

УДК 578.086

©Коллектив авторов

ПРИМЕНЕНИЕ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ В РЕШЕНИИ ЗАДАЧ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

*Е.В. Дубровин^{1,2}, Г.В. Преснова^{1,4}, М.Ю. Рубцова^{1,2,4}, В.Г. Григоренко^{1,2,4},
А.И. Иванов^{1,2}, А.М. Егоров^{1,2,4}, И.В. Яминский^{1,2,3*}*

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119234, Москва, ул. Ленинские горы, 1; эл. почта: yaminsky@nanoscopy.ru

²“Центр перспективных технологий”, Москва

³НПП “Центр перспективных технологий”, Москва,

⁴“НПП Иммунотех”, Москва

Представлены новые подходы, направленные на повышение эффективности определения ДНК методом сканирующей зондовой микроскопии с использованием высокоспецифичной гибридизации на аффинных поверхностях и наноструктур золота в качестве метки.

Сканирующая зондовая микроскопия позволяет по обнаружению золотых меток на аффинной поверхности регистрировать единичные акты гибридизации с последующим автоматическим подсчётом их общего числа.

Ключевые слова: сканирующая зондовая микроскопия, анализ и обработка изображений, ДНК биосенсор, высокоспецифическая гибридизация, наночастицы.

ВВЕДЕНИЕ

Процесс предварительного наращивания клеток для последующего выделения ДНК является наиболее длительной стадией молекулярно-генетической диагностики. Он может занимать от 8 ч до нескольких дней и даже недель в зависимости от скорости деления клеток. Амплификация интересующего гена методом ПЦР также является достаточно длительной стадией. Этот метод позволяет существенно увеличить концентрацию исследуемой ДНК и, таким образом, увеличить специфичность метода, но при этом он требует для проведения не менее двух часов, а также наличия специализированного оборудования – амплификаторов ДНК, которые не всегда входят в комплектацию клинических диагностических и микробиологических лабораторий. С точки зрения разработки новых методов выделения и определения диагностики, в том числе отвечающих требованиям методов для персонализированной медицины, преимущественно обладают методы анализа, основанные на уменьшенном количестве стадий и осуществляемые с использованием

минимального числа видов диагностического оборудования. Добиться этого возможно при увеличении специфичности метода выделения ДНК и существенном повышении чувствительности метода регистрации результатов гибридизации. Для этих целей предлагается использовать аффинные поверхности для высокоэффективного улавливания специфической ДНК из образцов и увеличить чувствительность детекции ДНК на носителях до уровня регистрации единичных биоспецифических взаимодействий.

Сканирующая зондовая микроскопия позволяет осуществить визуализацию одиночных молекул белков [1, 2], ДНК [3, 4] и РНК [5]. Высокое пространственное разрешение, достигаемое в экспериментах с помощью этого метода, не требующего сложных процедур пробоподготовки, наличие развитого инструментария и программного обеспечения являются достоинствами сканирующей зондовой микроскопии, которые открывают широкие возможности для её эффективного использования в решении практических задач современной медицины.

* - адресат для переписки

В данной статье показаны возможности сканирующей зондовой микроскопии применительно к обнаружению молекул ДНК с заданной последовательностью оснований (фрагментов ДНК вирусов или патогенных бактерий).

МЕТОДИКА

Подложки из кремния модифицировали в 10 мМ растворе 3-глицидопропилтриметоксисилана в сухом толуоле в течение 20 ч при 80°C. Отмывку носителей проводили последовательно в течение 10 мин в сухом толуоле, этаноле и деионизованной воде. Затем полученные пластины высушивали воздухом и выдерживали 10 мин при 100°C. Для проведения ковалентной иммобилизации олигонуклеотиды, содержащие амигруппу на 5'-конце, растворяли в солевом буферном растворе до конечной концентрации 20 мкМ и наносили на поверхность, модифицированную эпокси-группами. Для блокирования свободных эпокси-групп на кремнии проводили инкубацию носителей в 25% растворе этаноламина при 45°C в течение 15 мин.

Для получения коллоидного золота использовали метод Френса [6], основанный на восстановлении золотохлористоводородной кислоты HAuCl_4 цитратом натрия. Размеры полученных наночастиц золота были определены методом сканирующей электронной микроскопии. В работе были использованы частицы золота с размером 27 ± 4 нм.

