

УДК 616:579.873.21; 615.015.8

ДЕТЕКЦИЯ ИЗОЛЯТОВ ДИКОГО ТИПА И ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНОМЕ УСТОЙЧИВЫХ К ИЗОНИАЗИДУ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

© 2010 г. О. Ю. Лиманская^{1,2*}, Т. Н. Мухина³, В. Н. Степаншина³, И. Г. Шемякин³, Х. Wu⁴,
J. Zhang⁴, Т. В. Фесенко⁵, В. А. Покровский⁵, А. П. Лиманский¹

¹Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова Академии медицинских наук Украины,
Харьков, 61057, Украина

²Национальный научный центр “Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины”
Национальной академии аграрных наук, Харьков, 61023, Украина

³Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии,
пос. Оболенск, Калужская обл., 142279, Россия

⁴Institute of Tuberculosis Research, Beijing, 100091 China

⁵Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины, Киев, 03164, Украина

Поступила в редакцию 25.12.2009 г.

Принята к печати 09.02.2010 г.

Мутации в кодоне 315 гена *katG* микобактерий туберкулеза (МБТ) ассоциированы с устойчивостью к противотуберкулезному препарату первого ряда изониазиду (ИЗН). Разработано два варианта метода ПЦР для детекции однонуклеотидных полиморфизмов в кодоне 315. Использование двух наборов праймеров, в каждый из которых входит дополнительный конкурентный блокирующий праймер с 3'-терминальной фосфатной группой (для элиминации неспецифической амплификации), позволяет выявлять наличие в кодоне 315 гена *katG* наиболее распространенных точечных мутаций AGC → ACC и AGC → AGA. Проведение ПЦР с набором из двух праймеров, один из которых содержит 5 замкнутых нуклеотидов (LNA-мономеров), позволяет определить наличие любой из шести известных мутаций в кодоне 315 гена *katG*, т.е. дифференцировать чувствительность/резистентность исследуемого образца МБТ к ИЗН. Чистота и строение праймеров длиной 17 нуклеотидов, содержащих LNA-нуклеотиды, охарактеризованы методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии, а 17-членный дуплекс, образованный двумя комплементарными олигонуклеотидами, содержащими LNA-мономеры, — методом термической денатурации.

Ключевые слова: точечная мутация, ПЦР, микобактерии туберкулеза, изониазид, лекарственная устойчивость, LNA-мономеры, масс-спектрометрия MALDI-TOF.

DETECTION OF WILD TYPE ISOLATES AND POINT MUTATIONS IN GENOME OF ISONIAZID-RESISTANT MYCOBACTERIA TUBERCULOSIS, by O. Yu. Limanskaya^{1,2*}, T. N. Mukhina³, V. N. Stepanshina³, I. G. Shemyakin³, X. Wu⁴, J. Zhang⁴, T. V. Fesenko⁵, V. A. Pokrovskiy⁵, A. P. Limanskii^{1*} (¹Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov, 61057 Ukraine, *e-mail: olga.limanskaya@mail.ru; ²National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, National Academy of Agrarian Sciences, Kharkov, 61023 Ukraine; ³State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Kaluga Region, 142279 Russia; ⁴Institute of Tuberculosis Research, Beijing, 100091 China; ⁵Chuyko Institute for Surface Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 03164 Ukraine). The isoniazid resistance of mycobacteria tuberculosis (MBT) is associated with point mutations in the codon 315 of *katG* gene of MBT. The two PCR-techniques for detection of point mutations in codon 315 have been developed. A use of two sets of primers comprising the additional competitive blocking primer with 3'-terminal phosphate group (in order to eliminate unspecific amplification) allowed to identify most frequent point mutations AGC → ACC and AGC → AGA in the codon 315. PCR with a set of two primers one of which contained 5 LNA-monomers allowed to discriminate between

Принятые сокращения: LNA (locked nucleic acid) — замкнутая нуклеиновая кислота; MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization—time of flight) — времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; МТ (mutant type) — изолят мутантного типа; T_{an} — температура отжига; T_m — температура плавления; WT (wild type) — изолят дикого типа; ИЗН — изониазид; МБТ — микобактерии туберкулеза (*M. tuberculosis*); МЛУ — множественная лекарственная устойчивость.

* Эл. почта: olga.limanskaya@mail.ru

wild type and isoniazid-resistant MBT isolates; any of 6 known mutations in codon 315 of *katG* gene being detected. A structure and purity of the LNA-containing oligonucleotides (length of 17 nucleotides) was characterized by MALDI-TOF mass spectrometry; the duplex formed by two LNA-containing complementary oligonucleotides (length of 17 b.p.) was analyzed by thermal denaturation.

Key words: point mutation, PCR, mycobacteria tuberculosis, isoniazid, drug resistance, LNA-monomers, MALDI-TOF mass spectrometry.

Инфекционные болезни представляют серьезную угрозу для всего человечества: среди 51 млн. человек, ежегодно умирающих в мире, почти 17 млн. погибают от инфекционных и паразитарных болезней [1]. Заболеваемость туберкулезом является одной из нерешенных проблем практического здравоохранения. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [2] смертность от туберкулеза составляет около 2 млн. человек ежегодно. В Российской Федерации, как и в большинстве стран СНГ, показатели заболеваемости и смертности от туберкулеза в несколько раз выше, чем в странах Западной Европы (база данных Европейского регионального комитета ВОЗ, <http://data.euro.who.int/hfad/>). Ежегодно в Российской Федерации туберкулезом заболевает около 120 тыс. человек, общее количество больных составляет 2.5 млн. человек, а по экспертным оценкам — около 7 млн. [1]. Постановлением правительства № 715 от 01.12.2004 "Об утверждении перечня социально значимых заболеваний и перечня заболеваний, представляющих опасность для окружающих" туберкулез отнесен к социально значимым заболеваниям и внесен в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих (<http://arhiv.inpravo.ru/index.htm>).

