

УДК 577

АНАЛИЗ ГИБРИДИЗАЦИИ ДНК НА МИКРОЧИПАХ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Е.В. Дубровин, Г.В. Преснова, М.Ю. Рубцова, А.М. Егоров,
В.Г. Григоренко, В.М. Гукасов, И.В. Яминский

Использованные в данной работе микрочипы представляют собой поверхность с иммобилизованными определённым образом олигонуклеотидными зондами, способными гибридизоваться с комплементарными им участками одноцепочечной ДНК-мишени, находящейся в анализируемом растворе, нанесённом на эту поверхность [1]. Принцип комплементарности нуклеиновых кислот, заложенный в основу работы данного метода, обеспечивает её высокую аффинность и селективность, позволяя различать очень близкие последовательности молекул ДНК-мишени. Метод олигонуклеотидных микрочипов (ДНК-микрочипов) зарекомендовал себя как мощный инструмент для применения в медицинской диагностике, в пищевой индустрии, для мониторинга окружающей среды и других областях [2-6].

Как правило, ДНК-мишень несёт на себе какую-либо метку, например, это могут быть флуоресцентные метки [7-8], наночастицы золота [9], ферменты [10], радиоизотопы [11]. Для оценки степени гибридизации чаще всего используют оптические методы детекции (например, [7, 8, 11-12]). Также для детекции результатов гибридизации могут быть использованы электрохимические методы [13] и поверхностный плазмонный резонанс [14]. Особый интерес представляет использование для этих целей методов микроскопии высокого разрешения. Например, Ким с соавторами [15] продемонстрировали, что детекция результатов гибридизации ДНК-мишеней путём простого подсчёта числа пришитых к ним золотых наночастиц, регистрируемых сканирующей электронной микроскопией (СЭМ), позволяет достичь пределов обнаружения 1 пМ ДНК, в то время как предел обнаружения ДНК методом флуоресцентной детекции составил лишь 1 нМ. При этом соотношение сигнал/шум также оказалось на два порядка выше такового при флуоресцентном детектировании.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) обладает сравнимым с СЭМ латеральным разрешением, при этом, в отличие от СЭМ, имеет высокое разрешение по высоте. Сре-

ди прочих преимуществ АСМ перед СЭМ следует назвать относительно простые требования подготовки образцов, то есть для изучения ДНК-микрочипа, как правило, достаточно лишь прикрепить его на специальную шайбу. В ряде работ АСМ использовалась для изучения процессов, протекающих на поверхности микрочипов. Так, в работе [16] контролировалась шероховатость ДНК-микрочипа до и после гибридизации и было продемонстрировано, что она возрастает в случае, если ДНК-микрочип изготовлен на гладкой подложке (SiO_2) и незначительно падает, если ДНК-микрочип изготовлен на шероховатой подложке (SnO_2 , допированный Sb). АСМ позволяет выработать количественные критерии для оценки гибридизации ДНК-мишени на олигонуклеотидном микрочипе. В качестве такого критерия, например, использовалось суммарная толщина слоя чувствительной поверхности микрочипа с ДНК-мишенью, полученная с помощью АСМ-нанолитографии [17]. Изменение этой толщины после проведения гибридизации колебалось от 2,9 до 5,5 нм в зависимости от типа используемых в эксперименте зондов. Другим количественным критерием гибридизации ДНК на микрочипе было количество пришитых к ДНК-мишени золотых наночастиц на единицу поверхности, визуализированных на АСМ-изображениях [16]. В этой работе плотность наночастиц варьировала в пределах от $(6,6 \pm 0,3) \times 10^{10}$ до $(2,9 \pm 0,5) \times 10^{11}$ частиц/см².