В экспериментах был использован сканирующий зондовый микроскоп Наноскоп-3а ("Digital Instruments", США) и программное обеспечение ФемтоСкан Онлайн (Центр перспективных технологий, www.nanoscopy.ru). Измерения были проведены в режиме прерывистого контакта (теппинг-моды).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для обнаружения ДНК-мишени с определённой последовательностью оснований используются олигонуклеотидные зонды, комплементарные к выявляемой последовательности оснований ДНК-мишени. В принципе, сканирующая зондовая микроскопия обладает принципиальной возможностью отличать на изображениях фрагменты одноцепочечной и двухцепочечной ДНК [7]. В этом случае, сканирующая зондовая микроскопия даёт прямой путь наблюдения актов гибридизации ДНК-мишени и ДНК-зонда. Определённые преграды на пути внедрения такого способа в практическую клиническую

диагностику обусловлены рядом причин. Наблюдаемая высота молекул ДНК, адсорбированных на поверхности, имеет типичную высоту менее 1 нм, что лишь примерно на 2 порядка превышает разрешающую способность сканирующего зондового микроскопа. Следовательно, вносимая погрешность измерений может находиться на уровне единиц и более процентов. Кроме того, надо тщательно следить за чистотой используемых химических препаратов и применяемых подложек. Существенным ограничением является следующий фактор. В медицинской диагностике в качестве ДНК-зонда используются, как правило, короткие олигонуклеотидные последовательности длиной в 25-40 оснований. Наблюдение таких коротких последовательностей в зондовом микроскопе не очень эффективно из-за эффекта уширения, обусловленного конечным радиусом зонда (типичное значение радиуса около 10 нм). Использование уникальных зондов с радиусом закругления менее 1 нм в клинической практике становится дорогостоящим способом. Однако, можно с определённой долей уверенности утверждать, что дальнейшее совершенствование методов сканирующей зондовой микроскопии, может привести к прогрессу в этой области.

Простым выходом из этой ситуации может быть использование специальных меток, химически пришитых к ДНК-зонду. В качестве таких меток могут служить наночастицы золота или кремния. Нами рассмотрен случай использования золотых наночастиц золота размером около 27 нм.

Метод сканирующей зондовой микроскопии позволяет регистрировать в поле зрения единичные олигонуклеотидные зонды (см. рис. 1), демонстрируя тем самым чрезвычайно высокую чувствительность. Изображение на рисунке 1 соответствует той области образца, где были предварительно закреплены олигонуклеотидные зонды по описанной ранее методике [8].

Контроль монодисперсности исходных золотых наночастиц осуществлялся с помощью просвечивающего электронного микроскопа LEO912AB ("Carl Zeiss AG", Германия). Изображение золотых наночастиц представлено на рисунке 2. Средний размер частиц составил 27 нм, среднеквадратичное отклонение – 4 нм.

Метод сканирующей зондовой микроскопии позволяет проводить количественный подсчёт числа золотых меток на заранее заданной области.

