

УДК 543.51

Г.Н. Владимиров^{1,2}, А.С. Кононихин^{3,2}, Е.Н. Ильина⁴, В.М. Говорун⁴,
Е.Н. Николаев^{2,3}

¹ Московский физико-технический институт (государственный университет)

² Институт энергетических проблем химической физики РАН

³ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

⁴ Научно-исследовательский институт физико-химической медицины

Точное измерение масс продуктов полимеразно-цепной реакции как метод генотипирования

Настоящая работа посвящена изучению возможностей и ограничений метода анализа нуклеиновых кислот, основанного на точном измерении масс продуктов полимеразно-цепной реакции (ПЦР). Рассмотрены различные методы очистки продуктов ПЦР, найден оптимальный метод очистки для ионизации электрораспылением. Методика определения нуклеотидного состава по точным массам рассмотрена на примере химически синтезированной двойной цепи дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

Ключевые слова: молекулярная медицина, анализ нуклеиновых кислот, полимеразно-цепная реакция, генотипирование, масс-спектрометрия, нуклеотидный состав.

Важной задачей современной молекулярной медицины является выявление различных генетических маркеров — оценка вариаций нуклеотидных последовательностей ДНК, которые могут служить для установления родства, обнаружения мутаций, видовой идентификации микроорганизмов. Измерение масс продуктов ПЦР участка молекулы ДНК с высокой точностью позволяет определить нуклеотидный состав такого участка, и таким образом проводить генотипирование [1–5] — скрининговую процедуру анализа наследуемых признаков, связанных с нуклеотидной последовательностью ДНК.

Генотипирование — одна из задач, которые стоят перед современной масс-спектрометрией нуклеиновых кислот. В настоящее время при генотипировании с использованием масс-спектрометрии широко распространён подход, основанный на реакции минисеквенирования [4]. Как правило, в этом случае применяется МАЛДИ масс-спектрометрия, поскольку продуктами реакции служат олигонуклеотиды длиной 25–30 нт (нт — нуклеотидтрифосфат).

Существует альтернативный подход, основанный на точном измерении масс протяженных фрагментов ДНК (длиной до 150 нт), который обладает большими возможностями при изучении гипервариабельных участков ДНК [3, 4], например, участков митохондриальной ДНК челове-

ка, используемых в судебно-медицинском анализе [3].

Генотипирование по точным массам накладывает более высокие требования к точности измерения масс продуктов ПЦР (15 ppm, точность измерения 10^{-6} это 1 ppm) [6], по сравнению с требованиями при использовании подхода минисеквенирования (200 ppm).

Метод определения нуклеотидного состава по точным массам использует возможность получения при электрораспылении из двух-цепочечной молекулы ДНК ионов прямой и обратной цепей ДНК [10]. Поскольку молекула ДНК представляет из себя двойную спираль с комплементарной структурой — то количество аденина в одной из цепей равно количеству тимина в другой, аналогично с содержанием цитозина и гуанина, что можно выразить системой уравнений:

$$\begin{cases} wA + xT + yG + zC + D1 = \\ = MW1 \pm [mass\ accuracy], \\ xA + wT + zG + yC + D2 = \\ = MW2 \pm [mass\ accuracy], \end{cases} \quad (1)$$

где: A, G, C, T — массы аденина, гуанина, цитозина, тимина; $MW1, MW2$ — измеренные массы комплементарных полинуклеотидных цепей; D — слагаемое, учитывающее массу концевых групп молекул ДНК; $[mass\ accuracy]$ — это точность измерения масс.

При массах цепей порядка 40 кДа (одиночная цепь длиной 130 оснований) система (1) позволяет однозначно определять нуклеотидный состав при точности измерения масс в 15 ppm [6, 10].

Многие современные масс-спектрометры, имеющие высокую точность измерения масс (ИЦР ПФ, времяпролетный, orbitrap), для ионизации молекул с молекулярной массой больше 10 кДа используют метод электрораспыления, что позволяет получать многозарядные ионы с m/z удобным для измерений с высокой точностью. Ионизация электрораспылением чрезвычайно чувствительна к присутствию катионов металлов. Концентрации солей порядка 100 мкМ могут сильно уменьшить сигнал. Кроме того, ионы щелочных металлов K^+ , Na^+ затрудняют процедуру интерпретации масс-спектров за счёт образования аддуктов с молекулой ДНК.

Буферы, используемые при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), содержат соли в концентрациях порядка десятков миллимоль, поэтому основной проблемой при работе с продуктами ПЦР является очистка образца для масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением, требующая уменьшения концентрации солей более чем в 1000 раз [7].

