але при цьому збільшується ймовірність утворення внутрішньомолекулярних вторинних структур (дволанцюгових фрагментів), що будуть заважати формуванню специфічних міжмолекулярних зв'язків. Крім того, треба враховувати і зростання витрат на синтез довгих олігонуклеотидів.

Для оптимізації вибору довжини олігонуклеотидів були проаналізовані послідовності ділянки стикування гібридного гена *bcr-abl*, що містили однакову кількість нуклеотидів обох вихідних генів, а саме від 9 до 15 (Таблиця 1).

Відомо, що між гуаніном (G) та цитозином (C) формуються три водневі зв'язки, в той час як між двома іншими основами аденіном (A) та тиміном (T) — тільки два. Таким чином, більш високий вміст G і C призводить до надійнішого розпізнавання комплементарних послідовностей. Як видно з Таблиці 1, олігонуклеотиди довжиною 22 основи і довші мають деяку перевагу в цьому відношенні.

За допомогою веб-сервера DINAMelt [16-18] були розраховані зміни вільної енергії Гіббса при утворенні внутрішньомолекулярних вторинних структур ділянками стикування гібридного гена *bcr-abl* різної довжини, відповідними комплементарними послідовностями, а також при гібридизації між ними (формуванні специфічних міжмолекулярних зв'язків). Як і очікувалося, величина зміни вільної енергії Гіббса при гібридизації відображає поступове посилення взаємодій при збільшенні довжини

нуклеотидної послідовності (Таблиця 2). При цьому приріст ΔG_{Hybr} при збільшенні довжини на кожні 2 основи спочатку зростає, досягає

максимального значення для олігонуклеотидів, що складаються з 22 та 24 основ, а потім починає зменшуватись.

Таблиця 1

Варіанти довжини та послідовності олігонуклеотиду-проби і комплементарного олігонуклеотиду-мішені

Довжина (кількість основ)	Послідовність проби	Послідовність мішені	GC, %
18	GAAGGGCTTTTGAACCTCT	AGAGTTCAAAAAGCCCTTC	44
20	TGAAGGGCTTTTGAACCTCTG	CAGAGTTCAAAAAGCCCTTCA	45
22	CTGAAGGGCTTTTGAACCTCTGC	GCAGAGTTCAAAAAGCCCTTCAG	50
24	GCTGAAGGGCTTTTGAACCTCTGCT	AGCAGAGTTCAAAAAGCCCTTCAGC	50
26	CGCTGAAGGGCTTTTGAACCTCTGCTT	AAGCAGAGTTCAAAAAGCCCTTCAGCG	50
28	CCGCTGAAGGGCTTTTGAACCTCTGCTTA	TAAGCAGAGTTCAAAAAGCCCTTCAGCGG	50
30	GCCGCTGAAGGGCTTTTGAACCTCTGCTTAA	TAAAGCAGAGTTCAAAAAGCCCTTCAGCGGC	50

Таблиця 2

Зміни вільної енергії Гіббса при формуванні внутрішньоланцюгових вторинних структур різними за розміром ділянками стикування гібридного гена *bcr-abl* різної довжини (ΔG_{Self} проби), відповідними послідовностями (ΔG_{Self} мішені), а також гібридизації між ними (ΔG_{Hybr}).

Довжина (кількість основ)	ΔG_{Self} проби (ккал/мол)	ΔG_{Self} мішені (ккал/мол)	ΔG_{Hybr} (ккал/мол)	Приріст ΔG_{Hybr} порівняно з олігонуклеотидами коротшими на 2 основи
16			-20.2	
18	0.52	0.73	-23.1	2.9
20	0.52	0.72	-26.5	3.4
22	0.04	0.37	-30.2	3.7
24	-0.97	-0.27	-33.9	3.7
26	-1.38	-0.27	-37.4	3.5
28	-1.38	-0.27	-40.6	3.2
30	-1.91	-1.44	-43.6	3.0

В умовах 0.165 M Na⁺, 0 M Mg⁺⁺ при 22°C.

