

16+

ISSN 2304-4691

Актуальная биотехнология



№ 3(26)

2018

ISSN 2304-4691

**Основан в 2012г.
г. Воронеж**

Актуальная биотехнология

№ 3 (26)

2018

Учредитель ООО «Биоактуаль»



Главный редактор

Д.б.н., профессор О.С. Корнеева

Редакционный совет

Д.б.н., профессор Ф.К. Алимова
Д.т.н., профессор В.В. Бирюков
Д.т.н., профессор Л.А. Иванова
Д.б.н., профессор Л.П. Лазурина
Д.б.н., профессор Е.Г. Новосёлова
Д.х.н., профессор Т.В. Овчинникова
Д.т.н., профессор А.Н. Остриков
Д.б.н., профессор В.Н. Попов
Д.т.н., Член-Корр. РАСХН Л.В. Римарева

Ответственный редактор

К.т.н. А.А. Дерканосова

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций:

Свидетельство о регистрации ПИ № ФС77-62393 от 14 июля 2015 г.

Журнал «Актуальная биотехнология» выходит 4 раза в год:

№1 – март, №2 – июнь, №3 – сентябрь, №4 – декабрь

Подписной индекс издания в агентстве «Роспечать» 58012

По каталогу «Издания органов научно-технической информации» физические и юридические лица могут оформить подписку во всех отделениях почтовой связи Российской Федерации и странах СНГ и Балтии.

Адрес редакции и издательства

394026, г. Воронеж, пр-т Труда, д. 48, корп. 4, оф. 11

Адрес типографии

394036, Воронеж, пр. Революции, 19, а. 11

тел./факс: (473) 255-37-16

E-mail: actbio@mail.ru

Сдано в набор 10.09.2017. Подписано в печать 18.09.2017.

Дата выхода в свет: 20.09.2017

Формат 60×84 1/8

Усл. печ. л. 4,6. Тираж 1500 экз. Заказ ____

Цена - свободная.

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ДНК НА ОСНОВЕ ЛАТЕРАЛЬНОГО ПРОТОЧНОГО ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА

А.А. Филиппова, М.Ю. Рубцова, И.П. Андреева, Г.В. Преснова, М.М. Уляшова, А.М. Егоров

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Разработка методов обнаружения патогенных микроорганизмов является актуальной для клинической диагностики, обеспечения биобезопасности, контроля качества воды и продуктов питания. В последние годы активное внимание в этой области привлечено к развитию молекулярно-генетических методов (секвенирование, гибридационный анализ нуклеиновых кислот) [1–3]. Разработанные к настоящему времени методы определения генов являются многостадийными, достаточно длительными и требуют специального дорогостоящего оборудования. Для преодоления этих ограничений в последние годы начали развиваться методы латерального проточного анализа на тест-полосках для определения нуклеиновых кислот. Внимание к данной технологии объясняется ее экспрессностью (время анализа не превышает 20 мин), простотой выполнения анализа (все компоненты заранее вносятся на полоску) и регистрации его результатов (детекция с использованием недорогих сканеров, фотокамер, камер мобильных электронных устройств).

Принцип определения генов на тест-полоске основан на гибридизации исследуемой ДНК с иммобилизованным олигонуклеотидным зондом, структура которого комплементарна определенному участку ДНК-мишени. Для выявления образовавшихся дуплексов ДНК на носителе используются различные метки. Наиболее часто используемой меткой в латеральном проточном анализе являются наночастицы золота (НЧЗ). Они обладают оптическими свойствами и легко детектируются визуально или с помощью простых и недорогих лабораторных методов, стабильны в растворе или высушенной форме, легко сопрягаемы с биологическими материалами, благодаря чему являются наиболее предпочтительной меткой для латерального проточного анализа [4].

Принцип латерального проточного гибридационного анализа ДНК на тест-полоске представлен на Рис. 1. Тест-полоска состоит из нескольких мембранных носителей, которые перекрываются между собой. Это позволяет фронту жидкости свободно перетекать с одной мембраны на другую, сохраняя линейную форму движущегося фронта. Специфические распознающие молекулы, осуществляющие избирательное связывание нативных или меченых компонентов анализируемого образца, иммобилизуются на поверхности мембран [5].