АСМ позволяет детектировать отдельные гибридизованные молекулы и без каких-либо меток. Так, Кук с соавторами [18] анализировали особенности рельефа, наблюдаемые на АСМ-изображениях ДНК-микрочипов, и обнаружили увеличение средней высоты и диаметра находящихся на поверхности микрочипа наночастиц золота после проведения гибридизации. Это позволило им ввести морфологические критерии, позволяющие различить комплементарно гибридизованные от неспецифически связавшихся молекул ДНК и подсчитать количество каждого из них. В приведённом примере доля ком-

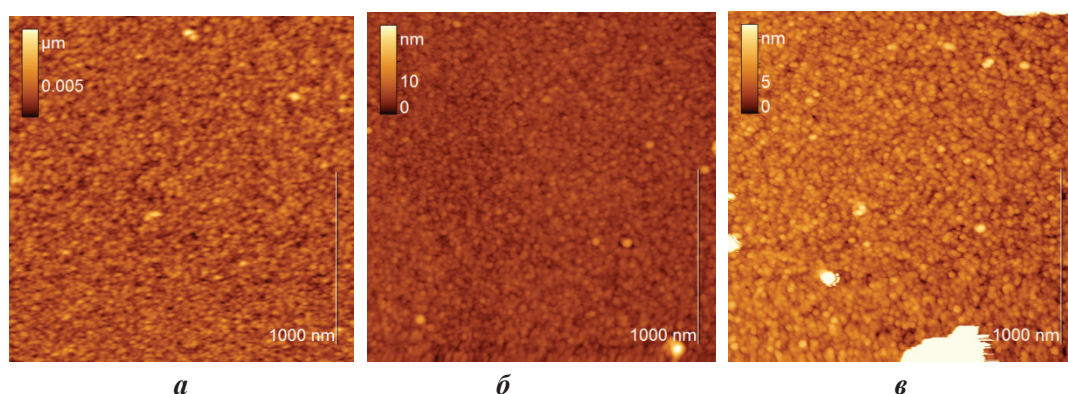


Рис. 1. АСМ-изображения поверхности олигонуклеотидного микрочипа: поверхность кремния, модифицированная ГОПС до (а) и после (б) нанесения олигонуклеотидных зондов, (в) после проведения гибридизации с комплементарными ДНК-мишенями. Размер изображений 2x2 мкм²

плементарно связавшихся олигонуклеотидных зондов составила 3,1%, в то время как доля неспецифическим образом связавшихся зондов – лишь 0,54-0,77%. Целью данной работы было дальнейшее развитие основанных на использовании АСМ количественных подходов оценки гибридизации ДНК на олигонуклеотидных микрочипах для идентификации нуклеиновых кислот, кодирующих бета-лактамазы СТХ-М типа. Для этого с помощью АСМ последовательно исследовалась морфология микрочипов на разных стадиях их изготовления и гибридизации.

В работе в качестве подложки использовался кремний, который очищался кислородной плазмой в течение 30 мин в установке реактивного ионного травления “RDE-300” (Alcatel, Франция), после чего обрабатывался 10 мМ раствором 3-глицидопропилтриметоксисилана (ГОПС) в сухом толуоле в течение 12 часов при 80°C, затем отмывался и выдерживался при 100°C в течение 10 мин. В дальнейшем, модифицированные аминогруппой на 5'-конце олигонуклеотидные зонды наносили на поверхность модифицированного кремния из раствора концентрацией 20 пмоль/мкл в 0,25 М натрий-фосфатном буфере, содержащем 0,3 М Na₂SO₄. После этого осуществляли блокирование свободных центров связывания белков на поверхности кремния в растворе, содержащем 1% БСА и 1% казеин в 10 мМК-фосфатном буфере pH 7,2, содержащем 0,15 М NaCl. Гибридизацию ДНК (1 нМ), меченной биотином, проводили в буфере 0,05 М NaH₂PO₄, 0,5 М NaCl, 0,005 М ЭДТА, pH 7,4 при температуре 45°C в течение 2 часов. Отмывку проводили 10 мМ калий-фосфатным буфером pH 7,2, содержащем 0,15 М NaCl и 0,1 % Твин 20. Затем микрочип инкубировали с раствором конъюгата стрептавидина с наночастицами золота в концентрации 40 нг/мл по белку в течение 45 мин при 37°C и отмывали. АСМ-исследования проводили на атомно-силовом микроскопе Nanoscope IIIa (Digital Instruments, США) в режиме прерывистого контакта с частотой сканирования 2,1 Гц, 512x512 точек. В работе использовались коммерческие кантилеверы fpN10 (Микромаш, Эстония) и NP-S1 (Veeco, США). Обработка и анализ изображений проводились с помощью программного обеспечения Фемто-