Щодо формування внутрішньоланцюгових вторинних структур, то, по-перше, тільки починаючи з розміру 24 основи вони стають термодинамічно вигідними, а, по-друге, всі їхні значення ΔG_{Self} досить невеликі (для кожної довжини олігонуклеотидів вони в десятки разів менші відповідних значень ΔG_{Hybr}). Таким чином, можна зробити висновок, що первинна послідовність ділянки стикування гібридного гена *bcr-abl* в межах 18-30 нуклеотидів не сприяє формуванню стабільних внутрішньоланцюгових вторинних структур, в той час як міжланцюгова гібридизація має бути дуже ефективною. При цьому найбільше співвідношення $\Delta G_{Hybr}/\Delta G_{Self}$ спостерігається для олігонуклеотиду-проби довжиною 24 основи.

Враховуючи всі вище наведені параметри, олігонуклеотид GCTGAAGGGCTTTTGAACCTCTGCT довжиною 24 основи було обрано для формування біоселективного елементу біосенсора ППР. Для іммобілізації на поверхні золота його 5'-кінець через спейсер із 6 метиленових груп було модифіковано SH-групою. Згаданий спейсер застосовують для запобігання значним стеричним перешкодам під час гібридизації біля сенсорної поверхні. Такий модифікований олігонуклеотид було названо **mod-Ph**. Повністю комплементарний до **mod-Ph** олігонуклеотид AGCAGAGTTCAAAAAGCCCTTCAGC ми назвали **P1**. Крім цього були використані практично некомплементарний неспецифічний олігонуклеотид **npt02**, а також два частково комплементарних олігонуклеотида, один з яких (**BA190**) є комплементарним тільки до фрагмента **mod-Ph**, похідного від гена *abl*, а інший (**Bcrex14**) — тільки до фрагмента **mod-Ph**, похідного від гена *bcr*. На Рис. 2 представлено (отримані також за допомогою веб-сервера DINAMelt) найбільш ймовірні варіанти міжмолекулярних дволанцюгових структур, що формуються при гібридизації за участю вище згаданих олігонуклеотидів.

Від ефективності іммобілізації одностанцюгових олігонуклеотидів-проб в значній мірі залежить вся подальша робота гібридизаційного ДНК-біосенсора. Процес іммобілізації має привести до надійної фіксації олігонуклеотиду на робочій поверхні та забезпечити доступність змістовної послідовності проби для її взаємодії з комплементарними фрагментами нуклеїнових кислот, що містяться в дослідних зразках. Для іммобілізації тільованих олігонуклео-

тидів на поверхні золота часто використовують умови запропоновані Herne і Tarlov [11], а саме в розчині 1.0 М KH_2PO_4 (рН 3.8) протягом 120 хв. Вважається, що при низькій величині рН та високій йонній силі електростатичне відштовхування негативно заряджених ланцюгів ДНК мінімізується, що створює сприятливі умови для високої щільності іммобілізації тіольованих олігонуклеотидів на поверхні золота. З іншого боку, занадто висока щільність іммобілізованих

олігонуклеотидів може спричинити зниження швидкості та ефективності наступного процесу гібридації з комплементарними фрагментами нуклеїнових кислот (також негативно зарядженими) [19]. Тому, щоб запобігти занадто високій поверневій щільності, іммобілізацію 1 мкМ тіольованого олігонуклеотиду **mod-Ph** проводили у вдвічі менш концентрованому розчині для іммобілізації 0.5 М KH_2PO_4 (рН 3.8) протягом лише 60 хв. при кімнатній температурі.