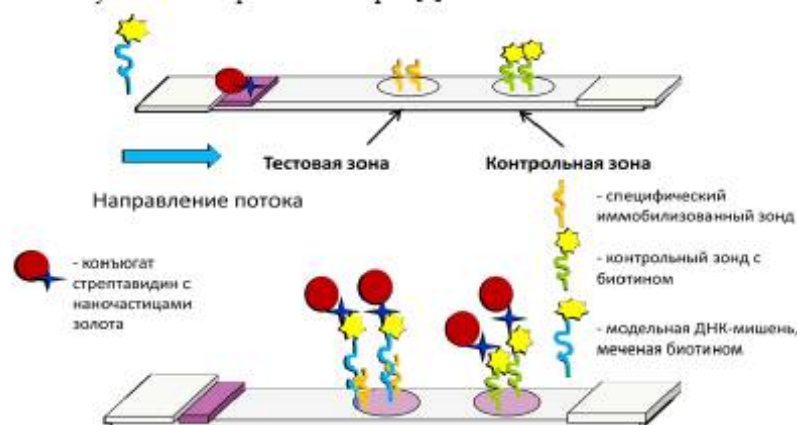


Рисунок 1 Общая схема проведения латерального проточного гибридационного анализа ДНК на тест-полоске

В тестовой зоне аналитической мембраны иммобилизуется специфический олигонуклеотидный зонд, в ДНК-мишень вводится метка – биотин. Для выявления образовавшихся на носителе дуплексов, меченных биотином, используется конъюгат стрептавидина с НЧЗ. ДНК-мишень, меченная биотином, вносится на полоску. При погружении конца тест-полоски в буферный раствор он начинает двигаться

вдоль полоски под действием капиллярных сил. При этом конъюгат стрептавидина с НЧЗ десорбируется и продвигается вместе с ДНК-мишенью вдоль полоски. Если ДНК-мишень содержит участок, комплементарный структуре иммобилизованного олигонуклеотидного зонда, в тестовой зоне образуются дуплексы ДНК, меченные биотином. Они взаимодействуют с конъюгатом стрептавидина с НЧЗ. В результате в месте образования дуплексов ДНК наблюдается окрашивание тестовой зоны. На тест-полоске также имеется контрольная зона с иммобилизованным контрольным олигонуклеотидным зондом, меченным биотином. Избыток несвязавшегося конъюгата движется далее вдоль мембраны и взаимодействует с контрольным зондом в контрольной зоне, которая также окрашивается.

Целью данной работы являлась оптимизация латерального проточного гибридационного анализа ДНК на модельной системе. В ходе работы решались следующие задачи: выбор компонентов тест-полоски и оптимизация условий проведения гибридационного анализа в проточном кинетическом режиме.

На первом этапе работы были получены НЧЗ методом Френса [6], основанном на восстановлении золотохлористоводородной кислоты HAuCl_4 (ЗХВК) питратом натрия. Этот метод позволяет получать гомогенные по составу НЧЗ заданного размера (от 8 до 40 нм) в зависимости от количества добавляемого восстановителя. Нами был получен образец золя НЧЗ. Размер частиц был определен по пику спектра поглощения коллоидного раствора, средний диаметр составил 25 нм. Размер полученных НЧЗ был подтвержден методом электронной сканирующей микроскопии (Рис. 2). Полученные наночастицы имеют сферическую форму и гомогенное распределение по размеру.