Не менее важная проблема — широкое распространение штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ), устойчивых к действию лекарственных препаратов. И здесь основным решением проблемы является своевременная детекция таких штаммов, причем на ранних стадиях заболевания, что позволит контролировать распространение конкретного штамма и корректировать схему химиотерапии в каждом конкретном случае. Есть ряд классических, утвержденных ВОЗ, методов определения устойчивости микобактерий к противотуберкулезным препаратам. Однако определение спектра лекарственной устойчивости МБТ занимает от 1 до 3 месяцев, в течение которых первичным больным назначают стандартный курс химиотерапии, предусматривающий прием противотуберкулезных препаратов первого ряда (согласно рекомендациям ВОЗ, к препаратам первого ряда отнесены изониазид, рифампицин, этамбутол, которые совместно с пиперазидом используются в коротком курсе лечения туберкулеза [2]). В отсутствие данных по чувствительности/устойчивости конкретного клинического изолята МБТ к назначенным препаратам существует вероятность того, что лечение окажется

неэффективным. Быстрое определение множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) МБТ чрезвычайно важно для выбора эффективной методики противотуберкулезной терапии. Решить эту проблему можно, взяв на вооружение современные методы генной инженерии и данные по генотипированию МБТ штаммов. При удачном раскладе время проведения анализа сократится до 1 суток.

В литературе описано множество молекулярно-биологических методов детекции устойчивых штаммов МБТ [3–6]. Исследования молекулярных механизмов устойчивости показали, что устойчивость МБТ к тому или иному препарату обусловлена единичными мутациями в определенных генах. Такие точечные мутации можно выявить, используя различные варианты ПЦР, а именно: 1) с применением праймера, имеющего некомплементарный по отношению к ДНК-матрице МБТ дикого типа (WT) нуклеотид на 3'-конце [7]; 2) с применением дополнительного праймера, у которого блокирован 3'-конец [8]; 3) с использованием LNA-содержащего праймера [9]; 4) с использованием дополнительного конкурентного LNA-модифицированного олигонуклеотида [10].

Принципиально новым подходом к решению проблемы определения МЛУ является разработка технологии биологических микрочипов, высокая чувствительность которых позволяет на клиническом материале одновременно проводить идентификацию возбудителя и анализ его резистентности сразу к нескольким препаратам. "ТБ-БИОЧИП" [11] — принципиально новая тест-система, которая позволяет выявить мутации в генах *rpoB*, *katG*, *oxyR*, *inhA* (всего 50 мутаций) МБТ, по которым можно определить профиль МЛУ всего за 48 ч.

Одной из наиболее распространенных форм устойчивости МБТ является устойчивость к изониазиду (ИЗН). Генетически ИЗН-устойчивость МБТ в основном обусловлена мутациями, локализованными в кодоне 315 гена *katG*, который кодирует синтез каталазы-пероксидазы [12, 13]. Общепринятая стратегия для детекции точечных мутаций основана на использовании метода аллель-специфичной ПЦР, где 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 фрагмента, но на практике амплифициру-

ются и последовательности, содержащие некомплементарные нуклеотиды. Современная стратегия детекции и типирования патогенов человека и животных состоит в разработке технологий, основанных на явлении ДНК-полиморфизма и на его молекулярно-генетическом анализе с использованием различных модификаций ПЦР. Для того, чтобы методом ARMS-ПЦР (ARMS – amplification refractory mutation system, система амплификации устойчивых мутаций) определить, к какому типу, WT или MT (мутантному типу), относится клинический изолят МБТ, необходимо провести анализ по 6 вариантам точечных мутаций в кодоне 315 гена *katG*, используя семь пар праймеров [14]. Использование стандартного варианта ПЦР, но с LNA-модифицированными праймерами, значительно упрощает конструирование набора праймеров. В этом случае достаточно использовать только одну пару праймеров, один из которых содержит от 3 до 5 LNA-оснований, комплементарных (или комплементарных и фланкирующих) интересующему кодону.

Принимая во внимание вышесказанное, литературные данные по сравнительному анализу различных модификаций ПЦР [15] и учитывая, что большинство клинических лабораторий оснащено стандартным ПЦР-оборудованием, мы разработали два варианта тест-систем для детекции мутаций в кодоне 315 гена *katG* МБТ. В первом случае для детекции точечных мутаций использованы LNA-содержащие праймеры. Разработанные наборы LNA-модифицированных праймеров позволяют в одной реакции определять наличие любой из шести возможных мутаций в кодоне 315 гена *katG*, т.е. дифференцировать WT и MT изоляты МБТ. Второй вариант предусматривает проведение ПЦР с дополнительным конкурентным блокирующим праймером, содержащим 3'-концевую фосфатную группу, что позволяет выявить 2 наиболее часто встречающиеся в кодоне 315 гена *katG* точечные мутации: AGC → ACC и AGC → AGA.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Проведение ПЦР. При анализе нуклеотидных последовательностей гена *katG* 62 изолятов МБТ использовали базы данных GenBank, программы GeneBee [16] и MeltCalc [17, 18]. Температуру плавления комплекса LNA-содержащий олигонуклеотид–оДНК рассчитывали с помощью программы Exiqon T_m prediction, предлагаемой на сайте <http://lna-tm.com> [19]. Апробацию разработанных наборов праймеров проводили на коллекции ДНК, экстрагированной из клинических изолятов МБТ установленного фенотипа (WT или резистентных к ИЗН MT, с мутациями в кодоне 315 гена *katG*). ДНК из изолятов MT с уровнем резистентности к ИЗН 1–25 мкг/мкл содержала то-

чечные мутации AGC → ACC, AGC → ACG и AGC → AGA в кодоне 315.

Наборы праймеров Mykat4–Mykat5–Mykat5P и Mykat4–Mykat9–Mykat9P, использование которых в ПЦР позволят определять в кодоне 315 гена *katG* точечные мутации AGC → ACC и AGC → AGA соответственно, проверяли на трех ДНК-матрицах: штамма HB385, содержащего мутацию AGC → AGA; штамма HB125, содержащего мутацию AGC → ACC; штамма H37Rv без мутации (отрицательный контроль амплификации).

ПЦР проводили в объеме 20–50 мкл с использованием сухого набора реагентов для амплификации ДНК (“Изоген”, Россия), реакционная смесь содержала 4 mM NaCl, 50 mM KCl, 12 mM Трис-НСl (рН 8.0), 2.5 mM MgCl₂, 200 мкМ dNTP, 0.1–0.5 мкМ каждого праймера, а также 1 ед. Taq ДНК-полимеразы, ингибированной антителами (для проведения ПЦР с использованием “горячего старта”). Электрофоретически чистые праймеры получены от фирмы “Синтол” (Россия), LNA-модифицированные праймеры содержали по пять LNA-нуклеотидов, полученных от фирмы “Exiqon” (Дания). ПЦР проводили на амплификаторе производства НПО “Точность” (Россия) в следующем режиме: начальная инкубация при 95°C в течение 2 мин; денатурация при 95°C 1 мин; отжиг при 58–71°C 1 мин; синтез при 70–74°C 1 мин; 38–45 циклов. Температуру отжига праймеров (T_{an}) оптимизировали путем постановки ряда реакций при увеличении температуры отжига с начальным шагом 2°C и уменьшением его до 0.5°C, до полной элиминации полосы неспецифического ампликона. Для амплификации использовали 0.05 мкг геномной ДНК МБТ. Продукты амплификации (10–20 мкл) разделяли методом электрофореза в 1.5% агарозном геле, содержащем бромистый этидий, при напряженности поля 10 В/см.