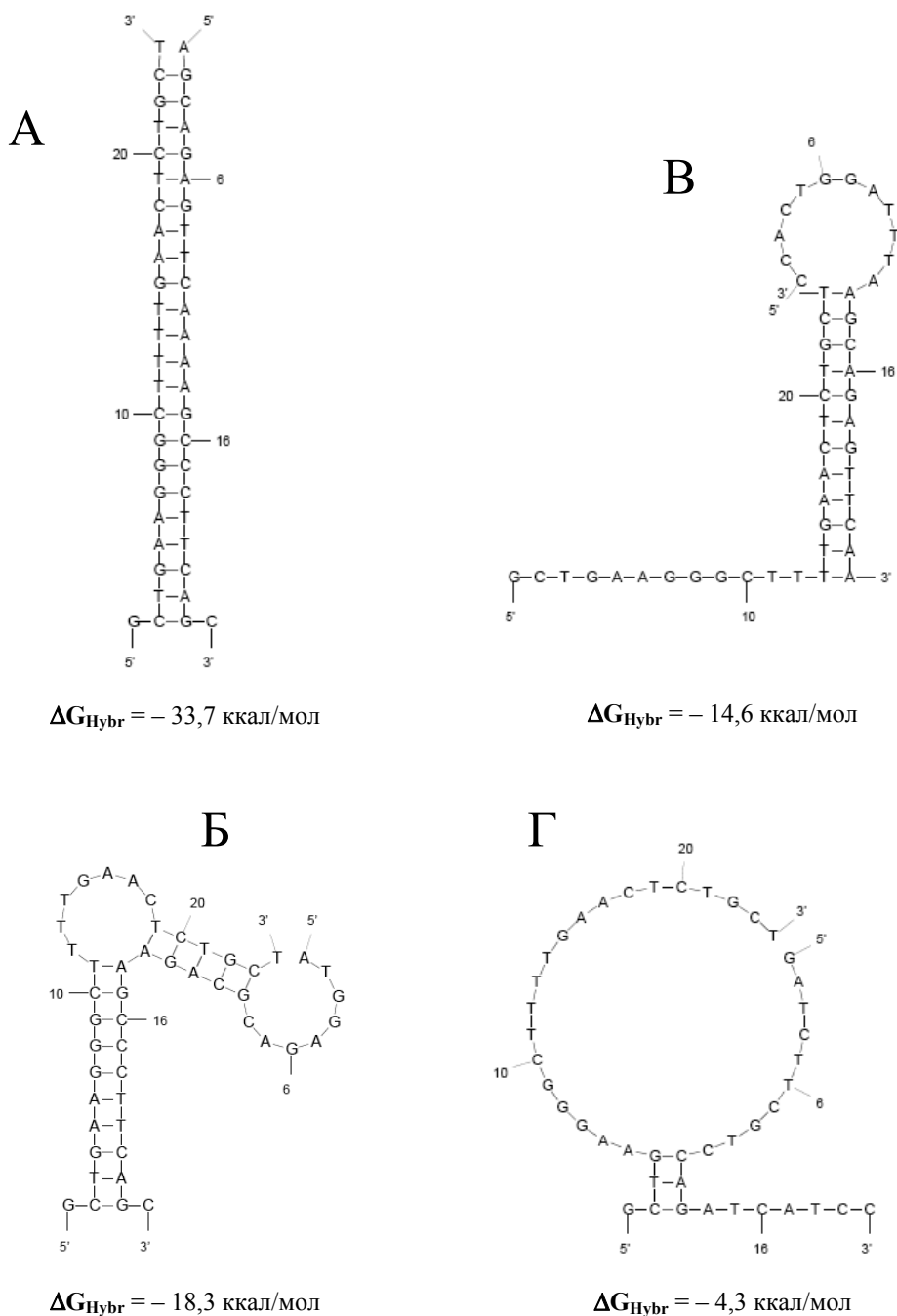


Рис. 2. Формування найбільш ймовірних міжмолекулярних дволанцюгових структур між пробою **mod-Ph**, та олігонуклеотидами-мішенями **P1** (А), **BA190** (Б), **Всrex14** (В) і **npt02** (Г) при гібридації між ними у розчині в умовах 0.165 М Na^+ , 0 М Mg^{++} при 22°C