Конъюгат стрептавидина с НЧЗ получали методом адсорбции за счет взаимодействия отрицательно заряженных групп белковой глобулы с положительно заряженными наночастицами. Для получения стабильных конъюгатов были оптимизированы условия (рН раствора белка и соотношение концентраций белок/НЧЗ). Для блокирования незанятых белком свободных центров связывания на поверхности НЧЗ в конъюгат добавляли бычий сывороточный альбумин (БСА) до конечной концентрации 0,2 %. Избыток стрептавидина удаляли центрифугированием. Для предотвращения коагуляции НЧЗ в процессе центрифугирования, а также в процессе нанесения и высушивания конъюгата на стекловолоконной мембране в раствор добавляли сахарозу до конечной концентрации 10 %. Стабилизационный эффект сахарозы связан с дополнительной защитой гидратных оболочек вокруг НЧЗ за счет удержания молекул воды. Такой конъюгат хранится при +4°C минимум месяц и оставался стабильным.

Для разработки метода латерального проточного анализа были использованы синтетические олигонуклеотидные зонды длиной 19 оснований, имеющие комплементарную структуру. Первый был иммобилизован на поверхности тест-полоски. В его 5' конец была введена аминогруппа и ножка из 13 dTTP. Во второй зонд, который являлся ДНК-мишенью, был введен биотин на 5' конец.

Одним из ключевых этапов при разработке аналитического метода, основанного на проведении реакции в латеральном потоке, является выбор пористых мембранных носителей. Свойства полимера, из которого изготовлена мембрана, имеют определяющее значение для ее связывающих характеристик. Наиболее часто иммобилизацию биологически активных соединений проводят на пористых мембранах из нитрата целлюлозы [7]. В работе были исследованы три вида аналитических нитроцеллюлозных мембран фирмы MDI: CNPF (10 μ), CNPC (15 μ) и 150-CNPH-N, различающихся сорбционной емкостью, скоростью протекания капиллярного потока и размерами пор. На каждую из мембран наносили 0,5 мкл раствора специфического олигонуклеотидного зонда в концентрации 50 пмоль/мкл в PBS. Далее мембраны сушили при температуре 60 °C в течение 1 часа, собирали тест систему и пропускали раствор ДНК-мишени в концентрации 10 пмоль/мкл. После окрашивания проводили сканирование тест-полосок и анализировали полученные цифровые изображения с использованием программы ScionImage. Результаты представлены на Рис. 3. Самый высокий аналитический сигнал был получен для мембраны 150-CNPH-N. Среднее значение было получено для мембраны CNPF, самый низкий аналитический сигнал был получен для мембраны CNPC. Для дальнейших исследований в качестве оптимальной была выбрана аналитическая мембрана 150-CNPH-N с высокой сорбционной емкостью и самой низкой скоростью протекания жидкости (4 см/150 сек).

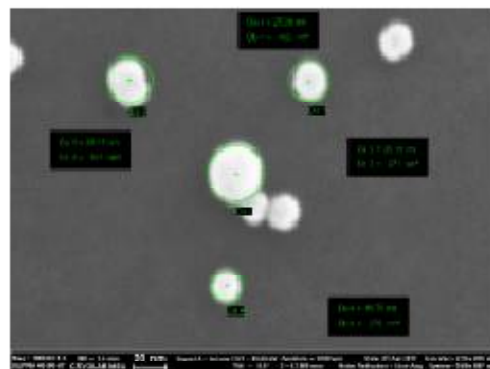


Рисунок 2 Изображение НЧЗ, полученное методом сканирующей электронной микроскопии

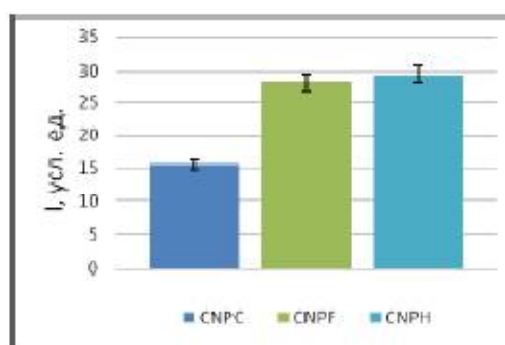


Рисунок 3 Интенсивность окрашивания тестовой зоны полоски для различных аналитических мембран (концентрация иммобилизованного зонда 50 пмоль/мкл, ДНК-мишени – 10 пмоль/мкл)

