

УДК 579:579.873.2:615.015.8
© Коллектив авторов

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С LNA-МОНОМЕРАМИ ДЛЯ ПЦР-ДЕТЕКЦИИ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНОМЕ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

О.Ю. Лиманская^{1,2}, Т.В. Фесенко³, В.А. Покровский³, Т.Н. Мухина⁴,
В.Н. Степанишина⁴, И.Г. Шемякин⁴, А.П. Лиманский¹*

¹ГУ “Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова
АМН Украины”, ул. Пушкинская, 14, Харьков, 61057 Украина;
эл. почта: olga.limanskaya@mail.ru

²Национальный научный центр “Институт экспериментальной и клинической
ветеринарной медицины, Харьков, Украина

³Институт химии поверхности им. А.А.Чуйко НАН Украины, Киев, Украина

⁴ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и
биотехнологии, пос. Оболенск, Московская обл., Российская Федерация.

Для детекции точечных мутаций в кодоне 315 гена *katG* микобактерий туберкулеза (МБТ), ассоциированных с резистентностью к противотуберкулезному препарату первого ряда изониазиду (ИЗН), использовали стандартную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с праймерами, содержащими LNA-модифицированные нуклеотиды (LNA – locked nucleic acid, или замкнутая нуклеиновая кислота). Чистота и строение праймеров, содержащих 5 LNA-мономеров, длиной 17 нуклеотидов охарактеризованы времяпролетной масс-спектрометрией с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ-TOF), а 17-мерный дуплекс, образованный двумя комплементарными олигонуклеотидами, – методом термической денатурации. Дуплекс, содержащий по пять LNA-мономеров в каждой нити, имеет гораздо более высокую температуру плавления, чем это следует из экстраполяции данных теоретических расчетов для модификации нуклеотидов одной нити дуплекса. Важным преимуществом олигонуклеотидов с LNA-мономерами по сравнению с немодифицированными является то, что для определения наличия любого из шести возможных вариантов мутаций в кодоне 315 гена *katG*, т.е. дифференциации чувствительных и резистентных МБТ к изониазиду, достаточной является постановка одной реакции с набором из двух праймеров с использованием одного LNA-модифицированного праймера в отличие от варианта мультиплексной ПЦР, для проведения которой понадобилось бы до 12 праймеров. Обсуждаются вопросы контроля степени модификации олигонуклеотидов LNA-мономерами.

Ключевые слова: плавление ДНК, точечная мутация, полимеразная цепная реакция, микобактерии туберкулеза, замкнутая нуклеиновая кислота, масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией.

* - адресат для переписки

ВВЕДЕНИЕ. Основным решением проблемы контроля за распространением лекарственно-устойчивых форм туберкулёза является их своевременное определение на ранних стадиях заболевания, которое позволит контролировать распространение конкретного штамма микобактерий туберкулёза (МБТ) и корректировать схему химиотерапии в каждом случае. Существует ряд традиционных классических методов определения резистентности микобактерий к противотуберкулёзным препаратам, утвержденных ВОЗ. При этом определение спектра лекарственной устойчивости микобактерий туберкулёза занимает от 1 до 3 месяцев, в течение которых первичным больным назначают курс терапии стандартными противотуберкулёзными препаратами первого ряда. Поскольку резистентность клинических изолятов МБТ к назначенным препаратам в течение этого периода остается невыясненной, существует вероятность, что приём препаратов окажется неэффективным. Быстрая детекция резистентности и особенно множественной лекарственной устойчивости МБТ является чрезвычайно важной для выбора эффективной методики противотуберкулёзной терапии. Решение данной проблемы представляется возможным на уровне генотипа, что позволит сократить время проведения соответствующего анализа до 1-3 дней.

Широко используемой технологией для детекции точечных мутаций является аллель-специфичная ПЦР, в которой один или оба праймера конструируют таким образом, что они отжигаются на сайтах с точечными мутациями. В идеале, комплементарный специфичной последовательности праймер ведет к амплификации только одного варианта, но на практике происходит значительная амплификация вариантов с отжигом праймеров с мишенями, содержащими некомплементарные нуклеотиды.

Аллель-специфичная ПЦР с LNA-модифицированными праймерами основана на том, что температура плавления (T_m , следовательно, и температура отжига) комплекса праймер – однострессовая ДНК-матрица для мутантного типа ниже температуры плавления совершенного дуплекса. Это означает, что при наличии точечной мутации в сайте, содержащем LNA-нуклеотид, комплекс праймер – однострессовая ДНК-матрица будет иметь более низкую температуру плавления (T_m) по сравнению с совершенным дуплексом. Введение LNA-нуклеотидов позволяет увеличить дискриминирующую мощность праймера. В LNA-модифицированных праймерах некоторые нуклеотиды замещены LNA-мономерами – аналогами нуклеотидов, содержащими метиленовый мостик 2'-O, 4'-C (рис. 1), который ограничивает конформационную гибкость дезоксирибозного кольца и переводит мономер в жесткую структуру. Это приводит к усилению гибридизации нити, содержащей LNA-мономеры, с комплементарной нитью дуплекса. Встраивание LNA-нуклеотидов значительно увеличивает термическую стабильность дуплекса по сравнению с немодифицированной ДНК (рис. 1B). Например, для 13-членного олигонуклеотидного дуплекса введение 9 замещенных LNA-мономеров приводит к увеличению температуры плавления (T_m) на 25°C, а введение 10 замещенных LNA-мономеров – на 28°C. Таким образом, вклад одного LNA-мономера в увеличение T_m (ΔT_m) для 13-членного дуплекса составляет 3°C. Это означает, что при наличии точечной мутации в сайте, содержащем LNA-нуклеотид, комплекс праймер – однострессовая ДНК-матрица будет иметь более низкую температуру плавления по сравнению с совершенным дуплексом.

Наиболее весомый вклад в развитие резистентности микобактерий туберкулеза к противотуберкулеznым препаратам, наряду с резистентностью к стрептомицину, вносит резистентность к изониазиду (ИЗН), обусловленная в основном мутациями, локализованными в кодоне 315 гена *katG*, кодирующего синтез каталазы-пероксидазы. Резистентность к ИЗН ассоциирована с мутациями в кодоне 315 с вероятностью 50 – свыше 90% (для различных географических регионов) [1, 2].

