



УДК 577.213:577.217

## ЭКСПРЕСС-ГИБРИДИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОЛОНИЙ С ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ ЗОНДАМИ

© 2007 г. Е. В. Четверина<sup>#</sup>, А. В. Кравченко, М. В. Фалалеева, А. Б. Четверин*Институт белка РАН, 142290, Пушкино Московской обл.*

Поступила в редакцию 30.06.2006 г. Принята к печати 03.10.2006 г.

Показано, что колонии ДНК, образованные при осуществлении ПЦР в полиакриламидном геле, а также колонии РНК, выросшие в агарозном геле, содержащем Q $\beta$ -репликазу, можно обнаружить с помощью процедуры, включающей перенос молекулярных колоний на нейлоновую мембрану и гибридизацию мембраны с флуоресцентно меченными олигонуклеотидными зондами. Предложенные усовершенствования делают процедуру гибридизации существенно проще и быстрее. На примере химерной последовательности AML1-ETO, являющейся маркером часто встречающегося лейкоза, показано, что метод экспресс-гибридизации молекулярных колоний позволяет быстро обнаруживать одиночные молекулы и определять титр ДНК- и РНК-мишеней. Гибридизация со смесью двух олигонуклеотидных зондов, меченных разными флуорофорами и комплементарных составным частям химерной молекулы, позволяет обнаруживать молекулярные колонии, содержащие обе части химерной последовательности, повышая таким образом специфичность диагностики.

*Ключевые слова:* молекулярная диагностика, метод молекулярных колоний, гибридизация на мембране, флуоресцентные зонды, лейкоз, химерные РНК-маркеры.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наибольшие чувствительность и надежность обнаружения нуклеиновых кислот (НК) достижимы с помощью ПЦР-версии метода молекулярных колоний (ММК) [1] – способа размножения отдельных молекул нуклеиновых кислот в иммобилизованных средах, таких, как гель. В иммобилизованной среде копии каждой размножаемой молекулы концентрируются вокруг родительской матрицы в виде сферической колонии [2, 3]. Если размножение осуществляется в тонком слое геля, то молекулярные колонии образуют двумерный рисунок, подобно колониям бактерий, выросших на поверхности питательного агара [4, 5].

По ряду параметров ММК превосходит способы, основанные на размножении НК в растворах [6]. Благодаря обнаружению молекул в виде счетных колоний, ММК делает анализ цифровым и позволяет производить прямой подсчет молекул. Благодаря пространственному разделению размножаемых молекул, ММК значительно снижает конкуренцию между мишенями при одновременном определении нескольких мишеней, а также помехи со стороны неспецифического синтеза,

вызванного ошибочной гибридизацией праймеров с посторонними НК. Ранее нами было показано, что одна молекула вирусной ДНК или две молекулы вирусной РНК могут быть надежно обнаружены в 100 мкл цельной крови, содержащих в триллион раз большее количество ДНК человека [7, 8], что является абсолютным рекордом чувствительности. Для сравнения, нижний предел обнаружения в биологических образцах ДНК вируса натуральной оспы с помощью жидкостной ПЦР в реальном времени составляет около 500 молекул [9].

Однако колонии НК невидимы, а существующие способы их обнаружения имеют существенные недостатки, что препятствует применению ММК в качестве инструмента диагностики. Способы, использующие окрашивание колоний флуоресцентными интеркалирующими красителями, такими, как этидиумбромид [4, 5] или SYBR Green I [10], а также включение радиоактивно меченных нуклеотидов [5], являются неспецифическими: они выявляют колонии, образованные как мишенью (анализируемой ДНК или РНК), так и посторонними НК. Специфически выявить колонии, образованные мишенью, можно посредством гибридизации с олигонуклеотидными зондами, комплементарными внутреннему участку мишени.

До настоящего времени было предложено два способа обнаружения колоний, использующих мишень-специфичные зонды. В одном из них колонии переносят на нейлоновую мембрану, которую затем гибридизуют с радиоактивно меченными зондами [5, 7, 11]. Недостатками этого способа

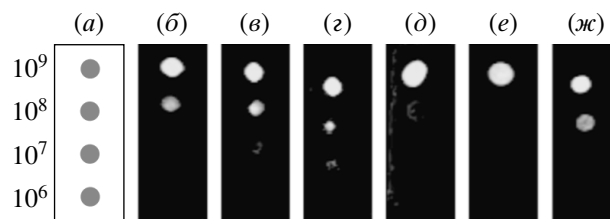
Сокращения: Q $\beta$ -репликаза – РНК-зависимая РНК-полимераза бактериофага Q $\beta$ ; AML1-ETO – химерная последовательность, состоящая из частей генов AML1 и ETO; ММК – метод молекулярных колоний; НК – нуклеиновые кислоты.

<sup>#</sup> Автор для связи (тел.: (4967) 73-89-17; факс: (495) 632-78-71; эл. почта: helena@vega.protres.ru).

являются необходимость использования короткоживущих радиоактивных изотопов ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$  или  $^{35}\text{S}$ ) и большая длительность процедуры получения радиоавтографа, часто более суток. В другом способе колонии гибридизуют *in situ* (в геле, где они были выращены) с флуоресцентными зондами или с немечеными олигонуклеотидными зондами, которые затем метят путем конечного включения флуоресцентных нуклеотидов [12]. Благодаря использованию флуоресцентных меток отпадает необходимость использования радиоактивных материалов, и время получения изображения сокращается до нескольких минут, однако осуществление гибридизации в геле существенно усложняет и удорожает процедуру, так как размноженные НК необходимо ковалентно иммобилизовать на матриксе геля (с этой целью иммобилизуют используемые для размножения олигонуклеотидные праймеры), а также необходимо удалять из геля одну из комплементарных цепей размноженной мишени (для чего используют расшиваемый гель и после размножения осуществляют частичную расшивку с целью облегчения диффузии нуклеиновых кислот). Кроме того, при гибридизации в геле мишени оказываются менее доступными для зондов, и удаление негибридизованных зондов из геля происходит медленнее, чем при гибридизации на мембране.