Особенностью латерального проточного анализа является его проведение в порах мембранного носителя при пропускании буферного раствора по тест-полоске. При этом образование биоспецифических комплексов (дуплексов ДНК) проходит в кинетическом (неравновесном) режиме. При оптимизации гибридационного проточного анализа необходимо учитывать свойства ДНК, которая является заряженным биополимером. Поэтому ее способность гибридизоваться с зондом при пропускании по носителю будет зависеть от конформации. Известно, что конформация ДНК в растворе зависит от ее структуры, наличия внутренних комплементарных фрагментов, молярности буфера, концентрации соли. Также известно, что конформация двухцепочечной ДНК является глобулярной, одноцепочечной – более вытянутой. Эти особенности необходимо было учитывать при разработке анализа.

Для оптимизации гибридационного анализа было необходимо подобрать буферный раствор, в котором конформация как ДНК-мишени, так и иммобилизованного зонда будет благоприятна для осуществления их гибридизации. Частичное разворачивание ДНК происходит при увеличении ионной силы буфера и добавлении неионогенных детергентов. Для латерального анализа состав буфера должен также обеспечить десорбцию конъюгата с НЧЗ и равномерное протекание компонентов вдоль всей полоски. Мы провели сравнительный анализ двух типов буферных растворов разной молярности (фосфатного и цитратного), каждый из которых содержал 0.1 % Tween 20.

Фосфатный буфер 1 (20 mM NaH_2PO_4 , 0.3 M NaCl, pH 7.4);

Фосфатный буфер 2 (20 mM NaH_2PO_4 , 2 mM ЭДТА, 0.3 M NaCl, pH 7.4);

Фосфатный буфер 3 (40 mM NaH_2PO_4 , 4 mM ЭДТА, 0.6 M NaCl, pH 7.4);

Цитратный буфер 1 (30 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 0.3 M NaCl, pH 7.0);

Цитратный буфер 2 (60 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 0.6 M NaCl, pH 7.0).

Результаты изучения влияния состава буфера на интенсивность окрашивания тестовой зоны полоски приведены на Рис. 4. Результаты показали, что при использовании цитратного буфера 2 интенсивность сигнала выше, поэтому в следующих экспериментах был использован именно этот буферный раствор (Рис. 4а).

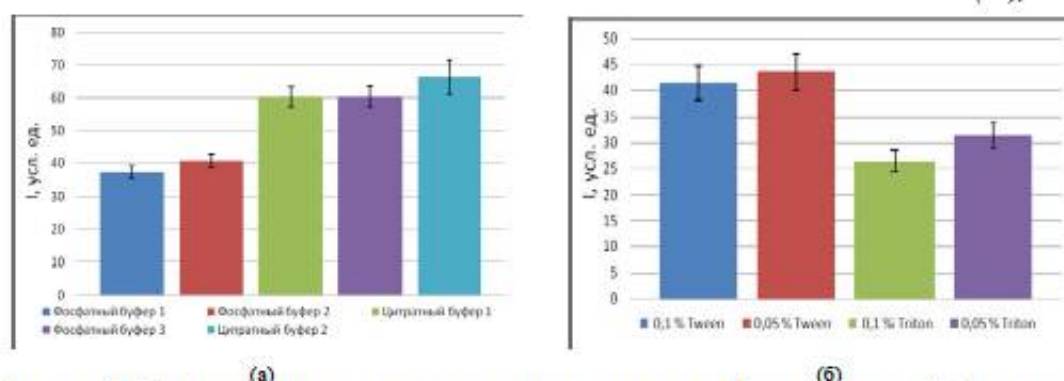


Рисунок 4 а) Зависимость интенсивности сигнала от состава буферной смеси. б) Зависимость интенсивности сигнала в тестовой зоне от концентрации Tween 20 и TritonX -100 (Цитратный буфер 2)

В цитратный буфер 2 (60 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$; 0,6 M NaCl) добавляли различные количества неионогенных детергентов Tween 20 (0,05 %, 0,1 %) и Triton X-100 (0,05 %, 0,1 %), улучшающие смачиваемость мембраны и снижающие неспецифические взаимодействия биополимеров (Рис. 4б). Во всех случаях наблюдали десорбцию конъюгата и прохождение растворов вдоль полоски с образованием окрашенных комплексов в тестовой зоне. Окрашивание было наиболее интенсивным при использовании Tween 20, при этом концентрация детергента в диапазоне 0,05–0,1 % не оказывала существенного влияния на результаты анализа. В дальнейших экспериментах использовали цитратный буфер 2, содержащий 0,1 % Tween 20.