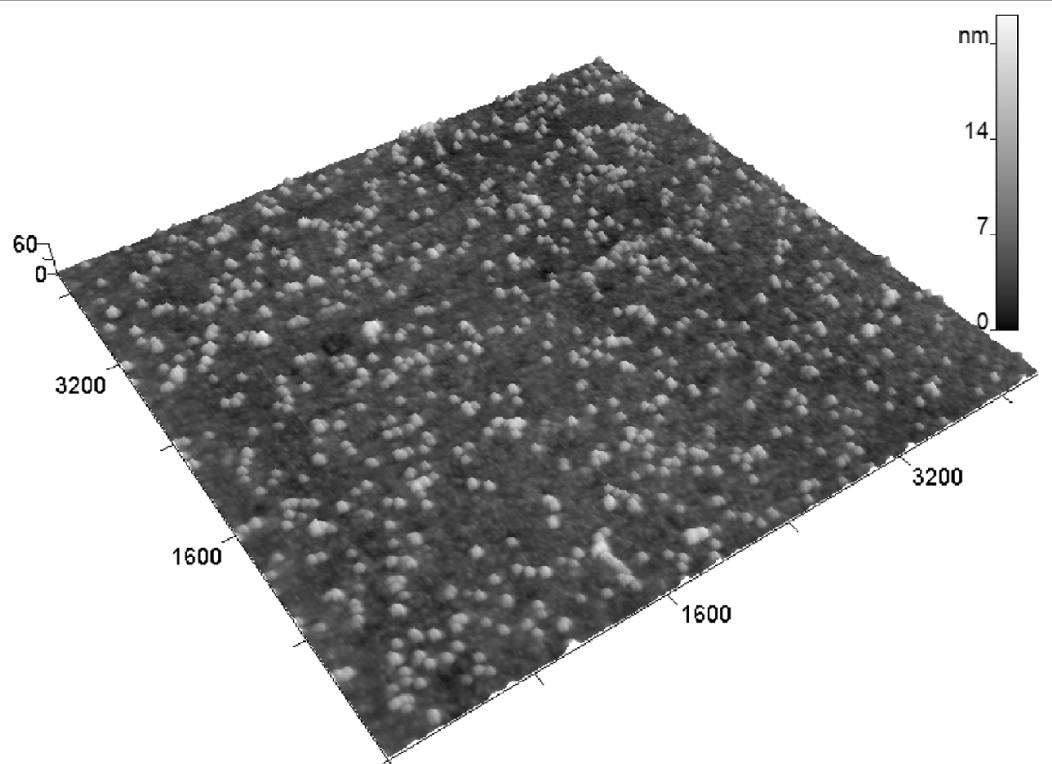


Рисунок 1. Изображение меченных золотыми наночастицами олигонуклеотидных зондов, полученное с помощью сканирующего зондового микроскопа в режиме атомно-силовой микроскопии. Размер наблюдаемой области $4,3 \times 4,3$ мкм². Наблюдаемый перепад высот, как видно из градаций цветовой палитры на размерном отрезке справа, составляет 25 нм.

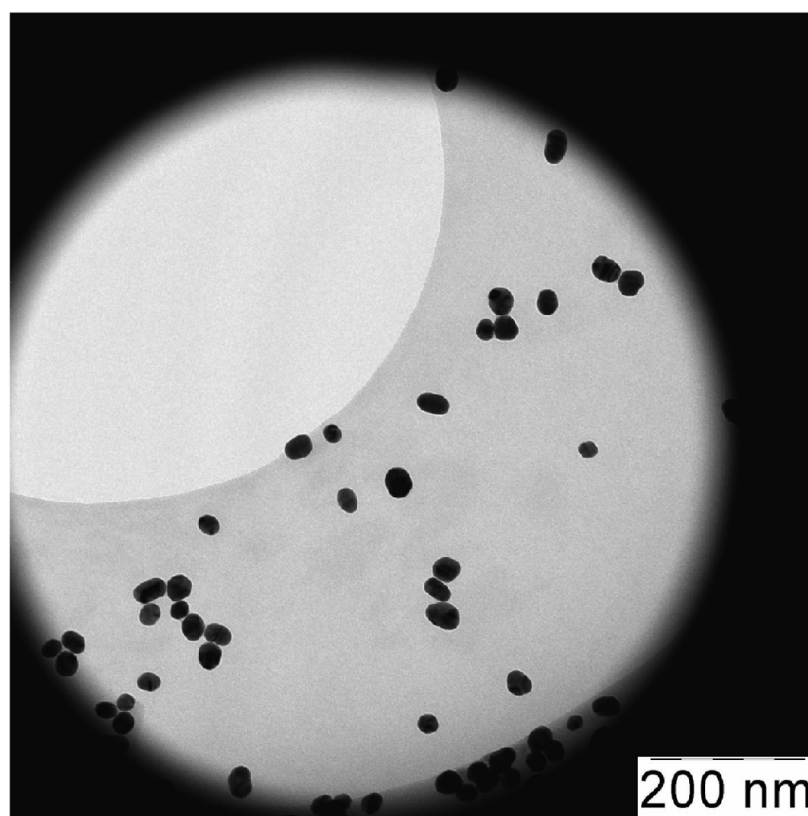


Рисунок 2. Изображение наночастиц золота, полученное методом просвечивающей электронной микроскопии. Мерный отрезок соответствует 200 нм.

СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

На контрольных образцах (модифицированный кремний без олигонуклеотидных зондов) – в сканирующий зондовый микроскоп наблюдаются лишь единичные выступы, соответствующие характерным размерам наночастиц золота.