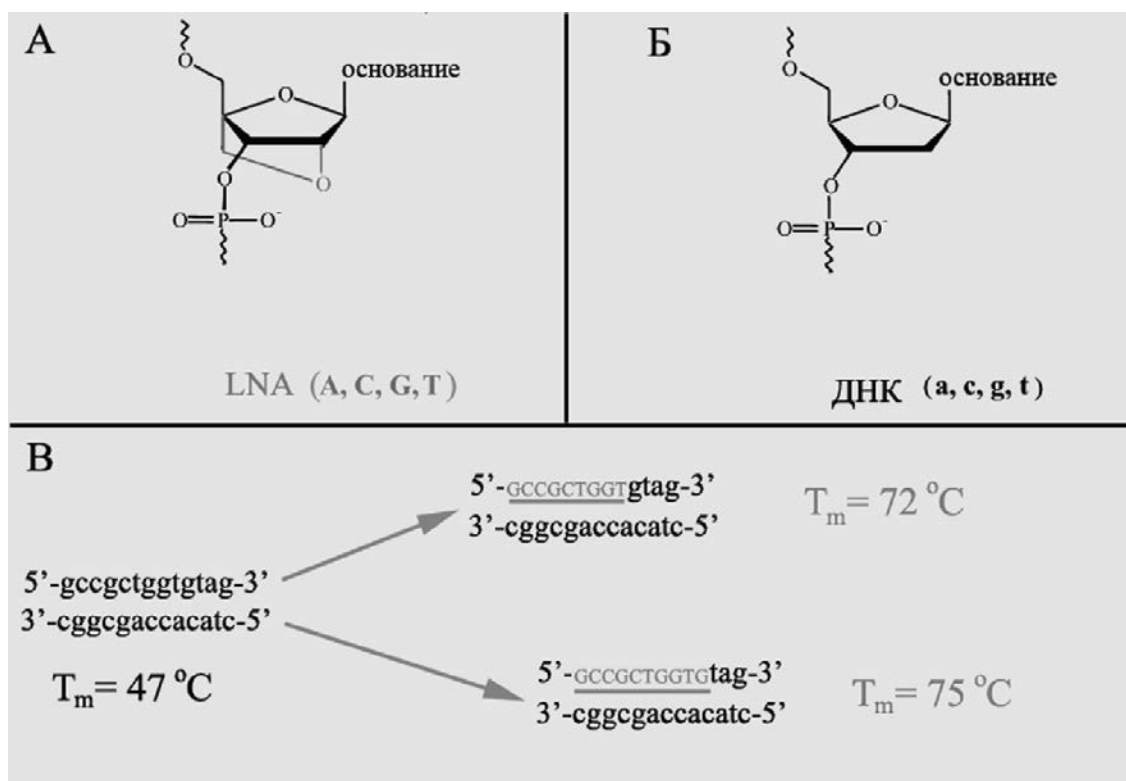


Рисунок 1.

Locked nucleic acid, или замкнутая нуклеиновая кислота (ЗНК), - новый химический аналог мономера ДНК (А), который может замещать нуклеотиды в последовательностях ДНК и РНК (Б).

ЗНК подчиняется правилам спаривания Уотсона-Крика, но имеет повышенную специфичность и аффинность при гибридизации. Сконструированные смешанные ЗНК/ДНК олигонуклеотиды (В)

облегчают контроль за плавлением проб и праймеров, а также за оптимизацией дискриминирующей последовательности при данной температуре. Введение дополнительного

ЗНК-модифицированного мономера для 13-членного олигонуклеотида, содержащего 9 ЗНК-модифицированных нуклеотидов (В), ведёт к повышению температуры плавления олигонуклеотида на 3 °С.

Применительно к микобактериям туберкулеза молекулы ДНК изолятов дикого типа представляют совершенные дуплексы, а ДНК резистентных к изониазиду изолятов характеризуется наличием мутаций в кодоне 315 гена *katG* и, следовательно, имеет более низкую температуру плавления. Установленные мутации затрагивают только вторую и третью позиции кодона 315, но не выявлены для первой позиции. Как следствие этого, в настоящее время детектировано шесть вариантов мутаций в кодоне 315 [3-5]. Важно отметить, что изменение T_m комплекса LNA-праймер – ДНК-матрица при наличии одонуклеотидного полиморфизма зависит как от количества LNA-мономеров, так и от длины праймера. Для 20-членного дуплекса введение одного дополнительного LNA-мономера приводит к увеличению T_m на ~1 °С. Поэтому для увеличения дискриминирующей мощности праймера, с одной стороны, относительное содержание LNA-мономеров должно быть относительно высоким. С другой стороны, увеличение длины праймера (для повышения специфичности) ведёт к уменьшению относительного вклада LNA-мономера (при сохранении их количества) и, следовательно, к уменьшению дискриминирующей мощности праймера.

В данной работе на основе использования современных достижений химии синтеза олигонуклеотидов – праймеров, содержащих LNA-модифицированные нуклеотиды (LNA – locked nucleic acid, или замкнутая нуклеиновая кислота), разработаны молекулярно-генетические тест-системы для ПЦР-детекции мутаций в кодоне 315 гена *katG* МБТ. Праймеры с LNA-модифицированными мономерами охарактеризованы методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией, а образованные ими дуплексы – методом термической денатурации. Разработанные наборы с использованием LNA-модифицированных праймеров позволяют посредством постановки одной реакции определять наличие любого из шести возможных вариантов мутаций в указанном кодоне, а, следовательно, дифференцировать МБТ дикого и мутантного (в кодоне 315 гена *katG*) типов, т.е. чувствительные и резистентные МБТ к противотуберкулезному препарату первого ряда изониазиду соответственно.

МЕТОДИКА.

УФ-спектроскопия олигонуклеотидных дуплексов. Для характеристики олигонуклеотидных дуплексов, содержащих по пять комплементарных LNA-модифицированных нуклеотидов, использовали термическую денатурацию с регистрацией оптической плотности при значении длины волны 260 нм. (Отметим, что более корректным является плавление дуплексов при длине волны 270 нм, поскольку именно при этой длине волны вклад коэффициентов экстинкции АТ- и GC-пар является одинаковым). УФ-спектроскопические исследования проводили на спектрофотометре Specord M40 (“Carl Zeiss Jena”, Германия), имеющем термостатированную камеру. Оптическую плотность регистрировали с шагом изменения температуры 0,05°C при скорости нагрева 0,5°C/мин. Для экспериментов по термической денатурации использовали микрокуветы с длиной оптического пути 1 см. Плавление проводили в 10⁻³, 10⁻² и 5·10⁻² М натрий-какодилатном буфере (pH 7,0) при концентрации ДНК 20-30 пкмоль/мкл. Дифференциальные профили плавления получали посредством дифференцирования интегрального профиля плавления с помощью программы Origin (версия 7.0, США).