Масс-спектрометрия олигонуклеотидов. Структуру LNA-модифицированных олигонуклеотидов подтверждали методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF). 0.5-мкл аликвоты очищенных методом электрофореза в 20% ПААГ с 8 М мочевиной олигонуклеотидов (10 мкг/мкл) наносили на матричные кристаллы, полученные путем 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 масс-спектрометра Autoflex II (“Bruker Daltonics Inc.”, Германия), снабженного азотным лазером, который позволяет проводить импульсное извлечение ионов. Масс-спектры

1	NCBI007 (H37Rv)	TGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACC <u>AG</u> CCCGTACGAGGTCGTATGGACGTTGTGG
2	DQ056356 – Chin <u>AAC</u>
3	AF314112 – Ital <u>ATC</u>
4	41309 – Finlan <u>ACA</u>
5	AY155353 – Taiw <u>ACC</u>
6	HB385 – Chin <u>AGA</u>
7	ДНК780 – Rus <u>ACG</u>

Рис. 1. Фрагмент гена *katG*, мутации в кодоне 315 (позиции однонуклеотидных полиморфизмов подчеркнуты) которого ассоциированы с устойчивостью МБТ к изониазиду. Приведены номера изолятов в GenBank и страна, предоставившая данные секвенирования (Ital, Taiw, Chin, Finlan, Rus соответствуют Италии, Тайваню, Китаю, Финляндии и России). Изолят H37Rv – лабораторный штамм *M. tuberculosis*.

олигонуклеотидов получены в режиме регистрации положительных ионов. Ионизацию образцов проводили УФ-лазером с длиной волны 337 нм в импульсном режиме: длительность импульса 3 нс, частота 20 Гц, максимальная энергия 65 мкДж. Время задержки экстракции ионов составляло 30 нс. Положительно заряженные ионы детектировали в режиме работы рефлектрона. Ускоряющее напряжение составляло 20 кВ. Результирующие масс-спектры составляли на основании не менее 100 индивидуальных спектров.

УФ-спектроскопия олигонуклеотидных дуплексов. Формирование олигонуклеотидных дуплексов, содержащих по 5 комплементарных LNA-нуклеотидов, подтверждали методом термической денатурации с регистрацией оптической плотности при длине волны 260 нм. УФ-спектроскопию проводили на спектрофотометре Specord M40 (“Carl Zeiss Jena”) в термостатированной камере. Оптическую плотность раствора регистрировали при шаговом изменении температуры на 0.05°C и скорости нагрева 0.5°C/мин. В экспериментах по термической денатурации использовали микрокюветы с длиной оптического пути 1 см. Плавление проводили в 10⁻³, 10⁻² и 5 × 10⁻² М натрий-какодилатном буфере (рН 7.0) при концентрации ДНК 20–30 пкмоль/мкл. Дифференциальные профили плавления получали на основании интегральных с помощью программы Origin (версия 7.0, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработанные нами экспресс-методы для детекции точечных мутаций в кодоне 315 гена *katG* МБТ основаны на использовании двух вариантов метода ПЦР: аллель-специфичной ПЦР с конкурентным блокирующим праймером и стандартной ПЦР с использованием LNA-модифицированных праймеров. При разработке наборов праймеров на первом этапе проводили анализ последовательностей полноразмерного и фрагментов гена *katG* изолятов МБТ, имеющихся в базе данных GenBank. Из приведенного на рис. 1 фрагмента компьютерного анализа гена *katG* с ва-

риантами точечных мутаций, обуславливающих ИЗН-резистентность изолятов МБТ, видно, что мутацию в кодоне 315 можно использовать для детекции как МТ, так и WT изолятов МБТ.

Аллель-специфичная ПЦР с конкурентным блокирующим праймером

Особенностью этого варианта ПЦР является использование наряду с комбинацией аллель-специфичных праймеров блокирующего праймера. При выявлении WT/MT фенотипа МБТ изолята это предполагает наличие, помимо пары обычных праймеров, дополнительного конкурентного олигонуклеотида, последовательность которого комплементарна нити ДНК-матрицы WT изолята МБТ и содержит сайт потенциальной мутации, т. е. кодон 315 гена *katG* (рис. 2). Конкурентный олигонуклеотид блокирован по 3'-концу так, что дальнейшая репликация немутантной цепи ДНК-полимеразой становится невозможной и происходит селективная амплификация мутантной ДНК. В этом варианте ПЦР, предназначенном для детекции ИЗН-устойчивых изолятов МБТ, блокирующий праймер содержал на 3'-конце фосфатную группу, которая и терминировала синтез кДНК.

Возможность практического применения разработанной тест-системы для детекции ИЗН-устойчивых штаммов МБТ экспериментально проверена на коллекции ДНК, выделенной из клинических изолятов МБТ с разным уровнем устойчивости к ИЗН и с различными единичными мутациями в кодоне 315 гена *katG*. Нами подобрано два набора праймеров: Мукат4–Мукат5–Мукат5Р и Мукат4–Мукат9–Мукат9Р, – использование которых позволяет детектировать точечные мутации AGC → ACC и AGC → AGA соответственно.

ДНК-полимеразную блокирующую активность праймера Мукат5Р подтверждает отсутствие ампликона при проведении ПЦР с использованием пары праймеров Мукат5Р–Мукат4 (рис. 3), а его специфичность – неселективность амплифика-

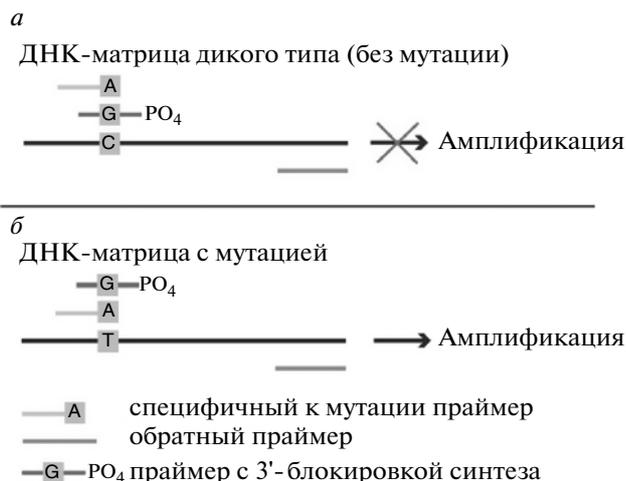


Рис. 2. Схема аллель-специфичной ПЦР с использованием дополнительного блокирующего конкурентного праймера с 3'-терминальной фосфатной группой для подавления амплификации ДНК аллеля дикого типа.