Решением проблемы могла бы стать гибридизация с флуоресцентными зондами на нейлоновых мембранах, однако из литературных данных можно было сделать вывод, что это маловероятно из-за слишком низкого содержания НК в колонии и слишком высокого уровня фоновой флуоресценции мембран. По оценкам разных лабораторий, в одной колонии диаметром 0,2–0,5 мм, образующейся при осуществлении ПЦР в геле, содержится около  $10^8$  молекул ДНК [7, 10]. При блоттинге на мембрану переносится около 10% [13], то есть  $10^7$  молекул или  $\approx 10^{-17}$  моль ДНК. Ранее неоднократно было заявлено, что обнаружить такие количества иммобилизованных на нейлоновой мембране нуклеиновых кислот посредством гибридизации с флуоресцентными зондами невозможно из-за высокой собственной флуоресценции нейлона [14–18].

Для преодоления этой проблемы было предложено использовать мембраны из материала с меньшим уровнем собственной флуоресценции, например, из полипропилена, полиэтилена или политетрафторэтилена [14]. Однако это не позволило повысить чувствительность детекции из-за низкой эффективности иммобилизации мишени на таких мембранах [15]. Поэтому для гибридизации наиболее часто применяют нейлоновые мембраны как идеально подходящие для иммобилизации НК и обладающие превосходными механическими свойствами, но вместо флуоресцентных зондов применяют более чувствительные системы детекции. Например, используют биотинилированные зонды, взаимодействующие с конъюгатом стрепта-



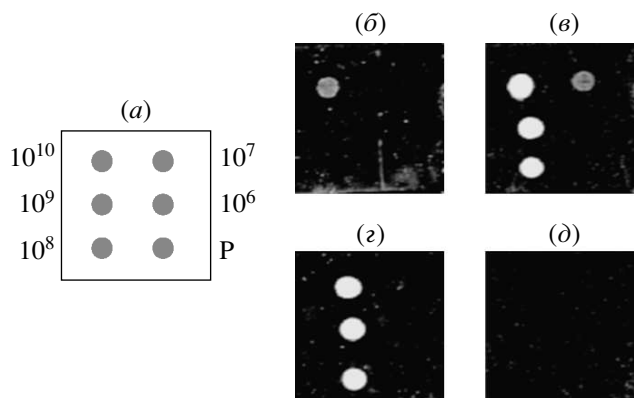
**Рис. 1.** Чувствительность детекции на нейлоновых мембранах флуоресцентного зонда, меченного флуорофором Cy5. Изображения получены в результате сканирования с использованием красного лазера (633 нм) и эмиссионного фильтра 670 нм для регистрации флуоресценции Cy5. Указано число молекул олигодезоксинуклеотида Cy5-AML, нанесенного, как показано на схеме *a*, на нейлоновые мембраны Hybond-N (*b*), Hybond-N+ (*c*) и Hybond-XL (*d*), Nytran (*e*), а также Biotrans (*f*) и Biotrans+ (*g*).

видина и щелочной фосфатазы, и субстрат, который под действием фосфатазы превращается во флуоресцирующий продукт, адсорбирующийся на мембране. Таким образом, в месте гибридизации каждой молекулы зонда образуется множество флуоресцирующих молекул, то есть происходит многократное усиление сигнала [15]. В работе [16] предложен аналогичный способ, отличающийся тем, что вместо флуоресценции используют хемилюминесценцию. Такое сопряжение с ферментативной реакцией позволяет увеличить чувствительность детекции до 10 амоль мишени [15, 16], что достаточно для обнаружения молекулярных колоний, однако многократно увеличивает сложность и стоимость диагностики. То же самое можно сказать и о способе, использующем биотинилированный зонд и конъюгат стрептавидина с фикоэритрином [17] – белком, интенсивность флуоресценции которого в 30–100 раз выше, чем интенсивность флуоресценции низкомолекулярных флуорофоров, используемых при изготовлении флуоресцентных зондов [19].

В данной работе мы демонстрируем, что молекулярные колонии можно легко обнаружить посредством гибридизации на нейлоновых мембранах с обычными флуоресцентными зондами. Нам также удалось существенно упростить и сократить процедуру гибридизации с олигонуклеотидными зондами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведены результаты наших экспериментов, проведенных с целью определения нижнего предела чувствительности детекции флуоресцентных зондов на нейлоновых мембранах разного типа и разных производителей. Различные количества олигодезоксинуклеотида, меченного цианиновым красителем Cy5 (флуоресцирующим в красной области спектра), наносили на мембраны в виде точек. Флуоресцентные изображения мембран получали на сканере микрочипов в условиях, оптимальных для детекции



**Рис. 2.** Избирательность детекции флуоресценции флуорофоров Cy3 и Cy5. Указано число молекул олигонуклеотида Cy5-AML1 (*б, в*) или Cy3-ЕТО (*з, д*), нанесенного, как показано на схеме *а*, на две мембраны Hybond-N+ (пятно "Р" содержит только растворитель). Изображения получены в результате сканирования мембран с использованием зеленого лазера (543 нм) и эмиссионного фильтра 570 нм для регистрации флуоресценции Cy3 (*б, з*), а также красного лазера (633 нм) и эмиссионного фильтра 670 нм для регистрации флуоресценции Cy5 (*в, д*).