Щоб слабо адсорбовані олігонуклеотиди і випадкові зміни коефіцієнту заломлення розчину не вплинули на кінцевий сенсорний відгук, визначали різницю між резонансним кутом, отриманим при пропусканні розчину для іммобілізації через вимірювальну комірку до введення **mod-Ph**, і стабільним його значенням, отриманим після інкубації і відмивання сенсорної поверхні тим самим розчином для іммобілізації. Типова величина такої різниці складала приблизно 0,2 кутових градуси, що відповідно до співвідношення між щільністю іммобілізації та сигналом ППР, наведеного в літературі [20], дорівнює приблизно 15×10^{12} молекул см^{-2} . Для порівняння можна навести значення поверхневої щільності іммобілізації одноланцюгових тіольованих олігонуклеотидів від $(1-10) \times 10^{12}$ [12] до 23×10^{12} молекул см^{-2} [21]. Отриманий нами високий показник, з одного боку, недвозначно свідчить про ефективність обраної нами методики іммобілізації, але з іншого боку, така висока щільність може негативно впливати на ефективність наступного процесу гібридизації [19].

Тіольовані олігонуклеотиди взаємодіють з поверхнею золота, головним чином, своїми SH-групами. При цьому формуються сульфідні комплекси золота і олігонуклеотиди надійно фіксуються на поверхні. Але не виключаються і фізичні взаємодії змістовної послідовності, наприклад між тимідинами та поверхнею золота [22], що можуть створити перешкоди для наступної гібридизації. Щоб зменшити ймовірність таких процесів провадять пасивацію поверхні, тобто блокування тих місць на поверхні золота, які залишилися вільними від тіольних груп олігонуклеотидів. Вважається, що після пасивації поверхня золота стає недоступною для неспецифічних взаємодій з різноманітними біомолекулами, а експонована в розчин змістовна послідовність іммобілізованих олігонуклеотидів, навпаки, стає більш доступною для подальшої гібридизації. Для цього використовують розчини відносно коротких тіолів, наприклад, 2-меркаптоетанолу [23], тіогликолевої кислоти [24] або 6-меркапто-1-гексанолу (МКГ) [11,25,26]. Саме обробку сенсорної поверхні 1 мМ розчином МКГ у воді протягом 30 хв після стадії іммобілізації одноланцюгових тіольованих олігонуклеотидів ми використовували для остаточного формування біоселективного елементу сенсора ППР.

Відомо, що швидкість, ефективність та специфічність гібридизації іммобілізованих одноланцюгових тіольованих олігонуклеотидів з комплементарними фрагментами нуклеїнових кислот залежить від температури, йонної сили, величини рН, хімічного складу середовища та деяких інших факторів. Наприклад, Herne and Tarlov [11] проводили гібридизацію в розчині, що містив 10 мМ Tris, 1 мМ EDTA, 1 М NaCl, при 24 °C протягом 90 хв. Інші автори досягали успішної гібридизації в 1 М NaCl протягом 14 год. [27], або в 50 мМ фосфатному буфері (рН 7.0), що містив 100 мМ K_2SO_4 [26], або в 10 мМ Tris (рН 7.3), що містив 50 мМ NaCl, протягом 1 год. [28]. Вибираючи умови проведення гібридизації з використанням сформованого біоселективного елементу сенсора ППР ми вважали, що сенсор повинен працювати при кімнатній температурі, а робочим буферним розчином має бути широко вживаний в молекулярно-біологічних лабораторіях буфер SSC, що містить цитрат і хлорид натрію. Зазвичай для створення сприятливих умов для гібридизації нуклеїнових кислот інкубацію проводять в $6 \times \text{SSC}$, а відмивання від неспецифічно адсорбованих фрагментів у $2 \times \text{SSC}$ [29]. В нашому випадку для мінімізації неспецифічних взаємодій і, відповідно, хибно позитивних сенсорних сигналів, а також, враховуючи методологічну необхідність використання того ж самого розчину як при гібридизації, так і під час відмивання, був застосований $1 \times \text{SSC}$ (15 мМ цитрат натрію, 150 мМ NaCl, рН 7.0). Для таких умов за допомогою веб-сервера DINAMelt були розраховані зміни вільної енергії Гіббса при гібридизації **mod-Ph** з олігонуклеотидами-мішенями **P1**, **Vcex14**, **BA190** та **npt02** і створені відповідні схеми формування найбільш ймовірних двоспиральних структур (Рис. 2).