ции в его отсутствие (рис. 3, 5 и 7) как с WT, так и с МТ (с различными мутациями в кодоне 315 гена *katG*) фрагментов ДНК. Введение блокирующего праймера приводит к синтезу только ампликона, содержащего мутацию AGC → ACC (рис. 3, 2).

Аналогичные результаты получены для набора праймеров Mykat4–Mykat9–Mykat9P, специфичного для мутации AGC → AGA (результаты не показаны).

ПЦР с LNA-содержащим праймером

LNA-мономеры – это аналоги нуклеиновых кислот, основной структурной особенностью которых является дополнительный метиленовый мостик между атомами углерода в положении 2' и 4' фуранозного кольца, приводящий к образованию фиксированной 3'-эндо конформации сахара (рис. 4).

В данной работе для детекции точечных мутаций, или однонуклеотидных полиморфизмов, в кодоне 315 гена *katG* МБТ разработаны два набора LNA-содержащих праймеров (Л7–Л8^{LNA} и Mykat24–Mykat25^{LNA}), каждый из которых содержал по одному LNA-модифицированному праймеру. Оба 17-нуклеотидных LNA-модифицированных праймера, Mykat25^{LNA} и Л8^{LNA}, содержали по 5 LNA-мономеров; причем 3 LNA-мономера каждого праймера комплементарны кодону 315 гена *katG*, а 2 других фланкируют указанный кодон. Принципиальным различием между этими наборами праймеров является ориентация LNA-модифицированного праймера: в наборе Л7–Л8^{LNA} LNA-праймер комплементарен “+”-цепи

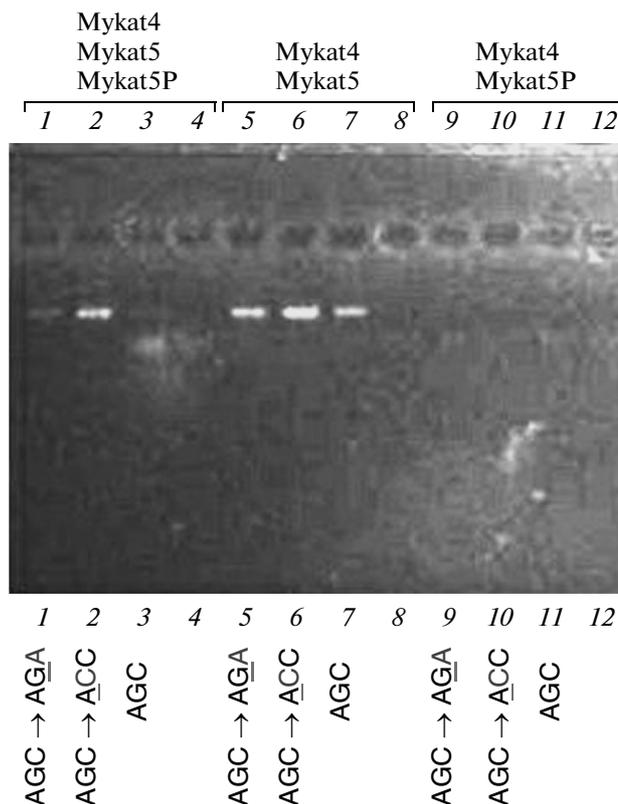


Рис. 3. Детекция точечной мутации AGC → ACC в гене *katG*. ПЦР проведена с тремя наборами праймеров: Mykat4–Mykat5–Mykat5P, Mykat4–Mykat5 и Mykat4–Mykat5P. Электрофорезом в 2%-ном агарозном геле разделены продукты амплификации: 1, 5, 9 – ДНК штамма H3785 *M. tuberculosis*, содержащего в 315 кодоне мутацию AGC → AGA; 2, 6, 10 – ДНК штамма H3785 *M. tuberculosis*, содержащего мутацию AGC → ACC; 3, 7, 11 – ДНК штамма H3785 *M. tuberculosis* – отрицательный контроль амплификации (кодон 315 содержит последовательность AGC); 4, 8, 12 – вода, отрицательный контроль амплификации. При выбранной температуре отжига набор праймеров Mykat4–Mykat5–Mykat5P позволяет дифференцировать в кодоне 315 гена *katG* МБТ мутацию AGC → ACC (2) от мутации AGC → AGA (1) и WT последовательности AGC (3). Подчеркнуты позиции точечных мутаций.

ДНК (рис. 5а), а в Mykat24–Mykat25^{LNA} “–”-цепи ДНК (рис. 5б).

Использование в ПЦР набора праймеров Л7–Л8^{LNA} позволяет дифференцировать мутантный и дикий тип гена *katG* МБТ (рис. 6): в случае WT гена *katG* образуется фрагмент ожидаемой длины 214 п.н. при $T_{ан}$ как 66°C, так и 71°C, в то время как для МТ изолята ампликон отсутствует (хотя амплификация происходит, о чем свидетельствует полоса неспецифического ампликона). Интенсивность полосы неспецифического ампликона уменьшается при повышении $T_{ан}$ с 66°C до 71°C (в этом случае проводили двухшаговую ПЦР для надежного дифференцирования WT и МТ изолятов).

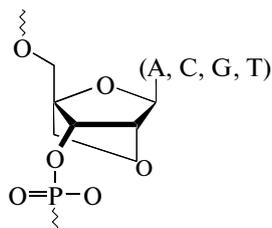


Рис. 4. LNA (locked nucleic acid) – модифицированный мономер нуклеиновой кислоты, который может замещать нуклеотиды в последовательностях ДНК и РНК.

В качестве положительного контроля использовали набор праймеров Mykat10–Mykat11, проведение ПЦР с которым позволяет амплифицировать фрагмент гена *katG* длиной 151 п.н., содержащий локус с кодоном 315 (рис. 6, 1). Последующее секвенирование этого укороченного ПЦР-продукта позволит идентифицировать тип мутации в кодоне 315 гена *katG* циркулирующих в регионе штаммов МБТ. В дальнейшем планируется проведение ПЦР с указанным набором праймеров и секвенирование образовавшегося ампликона для определения полиморфизма в кодоне 315.