флуоресценции Cy5. Оказалось, что чувствительность детекции практически не зависит от производителя мембран и что максимальная чувствительность ( $10^7$  молекул) наблюдается при использовании мембран, несущих положительный заряд, – Hybond-N+, Hybond-XL и Biotrans(+). По-видимому, более высокая чувствительность детекции на положительно заряженных мембранах является следствием того, что в этом случае образец (олигонуклеотидный зонд) меньше расплывается при нанесении на мембрану. В дальнейших экспериментах использовали мембрану Hybond-N+.

Почти такая же чувствительность наблюдается при детекции зонда, меченного другим цианиновым красителем (Cy3), флуоресцирующим в желто-зеленой области, и с использованием подходящих значений длины волны возбуждающего и регистрируемого света можно избирательно наблюдать флуоресценцию каждого из этих красителей (рис. 2).

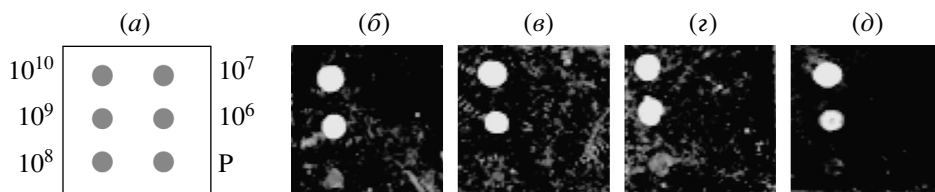
Установленная в вышеприведенных экспериментах чувствительность детекции флуоресцентного зонда на нейлоновой мембране оказалась неожиданно высокой в свете литературных данных, а минимальное детектируемое количество зонда оказалось приблизительно равным количеству ДНК, переносимой из одной колонии на мембрану. Однако даже такой чувствительности могло оказаться недостаточно для обнаружения молекулярных колоний, если эффективность гибридизации зонда, тем более на мембране (а не в растворе) и тем более с продуктом ПЦР (двукратной ДНК), существенно ниже 100%. Поэтому мы попытались выяснить, можно ли оптимизировать условия гибридизации. Эксперименты проводили,

используя мембраны, на которые были нанесены известные количества плазмидной ДНК, несущей фрагмент κДНК химерной мРНК AML1-ЕТО, являющейся маркером лейкоза, ассоциированного с хромосомной транслокацией  $t(8;21)(q22;q22)$  [20]. В качестве зонда использовали Cy5-меченный олигонуклеотид, комплементарный AML1-части химерной последовательности.

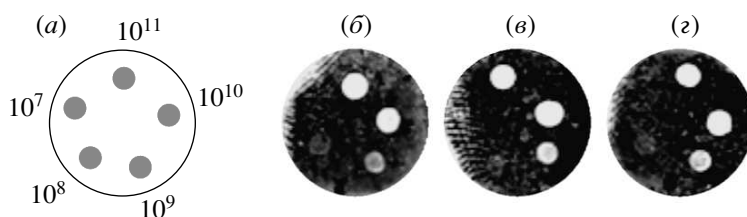
Проведенные эксперименты показали, что изменение условий по сравнению с опубликованными методами не приводит к увеличению выхода гибридизации или улучшению соотношения сигнал/фон. В то же время удалось существенно упростить и ускорить процедуру гибридизации. Оказалось, что время гибридизации можно сократить, по крайней мере, до 15 мин; гибридизация в течение 4 (как рекомендовано в работах [15, 16]) или 16 ч (как рекомендовано в работах [14, 17]) не приводит к увеличению флуоресцентного сигнала (рис. 3). Отмывку негибридизованного зонда можно также осуществлять при комнатной температуре; при этом уровень фоновой флуоресценции оказывается не выше, чем когда отмывку осуществляют при 40°C (рис. 4). Далее оказалось, что если зонд вообще не отмывать, то, хотя абсолютный уровень фоновой флуоресценции возрастает, соотношение сигнал/фон ухудшается незначительно. Наилучшего соотношения сигнал/фон удается добиться уже при однократной промывке мембраны в течение 5 мин. Присутствие на мембране больших количеств посторонних НК не сказывается на результате; это указывает на то, что в найденных условиях гибридизация происходит достаточно специфично (рис. 5).

Результаты экспериментов показывают, что в оптимальных условиях гибридизации удается обнаружить не более  $10^8$  молекул специфичной ДНК, нанесенной на мембрану в виде пятна, по размеру близкого молекулярной колонии. Это на порядок больше, чем ожидаемое количество ДНК, переносимое на мембрану из одной ПЦР-колонии с помощью блоттинга (см. выше). Поэтому неожиданным стало наблюдение, что молекулярные колонии можно обнаружить посредством гибридизации на нейлоновой мембране с олигонуклеотидными зондами, мечеными как Cy5, так и Cy3 (рис. 6). Судя по тому, что число колоний совпадает в пределах статистического разброса с числом молекул ДНК, введенных в гель до начала ПЦР (рис. 6а), можно заключить, что выявляются все колонии ДНК. Молекулы РНК выявляются с эффективностью около 50% (рис. 6б), что совпадает с результатом, полученным при использовании вирусных мишеней и радиоактивно меченных зондов [8]. На рис. 6в видно, что такую же процедуру можно использовать для обнаружения колоний РНК, выращенных с помощью Qβ-репликазы.