Проведение ПЦР. Для проверки разработанных наборов праймеров для детекции изолятов дикого типа и резистентных микобактерий туберкулеза к противотуберкулезному препарату первого ряда изониазиду использовали коллекцию ДНК, экстрагированной из клинических изолятов микобактерий туберкулеза дикого типа (WT) и резистентных к изониазиду с мутациями в кодоне 315 гена *katG* (MT). Тестирование наборов праймеров проводили на изолятах ДНК МБТ с точечными мутациями AGC→ACC, AGC→ACG и AGC→AGA в кодоне 315, характеризующихся уровнем резистентности к изониазиду 1 – 25 мкг/мкл.

ПЦР проводили с использованием сухого набора реагентов для амплификации ДНК (“Изоген”, Россия) в объеме реакционной смеси 20-50 мкл, содержащей 4 mM NaCl, 50 mM KCl, 12 mM трис-HCl (pH 8,0), 2,5 mM MgCl₂, 200 мкМ дезоксинуклеотидов, 0,1-0,5 мкМ каждого праймера, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы, ингибированной антителами, что дает возможность постановки ПЦР с горячим стартом. Синтезированные и очищенные посредством электрофореза в ПААГ праймеры были получены от фирмы “Синтол” (Россия). LNA-модифицированные праймеры содержали по пять LNA-нуклеотидов производства фирмы “Exiqon” (Дания; <http://www.exiqon.com/lna-technology>).

Стандартную ПЦР проводили на амплификаторе производства НПО “Точность” (Тула, Россия) при следующих температурных и временных параметрах: начальная инкубация – 95°C, 2 мин; денатурация – 95°C, 1 мин; отжиг – 58-71°C, 1 мин; синтез – 70-74°C, 1 мин; количество циклов – 38-45. Двухшаговую ПЦР проводили при следующих параметрах: начальная инкубация – 95°C, 2 мин; денатурация – 95°C, 1 мин; отжиг и синтез – 71°C, 2 мин; количество

циклов – 45. Температуру отжига праймеров (T_{an}) оптимизировали путём постановки ряда реакций при увеличении температуры отжига с шагом 2–0,5°C до полной элиминации полосы неспецифического ампликона. Для амплификации использовали 0,05 мкг геномной ДНК микобактерий туберкулеза. Для визуализации ампликонов 10–20 мкл ПЦР-продукта разделяли посредством электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем этидий бромистый, при напряженности поля 10 В/см. Расчет температуры плавления комплекса LNA-модифицированный олигонуклеотид – одонитевая ДНК проводили с помощью программы, имеющейся в свободном доступе на сайте <http://lna-tm.com> [6], а термодинамический анализ праймеров и ампликонов – с помощью программы MeltCalc [7, 8].

Масс-спектрометрия олигонуклеотидов. Характеризацию LNA-модифицированных олигонуклеотидов проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ, MALDI-TOF). Аликвоты очищенных посредством электрофореза в ПААГ олигонуклеотидов (0,5 мкл) наносили на матричные кристаллы, полученные путём высушивания водного матричного раствора, содержащего 3-гидроксипиколиновую кислоту (50 мг/мл) и двухосновный цитрат аммония (2 мг/мл), на мишени из нержавеющей стали.

Мишень высушивали при комнатной температуре до полного испарения растворителей и помещали в источник времяпролетного масс-спектрометра Autoflex II (“Bruker Daltonics Inc.”, Германия), снабженного азотным лазером ($\lambda=337$ нм), который позволяет проводить импульсное извлечение ионов. Масс-спектры олигонуклеотидов получены в режиме регистрации положительных ионов. Ионизация образцов производилась УФ-лазером с длиной волны 337 нм в импульсном режиме: длительностью импульса 3 нс, частотой 20 Гц и максимальной энергией 65 мкДж. Использовали время задержки экстракции ионов 30 нс. Положительно заряженные ионы детектировали в режиме работы рефлектрона. Ускоряющее напряжение составляло 20 кВ. Результирующие масс-спектры представляют собой сумму не менее 100 индивидуальных спектров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Исследования молекулярных механизмов резистентности показали, что устойчивость МБТ к тому или иному препарату обусловлена единичными мутациями в определенных генах. Ранее для выявления точечных мутаций в геноме патогенов мы использовали ПЦР с праймером, имеющим качающийся нуклеотид на 3'-конце, то есть некомплементарный по отношению к ДНК-матрице одного из видов (в случае генотипирования) [9].

В данной работе для детекции точечных мутаций, или однонуклеотидных полиморфизмов, в кодоне 315 гена *katG* МБТ разработаны два набора праймеров, включающих по одному LNA-модифицированному праймеру (Mykat25^{LNA} и Л8^{LNA}) длиной 17 нуклеотидов (н.). Каждый LNA-модифицированный праймер содержит по пять LNA-мономеров, причем три LNA-мономера каждого праймера комплементарны кодону 315 гена *katG*, а два других фланкируют указанный кодон. Принципиальным различием этих наборов праймеров является локализация LNA-модифицированного праймера – в одном наборе (Л7 – Л8^{LNA}) LNA-праймер комплементарен “+”-нити ДНК (рис. 2А), а в другом (Mykat24 – Mykat25^{LNA}) – “–”-нити ДНК (рис. 2Б).

Анализ продуктов амплификации при низкой температуре отжига (T_{an}) показывает, что оба набора праймеров позволяют амплифицировать фрагмент гена *katG* ожидаемой длины – 214 п.н. для набора праймеров Л7–Л8^{LNA} (дорожки 3, 4, рис. 3) и 110 п.н. (дорожки 5, 6, рис. 3) для набора праймеров Mykat24–Mykat25^{LNA}. Интенсивность полосы ампликона длиной 110 п.н. (дорожки 5, 6, рис. 3) при $T_a=58^\circ\text{C}$ была крайне низкой. Поэтому дальнейшие эксперименты проводили только с набором праймеров Л7–Л8^{LNA}.