В оптимизированных условиях проводили определение на тест-полоске модельной одноцепочечной ДНК-мишени длиной 19 оснований методом ЛПА. Полученная градуировочная кривая изображена на Рис. 5. Был рассчитан предел обнаружения, который составил $C_{\min} = 70 \pm 10$ фмоль/мкл. Коэффициент вариации составил 10–15 %. Время анализа на полоске составило 15–20 минут.

Разработанный нами метод превосходит по чувствительности методы, описанные в литературе, основанные на гибридизации ДНК на тест-полосках, в которых предел обнаружения составил 0,5 нмоль/мкл (ДНК-мишень 60 оснований) [8] и 40 пмоль/мкл (ДНК-мишень 21 основание) [9].

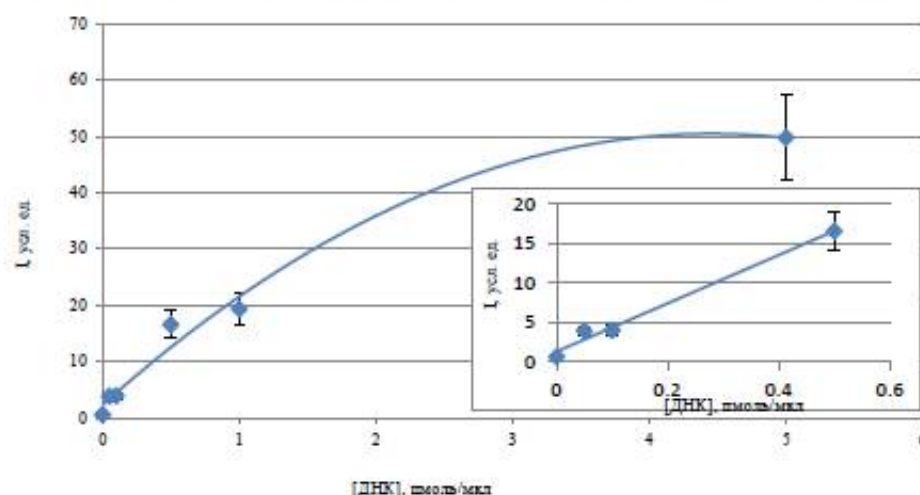


Рисунок 5 Градуировочная зависимость интенсивности окрашивания тестовой зоны от концентрации ДНК-мишени

Таким образом, нами был разработан метод лагериального проточного анализа ДНК, основанный на гибридизации ДНК-мишени с иммобилизованным олигонуклеотидным зондом, с использованием наночастиц золота в качестве метки. Данный метод характеризуется быстротой (время анализа 15–20 мин) и простотой (все компоненты заранее вносимы на полоску). Оптимизированы условия гибридизационного анализа ДНК на пористых мембранных носителях, включающие состав буферной смеси, тип аналитической мембраны, условия получения стабильного конъюгата стрептавидина с НЧЗ. Разработана тест-система для определения модельной однопепетивной ДНК длиной 19 оснований. Предел обнаружения составил 70 ± 10 фемтограмм/мл. Этот метод может найти свое применение в таких областях как здравоохранение, сельское хозяйство, контроль качества продуктов питания, охрана окружающей среды и т.д. Также в перспективе этот подход может быть реализован в формате мультанализа для одномоментного определения нескольких типов генов с использованием олигонуклеотидных зондов разной структуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Проект № 13-14-00014-П).