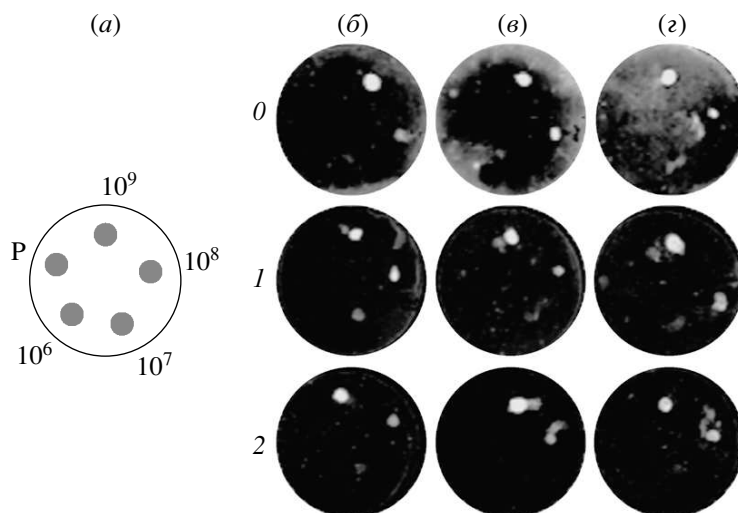
Полученные результаты указывают на то, что посредством гибридизации с флуоресцентными зондами на нейлоновой мембране можно обнаруживать порядка  $10^7$  молекул ДНК моле-



**Рис. 3.** Эффективность выявления ДНК-мишени в зависимости от продолжительности гибридизации. Указанное число молекул плазмиды pTZ-AML-ЕТО нанесли, как показано на схеме *a*, на 4 мембраны Hybond-N+ (пятно “P” содержит только растворитель), после чего мембраны гибридизовали с зондом Су5-AML при 50°C в течение 15 мин (*б*), 1 (*в*), 4 (*г*) или 16 ч (*д*), негибридизованный зонд отмывали (дважды в течение 10 мин при комнатной температуре и третий раз при 40°C) и мембраны сканировали, используя красный лазер (633 нм) и эмиссионный фильтр 670 нм для регистрации флуоресценции Су5.



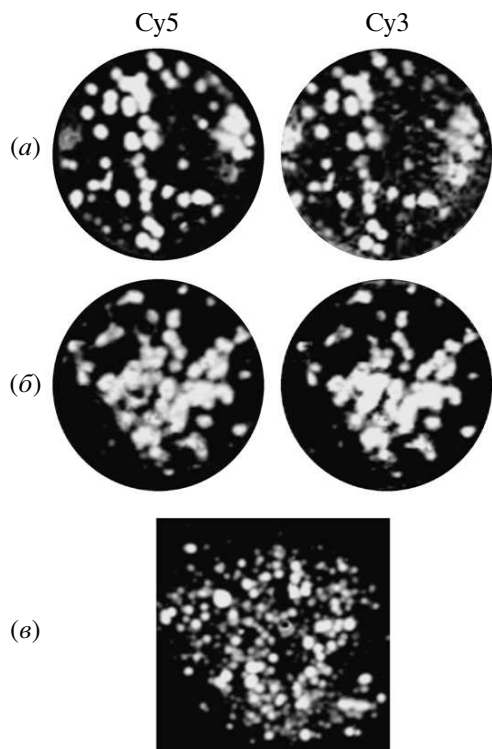
**Рис. 4.** Зависимость результата гибридизации от температурного режима отмывки негибридизованного зонда. Указанное число молекул плазмиды нанесли, как показано на схеме *a*, на 3 мембраны Hybond-N+, после чего мембраны гибридизовали с Су5-меченным зондом при 50°C в течение 15 мин и отмывали дважды в течение 10 мин при комнатной температуре (24°C), а третий раз – при комнатной температуре (*б*), 35°C (*в*) или 40°C (*г*), и затем сканировали, используя красный лазер (633 нм) и эмиссионный фильтр 670 нм для регистрации флуоресценции Су5.



**Рис. 5.** Гибридизация флуоресцентного зонда в присутствии неспецифических НК. Указанное число молекул плазмиды нанесли, как показано на схеме *a*, на 3 сухих образца ПААГ, которые затем пропитали ПЦР-смесью, либо не содержащей НК (*б*), либо содержащей  $\approx 0.5$  мкг РНК (*в*) или  $\approx 2$  мкг суммарных НК (*г*), выделенных из цельной крови человека, после чего НК перенесли на мембраны Hybond-N+ с помощью блоттинга. Мембраны гибридизовали с Су5-меченным зондом при 50°C в течение 15 мин и либо не отмывали (ряд 0), либо отмывали от негибридизованного зонда один раз (ряд 1) или два раза (ряд 2) в течение 5 мин при комнатной температуре (24°C), и затем сканировали, используя красный лазер (633 нм) и эмиссионный фильтр 670 нм для регистрации флуоресценции Су5.

кулярных колоний, то есть значительно меньшее количество, чем можно было ожидать, исходя из литературных данных и из результатов предварительных экспериментов (см. выше). Вероятно, локальные условия в молекулярной ко-

лонии, влияющие на соотношение сигнал/фон и квантовый выход флуоресценции, оказываются иными и более благоприятными, чем при детекции ДНК, непосредственно нанесенной на мембрану.



**Рис. 6.** Обнаружение посредством гибридизации на мембране с флуоресцентными зондами молекулярных колоний, полученных путем размножения ДНК в ПААГ при помощи ПЦР (а, б), либо путем размножения РНК в агарозном геле при помощи Q $\beta$ -репликазы (в). Матрицами служили 50 молекул плазмиды рTZ-AML-ETO (а), продукт обратной транскрипции 100 молекул РНК AML-ETO (б) или рекомбинантные РНК, образованные при посеве на гель, содержащий Q $\beta$ -репликазу и рибонуклеозид-5'-трифосфаты, отожженной смеси  $10^5$  молекул 5'-фрагмента и  $10^5$  молекул 3'-фрагмента RQ135 [11] (в). НК переносили на мембраны Hybond-N+, а затем гибридизовали со смесью олигодезоксинуклеотидов Cy5-AML и Cy3-ETO и регистрировали флуоресценцию Cy5 и Cy3 (а, б), или гибридизовали с олигодезоксинуклеотидом Cy5-Ном и регистрировали флуоресценцию Cy5 (в).