скан Онлайн (Центр перспективных технологий, Россия. www.nanoscopy.net).

На рис. 1 представлены полученные на воздухе АСМ-изображения поверхности кремния, модифицированного ГОПС до (рис 1а) и после (рис 1б) нанесения на него олигонуклеотидных зондов, а также поверхность микрочипа после проведения гибридизации с комплементарной ДНК-мишенью (рис. 1в). Визуальный анализ полученных АСМ-изображений не выявляет значимых отличий в морфологии данных поверхностей. Анализ среднеквадратичной шероховатости, вычисленной для этих поверхностей, демонстрирует небольшое увеличение своего значения от ГОПС-модифицированной поверхности к поверхности с гибридизованной ДНК: 1,60 нм, 1,80 и 1,88 нм для поверхностей, представленных соответственно на рис. 1а,б,в. Наблюдаемое увеличение среднеквадратичной шероховатости может отражать появление олигонуклеотидов, а затем молекул ДНК на поверхности.

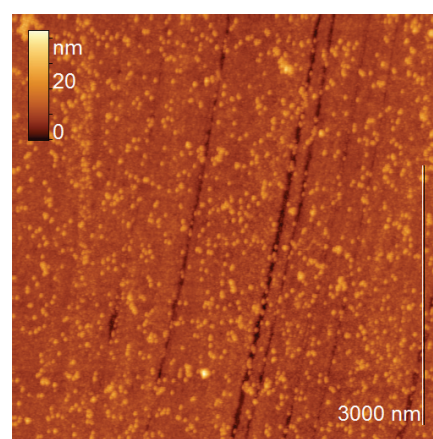


Рис.2. АСМ-изображение поверхности олигонуклеотидного микрочипа после проведения гибридизации с комплементарными ДНК-мишенями, мечеными наночастицами золота. Размер изображения 5x5 мкм²

Для надёжной визуализации результатов гибридизации к молекулам ДНК-мишеней пришивались золотые наночастицы, размер которых составлял 27±3 нм. АСМ-изображение микрочипа после гибридизации с меченой

наночастицами ДНК представлено на рис. 2. Поскольку АСМ-изображения содержат информацию о трёхмерном строении поверхности, в частности, наночастиц, полуавтоматический анализ данных АСМ позволяет рассчитать ряд параметров, характеризующих эти наночастицы, такие как высоту, площадь, объём, периметр, форм-фактор. Эти величины можно использовать для установления критериев, позволяющих отличить специфически связывающуюся наночастицу-метку от случайно адсорбированных частиц или загрязнений. Такие параметры, как суммарная площадь и объём частиц, нормированные на единицу поверхности, могут служить количественным критерием, характеризующим эффективность гибридизации ДНК. В таблице 1 приведены значения суммарных площади и объёма наблюдаемых на рис.2 наночастиц, на единицу поверхности, в сравнении с контрольными значениями (при отсутствии комплементарной гибридизации ДНК). В частности, площадь наблюдаемых на АСМ-изображении наночастиц на образце с проведённой комплементарной гибридизацией на порядок превышает это значение для контрольного образца, на котором отсутствовали олигонуклеотидные зонды. Данные критерии можно использо-

зовать для определения предела чувствительности детектирования гибридизации, а также для сравнения её эффективности.

Таблица 1.

