

**СПОСОБЫ ДЕТЕКЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ****© С. М. Бикбулатова\*, Д. А. Чемерис, Ю. М. Никоноров, О. И. Машков, Р. Р. Гарафутдинов, А. В. Чемерис, В. А. Вахитов**

*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН  
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, пр. Октября, 71.  
Тел./факс: +7 (347) 235 60 88.  
E-mail: mbb@anrb.ru*

*Обзор посвящен описанию и сравнительному анализу эффективности современных способов детекции целевых продуктов ПЦР в режиме реального времени. Подчеркиваются преимущества использования интеркалирующих красителей и гибридизационных зондов, таких как TaqMan, Molecular Beacon, Scorpion, Amplifluor и других. Рассматриваются особенности конструирования специфических праймеров, применения различных флуорохромов и вариантов их расположения на праймерных последовательностях относительно друг друга и в паре с тушителем, применение гибридизационных зондов, способствующих усилению аналитического сигнала и повышению специфичности детекции ампликонов.*

**Ключевые слова:** нуклеиновые кислоты, амплификация, ПЦР в реальном времени, гибридизационный зонд, флуорохром, интеркалирующий краситель, тушитель флуоресценции, резонансный перенос энергии флуоресценции.

**Введение**

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) известна уже более четверти века и в настоящее время применяется для решения широкого круга научных и практических задач, что обусловлено относительной простотой данного метода, высокой чувствительностью и надежностью при небольшой себестоимости. Долгое время анализ результатов ПЦР проводился по окончании реакции с помощью гелеэлектрофореза и получил название «анализ по конечной точке». Однако такой анализ подразумевает дополнительные манипуляции, связанные с контактом продуктов амплификации (ампликонов) с внешней средой, что не исключает загрязнение ими лабораторного пространства. Уже в 90-х годах прошлого столетия все более очевидным становился недостаток ПЦР, являющийся следствием ее главного преимущества – уникальной чувствительности, позволяющей получать необходимое количество ДНК из единичных копий исходной матрицы. Этот недостаток – угроза получения ложно-положительных результатов в силу возможного загрязнения исследуемых проб – серьезно ужесточил требования к оснащению лабораторий и к условиям работы. Второй причиной, потребовавшей усовершенствования метода ПЦР, стала необходимость измерения количества ДНК-матрицы в исследуемом материале, что практически невозможно было осуществить при помощи классической ПЦР «по конечной точке».

С целью преодоления указанных проблем стал проводиться поиск способов проведения ПЦР таким образом, чтобы накопление продуктов амплификации можно было контролировать непосредственно в ходе реакции. В результате счастливой «ошибки», допущенной одним из сотрудников R. Higuchi, который провел ПЦР в присутствии интеркалирующего красителя – бромистого этидия,

считавшегося сильным ингибитором ДНК-полимеразы, была предложена ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [1]. Новый вариант изначально был назван кинетической ПЦР, т.к. изменение аналитического сигнала позволяет построить кинетическую кривую процесса [2, 3].

Разработка ПЦР-РВ повлекла за собой создание нового типа ДНК-амплификаторов, оснащенных оптическим модулем и способных детектировать изменение флуоресценции образцов в каждом цикле амплификации. Это обусловило ряд существенных преимуществ: высокую специфичность детекции, сведение к минимуму риска получения ложноположительных результатов, возможность количественной оценки исходной ДНК, сокращение времени анализа, автоматическую регистрацию и интерпретацию полученных данных в электронном формате.

**Флуоресцентный анализ – основа ПЦР-РВ**

Метод ПЦР-РВ основан на использовании флуорохромов – молекул, обладающих способностью к свечению в результате поглощения световой энергии. Первоначально ПЦР в реальном времени базировалась на применении интеркалирующих красителей (ИК) – органических соединений, способных к нековалентному связыванию с одно- и/или двуцепочечной ДНК, приводящему к значительному усилению флуоресценции. Помимо бромистого этидия для этой цели были предложены красители группы SYBR (SYBR Green I, SYBR Gold), LCGreen, SYTO 9, YO-PRO, VEBO и ряд других.