ПЦР С ПРАЙМЕРАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ LNA-НУКЛЕОТИДЫ

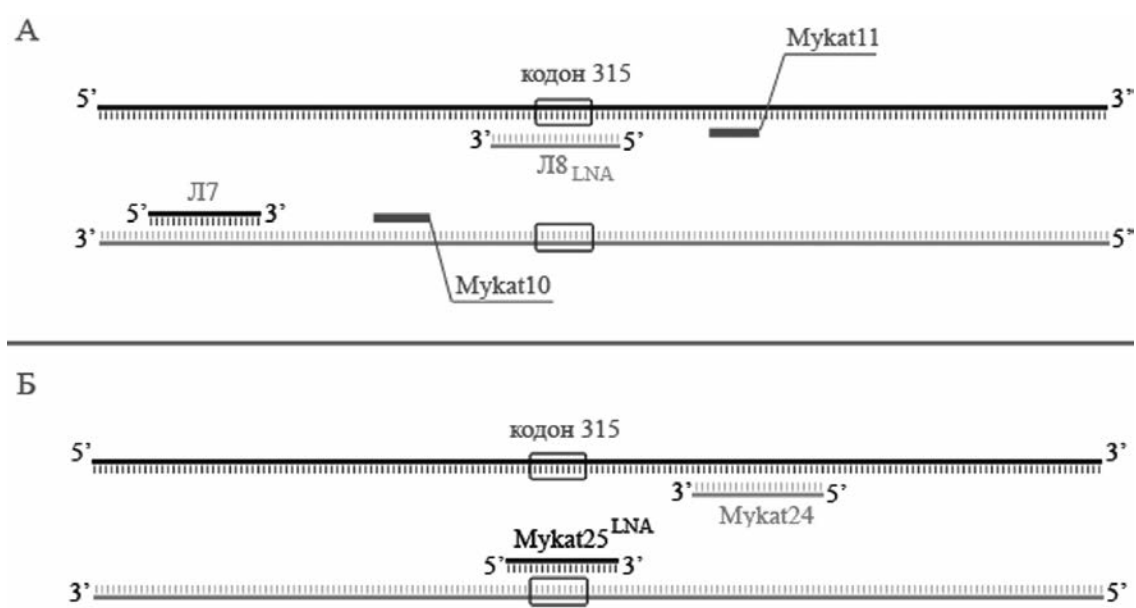


Рисунок 2.

Локализация праймеров на гене *katG* ДНК микобактерий туберкулеза относительно кодона 315, мутации в котором сцеплены с резистентностью к противотуберкулёзному препарату первого ряда изониазиду. Наборы праймеров Л7 - Л8^{LNA} и Mykat24 - Mykat25^{LNA} позволяют амплифицировать фрагменты гена *katG*, содержащего кодон 315, длиной 214 и 110 п.н. Праймеры Л8^{LNA} и Mykat25^{LNA} содержат по пять LNA-модифицированных нуклеотидов, два из которых фланкируют, а три являются комплементарными +-нити (А) и - -нити (Б) в области кодона 315 гена *katG*. Набор праймеров Mykat10 - Mykat11 был использован для амплификации фрагмента длиной 151 п.н., содержащего кодон 315, в качестве маркера молекулярной массы.

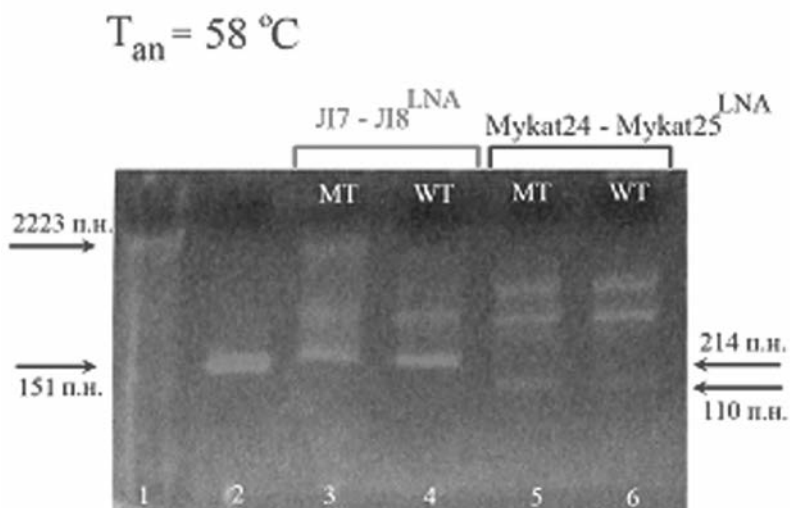


Рисунок 3.

Детекция продуктов амплификации фрагмента гена *katG* ДНК микобактерий туберкулёза дикого типа (WT) и резистентных (с мутацией в кодоне 315 гена *katG*) к изониазиду (MT) после проведения полимеразной цепной реакции с набором праймеров Л7 - Л8^{LNA} и электрофореза в 1,5% агарозном геле. Температура отжига T_{an} составляет 58°C. 1 - амплификация полноразмерного гена *katG* (2223 п.н.); 2 - фрагмент длиной 151 п.н., содержащий кодон 315; 3, 4 - фрагмент длиной 214 п.н. после амплификации с набором праймеров Л7 - Л8^{LNA} ДНК микобактерий туберкулёза, резистентных к изониазиду (3), и дикого типа (4); 5, 6 - фрагмент длиной 110 п.н. после амплификации с набором праймеров Mykat24 - Mykat25^{LNA} ДНК микобактерий туберкулёза, резистентных к изониазиду (5), и дикого типа (6). Л8^{LNA}, Mykat25^{LNA} - модифицированные праймеры, содержащие LNA-нуклеотиды.