Какова бы ни была природа наблюдаемых эффектов, полученные результаты показывают, что для детекции молекулярных колоний можно применять обычные флуоресцентные зонды вместо более дорогостоящих и менее стабильных систем, использующих флуоресцирующие белки или ферментативные способы усиления сигнала. Установленная в этой работе чувствительность флуоресцентных зондов такова, что ее достаточно для детекции молекулярных колоний, полученных с помощью любых иных праймерзависимых систем экспоненциального размножения нуклеиновых кислот, в том числе 3SR (Self-Sustained Sequence Replication [21]), SDA (Strand Displacement Amplification [22]), NASBA (nucleic acid sequence-based amplification [23]), RCA (rolling circle amplification [24, 25]) и LAMP (loop-mediated isothermal DNA amplification [26]), так как во всех

этих случаях коэффициент размножения (число копий, которые могут быть сделаны с одной молекулы мишени) превышает  $10^7$ .

Рис. 6 (а, б) также демонстрирует, что мембрану можно гибридизовать со смесью флуоресцентных зондов и получать информацию отдельно о гибридизации каждого из зондов при условии, что спектральные характеристики меток различаются достаточно, чтобы обеспечить избирательную регистрацию флуоресценции каждого из зондов, как это наблюдается для флуорофоров Cy3 и Cy5 (рис. 2). Гибридизацию одновременно с несколькими флуоресцентными зондами, различающимися как по нуклеотидным последовательностям, так и по флуорофорам, можно использовать, например, для раздельного определения сразу нескольких мишеней либо для определения вариантов последовательности одной мишени, например, для анализа так называемого SNP (single nucleotide polymorphism, однонуклеотидного полиморфизма). В данном же случае смесь флуоресцентных зондов использована для обнаружения разных частей химерной молекулы, являющейся маркером лейкоза: Cy5-меченный зонд специфичен к AML-части, а Cy3-меченный зонд – к ETO-части последовательности AML1-ETO. Гибридизация обоих зондов с одной и той же колонией свидетельствует о том, что данная колония образована химерными молекулами (рис. 6а, б). Это дает возможность повысить специфичность диагностики путем отсеивания колоний, образованных нехимерными молекулами, содержащимися в нормальных лейкоцитах.

Использование флуоресцентных меток вместо радиоактивных позволяет существенно снизить стоимость и сократить время процедуры анализа, а также повысить его безопасность. Осуществление гибридизации на мембране упрощает процедуру по сравнению с гибридизацией в геле; в частности, это позволяет исключить необходимость ковалентной иммобилизации гибридизуемой цепи НК на матриксе геля и значительно ускорить процедуру гибридизации.

По материалам данного исследования подана заявка на патент [27].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Матрицы и олигонуклеотиды.** Плазмида рTZ-AML-ETO содержит кДНК (395 п.о.) участка химерной мРНК AML1-ETO, ассоциированной с острым миелоидным лейкозом, вызванным хромосомной транслокацией t(8;21)(q22;q22) [28] с участием генов *AML1* (GeneBank accession number D43969) и *ETO* (GenBank accession number D14289). Данную кДНК, синтезированную с использованием в качестве матрицы суммарного препарата РНК, выделенного из лейкоцитов больного данным видом лейкоза и любезно предоставленную И.С. Косоруковой и Е.В. Флейшман (Институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва),

размножили посредством ПЦР с использованием 5'-фосфорилированных праймеров (5'-3'): AML1-A (CTACCGCAGCCATGAAGAACC) и ETO-B (AGAGGAAGGCCATTTGCTGAA), описанных в работе [29], и лигировали в вектор pTZ19R (GeneBank accession number L08957), расщепленный по сайту SmaI и дефосфорилированный. Установленная прямым секвенированием клонированная последовательность (5'-3')

CTACCGCAGCCATGAAGAACCAGGTTG-  
CAAGATTTAATGACCTCAGGTTTGTGCG-  
GTTCGAAGTGGAGAGGGAAAAGCT-  
TCACTCTGACCATCACTGTCTTCACAAAC-  
CCACCGCAAGTCGCCACCTACCACAGAGCC-  
ATCAAAATCACAGTGGATGGGC-  
CCCGAGAACCTCGAaacCGTACTGAGAAG-  
CACTCCACAATGCCAGACTCACCTGTG-  
GATGTGAAGACGCAATCTAGGCTGACTCCT-  
CCAACAATGCCACCTCCCCAACTACT-  
CAAGGAGCTCCAAGAACCAGTTCATTTA-  
CACCGACAACGTTAATAATAGCACGAGC-  
CATTCTCCTACAGTCTTGAATGGCGC-  
CCSCTCACCACCAATGGCTTCAGCAATGGG  
CCTTCCTCT имеет точечную замену по сравнению с опубликованной [20]: **t** → **c**, сразу после динуклеотида "aa", представляющего собой стыковочные нуклеотиды генов *AML1* и *ETO*. Жирным шрифтом показаны участки гибридизации праймеров AML1-C (ATGACCTCAGGTTTGTGCGGTTCG) и ETO-D (TGAAGTGGTCTTGGAGCTCCT) [29], задающих ПЦР-продукт длиной 260 п.о. Одинарной линией подчеркнут участок, идентичный последовательности зонда Cy5-AML (Cy5-(5')AATCACAGTGGATGGGCCCGAGAA), а двойной линией – участок, идентичный последовательности зонда Cy3-ETO (Cy3-(5')ACCGTACTGAGAAGCACTCCACAAT). Флуорофоры Cy3 (максимум возбуждения при 548 нм, максимум эмиссии при 562 нм) и Cy5 (максимум возбуждения при 646 нм, максимум эмиссии при 664 нм), представляющие собой цианиновые красители (торговые марки Amersham Biosciences Trading GmbH, в настоящее время подразделение GE Healthcare, Австрия), ковалентно связаны с олигонуклеотидами через ножку PO<sub>4</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>. Все олигонуклеотиды были синтезированы ЗАО "Синтол" (<http://www.syntol.ru>).