Характеристика праймеров с LNA-мономерами

MALDI-TOF-масс-спектрометрию применяли для проверки структуры и качества синтетических одноцепочечных LNA-содержащих олигонуклеотидов Л8^{LNA} и Mykat25^{LNA} (рис. 7 и рис. 8). Масс-спектрометрия олигонуклеотидов позволя-

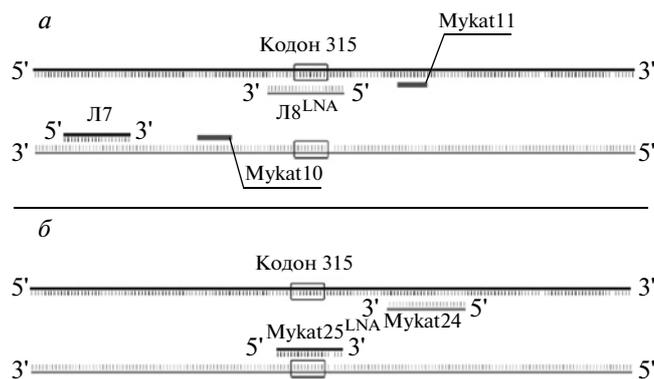


Рис. 5. Локализация праймеров на гене *katG* МБТ относительно кодона 315. Наборы праймеров Л7–Л8^{LNA} и Mykat24–Mykat25^{LNA} позволяют амплифицировать фрагменты гена *katG* длиной 214 и 110 п.н. Праймеры Л8^{LNA} и Mykat25^{LNA} содержат по 5 LNA-модифицированных нуклеотидов, два из которых фланкируют, а три – комплементарны: *a* – плюс-цепи; *b* – минус-цепи ДНК в области кодона 315 гена *katG*. Набор праймеров Mykat10–Mykat11 использован для амплификации фрагмента длиной 151 п.н., содержащего кодон 315 и являющегося маркером молекулярной массы.

ет (1) проконтролировать полноту снятия защиты с реакционных групп азотистых оснований нуклеотидов, а также (2) выявить укороченные олигонуклеотиды с недостающими звеньями. В масс-спектрах исследованных олигонуклеотидов (рис. 7) присутствовали пики с соотношением масса/заряд (m/z) 5373.8 (Л8^{LNA}) и 5347.3 (Mykat25^{LNA}), подтверждающие наличие LNA-мономеров (табл. 1). Пики с указанными массами идентифицированы как со-

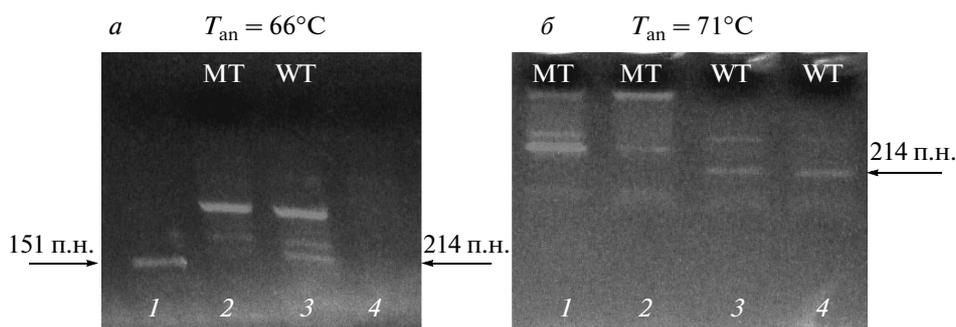


Рис. 6. Детекция продуктов амплификации фрагмента гена *katG* МБТ дикого (WT) и мутантного (MT) типов. Электрофоретический анализ (в 1.5%-ном агарозном геле) продуктов амплификации, проведенной с набором праймеров Л7–Л8^{LNA} при температуре отжига: *a* – 66°C для MT (2) и WT (3) изолятов МБТ (при наличии мутации в кодоне 315 полоса ампликона длиной 214 п.н. отсутствует); отрицательный контроль (4); маркер молекулярной массы – продукт амплификации 151-членного фрагмента гена *katG*, содержащего кодон 315, с набором праймеров Mykat10–Mykat11 (1); *b* – 71°C; продукты амплификации фрагмента гена *katG* для двух различных клинических изолятов МБТ MT: с мутацией AGC → AGA (1) и AGC → ACC (2) (ампликон ожидаемой длины не синтезируется, присутствуют только полосы, соответствующие неспецифическим ампликонам большей длины) – и двух различных клинических изолятов МБТ WT (3 и 4, характерный ампликон длиной 214 п.н.).

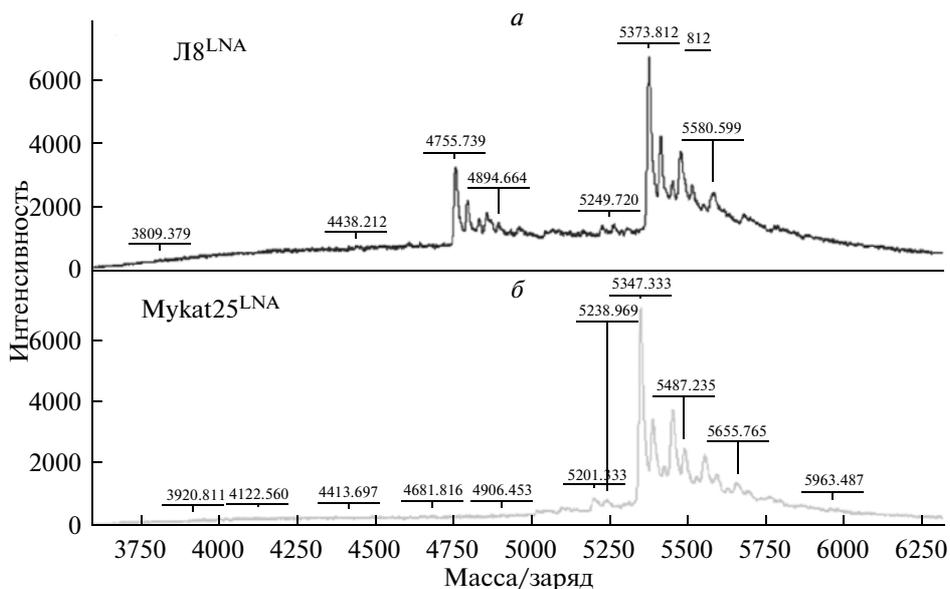


Рис. 7. Масс-спектры времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации 17-членных олигонуклеотидов, содержащих по 5 LNA-мономеров.