Анализ ПЦР-продуктов амплификации показывает, что набор праймеров Л7-Л8^{LNA} позволяет амплифицировать фрагмент гена *katG* ожидаемой длины 214 п.н. при температурах отжига, которые составляли 66°C (дорожка 3, рис. 4А) и 71°C (дорожки 3, 4 рис. 4Б). Использование ПЦР с набором праймеров Л7-Л8^{LNA} позволяет дифференцировать мутантный (МТ) и дикий тип (WT) гена *katG* МБТ (дорожки 3 и 4, рис. 4Б): для дикого типа гена *katG* амплифицируется фрагмент гена длиной 214 п.н., в то время как для мутантного изолята МБТ ампликон отсутствует (хотя амплификация происходит, о чём свидетельствует полоса неспецифического ампликона, которая образуется вследствие небольшой длины праймера Л8^{LNA}). Интенсивность полосы неспецифического ампликона уменьшается при повышении T_{an} с 66°C до 71°C (в этом случае проводили двухшаговую ПЦР, которая позволяла надежно дифференцировать изоляты МБТ мутантного и дикого типов).

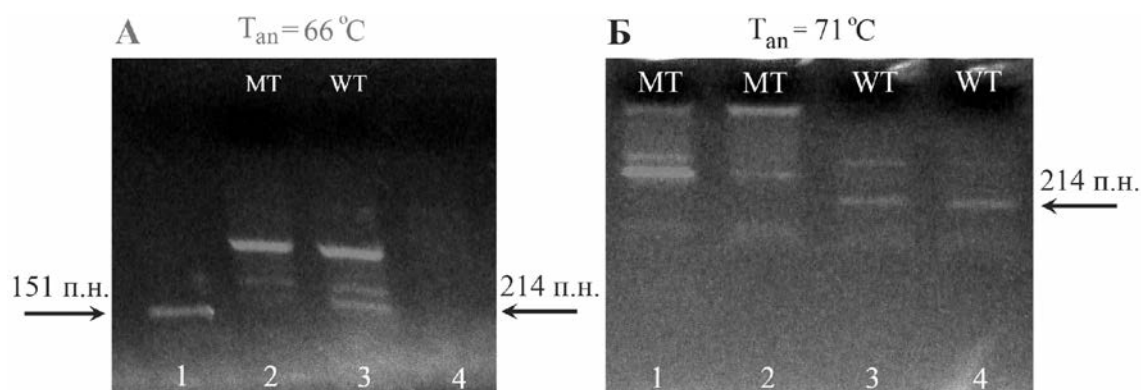


Рисунок 4.

Детекция продуктов амплификации фрагмента гена *katG* ДНК микобактерий туберкулёза, чувствительных (WT) и устойчивых к изониазиду (МТ), после проведения ПЦР с набором праймеров Л7 - Л8^{LNA} и электрофореза в 1,5% агарозном геле. Л8^{LNA} - модифицированный праймер, содержащий LNA-нуклеотиды.

- (А) Температура отжига T_{an} составляет 66°C. 1 - маркер молекулярной массы - фрагмент длиной 151 п.н., содержащий кодон 315, после амплификации с набором праймеров Mykat10 - Mykat11; 2, 3 - амплификация с набором праймеров Л7 - Л8^{LNA} мутантных по кодону 315 гена *katG* ДНК микобактерий туберкулёза (2), и дикого типа (3); 4 - отрицательный контроль амплификации. Наличие мутации в кодоне 315 приводит к отсутствию полосы ампликона длиной 214 п.н. (2), которая характерна для изолятов дикого типа (3).
- (Б) Температура отжига T_{an} составляет 71°C. Амплификация фрагмента длиной 214 п.н. с набором праймеров Л7 - Л8^{LNA} для ДНК микобактерий туберкулёза, резистентных к изониазиду (1, 2), и ДНК изолятов дикого типа (3, 4).

Праймеры Л8^{LNA} и Mykat25^{LNA} из двух разных наборов праймеров сконструированы таким образом, что являются комплементарными один другому и могут образовать двухнитевой олигонуклеотид длиной 17 п.н. Теоретически рассчитанное значение температуры плавления (T_m) немодифицированного дуплекса Л8–Mykat25 составляет 45°C при ионной силе (I) 1 mM Na⁺. Модификация LNA-мономерами пяти нуклеотидов в каждой нити приводит к резкому увеличению (до 88°C) температуры плавления дуплекса Л8^{LNA}–Mykat25^{LNA} (рис. 5). Видно, что вклад одной пары LNA-модифицированных нуклеотидов в повышение температуры плавления 17-членного дуплекса составляет 8,6°C, а одного LNA-нуклеотида – 4,3°C. В то же время для 17-членного олигонуклеотидного дуплекса Л8^{LNA}–Mykat25 при модификации нуклеотидов только одной нити определенная из теоретически рассчитанного значения

ПЦР С ПРАЙМЕРАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ LNA-НУКЛЕОТИДЫ

температуры плавления (табл. 1) величина ΔT_m составляет 2,8°C. Таким образом, LNA-модификация пяти нуклеотидов в обеих нитях дуплекса приводит к гораздо более сильной стабилизации дуплекса, чем можно было ожидать, исходя из теоретических расчетов, экстраполируя данные односторонней LNA-модификации на случай LNA-модификации обеих нитей дуплекса. (Отметим, что теоретическое определение T_m с помощью программы [7, 8] возможно только для случая LNA-модификации нуклеотидов одной нити дуплекса).

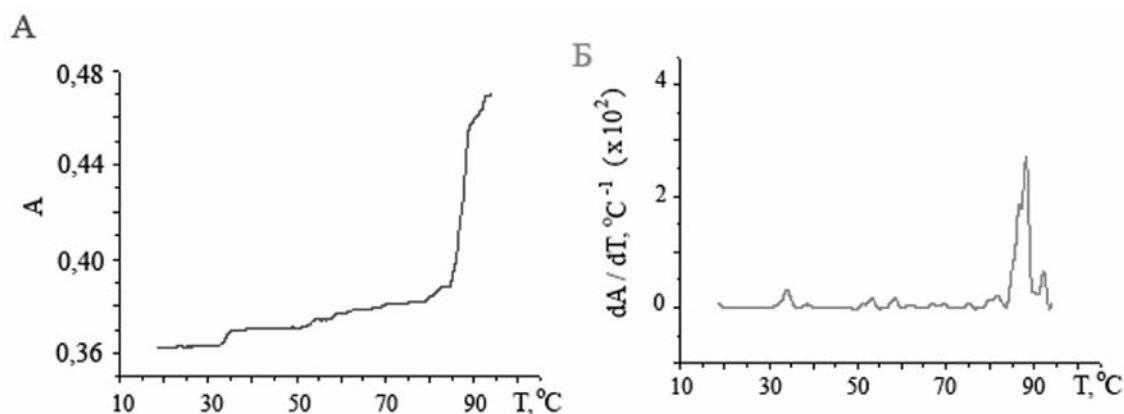


Рисунок 5.