ЛИТЕРАТУРА

1. G.Y. Ang, C.Y. Yu, C.Y. Yeap Ambient temperature detection of PCR amplicons with a novel sequence-specific nucleic acid lateral flow biosensor // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2012. – Vol. 32. – P. 151–156.
2. J.R. Choi, J. Hu, R. Tang et al. An Integrated Paper-based Sample-to-Answer Biosensor for Nucleic Acid Testing at the Point of Care // *Lab on a Chip*. – 2015. – P. 1–25.
3. A.L. Chua, C.Y. Yeap, M. Ravichandran et al. A rapid DNA biosensor for the molecular diagnosis of infectious disease // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2011. – Vol. 26. – P. 3825–3831.
4. J. Singh, S. Sharma, S. Nara Evaluation of gold nanoparticle based lateral flow assays for diagnosis of enterobacteriaceae members in food and water // *Food Chemistry*. – 2015. – Vol. 170. – P. 470–483.
5. Raphael C. Wong, Harley Y. Tse // *Lateral Flow Immunoassay*. – 2009. P. 75–93.
6. Frein Controlled nucleation for regulation of particle-size in monodisperse gold suspensions // *Nature Phys. Sci.* – 1979. – Vol. 241. – P. 20–22. Fridley G., Holstein C., Oza S., Yager P. The evolution of nitrocellulose as a material for bioassays // *MRS Bulletin*. – 2013. – Vol. 38. – P. 326–330.
7. X. Mao, A. Gurung, H. Xu, M. Baloda, Y. He, G. Liu Simultaneous Detection of Nucleic Acid and Protein Using Gold Nanoparticles and Lateral Flow Device // *Anal. Sci.* – 2014. – Vol. 30, no. 6. – P. 637–642.
8. W. Qiu, H. Xu, S. Takalkar, A.S. Gurung, B. Liu, Y. Zheng, Z. Guo, M. Baloda, K. Baryeh, G. Liu Carbon nanotube-based lateral flow biosensor for sensitive and rapid detection of DNA sequence // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2013. – Vol. 44. – P. 507–512.

УДК 577.2:696

ИЗМЕНЕНИЕ ТИПА КАТАЛИЗА ФЕРМЕНТОВ МЕТОДОМ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА

С.С. Горина, Е.О. Смирнова, Я.Ю. Гончарова, Л.Ш. Мухтарова, А.Н. Гречкин

Казанский институт биохимии и биофизики, Казань, Россия

Сайт-направленный мутагенез (СНМ) отличается от спонтанного мутагенеза тем, что происходит направленное изменение в молекуле ДНК. Метод СНМ основан на использовании олигонуклеотидных праймеров, с помощью которых в ходе ПЦР вносятся изменения в конкретный участок клонированной последовательности ДНК. Этот метод позволяет изучать относительную важность определенной аминокислоты для структуры и функции белка.

Объект исследования – ферменты клана CYP74, принадлежащие к суперсемейству цитохромов P450. В состав клана CYP74 входят алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ), дивинилэфирсинтазы (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС). В то время как большинство цитохромов P450 являются монооксигеназами и требуют последовательной поставки двух электронов через различные типы окислительно-восстановительных белков, ферменты CYP74 катализируют превращение субстрата с помощью независимой внутримолекулярной системы переноса. И, следовательно, в них отсутствует необходимость в молекулярном кислороде и окислительно-восстановительном партнере для протекания реакции.

Целью исследования явилось установление детерминант катализа ферментов CYP74 методом сайт-направленного мутагенеза.

Ранее в ходе наших работ был охарактеризован ряд новых предшественников ферментов CYP74. Среди них первые 13-специфичные ДЭС (LuDES (*Limn. ustatisstium*), RaDES (*Ram. acis*), SmDES1 и SmDES2 (*Selaginella moellendorffii*) (Gorina S.S., et al. 2014, 2016)) предшественниками субстратами которых являются 13-гидроперекиси линолевой (13-ГПОД) и альфа-линоленовой (13-ГПОТ) кислот. Это отличает их от 9-специфичных ДЭС, которые утилизуют 9-гидроперекиси