В настоящее время описано несколько простых методов очистки продуктов ПЦР: осаждение этанолом с последующим микродиализом [8] и очистка на анион обменной смоле [7]. Так же существует несколько подходов с использованием коммерческих наборов [5], однако сами по себе рассмотренные наборы (Geneclean, Genopure) не дают достаточное для ионизации электрораспылением качество очистки [8]. Также стоит отметить, что метод очистки ПЦР продуктов на анион обменной смоле проще автоматизировать, чем переосаждение с последующим микродиализом — это становится полезным при проведении генотипирования, когда приходится работать с большим количеством образцов [7].

Нами были опробованы различные методы очистки продуктов ПЦР: переосаждение спиртом, очистка на Glass milk (Sigma, USA), очистка набором Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA), очистка набором Microcon Centrifuge Filter Devices (Millipore, USA). Однако использование

этих подходов оказалось непригодным для получения масс-спектров продуктов ПЦР — при попытках получения спектров сигнал — либо отсутствовал в виду недостаточной степени очистки образца от солей (переосаждение, очистка на Glass milk), либо был подавлен сигналом от загрязнений вносимых при очистке образца (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Microcon Centrifuge Filter Devices — наблюдались серия пиков с разностью по массе 118,2 Да).

Был также опробован подход очистки продуктов ПЦР на анионообменной смоле. Использована смола на носителях из магнитных частиц, являющаяся составной частью набора ClinProt Profiling Kit MB-WAX (Bruker Daltonics, Germany). Для работы со смолой использовались растворы: 100 мМ NH_4OAc , 40 мМ NH_4HCO_3 , 10% NH_4OH , 50% MeOH.

Результаты очистки на анионообменной смоле показали приемлемый уровень потерь ПЦР продукта в ходе очистки (рис. 1, дорожка 3). Удалось получить масс-спектры продукта ПЦР длиной 111 пар оснований (рис. 2). Также была проведена очистка синтетической двух-цепочечной ДНК длиной 65 пар оснований (рис. 1, дорожка 5), которая показала, что в ходе очистки на анионообменной смоле в образец не вносятся загрязнений.

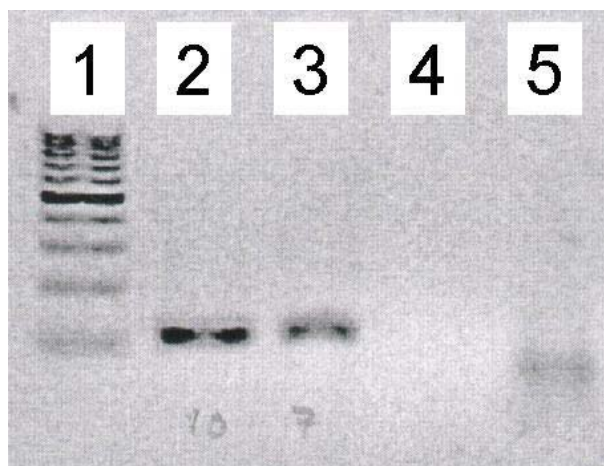


Рис. 1

Масс-спектрометрический анализ проводился на масс-спектрометре ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье Finnigan LTQ FT (Thermo Electron, Bremen, Germany) оснащённым сверхпроводящим соленоидом с напряжённостью магнитного поля 7 тесла, с ионным источником электрораспыления Finnigan

Ion Max Source. Спектры получали — как в режиме полного сканирования (FULL), так и в режиме мониторинга одиночных ионов (SIM). Измерение проводили для отрицательных ионов. Образцы полинуклеотидов для электрораспыления разводили в буфере содержащем 60% ацетонитрила.

Ацетат аммония и пиперидин сдвигающие зарядовое распределение в область меньших зарядовых состояний и стабилизирующие ДНК при электрораспылении [9] не добавлялись, так как это приводило к падению интенсивности сигнала.