Интегральный (А) и дифференциальный (Б) профили плавления дуплекса, образованного двумя 17-членными олигонуклеотидами (Л8^{LNA} - Mykat25^{LNA}), каждый из которых содержит по пять LNA-модифицированных нуклеотидов. Плавление проведено в 1мМ какодilate натрия (pH 7,0).

Таблица 1. Теоретически рассчитанная температура плавления T_m (°C) немодифицированного дуплекса (Л8 - Mykat25) и дуплекса с пятью LNA-мономерами в одной нити (Л8^{LNA} - Mykat25) при различной ионной силе (I) и общей концентрации праймеров 0,5 мкМ.

Праймер	Ионная сила		
	I = 1 мМ Na ⁺	I = 10 мМ Na ⁺	I = 50 мМ Na ⁺
Л8 – Mykat25	41	51	58
Л8 ^{LNA} – Mykat25	55	65	72

Проведенные эксперименты по плавлению олигонуклеотидного дуплекса Л8^{LNA}-Mykat25^{LNA} при значениях ионной силы I = 5 мМ Na⁺ и I = 50 мМ Na⁺ позволили зарегистрировать только начало интервала плавления ввиду высокой T_m дуплекса (результаты не приведены). Это объясняется ростом T_m дуплекса с увеличением ионной силы раствора примерно пропорционально логарифму концентрации катионов [10].

Одним из наиболее эффективных методов анализа макромолекул зарекомендовала МАЛДИ-масс-спектрометрия с использованием времяпролетного (TOF) анализатора. Для нуклеиновых кислот были получены МАЛДИ-масс-спектры в диапазоне 600 Да (ниже данной величины интерпретация результатов затруднена ввиду присутствия ионов матрицы) – 90 кДа (примерно 300 нуклеотидов). При этом для получения высококачественного масс-спектра методика подготовки нуклеиновой кислоты имеет крайне важное значение. На качество спектра влияют множество факторов: чистота образца, состав растворителя, состав матрицы и поверхностные свойства субстрата.

В данной работе времяпролетную МАЛДИ-масс-спектрометрию применяли для контроля качества химического синтеза односторонних олигонуклеотидов с LNA-мономерами. Зарегистрированные МАЛДИ-масс-спектры олигонуклеотидов Л8^{LNA} и Mykat25^{LNA} (рис. 6 и рис. 7) использованы для (i) контроля снятия защиты с реакционных групп азотистых оснований нуклеотидов, а также (ii) выявления примеси олигонуклеотидов с недостающими звеньями. В масс-спектрах LNA-модифицированных олигонуклеотидов (рис. 6) присутствовали пики с соотношением масса/заряд (m/z) 5373,8 (Л8^{LNA}) и m/z 5347,3 (Mykat25^{LNA}), подтверждающие наличие LNA-мономеров в праймерах (табл. 2). Пики с указанными массами идентифицированы как соответствующие кластерным ионам $[Л8^{LNA} + Na]^+$ и $[Mykat25^{LNA} + Na]^+$.

МАЛДИ-масс-спектры с более высоким разрешением (рис. 7) позволили определить наличие неудаленных защитных групп на реакционных группах нуклеотидов. Известно, что для предотвращения разветвления нити олигонуклеотида в процессе элонгации аминогруппы оснований в фосфорамидитах dG, dA и dC заблокированы [11]. При наличии неснятых защитных групп в масс-спектре олигонуклеотида, кроме ожидаемой основной полосы, появляются дополнительные пики большей массы. Например, используемые для защиты аминогрупп изобутирил (для dG) и бензоил (для dA и dC) увеличивают массу олигонуклеотида на 70 и 104 Да соответственно [12].