Химерную РНК AML1-ETO длиной 940 нт получали путем транскрипции плазмиды pTZ-AML-ETO, обработанной рестриктазой MspI, с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага T7 [30]. Полученный препарат обрабатывали ДНКазой RQ1, свободной от РНКаз (Promega, США), экстрагировали фенолом и очищали от компонентов транскрипционной системы, в том числе нуклеотидов, с помощью осаждения этанолом в присутствии 2 М ацетата аммония с последующим промыванием осадка спиртово-солевым раствором, полученным путем смешивания 45 объемов

96% этанола с 55 объемами водного раствора, содержащего 200 мМ цитрат натрия и 300 мМ NaCl [7]. Конечный препарат содержал менее одной молекулы ДНК на каждые 1000 молекул РНК.

**Определение чувствительности детекции флуоресцентных зондов на нейлоновых мембранах.** Олигодезоксинуклеотиды Cy5-AML и Cy3-ETO последовательно разводили в буфере А, содержащем 10 мМ Трис-НСl (рН 9.0), 0.1 мМ EDTA, 0.1% полиэтиленгликоль 6000 ("for synthesis"; арт. № 807491; Merck, Германия) и 10 нг/мкл poly(A) (кат. № P 9403; Sigma Chemical Company, США) до получения требуемой концентрации и наносили в виде миниатюрных аликвот (0.2–0.5 мкл) на кусочки нейлоновых мембран следующих марок: Hybond-N (кат. № RPN303N), Hybond-N+ (кат. № RPN303B) и Hybond-XL (кат. № RPN303S) фирмы "Amersham Biosciences"; Nytran (кат. № 01070) фирмы "Schleicher & Schull" (Германия); Biotrans (кат. № 810305) и Biotrans(+) (кат. № 810204) фирмы "ICN", в настоящее время MP Biomedicals (США). После высыхания пятен мембраны наклеивали на предметные стекла для микроскопии с помощью двусторонней липкой ленты и сканировали при разрешении 50 мкм с помощью конфокального сканера микрочипов ScanArray Express (PerkinElmer, США), используя зеленый (543 нм) лазер и эмиссионный фильтр 570 нм для регистрации флуоресценции Cy3 или красный (633 нм) лазер и эмиссионный фильтр 670 нм для регистрации флуоресценции Cy5.

**Гибридизация ДНК на нейлоновой мембране с флуоресцентными зондами.** Плазмиду pTZ-AML-ETO выделяли по методу [31]. Для перевода плазмиды из кольцевой формы в линейную и приближения ее, таким образом, по свойствам к ПЦР-продукту, ее подвергали деградации эндонуклеазой рестрикции MspI. Полученный препарат последовательно разводили в буфере А и наносили в виде миниатюрных аликвот (0.2–0.5 мкл) на кусочки нейлоновой мембраны Hybond-N+. После высыхания пятен, мембрану подвергали процедуре гибридизации, приспособленной для выявления молекулярных колоний. Мембрану промывали 80% этанолом в течение 5 мин при 4°C, высушивали (15 мин при комнатной температуре) и для денатурации ДНК выдерживали при 80°C в течение 1.5 мин на фильтровальной бумаге № 3 (Whatman, США), смоченной раствором, содержащим 0.5 М NaOH и 10 мМ EDTA. Влажную мембрану подвергали УФ-облучению (160 мДж/см<sup>2</sup>) в приборе Stratelinker (Stratagene, США) с целью иммобилизации ДНК, после чего промывали в буфере Б [1-кратный буфер SSPE (10 мМ фосфат натрия, рН 7.7, 180 мМ NaCl, 1 мМ EDTA), содержащий 0.5% SDS], в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем в буфере В (4-кратный SSPE, содержащий 1% SDS) в течение 5 мин при 50°C. Промытую мембрану гибридизовали в запаянном полиэтиленовом пакете в течение 15 мин при 50°C в буфере В, содержащем 2 нМ зонды Cy5-

AML и Су3-ЕТО, из расчета 50 мкл буфера на 1 см<sup>2</sup> мембраны, после чего отмывали от негибридизованного зонда в буфере Б (5 мл на мембрану) в течение 5 мин при комнатной температуре. Мембрану высушивали и сканировали как указано выше.