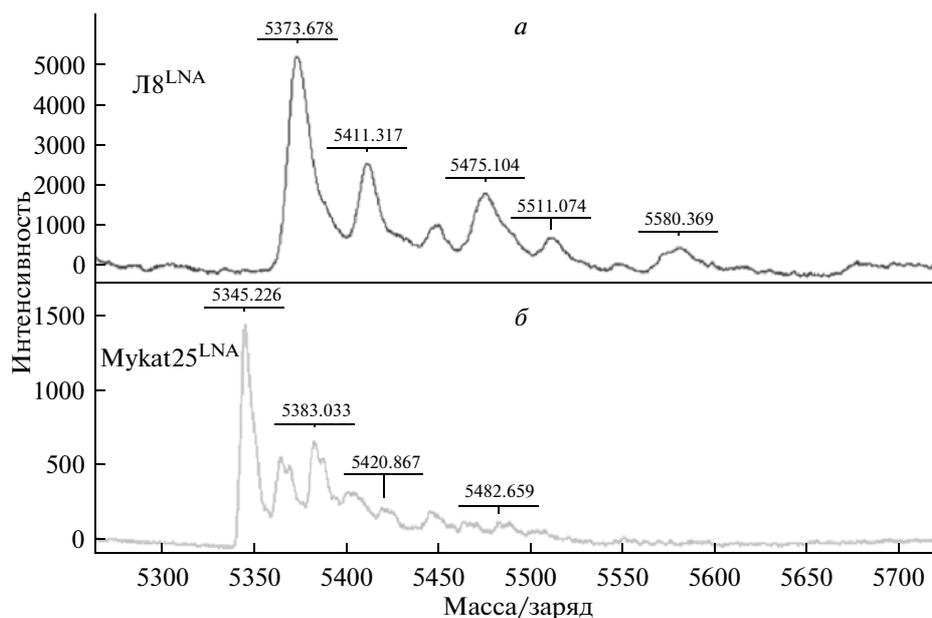


Рис. 8. Масс-спектры высокого разрешения LNA-содержащих олигонуклеотидов.

ответствующие кластерным ионам $[Л8^{LNA} + Na]^+$ и $[Mykat25^{LNA} + Na]^+$.

Праймеры $Л8^{LNA}$ и $Mykat25^{LNA}$ сконструированы таким образом, что являются комплементарными один другому и могут образовать двухцепочечный олигонуклеотид длиной 17 п.н. Теоретически рассчитанное значение температуры плавления (T_m) немодифицированного дуплекса

$Л8-Mykat25$ составляет $45^\circ C$ при ионной силе $1 \text{ mM } Na^+$. Присутствие пяти LNA-мономеров в каждой цепи приводит к резкому увеличению T_m (до $88^\circ C$) дуплекса $Л8^{LNA}-Mykat25^{LNA}$ (рис. 9). Видно, что вклад одной пары LNA-модифицированных нуклеотидов в повышение температуры плавления 17-членного дуплекса составляет $8.6^\circ C$, а одного LNA-нуклеотида – $4.3^\circ C$. В то же

Таблица 1. Структура олигонуклеотидов, содержащих LNA-модифицированные мономеры

Обозначение	Последовательность*	Формула олигонуклеотида/расчетная молекулярная масса (Да)	
		немодифицированный	LNA-модифицированный
Mykat25 ^{LNA}	5'-GATCACCAGCGGCATCG-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'-CGATGCCGCTGGTGATC-3'	C ₁₆₅ H ₂₀₉ N ₆₃ O ₁₀₂ P ₁₆ 5202	C ₁₇₀ H ₂₀₉ N ₆₃ O ₁₀₇ P ₁₆ 5342

* LNA-модифицированные нуклеотиды выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

время для 17-членного олигонуклеотидного дуплекса L8^{LNA}–Mykat25 (при модификации нуклеотидов только одной нити) теоретически рассчитанное значение ΔT_m составляет 2.8°C (табл. 2). Таким образом, LNA-модификация 5 нуклеотидов в обеих цепях приводит к гораздо большей стабилизации дуплекса, чем можно было ожидать, исходя из теоретических расчетов (экстраполируя данные по LNA-модификации одной цепи на случай LNA-модификации обеих цепей дуплекса). Следует заметить, что теоретическое определение T_m с помощью программы [4, 5] возможно только для случая односторонней LNA-модификации.

Результаты экспериментов по изучению влияния ионной силы раствора (5 mM Na⁺ и 50 mM Na⁺) на T_m дуплекса L8^{LNA}–Mykat25^{LNA} оказались малоинформативными, так как из-за высокой T_m дуплекса зарегистрирована только начальная часть его профиля плавления (результаты не при-

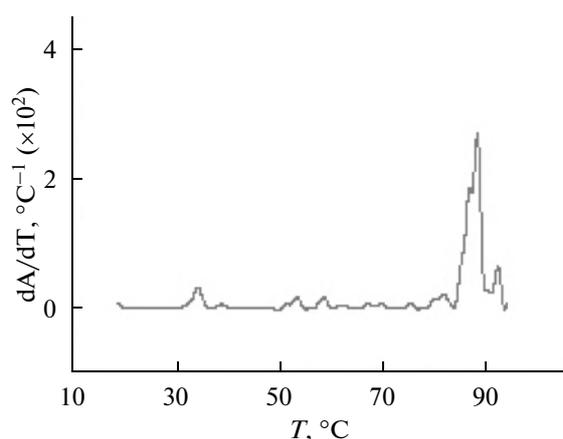


Рис. 9. Дифференциальный профиль плавления дуплекса, образованного двумя 17-членными олигонуклеотидами (L8^{LNA}–Mykat25^{LNA}), каждый из которых содержит по 5 LNA-модифицированных нуклеотидов. Плавление проведено в 1 mM какодилате натрия (рН 7.0).

ведены). Дело в том, что с увеличением ионной силы раствора значение T_m дуплекса возрастает пропорционально логарифму концентрации катионов [7].

На основе разработанных технологий, позволяющих детектировать WT и МТ изоляты МБТ и определять тип точечных мутаций, ассоциированных с резистентностью к ИЗН, мы предлагаем общую схему анализа клинического образца (рис. 10). Отличительной особенностью данной схемы, на наш взгляд, является возможность быстрого опре-



Рис. 10. Схема анализа клинического образца на 1) наличие микобактерий туберкулеза, 2) чувствительность/устойчивость изолята МБТ по отношению к изониазиду и 3) тип точечной мутации в кодоне 315 гена *katG*, ассоциированной с резистентностью к изониазиду.