Однако невысокая специфичность ИК стимулировала поиск новых аналитических систем, приведший к разработке способов детекции, основанных на использовании олигонуклеотидных гибридизационных зондов (проб). В настоящее время предложено уже более трех десятков подходов; но лишь немногие из них нашли коммерческое применение

\* автор, ответственный за переписку

(табл. 1). В целом гибридизационные зонды представляют собой олигонуклеотиды, меченые в разных сочетаниях одним или несколькими флуоресцентными красителями и тушителями флуоресценции по концам и/или внутри цепочки, функционирующие по отдельности или в паре, обеспечивающие «включение-выключение» флуоресценции и дающие изменение интенсивности флуоресцентного сигнала за счет процессов внутри- и межмолекулярного переноса энергии при образовании вторичных структур.

Известно несколько механизмов передачи энергии возбуждения, однако в гибридизационных зондах реализуется резонансный перенос энергии флуоресценции (fluorescence resonance energy transfer, FRET), который основан на обмене энергии между двумя фотоактивными молекулами или группами, одна из которых выступает донором (первый флуоресцентный краситель), а другая – акцептором (второй флуоресцентный краситель или «темновой» тушитель) энергии [4]. Эффективность переноса энергии зависит от взаимного расположения донора и акцептора, она максимальна на расстояниях порядка 1–10 нм. В качестве флуоресцентных красителей используются преимущественно флуорохромы ксантонового, родаминового и цианинового рядов, в качестве тушителей – соединения, содержащие в молекуле азогруппу. Однако поиск эффективных пар «флуорофор-тушитель» до сих пор остается актуальным [5].

Преимущество использования в качестве гибридизационных зондов олигонуклеотидов, меченых

флуоресцентными красителями, составляющих пару «донор энергии – акцептор энергии», впервые было продемонстрировано в классической работе [6]. Поскольку перенос энергии происходит лишь при нахождении красителей в составе единой структуры (в данном случае – двуцепочечной молекулы ДНК) и на определенном расстоянии друг от друга, нет необходимости удаления несвязавшихся проб, т.к. возбуждается краситель-донор, а регистрируется свечение красителя-акцептора. Варианты зондов, включающие различные виды используемых репортерных групп и их взаимное расположение, будут рассмотрены ниже.

#### Детекция результатов ПЦР с помощью интеркалирующих агентов

Использование различных красителей, способных аналогично бромистому этидию связываться с ДНК и при этом увеличивать квантовый выход флуоресценции, оказалось простым и недорогим способом проведения ПЦР-РВ (рис. 1). В настоящее время для этой цели широко применяется краситель SYBR Green I с длиной волны испускания 520 нм, флуоресценция которого возрастает более чем в 100 раз в присутствии двуцепочечной ДНК [7]. Однако в высоких концентрациях SYBR Green I ингибирует ДНК-полимеразу, что приводит к получению ложно-отрицательных результатов. В связи с этим были предложены красители SYTO 9 [8] и Eva Green, лишенные данного недостатка и обладающие теми же спектральными характеристиками, что и SYBR Green I.

Таблица 1

Способы детекции накопления продуктов ПЦР в реальном времени

Низкоспецифичные		Высокоспецифичные	
Интеркалирующие красители (ИК)	Системы с использованием единичных праймеров	Системы с гибридизационными зондами (ГЗ)	Системы с совместным использованием ГЗ и ИК
EtBr	Amplifluor	TaqMan	ResonSense
SYBR Green I	LUX	TaqMan/MGB	Angler
SYBR Gold	Plexor	Molecular Beacon	iFRET
LCGreen	DzyNA	Scorpion	
SYTO 9	Cyclicon	Duplex Scorpion	
YO-PRO	AEGIS	HyBeacon	
BEBO	Three-STAR	HybProbes	
	UFA (УФА)	Light-up probe	
	FRET primers	MagiProbe	
		PriProET	