На рисунке 3 представлены результаты измерений контрольных образцов – модифицированной поверхности кремния без олигонуклеотидных зондов. Наблюдаемая шероховатость поверхности находится в пределах 4 нм, что существенно меньше наблюдаемого размера золотых наночастиц.

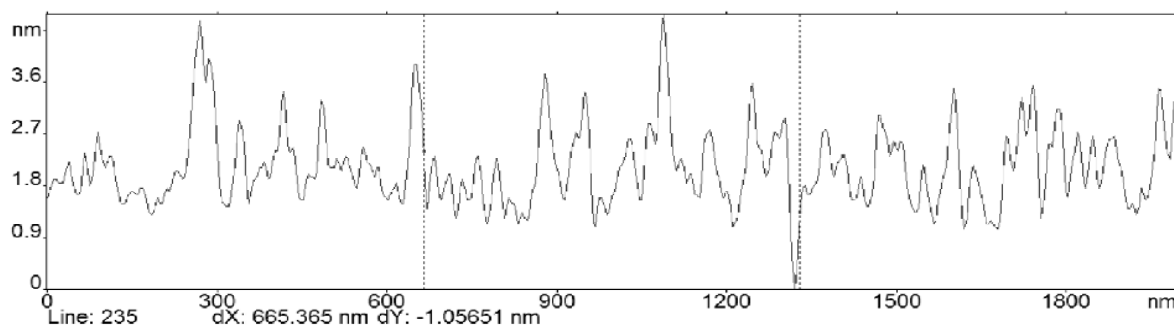
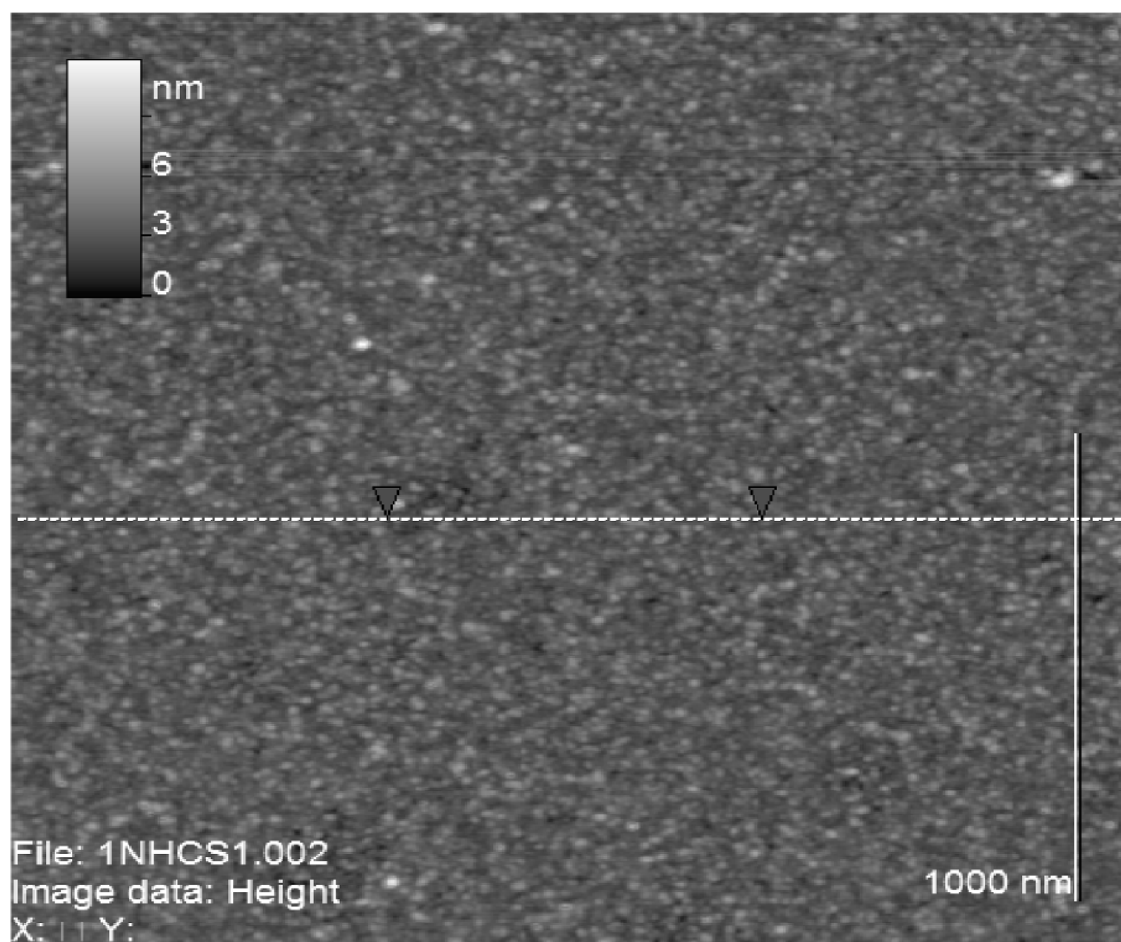