деления WT изолятов МБТ, что позволит незамедлительно назначать первичным больным короткий курс химиотерапии с использованием ИЗН.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

LNA-модифицированные нуклеотиды подчиняются правилам спаривания Уотсона-Крика, но отличаются от классических нуклеотидов повышенной специфичностью и аффинностью при гибридизации [20]. Дуплексы, содержащие LNA-мономеры, характеризуются чрезвычайно высокой термической стабильностью [21]. Введение одного LNA-нуклеотида в состав одной цепи дуплекса (длиной 13 п.н.) приводит к повышению температуры плавления (T_m) всего дуплекса на 3–4°C, 9 LNA-нуклеотидов повышают T_m на 25°C, а 10 – на 28°C. Таким образом, вклад одного LNA-мономера в увеличение T_m для 13-членного дуплекса составляет 3°C. В общем случае величина сдвига температуры плавления (ΔT_m) зависит от длины дуплекса.

Чтобы идентифицировать генетические маркеры ИЗН-резистентности в клиническом изоляте МБТ методом мультиплексной ПЦР, необходимо использовать 6 пар праймеров: одна пара на один вариант точечной мутации в кодоне 315 гена *katG* МБТ. Ту же задачу можно решить всего с одним набором праймеров, если в стандартной методике ПЦР использовать праймер, содержащий от 3 до 5 LNA-нуклеотидов, комплементарных (или комплементарных и фланкирующих) интересующему кодону с мутациями.

Аллель-специфичная ПЦР с LNA-модифицированными праймерами основана на том, что температура плавления (следовательно, и температура отжига) комплекса праймер–оцДНК-матрица для мутантного типа ниже температуры плавления совершенного дуплекса. Это означает, что при наличии точечной мутации в сайте, содержащем LNA-нуклеотид, температура плавления комплекса праймер–оцДНК-матрица будет ниже температуры плавления совершенного дуплекса. Применительно к микобактериям туберкулеза молекулы ДНК WT изолятов образуют с LNA-содержащим праймером совершенные дуплексы, а ДНК устойчивых к ИЗН изолятов, с мутациями в кодоне 315 гена *katG*, образуют с тем же праймером дуплекс, температура плавления которого ниже, чем у совершенного. Важно отметить, что T_m комплекса LNA-праймер–ДНК-матрица при наличии однонуклеотидного 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 приблизительно на 1°C. При выборе длины праймера мы рассуждали так. Дискриминирующую способность праймера можно усилить, увеличив

Таблица 2. 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 и концентрации праймеров 0.5 мкМ

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

относительное содержание LNA-мономеров. При этом увеличение длины самого праймера (что обычно используется для повышения специфичности) будет снижать относительный вклад LNA-мономеров (при сохранении их количества) и, следовательно, дискриминирующую мощность праймера.

Отметим, что анализ продуктов амплификации ДНК МБТ при низкой температуре отжига (T_{an}) показывает, что с обоими наборами праймеров амплифицируются фрагменты гена *katG* ожидаемой длины: 214 п.н. для набора праймеров Л7–Л8^{LNA} (рис. 6б, 3, 4) и 110 п.н. для набора праймеров Mykat24–Mykat25^{LNA} (результаты не показаны). Интенсивность полосы ампликона длиной 110 п.н. при $T_{an} = 58^\circ\text{C}$ крайне низкая. При T_{an} в интервале 66–71°C ПЦР с набором праймеров Л7–Л8^{LNA} позволяет дифференцировать гены *katG* изолятов МТ и WT МБТ, в то время как амплификации фрагмента гена *katG* с праймерами Mykat24–Mykat25^{LNA} не наблюдается. По этой причине большинство экспериментов проведено только с набором праймеров Л7–Л8^{LNA}. Мы предполагаем, что низкая интенсивность ампликона длиной 110 п.н. обусловлена относительно высоким вкладом пяти LNA-мономеров в температуру плавления данного короткого ампликона, что приводит к плавлению только части молекул ампликона при температуре денатурации (95°C) в каждом цикле ПЦР. Косвенно это подтверждается плавлением дуплекса, образованного комплементарными олигонуклеотидами Л8^{LNA} и Mykat25^{LNA} при температуре выше 95°C и низкой ионной силе, характерной для реакционной смеси при проведении ПЦР (результаты не приведены). Для ампликона, фланкированного праймерами Л7–Л8^{LNA}, соотношение LNA-мономеров и их вклад в плавление ампликона (длина которого составляет 214 п.н.) в два раза меньше по сравнению с ампликоном, фланкированным праймерами Mykat24–Mykat25^{LNA}. Это означает, что только часть молекул ампликона, фланкированного праймерами Mykat24–Mykat25^{LNA}, может денатурировать при 95°C (поскольку полуширина интервала плавления дуплекса длиной 110 п.н. составляет 5–8°C), в результате чего ампликон синтезируется в коли-

честве, недостаточном для визуализации ДНК посредством УФ-детекции интеркалированного бромистого этидия.

Обращает на себя внимание тот факт, что интенсивность флуоресценции ампликона, образовавшегося при проведении ПЦР с набором праймеров Л7–Л8^{LNA} (рис. 6а, 3), значительно ниже интенсивности ПЦР-продукта, полученного с набором праймеров Mykat10–Mykat11 (рис. 6а, 1). На наш взгляд, низкая интенсивность полосы ампликона, фланкированного праймерами Л7–Л8^{LNA}, обусловлена относительно высоким вкладом пяти LNA-мономеров в температуру плавления данного ампликона (введение LNA-мономеров в состав дуплекса приводит к повышению температуры плавления дуплекса при неизменных ионных условиях), что приводит только к частичному плавлению ампликона при температуре денатурации (95°C) в каждом цикле ПЦР. Это означает, что только часть молекул ампликона, фланкированного праймерами Л7–Л8^{LNA}, может денатурировать при 95°C, в результате чего синтезируется меньшее количество ампликона, чем при проведении ПЦР с праймерами Mykat10–Mykat11 (не содержащими LNA-мономеров).