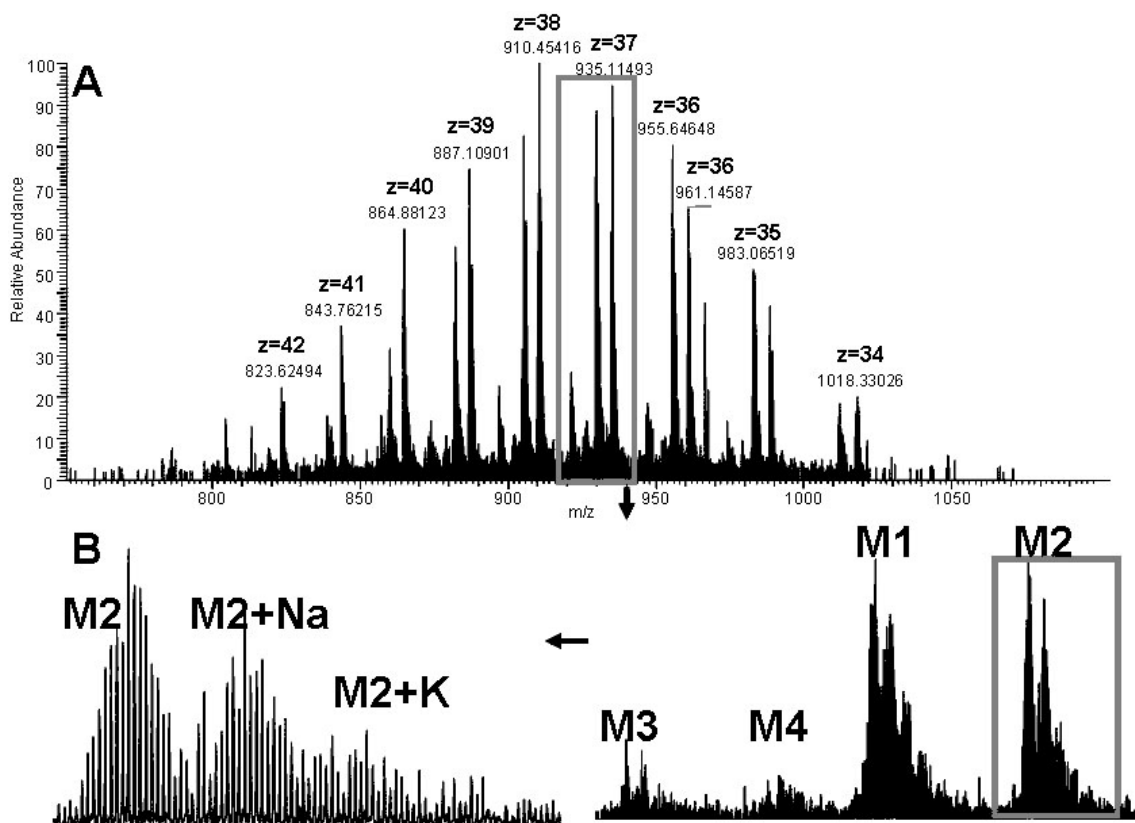


Рис. 2

Анализировался ПЦР продукт (рис. 1), имеющий последовательность: gcgctcgagat atggttcattctgtatacaattcattggctccagaaggtttta gccaaagtcttattcaaccagtcagattccaaccagcaaaa aagtaaaagcttcga. Для проведения ПЦР использовалась Solis Biodyne HOT FIREPol полимеразы. В процессе проведения полимеразно цепной реакции начальная температура 94 °C поддерживалась в течении 10 минут, далее следовало 40 циклов с температурами 94 °C в течении 10 секунд, 60 °C в течении 10 секунд, 72 °C в течении 10 секунд, с инактивацией полимеразы после окончания циклов при 72 °C в течении 10 минут.

Для ПЦР продукта (рис. 1, 2) очищенного на анионообменной смоле измеренные массы составили: $M1 = 34425,4$ Да, $M2 = 34620,5$ Да, $M3 = 34112,3$ Да, $M4 = 34293$ Да (для пиков каждой из этих масс были также видны пики присоединения натрия и калия +21,9 Да, +37,9 Да).

Для массы $M4$ соотношение сигнал-шум не было достаточным для точного определения величины моноизотопной массы.

Известно, что может происходить аденелирование цепей ДНК [10], поэтому в каждом зарядовом состоянии мы видим 4 массы: 2 массы соответствуют аденелированным цепям ($M1$, $M2$), а две другие не аденелированным ($M3$, $M4$ — рис. 2), учитывая потерю фосфатной группы (PO_2H) $D1 = D2 = -61,96$ Да и предполагая массы цепей с учётом аденелирования: $MW1 = 34425,4 - 313,06 = 34112,3$ Да, $D1 = -61,96$ Да, $MW2 = 34620,5 - 313,06 = 34307,4$ Да, $D2 = -61,96$ Да и принимая точность измерения масс в 15 ppm, из системы (1) находим: $w = 35$, $x = 30$, $y = 20$, $z = 26$. Таким образом, состав продуктов ПЦР оказался: A35 T30 G20 C26 для одной цепи ДНК, и A30 T35 G26 C20 для другой, таким образом по точным массам можно определять нуклеотидный состав продуктов ПЦР.