Значения суммарной площади и объёма ассоциированных с ДНК-мишенями наночастиц золота, нормированные на единицу площади микрочипа

	Нормированная площадь наночастиц	Нормированный объём наночастиц, нм
Комплементарная гибридизация	0,082	0,804
Контроль	0,008	0,102

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), программы грантов Президента РФ для молодых учёных (МК-312.2013.2) и Российского фонда фундаментальных исследований (15-04-07678).

Список литературы:

1. Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray // *Science* 1995, 270, 467–470.
2. Yoo S.M., Choi J.H., Lee S.Y., Yoo N.C. Applications of DNA Microarray in Disease Diagnostics // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 19, 635–646.
3. Behr M.A., Wilson M.A., Gill W.P., Salamon H., Schoolnik G.K., Rane S., Small P.M. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray // *Science* 1999, 284, 1520–1523.
4. Nuwaysir E.F., Bittner M., Trent J., Barnett J.C., Afshari C.A. Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics // *Mol. Carcinog.* 1999, 24, 153–159.
5. Iida K., Nishimura I. Gene expression profiling by DNA microarray technology // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2002, 13, 35–50.
6. Hoheisel J.D. Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis // *Nat. Rev. Genet.* 2006, 7, 200–210.
7. Fodor S.P.A. DNA sequencing – Massively parallel genomics // *Science* 1997, 277, 393–395.
8. Sassolas A., Leca-Bouvier B.D., Blum L.J. DNA biosensors and microarrays // *Chem. Rev.* 2008, 108, 109–139.
9. Lytton-Jean A.K., Han M.S., Mirkin C.A. Microarray detection of duplex and triplex DNA binders with DNA-modified gold nanoparticles // *Anal. Chem.* 2007, 79, 6037–6041.
10. Ryan O., Smyth M.R., Fagain C.O. Horseradish peroxidase: the analyst's friend // *Essays Biochem.* 1994, 28, 129–146.
11. Herwig R., Aanstad P., Clark M., Lehrach H. Statistical evaluation of differential expression on cDNA nylon arrays with replicated experiments // *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, e117.
12. Herne T.M., Tarlov M.J. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces // *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 8916–8920.
13. Liao J.C., Mastali M., Gau V., Suchard M.A., Møller A.K., Bruckner D.A., Babbitt J.T., Li Y., Gornbein J., Landaw E.M., McCabe E.R.B., Churchill B.M., Haake, D.A. Use of electrochemical DNA biosensors for rapid molecular identification of uropathogens in clinical urine specimens // *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44, 561–570.
14. Malic L., Cui B., Veres T., Tabrizian M. Enhanced surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization on periodic gold nanoposts // *Opt. Lett.* 2007, 32, 3092–3094.
15. Kim H., Takei H., Yasuda K. Quantitative evaluation of a gold-nanoparticle labeling method for detecting target DNAs on DNA microarrays // *Sens. Actuators, B* 2010, 144, 6–10.
16. Lavalley V., Chaudou t P., Stambouli V. An atomic force microscopy study of DNA hairpin probes monolabelled with gold nanoparticle: Grafting and hybridization on oxide thin films // *Surface Science* 2007, 601, 5424–5432.
17. Han W.-H., Liao J.-M., Chen K.-L., Wu S.-M., Chiang Y.-W., Lo S.-T., Chen C.-L., Chiang C.-M. Enhanced Recognition of Single-Base Mismatch Using Locked Nucleic Acid-Integrated Hairpin DNA Probes Revealed by Atomic Force Microscopy Nanolithography // *Anal. Chem.* 2010, 82, 2395–2400.
18. Cook M.A., Chan C.-K., Jorgensen P., Ketela T., So D., Tyers M., Ho C.-Y. Systematic Validation and Atomic Force Microscopy of Non-Covalent Short Oligonucleotide Barcode Microarrays // *PLoS ONE* 2008, 3, e1546.