Перед експериментами з гібридизації олігонуклеотидів на сенсорній поверхні спектрометра ППР їхні розміри та інтактність перевіряли за допомогою електрофорезу у 20 %-ному ПААГ у денатуруючих умовах. Всі препарати олігонуклеотидів виявилися гомогенними, при електрофоретичних перевірках їхні смуги на доріжках гелю розміщувалися відповідно молекулярній масі. Ні додаткових смуг, ні ознак деградації досліджуваних олігонуклеотидів не було виявлено.

Для отримання сенсорного відгуку при гібридизації у проточному режимі у вимірювальну

комірку вводили по 120 мкл 200 нМ розчинів досліджуваних олігонуклеотидів. Спочатку, щоб перевірити вплив неспецифічних взаємодій, вводили некомплементарні олігонуклеотиди **npt02**, які, як видно на сенсограмі (Рис. 3), не викликали ніякого сенсорного відгуку. А от при введенні комплементарного олігонуклеотиду **P1** відбувається значний зсув резонансного кута (більш ніж на 20 мград) і відмивання робочим буферним розчином практично не змінює цю величину. Це свідчить про сильну взаємодію між іммобілізованими олігонуклеотидами **mod-Ph** та **P1**, тобто про формування двоспіральних структур на поверхні сенсора ППР.

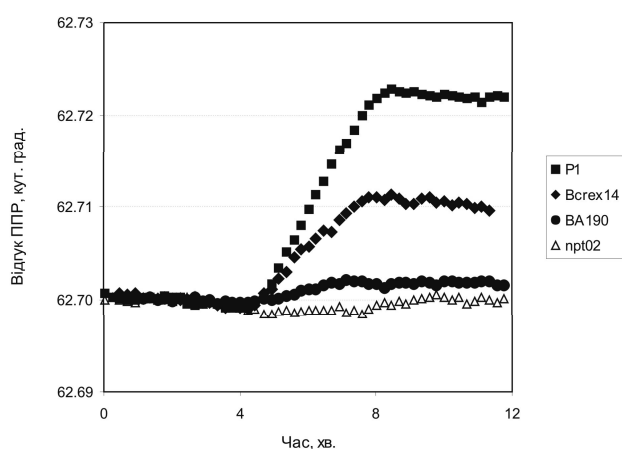


Рис. 3. Сенсограми типових відгуків ППР при введенні до вимірювальної комірки з біоселективним елементом біосенсора ППР на основі олігонуклеотиду **mod-Ph** досліджуваних олігонуклеотидів-мішеней **P1**, **Bcrex14**, **BA190** та **npt02**

Для того, щоб біоселективний елемент сенсора ППР можна було використати більше одного разу, необхідно вирішити проблему регенерації сенсорної поверхні, а саме навчитися проводити дегібридацію сформованих дволанцюгових структур так, щоб якнайдовше зберегти активність іммобілізованих на поверхні тілованих олігонуклеотидів. Відомо багато способів дегібридації дуплексів ДНК — це зміна температури або рН розчину, застосування різноманітних хаотропних агентів. На жаль застосування розчинів HCl, NaOH та формаміду не приводило до повної дегібридації або викликало швидку інактивацію біоселективного елементу сенсора ППР. Тільки обробка 8 М розчином сечовини повертала сигнал сенсора ППР до рівня, що спостерігали перед гібридацією, і, таким чином, дозволяла знову використовувати той самий біоселективний

елемент. При цьому досягалася непогана відтворюваність результатів. Так при введенні 7 зразків 200 нМ **P1** поспіль коефіцієнт варіації склав 5,1 %.