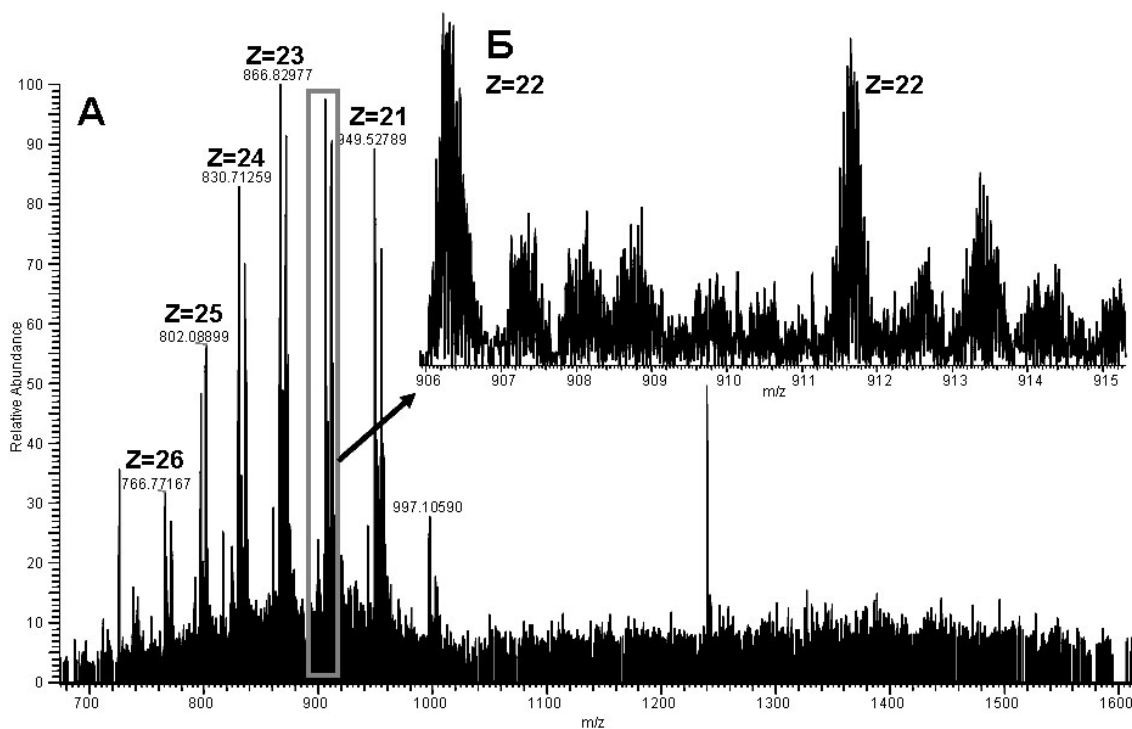


Рис. 3

Анализировался образец синтетической (твердофазный циклический синтез, осуществленный в ООО НПФ Литех) двухцепочечной ДНК длиной 65 пар оснований (смотри рис. 3), имеющий последовательность: gatgagtctgactgttctgatgagctcttcgctgctgtctccgcttcttctgcataggagatg с концентрацией 7 pmol/mL, полученный из растворов синтетической полинуклеотидов комплементарного состава следующим образом: были смешаны эквимольные растворы полинуклеотидов комплементарных составов, растворы были нагреты до 95 °C и удерживались при этой температуре в течении 5 минут, после чего смесь охлаждалась до температуры 60 °C и удерживалась при этой температуре в течении 10 минут.

Также были проанализированы 10 образцов синтетических полинуклеотидных цепей различного нуклеотидного состава длиной 64–65 нуклеотидов. Были обнаружены различия в массах наблюдаемых ионов и массах полинуклеотидных цепей известных из нуклеотидного состава. Стоит отметить, что для разных образцов наблюдалось разное количество пиков (2–10) соответствовавших одному зарядовому состоянию. Масс-разности совпавшие более чем для 3 разных образцов составили: +0 Да, +23 Да, +39 Да, 60 Да, 76 Да, 114 Да, 152 Да, 190 Да; +23 Да — это

присоединение Na, +39 Да — присоединение K.

Для образца синтетической 2х цепочечной молекулы ДНК (рис. 3), измеренные массы составили: $M1 = 19952,2$ Да (что близко к массе одной из цепей $M_{1t} = 19952,256$ Да, если $D1 = 0$ Да, $M2 = 19974,25$ Да ($M2 = M1 + M_{Na-H}$, $M_{Na-H} = 21,98$ Да); $M3 = 20069,3$ Да (что близко к массе другой цепи $M_{1t} = 20069,406$ Да, если $D2 = 0$ Да, $M3 = 20090,2$ Да (близко к $M4 = M3 + M_{Na-H}$, $M_{Na-H} = 21,98$ Да).

