

ОПТИМІЗАЦІЯ СТВОРЕННЯ БІОСЕЛЕКТИВНОГО ЕЛЕМЕНТУ ППР-БІОСЕНСОРА ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ОЛІГОНУКЛЕОТИДІВ ФІЛАДЕЛЬФІЙСЬКОЇ ХРОМОСОМИ

Соболевський М.С.¹, Самойлов А.В.², Ушенін Ю.В.², Солдаткін О.П.¹

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,

maxim.sobolevskiy@gmail.com

²Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є.Лашкарьова

Однією з нагальних проблем у діагностиці хронічної мієлоїдної лейкемії є розробка таких методів детекції філадельфійської хромосоми, які матимуть меншу вартість виготовлення та експлуатації апаратів і більшу швидкість аналізу, ніж ПЛР та FISH. Перспективним напрямом у детекції олігонуклеотидів гібридного гена *BCR-ABL1* філадельфійської хромосоми є розробка гібридизаційних ДНК-біосенсорів на основі спектрометрії поверхневого плазмонного резонансу (ППР).

Метою даної роботи була оцінка впливу послідовності цільового олігонуклеотида та умов іммобілізації зондового олігонуклеотида на селективність ППР-біосенсора у разі гібридизації іммобілізованих олігонуклеотидів з олігонуклеотидами-мішенями. Оскільки в структурі гена *BCR-ABL1* можуть відбуватись спонтанні точкові мутації, було також вирішено провести дослід з селективної гібридизації ДНК-мішеней, що відрізняються між собою точковими замінами одного або двох нуклеотидів.

Дослід з детекції олігонуклеотидів-мішеней виконували на ППР-спектрометрі «Плазмон-6», що розроблений Інститутом фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України. Для цього на сенсорній поверхні було іммобілізовано зондові одноланцюгові молекули ДНК *mod-Ph*, що повністю комплементарні до 24-основного фрагменту гібридного гена *BCR-ABL1* у разі перебудови e13a2 [1]. Розчини, в яких проводили їх іммобілізацію, обрано з тих міркувань, що за низької концентрації йонів у середовищі збільшується електростатичне відштовхування між ДНК-зондами, що приводить до зменшення кількості молекул, іммобілізованих на сенсорній пластинці та зменшення стеричних перешкод для їх подальшої гібридизації з цільовими молекулами ДНК [2]. Селективність отриманих біосенсорів визначали як відношення сенсорних відгуків у разі гібридизації *mod-Ph* із повністю комплементарною мішенню та з частково комплементарним олігонуклеотидом, що відповідає ділянці гена *BCR* за відсутності розриву між 13 та 14 екзонами [1].

Імобілізацію *mod-Ph* проводили за методикою Herne і Tarlov [3] у середовищі таких буферних розчинів: KH_2PO_4 (рН 4) концентрацією 0,5 М та цитратного буферного розчину (рН 3) концентраціями 0,02, 0,1 та 0,25 М.

З метою визначення селективності ППР-біосенсорів для детекції точкових замін нуклеотидів було проведено досліди з гібридизації трьох 21-основних зондових олігонуклеотидів, послідовності яких відрізняються між собою однією або двома азотистими основами, із відповідними цільовими олігонуклеотидами. Середовище імобілізації зондів – 0,5 М KH_2PO_4 (рН 4).

В результаті проведених нами досліджень та отриманих даних можна зробити такі висновки:

1. Встановлено, що найвищі значення сенсорного відгуку даних модифікацій ППР-біосенсора спостерігаються для концентрацій цільових олігонуклеотидів, вищих за 200 нМ.

2. Виявлено, що середовищем для імобілізації, що дає змогу для зв'язування із сенсорною поверхнею найбільшої кількості зондових молекул *mod-Ph*, є 0,5 М розчин KH_2PO_4 .

3. Оцінено, що найменшою детектованою концентрацією олігонуклеотидів-мішеней для досліджених модифікацій ППР-біосенсора є 50 нМ.

4. Показано, що ППР-біосенсор, модифікований зондами *mod-Ph* у цитратному буферному розчині, демонструє значення селективності (2,2-2,3 відносні одиниці) вищі, ніж значення селективності біосенсора, модифікованого відповідними зондами у середовищі 0,5 М KH_2PO_4 (1,6 відносних одиниць).

5. Встановлено, що селективність ППР-біосенсора для детекції одноступінчастих замін у цільовому олігонуклеотиді становила від 1,2 до 2,9 відносних одиниць.

Список використаної літератури:

1. Ross, D., O'Hely, M., Bartley, P. et al. Distribution of genomic breakpoints in chronic myeloid leukemia: analysis of 308 patients. *Leukemia*. 2013. № 27, P. 2105–2107.
2. Peterson A.W., Heaton R.J., Georgiadis R.M., The effect of surface probe density on DNA hybridization. *Nucleic Acids Res.* 2001, Vol. 29, №24, P. 5163-5168.
3. T. Herne, M. Tarlov. Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces. *Journal of the American Chemical Society*. 1997. Vol. 119, №38. P. 8916–8920.