Мы предполагали, что понизить T_m дуплекса, содержащего LNA-мономеры, можно посредством уменьшения ионной силы реакционной смеси. Результаты исследования влияния ионной силы реакционной смеси на эффективность амплификации показали, что интенсивность флуоресценции ампликона при понижении ионной силы в 2.5 раза (с 50 мМ до 20 мМ Na⁺) не изменяется. Таким образом, единственный способ, позволяющий увеличить количество ампликона, – увеличение объема реакционной смеси при проведении ПЦР с LNA-модифицированными праймерами, т.е. проведение реакции в объеме 50 мкл вместо 20 мкл.

Таким образом, нами разработано 2 варианта детекции точечных мутаций в кодоне 315 гена *katG* МБТ. Оба основаны на оптимизации условий проведения ПЦР с помощью специфических наборов праймеров. В одном варианте дискриминирующую мощность набора праймеров усиливали применением дополнительного блокирующего праймера с 3'-концевой фосфатной группой в кодоне 315 гена *katG*. Использование только двух наборов праймеров: Mykat4–Mykat5–Mykat5P и Mykat4–Mykat9–Mykat9P – при проведении ПЦР позволяет детектировать 2 самых распространенных точечных мутации AGC → ACC и AGC → AGA, соответственно, в кодоне 315 гена *katG*, ассоциированных с устойчивостью МБТ к ИЗН. Второй вариант основан на применении ПЦР с набором из 2 праймеров, один из которых содержит LNA-мономеры, комплементарные последовательности кодона 315 гена *katG* МБТ, что

позволяет проводить быструю дифференцировку WT и MT изолятов МБТ.

Разработанные молекулярно-генетические тест-системы позволяют в течение 1–3 суток выявлять изоляты МБТ, устойчивые к противотуберкулезному препарату изониазиду, и могут быть использованы в клинических лабораториях, оснащенных стандартным оборудованием для проведения ПЦР.

Работа частично поддержана грантом АМН 72/2007 Академии медицинских наук Украины, а также Центром коллективного пользования прибором “Масс-спектрометрический комплекс с лазерной десорбцией и ионизацией Autoflex II” Национальной академии наук Украины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сергиев В.П., Филатов Н.Н. 2006. Инфекционные болезни на рубеже веков. М.: Наука.
2. Global tuberculosis control. Epidemiology, strategy, financing. *WHO report 2009. World Health Organization*. Geneva, World Health Organization 2009. P. 304. <http://www.who.int/tb>
3. Kolchinsky A., Mirzabekov A. 2002. Analysis of SNPs and other genomic variations using gel-based chips. *Human mutation*. **19**, 343–360.
4. Mikhailovich V., Lapa S., Gryadunov D., Sobolev A., Strizhkov B., Chernyh N., Skotnikova O., Irtuganova O., Moroz A., Litvinov V., Vladimirskii M., Perelman M., Chernousova L., Erokhin V., Zasedatelev A., Mirzabekov A. 2001. Identification of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2531–2540.
5. Wu X., Zhang J., Liang J., Lu Y., Li H., Li C., Yue J., Zhang L., Liu Z. 2007. Comparison of three methods for rapid identification of mycobacterial clinical isolates to the species level. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1898–1903.
6. Wu X., Zhang J., Chao L., Liang J., Lu Y., Li H., Yang Y., Liang Y., Li C. 2009. Identification of rifampin-resistant genotypes in *Mycobacterium tuberculosis* by PCR-reverse dot blot hybridization. *Mol. Biotechnol.* **41**, 1–7.
7. Лиманская О.Ю. 2009. Видоспецифическая детекция микобактерий туберкулезного комплекса. *Туберкулез и болезни легких*. **10**, 49–56.
8. Orum H. 2000. PCR clamping. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2**, 27–30.
9. Strand H., Ingebretsen O., Nilssen O. 2008. Real-time detection and quantification of mitochondrial mutations with oligonucleotide primers containing locked nucleic acid. *Clin. Chim. Acta.* **390**, 126–133.
10. Dominguez P., Kolodney M. 2005. Wild-type blocking polymerase chain reaction for detection of single nucleotide minority mutations from clinical specimens. *Oncogene*. **24**, 6830–6834.
11. Заседателев А.С., Соболев А.Ю., Грядун Д.А., Лапа С.А., Михайлович В.М., Мирзабеков А.Д. 2005. Способ одновременного обнаружения микобактерий туберкулезного комплекса и идентификации

- ции мутаций в ДНК микобактерий, приводящих к устойчивости микроорганизмов к рифампицину и изониазиду, на биологических микрочипах, набор праймеров, биочип и набор олигонуклеотидных зондов, используемые в способе. Патент 2005140679 РФ: МПК С12 Q 1/68, С12 R 1/32/; заявитель и патентообладатель Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. № 2005140679/13; заявл. 26.12.05; опубл. 10.07.07, Бюл. № 19.
12. Низова А.В., Степаншина В.Н., Майская Н.В., Богун А.Г., Майорова А.А., Шемякин И.Г. 2007. Анализ устойчивости клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* к лекарственным препаратам первого и второго ряда. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. **4**, 7–10.
 13. Lipin M., Stepanshina V., Shemyakin I., Shinnick T. 2007. Association of specific mutations in katG, rpoB, rpsL and rrs genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 620–626.
 14. Johnson R., Jordaan A., Pretorius L., Engelke E., van der Spuy G., Kewley C., Bosman M., van Helden P., Warren R., Victor T. 2006. Ethambutol resistance testing by mutation detection. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **10**, 68–73.
 15. Josefsen M., Lofstrom C., Sommer H., Hoorfar J. 2009. Diagnostic PCR: Comparative sensitivity of four probe chemistries. *Mol. Cell Probes.* **23**, 201–203.
 16. Бродский Л., Драчев А., Татузов Р., Чумаков К. 1991. Пакет прикладных программ для анализа последовательностей биополимеров: GeneBee. *Биополимеры и клетка*. **7**, 10–14.
 17. Schütz E., von Ahsen N. 1999. Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches. *Biotechniques*. **27**, 1218–1224.
 18. von Ahsen N., Wittwer C., Schutz E. 2001. Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for Mg²⁺, deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas. *Clin. Chem.* **47**, 1956–1961.
 19. SantaLucia J. 1998. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 1460–1465.
 20. Orum H., Jakobsen M., Koch T., Vuust J., Borre M. 1999. Detection of the factor V Leiden mutation by direct allele-specific hybridization of PCR amplicons to photoimmobilized locked nucleic acids. *Clinical Chemistry*. **45**, 1898–1905.
 21. Latorra D., Arar K., Hurley J. 2003. Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Mol. Cell Probes.* **17**, 253–259.