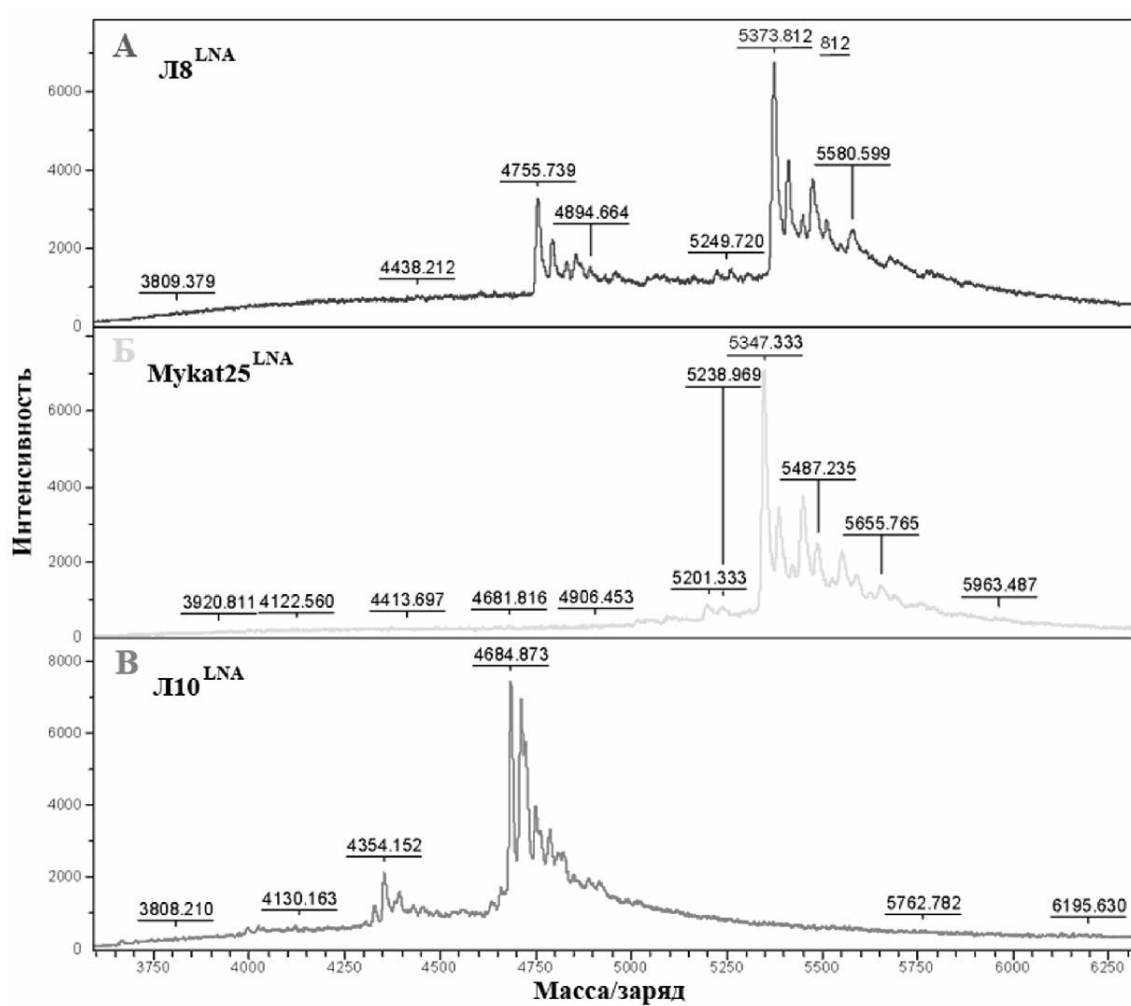


Рисунок 6.

Масс-спектрометрический анализ олигонуклеотидов Л8^{LNA} (А), Mykat25^{LNA} (Б) и Л10^{LNA} (В) длиной 17 нуклеотидов, из которых пять являются LNA-мономерами.

ПЦР С ПРАЙМЕРАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ LNA-НУКЛЕОТИДЫ

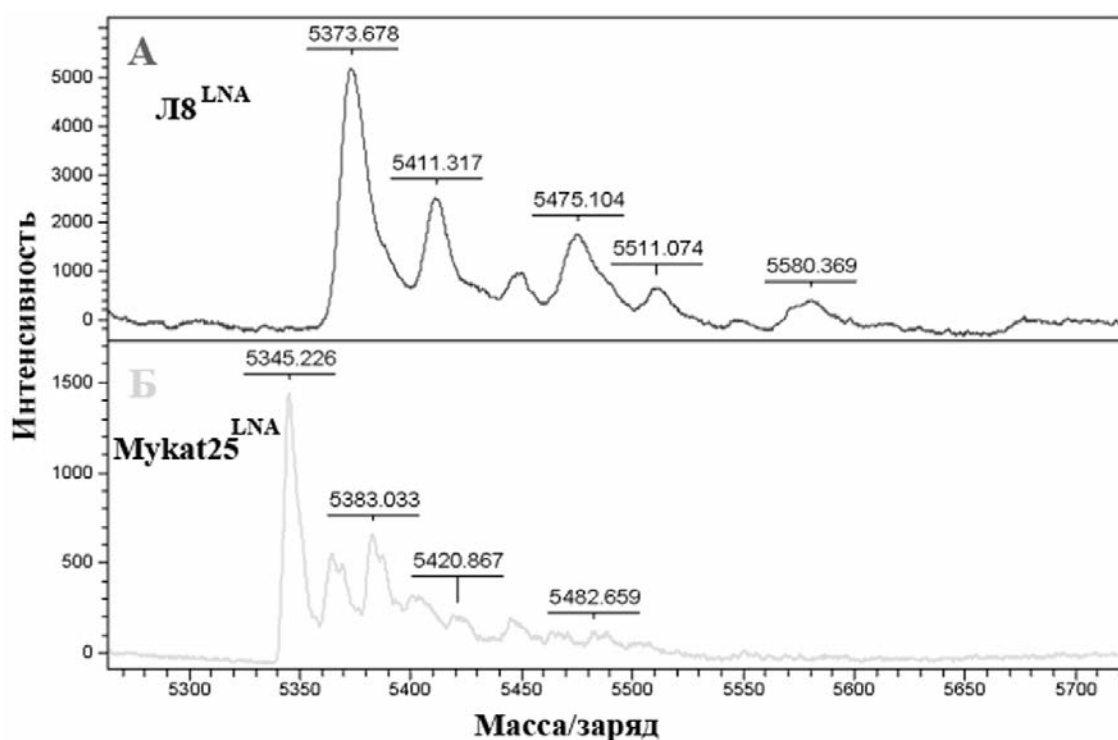


Рисунок 7.

Высокоразрешённые масс-спектры с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ-TOF) олигонуклеотидов $L8^{LNA}$ (А) и $Mykat25^{LNA}$ (Б).

Таблица 2. Параметры олигонуклеотидов, содержащих LNA-модифицированные мономеры, которые охарактеризованы с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. LNA-модифицированные нуклеотиды выделены большими буквами. Выделены формулы и молекулярные массы ожидаемых соединений.

Олигонуклеотид	Последовательность	Формула/ молекулярная масса	
		нзмодифицированный олигонуклеотид	олигонуклеотид с LNA- мономерами
$Mykat25^{LNA}$	5'-gatcacCAGCGcatcg-3'	$C_{164}H_{207}N_{67}O_{98}P_{16}$ 5180.4	$C_{169}H_{207}N_{67}O_{103}P_{16}$ 5320.4
$L8^{LNA}$	5'-cgatgcCGCTGgtgac-3'	$C_{165}H_{209}N_{68}O_{102}P_{16}$ 5202	$C_{170}H_{209}N_{68}O_{107}P_{16}$ 5342

В масс-спектре олигонуклеотида $L8^{LNA}$ (рис. 5А), кроме основного пика ожидаемой массы с m/z 5373,8, зарегистрирован пик меньшей массы с m/z 4755,7, который может соответствовать более короткому олигонуклеотиду длиной 15 н. Детекция такого более короткого олигонуклеотида в МАЛДИ-масс-спектре объясняет высокую интенсивность неспецифического ампликона, образующегося при проведении ПЦР с праймерами $L7 - L8^{LNA}$ (рис. 4А, дорожки 2 и 3;

рис. 4Б, дорожки 1, 2). Соотношение площадей под группой пиков ожидаемой массы (m/z 5373,8) и меньшей массы (с m/z 4755,7) показывает, что олигонуклеотид длиной 15 н. составляет около 25% общего количества Л8^{LNA}, что вполне достаточно для проведения ПЦР (концентрация праймера Л8^{LNA} при проведении ПЦР составляла 0,5-1 мкМ).