При введенні 200 нМ розчинів частково комплементарних олігонуклеотидів **Bcrex14** та **BA190** можна було також спостерігати появу сенсорного сигналу, але значно меншого, ніж у випадку повністю комплементарного олігонуклеотиду **P1**.

Таким чином, спочатку на основі теоретичних розрахунків ми обрали оптимальні послідовність та розмір олігонуклеотиду-проби, що відповідає ділянці стикування гібридного гена *bcr-abl*, потім шляхом іммобілізації тілованого олігонуклеотиду обраної послідовності в умовах, що дозволили отримувати досить високу його поверхневу щільність, та пасивацією сенсорної поверхні 1 мМ МКГ сформували біоселективний елемент сенсора ППР, за допомогою якого експериментально можна розпізнавати олігонуклеотиди різного ступеня комплементарності до іммобілізованого олігонуклеотиду **mod-Ph**. Слід зазначити, що отримані експериментальні дані досить добре узгоджуються з теоретичними розрахунками для взаємодій досліджуваних олігонуклеотидів у розчині, приведеними в Таблиці 2 та на Рис. 2. Деяко відрізняються від попередньо розрахованих результати стосовно частково комплементарного олігонуклеотиду **BA190**. Можливо це пояснюється тим, що на відміну від іншого частково комплементарного олігонуклеотиду **Bcrex14**, який гібридується з віддаленою від поверхні частиною іммобілізованого олігонуклеотиду **mod-Ph**, гібридація **BA190** відбувається з наближеною до поверхні частиною **mod-Ph**, тобто в менш сприятливих умовах. Подальші дослідження зможуть докладніше пояснити особливості гібридації досліджуваних олігонуклеотидів на поверхні біоселективного елементу сенсора ППР, що відкриє можливості для розробки оптичного біосенсора на основі явища ППР з метою його практичного застосування для виявлення Ph⁺-позитивних лейкоемій.

Подяка

Автори вдячні НАТО за фінансове сприяння розвитку наукових контактів з нашими зарубіжними партнерами — Collaborative Linkage Grant PDD(CP)-(CBP.NUKR.CLG 983025).