Рисунок 3. Контрольные измерения модифицированной поверхности кремния без олигонуклеотидных зондов. Вверху – изображение участка поверхности размером 2×2 мкм², внизу – поперечное сечение вдоль выбранной линии на изображении. Перепад высот вдоль этой линии отражает шероховатость исходной поверхности и находится в пределах 4 нм, что существенно меньше наблюдаемого размера золотых наночастиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Разработан эффективный метод выявления ДНК-мишени с помощью олигонуклеотидных зондов (нуклеиновые кислоты бактериальных ферментов бета-лактамаз CTX-M и VIM типов и нуклеиновые кислоты, соответствующие консервативным участкам генов *E. coli*) [8], меченных золотыми наночастицами, и последующим наблюдением в сканирующий зондовый микроскоп. Метод атомно-силовой микроскопии позволяет осуществлять подсчёт актов гибридизации на поле 10×10 мкм² с точностью до единиц процентов.

Работа выполнена при поддержке ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы" (государственный контракт № 14.512.11.0026).

2. Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров (под ред. Яминского И.В.) (1997) Научный мир, М.
3. *Sergeev V.S., Mikhailenko S.V., Pyshkina O.A., Yaminsky I.V., Yoshikawa K.* (1999) J. Am. Chem. Soc., **121**, 1780-1785.
4. *Dubrovina E.V., Gerritsen J.W., Zivkovic J., Yaminsky I.V., Speller S.* (2010) Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **76**, 63-69.
5. *Drygin Yu.F., Bordunova O.A., Gallyamov M.O., Yaminsky I.V.* (1998) FEBS Letters, **425**, 217-221.
6. *Frens G.* (1973) Nature, **241**, 20-22.
7. *Галлямов М.О., Яминский И.В.* (1998) Сканирующая зондовая микроскопия нуклеиновых кислот (описание лабораторной работы специального физического практикума кафедры физики полимеров и кристаллов физического ф-та МГУ), Центр перспективных технологий, М.
8. *Presnova G.V., Rubtsova M.Yu., Presnov D.E., Grigorenko V.G., Yamskiy I.V., Yegorov A.M.* (2014) Biochemistry (Moscow) Supplement Series B Biomedical Chemistry, **8**, 164-167.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kiselyova O.I., Yaminsky I.V., Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Kuznetsov V.Yu., Archakov A.I.* (1999) Arch. Biochem. Biophys., **371**(1), 1-7

Поступила: 10. 07. 2013.

IMPLEMENTATION OF SCANNING PROBE MICROSCOPY FOR THE SOLUTION OF MOLECULAR DIAGNOSTICS TASKS

E.V. Dubrovina^{1,2}, G.V. Presnova^{1,2,4}, M.Yu. Rubtsova^{1,2,4}, V.G. Grigorenko^{1,2,4}, A.I. Ivanin^{1,2}, A.M. Egorov^{1,2,4}, I.V. Yaminsky^{1,2,3}

¹Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, 1, Moscow, Russia
e-mail: yaminsky@nanoscopy.ru

²Advanced Technologies Center, Moscow, Russia

³RPE Advanced Technologies Center, Moscow, Russia

⁴"RPE Immunotek", Moscow, Russia

We present new approaches to improve the efficiency of DNA by scanning probe microscopy using a highly specific hybridization on affine surfaces and nanostructures of gold as a labels.

Scanning probe microscopy allows to register of individual acts of hybridization by the detection of gold labels on the surface affinity followed by automatic calculation of the total.

Key words: scanning probe microscopy, analysis and image processing, DNA-biosensor, highly specific hybridization, nanoparticles.