Существенным недостатком синтезированных олигонуклеотидов с LNA-мономерами является наличие группы пиков (рис. 6 и рис. 7) вместо одного пика ожидаемой массы (табл. 2), как это должно иметь место в случае корректного синтеза [13]. Большинство этих дополнительных пиков, возможно, является результатом неполного обессоливания образца, содержащего олигонуклеотид.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Использование LNA-модифицированных праймеров позволяет детектировать точечные мутации в геноме лекарственно-устойчивых микобактерий туберкулёза посредством аллель-специфичной ПЦР, без дополнительного секвенирования ампликона, т.е. дифференцировать микобактерии туберкулёза дикого и мутантного (в кодоне 315 гена *katG*) типов (чувствительные и резистентные патогены к изониазиду, противотуберкулёзному препарату первого ряда). Это свидетельствует о достаточной для проведения ПЦР степени очистки праймеров. Кроме того, использование очищенных посредством ВЭЖХ праймеров, несомненно, позволит повысить эффективность ПЦР-анализа.

Методом термической денатурации показано, что T_m олигонуклеотидного дуплекса длиной 17 н., содержащего по пять комплементарных LNA-мономеров в одной нити, резко возрастает (примерно на 47°C) по сравнению с немодифицированным дуплексом, что значительно выше ожидаемой величины. Анализ МАЛДИ-масс-спектров одонитевых олигонуклеотидов, образовавших дуплекс, показал, что несмотря на очистку посредством электрофореза в ПААГ, олигонуклеотид с LNA-мономерами содержит фракцию олигонуклеотида с недостающими звеньями, а также фракции с неудалёнными защитными группами.

Созданные молекулярно-генетические тест-системы для выявления изолятов дикого типа и резистентных микобактерий туберкулёза к изониазиду могут применяться в диагностических лабораториях со стандартным ПЦР-оборудованием и позволят сократить определение лекарственной устойчивости микобактерий туберкулёза с 1-3 месяцев традиционными бактериологическими методами, которые используют во многих противотуберкулёзных диспансерах, до 1-3 дней с помощью ПЦР.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта АМН 72/2007 Академии медицинских наук Украины, а также Центра коллективного пользования прибором "Масс-спектрометрический комплекс с лазерной десорбцией и ионизацией Autoflex II" НАН Украины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Низова А.В., Степанишина В.Н., Майская Н.В., Богун А.Г., Майорова А.А., Шемякин И.Г. (2007) Эпидемиология и инфекционные болезни, **4**, 7-10.
2. Lipin M., Stepanshina V., Shemyakin I., Shinnick T. (2007) Clin. Microbiol. Infect., **13**, 620-626.
3. Исакова Ж.Т., Гончарова З.К., Алдашев А.А. (2008) Проблемы туберкулёза и болезней лёгких, **11**, 39-42.
4. Mokrousov I., Otten T., Filipenko M., Vyazovaya A., Chrapov E., Limeschenko E., Steklova L., Vyshnevskiy B., Narvskaya O. (2002) J. Clin. Microbiol., **40**, 2509-2512.
5. Wu X., Lu Y., Zhang J., Ding B. (2006) Chin. Med. J., **119**(3), 230-233.
6. SantaLucia J. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**(4), 1460-1465.
7. Schütz E., von Ahsen N. (1999) Biotechniques, **27**(6), 1218-1224.

ПЦР С ПРАЙМЕРАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ LNA-НУКЛЕОТИДЫ

8. *von Ahsen N., Wittwer C., Schütz E.* (2001) Clin. Chem., **47**(11), 1956-1961.
9. *Лиманский А.П., Минухин В.В., Лиманская О.Ю., Павленко Н.В., Мишина М.М., Цыганенко А.Я.* (2005) Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, **3**, 33-39.
10. *Лиманский А.П.* (1997) Ультразвуковая перинатальная диагностика, **8-9**, 209-217.
11. *Ильина Е.Н., Говорун В.М.* (2009) Биоорганическая химия, **35**(2), 149-164.
12. *Sauer S.* (2007) J. Biochem. Biophys. Methods, **70**(2), 311-318.
13. *Humeny A., Bonk T., Berkholtz A., Wildt L., Becker C.-M.* (2001) Clin. Biochem., **34**(6), 531-536.

Поступила: 15. 04. 2010.

CHARACTERIZATION OF OLIGONUCLEOTIDES WITH LNA-MONOMERS FOR PCR DETECTION OF POINT MUTATIONS IN MYCOBACTERIA TUBERCULOSIS GENOME

*O.Yu. Limanskaya^{1,2}, T.N. Fesenko³, V.A. Pokrovskiy³, T.N. Mukhina⁴, V.N. Stepanshina⁴,
I.G. Shemyakin⁴, A.P. Limanskiy¹*

¹Mechnikov Institute for Microbiology and Immunology, Academy of Medical Sciences of Ukraine,
Pushkinskaya ul., 14, Kharkov, 61057 Ukraine; e-mail: olga.limanskaya@mail.ru

²National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine",
Pushkinskaya ul., 83, Kharkov, 61023 Ukraine

³Chuyko Institute for Surface Chemistry of NASU, ul. Generala Naumova, 17, Kiev, 03164 Ukraine

⁴State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology,
Obolensk, Moscow Region, 142279 Russia

Point mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) have been analyzed in codon 315 of the *katG* gene by conventional polymerase chain reaction (PCR) using primers containing locked nucleic acid (LNA) modified nucleotides. Purity and structure of primers containing 5 LNA monomers of 17 nucleotides in length were characterized by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and a 17-mer duplex formed by two complementary oligonucleotides was characterized by the method of thermal denaturation. The duplex containing five LNA monomers per each strand was characterized by a higher melting temperature than it was expected using extrapolation of theoretical calculation for nucleotide modification of one strand of the duplex. Detection of any of six possible mutations in *katG* codon 315 (i.e. discrimination between sensitive and resistant MTB) requires just one PCR employing a set of two primers with one LNA-modified primer; this is an important advantage of oligonucleotides containing LNA over unmodified nucleotides: employment of multiplex PCR would require up to 12 primers. Problems of control of oligonucleotide modification by LNA monomers are discussed.

Key words: DNA melting, point mutation, polymerase chain reaction, mycobacteria tuberculosis, locked nucleic acid, mass spectrometry with matrix-assisted laser desorption/ionization.