Считая (рис. 3) $MW1 = 19952,2$ Да, $D1 = 0$ Да, $MW2 = 20069,3$ Да, $D2 = 0$ Да и принимая точность измерения масс в 15 ppm, из системы (1) находим: $w = 9$, $x = 22$, $y = 17$, $z = 17$. Таким образом, состав синтетической ДНК оказался: A9 T22 G17 C17 для одной цепи ДНК и A22 T9 G17 C17 для другой. Следовательно, нам удалось по точным массам полинуклеотидных цепей определить нуклеотидный состав двухцепочечной цепи ДНК.

Рассмотрены различные методы очистки продуктов ПЦР, найден оптимальный метод очистки для генотипирования по точным массам — хроматографическая очистка продуктов ПЦР на анионообменной смоле.

Методика генотипирования по точным массам рассмотрена на примере химически

синтезированной двойной цепи ДНК, длиной 65 пар оснований и продуктов ПЦР длиной 111 пар оснований, определены нуклеотидные составы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hofstadler S.A., Sampath R., Blyn L.B., Eshoo M.W., Hall T.A., Jiang Yu., Drader J.J., Hannis J.C., Sannes-Lowery K.A., Cummins L.L., Libby B., Walcott D.J., Schink A., Massire C., Ranken R., Gutierrez J., Manalili S., Ivy C., Melton R., Levene H., Barrett-Wilt G., Li F., Zapp V., White N., Samant V., McNeil J.A., Knize D., Robbins D., Rudnick K., Desai A., Moradi E., Ecker D.J. TIGER: the universal biosensor // *International Journal of Mass Spectrometry*. — 2005. — V. 242, N. 1. — P. 23–41.

2. Tost J., Gut I.G. Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications // *Clinical Biochemistry*. — 2005, V. 38. — P. 335–350.

3. Hall T.A., Budowle B., Jiang Y., Blyn L., Eshoo M., Sannes-Lowery K.A., Sampath R., Drader J.J., Hannis J.C., Harrell P., Samant V., White N., Ecker D.J., Hofstadler S.A. Base composition analysis of human mitochondrial DNA using electrospray ionization mass spectrometry: a novel tool for the identification and differentiation of humans // *Anal. Biochem.* — 2005. — V. 344, N. 1. — P. 53–69.

4. Jiang Y., Hall T.A., Hofstadler S.A., Naviaux R.K. Mitochondrial DNA Mutation Detection by Electrospray Mass Spectrometry // *Clinical Chemistry*. — 2007. — V. 53, N. 2. — P. 195–203.

5. Ecker D.J., Drader J.J., Gutierrez J., Gutierrez A., Hannis J.C., Schink A., Sampath R., Blyn L.B., Eshoo M.W.,

Hall T.A., Tobarmosquera M., Jiang Y., Sannes-Lowery K.A., Cummins L.L., Libby B., Walcott D.J., Massire C., Ranken R., Manalili S., Ivy C., Melton R., Levene H., Harpin V., Li F., White N., Pear M., Ecker J.A., Samant V., Knize D., Robbins D., Rudnick K., Hajjar F., Hofstadler S.A. The Ibis T5000 Universal Biosensor: An Automated Platform for Pathogen Identification and Strain Typing // *JALA*. — 2006. — V. 6, N. 11. — P. 341–351.

6. Muddiman D.C., Anderson G.A., Hofstadler S.A., Smith R.D. Length and base composition of PCR-amplified nucleic acids using mass measurements from electrospray ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* — 1997. — V. 69, N. 8. — P. 1543–1549.

7. Jiang Y., Hofstadler S.A. A highly efficient and automated method of purifying and desalting PCR products for analysis by electrospray ionization mass spectrometry // *Anal. Biochem.* — 2003. — V. 316, N. 1. — P. 50–57.

8. Null A.P., George L.T., Muddiman D.C. Evaluation of sample preparation techniques for mass measurements of PCR products using ESI-FT-ICR mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 2002. — V. 13, N. 4. — P. 338–344.

9. Muddiman D.C., Cheng X., Udseth H.R., Smith R.D. Charge-State Reduction with Improved Signal Intensity of Oligonucleotides in Electrospray Ionization Mass Spectrometry // *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* — 1996. — V. 7, N. 8. — P. 697–706.

10. Null A.P., Muddiman D.C. // *J. Mass Spectrom.* — 2001. — V. 36. — P. 589–606.

Поступила в редакцию 02.02.2009.