#### Выращивание колоний ДНК (ПЦР в ПААГ).

Гель приготавливали в лунках (диаметром 14 мм, глубиной 0.4 мм), высверленных в предметных стеклах толщиной 1 мм в мастерской Института белка РАН (Пущино, Московская обл.). Стекла обезжиривали вымачиванием в 0.5 М NaOH в течение ночи, тщательно промывали и высушивали, после чего внутреннюю поверхность лунок обрабатывали с помощью реагента PlusOne™ Bind-Silane A174 (Amersham Biosciences), вливая в каждую лунку 80 мкл разбавленного реагента (0.4% в водном растворе 2% уксусной кислоты и 80% этанола). После испарения растворителя (≈1 ч при комнатной температуре) стекла промывали водой, затем отмывали этанолом (20 мл на стекло) в течение 15 мин при помешивании, снова промывали и высушивали. В каждую лунку вносили 65 мкл дегазированного раствора, содержащего 8% акриламид, 0.12% *N,N'*-метиленабисакриламид и 0.04% персульфат аммония, непосредственно перед использованием смешанного с ТЕМЕД (*N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин) до конечной концентрации 0.5%. В процессе заполнения лунки закрывали путем надвигания другого предметного стекла, предварительно обработанного реагентом PlusOne™ Repel-Silane ES (Amersham Biosciences) по инструкции производителя. После инкубации в течение 40 мин при комнатной температуре и еще в течение 1 ч при 4°C, верхнее стекло снимали, нижнее стекло (содержащее гели) трижды кипятили в течение 20 мин в деионизованной воде (40 мл/стекло) и высушивали при комнатной температуре в течение ночи.

Перед экспериментом гели восстанавливали до их первоначального объема путем пропитывания в полной ПЦР-смеси. С этой целью, вокруг каждой лунки наносили кольцо из 2 мкл минерального масла (“для ИК-спектроскопии”; Fluka Chemie, Швейцария), лунку наполовину закрывали покровным стеклом, под которое вливали 60–65 мкл ПЦР-смеси, одновременно надвигая покровное стекло так, чтобы заполнить лунку без пузырьков воздуха. Затем каждую лунку заклеивали поверх покровного стекла кусочком липкой фольги для ПЦР (Eppendorf AG, Германия) и до начала ПЦР инкубировали при 4°C в течение 1.5 ч с тем, чтобы гель полностью поглотил жидкость.

ПЦР-смесь имела следующий состав: 50 мМ Трис-HCl (рН 8.7 при 20°C), 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.2 мМ dATP, dGTP, dTTP и dCTP, 0.2 мкМ праймеры AML1-C и ЕТО-D, 1 мг/мл BSA (фракция V; Roche Diagnostics, Германия), 1.2 нг/мкл *Taq*-ДНК-полимеразы (приготовленной как описано ранее [7]), а также ≈50 молекул плазмиды pTZ-AML-ЕТО или продукт обратной транскрипции, синтезированной

при 50°C в течение 60 мин в 10 мкл реакционной смеси следующего состава: ≈100 молекул РНК AML-ЕТО, 0.5 мкМ праймер ЕТО-D, 5 нг/мкл poly(A), 0.2 мМ dATP, dGTP, dTTP и dCTP, реакционный буфер для обратной транскрипции (Amersham Biosciences) и 50 ед. обратной транскриптазы M-MuLV (Amersham Biosciences). Препараты плазмиды и РНК разводили в буфере А.

ПЦР осуществляли в амплификаторе UNO-Thermoblock™ (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Германия), оборудованном нагревательным блоком “*in situ*” с ровной поверхностью, в следующем режиме: три первых ПЦР-цикла включали расплавление при 94°C в течение 15 с, отжиг при 58°C в течение 15 с и элонгацию при 72°C в течение 40 с. В последующих 40 циклах время расплавления составляло 6 с, а время элонгации в последнем цикле – 5 мин.