Список літератури

1. Nowell P.C. and Hungerford D.A., Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes // *J. Natl. Cancer Inst.* — 1960. — V.25, №1. — P. 85-109.
2. Rowley J.D., A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining // *Nature.* — 1973. — V.243, №5405. — P. 290-293.
3. Телегеев Г.Д., Дубровская А.Н., Дыбков М. В., Роль белка BCR/ABL в лейкогенезе // *Экспериментальная онкология.* — 1999. — Т.21, №3-4. — С. 182-194.
4. Liedberg B., Nylander C., Lundström I., Biosensing with surface plasmon resonance — how it all started // *Biosens. Bioelectron.* — 1995. — V.10, №1. — P. i-ix.
5. Myszka D.G., Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 1997. — V.8, №1. — P. 50-57.
6. Homola J., Present and future of surface plasmon resonance biosensors // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2003. — V.377, №3. — P. 528-539.
7. Kai E., Ikebukuro K., Hoshina S. et al., Detection of PCR products of *Escherichia coli* O157:H7 in human stool samples using surface plasmon resonance (SPR) // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* — 2000. — V.29, №4. — P. 283-288.
8. Mannelli I., Lecerf L., Guerrouache M. et al., DNA immobilisation procedures for surface plasmon resonance imaging (SPRI) based microarray systems // *Biosens. Bioelectron.* — 2007. — V.22, №6. — P. 803-809.
9. Nuzzo R.G. and Allara D.L., Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces // *J. Am. Chem. Soc.* — 1983. — V.105, №13. — P. 4481-4483.
10. Lucarelli F., Marrazza G., Turner A.P.F., et al., Carbon and gold electrode as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors // *Biosens. Bioelectron.* — 2004. — V.19, №6. — P. 515-530.
11. Herne T.M. and Tarlov M.J., Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces // *J. Am. Chem. Soc.* — 1997. — V.119, № 38. — P. 8916-8920.
12. Steel A.B., Herne T.M., Tarlov M.J., Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold // *Anal. Chem.* — 1998. — V.70, №22. — P. 4670-4677.
13. http://www.molbiol.ru/protocol/11_04.html
14. Groffen J., Stephenson J.R., Heisterkamp N. et al., Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22 // *Cell.* — 1984. — V.36, №1. — P. 93-99.
15. Sommer, R. and Tautz, D., Minimal homology requirements for PCR primers // *Nucleic Acids Res.* — 1989. — V.17, №16. — P. 6749.
16. <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/hybrid/>
17. Markham N. R. and Zuker M., DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction // *Nucleic Acids Res.* — 2005. — V.33, Web Server issue. — P. W577-W581.
18. Markham N. R. and Zuker M., UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization // *Bioinformatics*, Volume II. Structure, Functions and Applications, number 453 in *Methods in Molecular Biology.* - Humana Press, Totowa, NJ.: ed. by J. M Keith, — 2008. — P. 3-31.
19. Peterson A.W., Heaton R.J., Georgiadis R.M., The effect of surface probe density on DNA hybridization // *Nucleic Acids Res.* — 2001. — V.29, №24. — P. 5163-5168.
20. Su X., Wu Y.-J., Knoll W., Comparison of surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance techniques for studying DNA assembly and hybridization // *Biosens. Bioelectron.* — 2005. — V.21, №5. — P. 719-726.
21. Ge B., Huang Y.-C., Sen D. et al., Electrochemical investigation of DNA-modified surfaces: From quantitation methods to experimental conditions // *J. Electroanal. Chem.* — 2007. — V.602, №2. — P. 156-162.
22. Petrovykh D.Y., Kimura-Suda H., Whitman L.J. et al., Quantitative Analysis and Characterization of DNA Immobilized on Gold // *J. Am. Chem. Soc.* — 2003. — V.125, №17. — P. 5219-5226.
23. Fan C., Plaxco K.W., Heeger A.J., Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — V.100, №16. — P. 9134-9137.
24. Masuda T., Yamaguchi A., Hayashida M. et al., Visualization of DNA hybridization on gold thin film by utilizing the resistance effect of DNA monolayer // *Sensors Actuat. B.* — 2005. — V.105, №2. — P. 556-561.
25. Wang R., Tombelli S., Minunni M. et al., Immobilisation of DNA probes for the development of SPR-based sensing // *Biosens. Bioelectron.* — 2004. — V.20, №5. — P. 967-974.
26. Keighley S. D., Li P., Estrela P., Migliorato P., Optimization of DNA immobilization on gold electrodes for label-free detection by electrochemical impedance spectroscopy // *Biosens. Bioelectron.* — 2008. — V.23, №8. — P. 1291-1297.
27. Heaton R.J., Peterson A.W., Georgiadis R.M., Electrostatic surface plasmon resonance: Direct electric field-induced hybridization and denaturation in monolayer nucleic acid films and label-free discrimination of base mismatches // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2001. — V.98, №7. — P. 3701-3704.
28. Arinaga K., Rant U., Knežević J. et al., Controlling the surface density of DNA on gold by electrically induced desorption // *Biosens. Bioelectron.* — 2007. — V.23, №3. — P. 326-331.
29. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular cloning. A laboratory manual.* — Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2nd Ed., 1989.