#### Выращивание и обнаружение колоний РНК.

На агарозные гели размером 18 × 18 × 0.37 мм, содержащие Qβ-репликазу, наносили отожженную смесь 5'- и 3'-фрагментов RQ135 РНК, накрывали мембраной Hybond-N, смоченной раствором рибонуклеозид-5'-трифосфатов, и инкубировали на термостатируемом столике в течение 60 мин при 22°C [11]. После снятия первой мембраны, с геля делали реплику на вторую мембрану (Hybond-N+), которую трижды промывали при комнатной температуре в течение 5 мин при слабом перемешивании в растворе, содержащем 3% фосфорной кислоты, 50 мМ Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 мМ EDTA, а затем один раз холодным 50% этанолом. Высушенную мембрану выдерживали в течение 1.5 мин при 80°C на бумаге Whatman 3, смоченной денатурирующим раствором (6% формальдегид, 50% формамид, 50 мМ Na-фосфат рН 7.0, 1 мМ EDTA). Влажную мембрану подвергали УФ-облучению (70 мДж/см<sup>2</sup>) в приборе Hoefer UVC 500 UV Crosslinker (Amersham Biosciences) с целью иммобилизации РНК, после чего гибридизовали с 2 нМ зондом Су5Hom (Су5-(5')TCTGCAGGTCGACTCTAGGAT), отмывали и сканировали как описано выше для гибридизации ДНК.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 05-04-48897), Федеральной целевой научнотехнической программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники” на 2002–2006 годы (Государственный контракт № 02.434.11.3024) и Программы “Молекулярная и клеточная биология”. Авторы благодарят И.С. Косорукову и Е.В. Флейшман (лаборатория цитогенетики, Институт канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва), любезно предоставивших кДНК фрагмента мРНК AML1-ЕТО, и Ю.А. Заболотневу (Институт белка РАН) за техническую помощь.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Четверин А.Б., Четверина Е.В. // Молекуляр. биология. 2002. Т. 36. С. 320–327.
2. Четверин А.Б., Четверина Е.В. Способ размножения нуклеиновых кислот, способ их экспрессии и среда для их осуществления / Патент РФ № 2048522, 1995.
3. Chetverin A.B., Chetverina H.V. Method for amplification of nucleic acids in solid media. / US Patent 5.616,478. 1997.
4. Chetverin A.B., Chetverina H.V., Munishkin A.V. // J. Mol. Biol. 1991. V. 222. P. 3–9.
5. Chetverina H.V., Chetverin A.B. // Nucleic Acids Res. 1993. V. 21. P. 2349–2353.
6. Четверин А.Б., Четверина Е.В. // Молекуляр. медицина. 2003. Т. 1. С. 30–40.
7. Chetverina H.V., Samatov T.R., Ugarov V.I., Chetverin A.B. // BioTechniques. 2002. V. 33. P. 150–156.
8. Chetverina H.V., Falaleeva M.V., Chetverin A.B. // Anal. Biochem. 2004. V. 334. P. 376–381.
9. LeDuc J.W., Damon I., Relman D.A., Huggins J., Jahrling P.B. Smallpox Research Activities: U.S. Interagency Collaboration, 2001. // Emerg. Infect. Dis. 2002. V. 8. P. 743–745.
10. Mitra R.D., Church G.M. // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. e34.
11. Chetverin A.B., Chetverina H.V., Demidenko A.A., Ugarov V.I. // Cell. 1997. V. 88. P. 503–513.
12. Mitra R.D., Butty V.L., Shendure J., Williams B.R., Housman D.E., Church G.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 5926–5931.
13. Samatov T.R., Chetverina H.V., Chetverin A.B. // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33. e145.
14. Caldwell K.D., Chu T.-J., Pitt W.G. DNA sequencing using fluorescence background electroblotting membrane / US Patent 5.112,736. 1992.
15. Weiss R.B., Kimball A.W., Gesteland R.F., Ferguson F.M., Dunn D.M., Di Sera L.J., Cherry J.L. Automated hybridization / imaging device for fluorescent multiplex DNA sequencing / US Patent 5.470,710. 1995.
16. Guerasimova A., Ivanov I., Lehrach H. // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. P. 703–705.
17. Guerasimova A., Nyarsik L., Girnus I., Steinfath M., Wruck W., Griffiths H., Herwig R., Wierling C., O'Brien J., Eickhoff H., Lehrach H., Radelof U. // Bio-techniques. 2001. V. 31. P. 490–495.
18. Andreoli R., Amin M., Meyering M., Chesterson R., Ostreicher E. Low fluorescence nylon / glass composites for micro-analytical diagnostic applications / US Patent 6.734,012. 2004.
19. Haugland R.P. Nucleic acid detections and genomics technology. Handbook of Fluorescent Probes and Fluorescent Products. 9th Ed. Eugene, Oregon: Molecular Probes, Inc., 2002. Chapter 6.
20. Miyoshi H., Kozu T., Shimizu K., Enomoto K., Maseki N., Kaneko Y., Kamada N., Ohki M. // EMBO J. 1993. V. 12. P. 2715–2721.
21. Guatelli J.C., Whitfield K.M., Kwok D.Y., Barringer K.J., Richman D.D., Gingeras T.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 1874–1878.
22. Walker G.T., Little M.C., Nadeau J.G., Shank D.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 392–396.
23. Compton J. // Nature. 1991. V. 350. P. 91–92.
24. Fire A., Xu S.-Q. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 4641–4645.
25. Lizardi P.M. Molecular cloning using rolling circle amplification / US Patent Application 20020048761. 2002.
26. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. e63.
27. Четверина Е.В., Четверин А.Б., Кравченко А.В. Обнаружение молекулярных колоний посредством гибридизации на мембранах с флуоресцентными зондами. Заявка на получение патента РФ № 2006108053. 2006.
28. Viehmann S., Teigler-Schlegel A., Bruch J., Langebrake C., Reinhardt D., Harbott J. // Leukemia. 2003. V. 17. P. 1130–1136.
29. van Dongen J.J., Macintyre E.A., Gabert J.A., Delabesse E., Rossi V., Saglio G., Gottardi E., Rambaldi A., Dotti G., Griesinger F., Parreira A., Gameiro P., Diaz M.G., Malec M., Langerak A.W., San Miguel J.F., Biondi A. // Leukemia. 1999. V. 13. P. 1901–1928.
30. Gurevich V.V., Pokrovskaya I.D., Obukhova T.A., Zozulya S.A. // Anal. Biochem. 1991. V. 195. P. 207–213.
31. Ugarov V.I., Samatov T.R., Chetverina H.V., Chetverin A.B. // BioTechniques. 1999. V. 26. P. 194–198.

## Express Hybridization of Molecular Colonies with Fluorescent Probes

E. V. Chetverina<sup>#</sup>, A. V. Kravchenko, M. V. Falaleeva, and A. B. Chetverin<sup>#</sup>Phone: +7 (496) 773-8917; fax: +7 (495) 632-7871; e-mail: helena@vega.protres.ru  
Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

DNA colonies formed during PCR in a polyacrylamide gel and RNA colonies grown in an agarose gel containing Q $\beta$  replicase can be identified using the procedure of transfer of molecular colonies onto a nylon membrane followed by membrane hybridization with fluorescent oligonucleotide probes. The suggested improvements significantly simplify and accelerate the procedure. By the example of a chimeric AML1–ETO sequence, a marker of frequently occurring leukemia, the express hybridization method was shown to allow the rapid identification of single molecules and the determination of titers of DNA and RNA targets. Hybridization with a mixture of two oligonucleotide probes labeled with different fluorophores complementary to components of the chimeric molecule ensures the identification of molecular colonies containing both parts of the chimeric sequence and improves the specificity of diagnostics. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2007, vol. 33, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* chimeric RNA markers, fluorescent probes, membrane hybridization, leukemia, molecular colony technique, molecular diagnostics