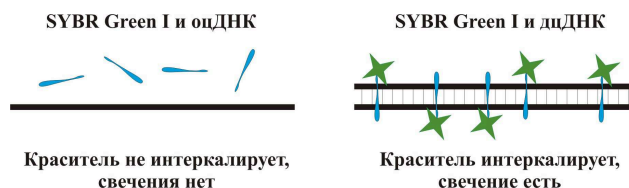


Рис. 1. Детекция результатов ПЦР с помощью интеркалирующих красителей на примере SYBR Green I.

Еще одним ИК, предложенным для анализа продуктов ПЦР, является LCGreen, который отличается отсутствием ингибирования ПЦР даже в высоких концентрациях [9]. Это свойство оказалось весьма важным для пост-амплификационного анализа продуктов реакции путем плавления [10]. Поскольку с повышением температуры молекулы ДНК денатурируют блоками в зависимости от их нуклеотидного состава, локально «расплавившийся» участок теряет способность удерживать молекулу ИК, что приводит к снижению флуоресценции образца. Ввиду того, что SYBR Green I ингибирует ПЦР, приходится снижать его концентрацию до минимально необходимого уровня, который, однако, оказывается недостаточным для полной интеркаляции. В результате этого плавление участков ДНК без красителя не сопровождается его высвобождением и не меняет общего свечения комплекса ДНК-краситель. Для LCGreen данной проблемы не существует, поскольку он присутствует в реакционной смеси в концентрации, достаточной для полной интеркаляции, обеспечивая тем самым уменьшение флуоресценции раствора при плавлении блока ДНК любого нуклеотидного состава. Однако максимум возбуждения LCGreen лежит в области 440 нм, что не позволяет использовать его с целым рядом современных ДНК-амплификаторов.

Главным недостатком использования всех ИК является способность связываться с любой двуцепочечной ДНК, появляющейся в реакционной смеси, которая может быть как целевым продуктом ПЦР, так и артефактом. Поэтому для получения корректных результатов необходимо дополнительное изучение продуктов амплификации с помощью «плавления» ампликонов. В связи с этим ПЦР-РВ с интеркалирующими красителями, несмотря на дешевизну и удобство, в практической ДНК-диагностике должна использоваться достаточно осторожно.

#### **Детекция результатов ПЦР с помощью гибридных зондов**

Впервые использование гибридных зондов для слежения за ходом ПЦР было описано американскими авторами [11]. Ими был разработан способ детекции продуктов ПЦР, заключавшийся в ферментативном расщеплении за счет 5'→3'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы радиоактивно меченого по 5'-концу олигонуклеотида. Однако предложенная методика оказалась достаточно сложной, а детекция высвобожденного изотопа  $^{32}\text{P}$  не велась в режиме реального времени. Тем не менее, данная работа послужила одной из отправных точек при создании способов детекции результатов ПЦР, основанных на использовании флуоресцентно меченых гибридных зондов, в частности, наиболее широко используемой TaqMan-системы [12]. Она отличается относительной простотой и высокой специфичностью и представляет собой линейный олигонуклеотид, меченый по концам флуорохромом и тушителем соответст-

венно. Место его отжига располагают между участками отжига «прямого» и «обратного» праймеров, что исключает детекцию нецелевых продуктов, которые теоретически могут образоваться в результате неспецифического отжига (рис. 2, а).

Поскольку классическая TaqMan-система не вполне совершенна, были приложены усилия по созданию новых вариантов зондов для ПЦР-РВ. Так, серьезного улучшения TaqMan-системы удалось добиться присоединением к 3'-концу зонда лигандов малой бороздки ДНК (minor group binder, MGB) [13]. Они существенно стабилизируют двуцепочечные структуры за счет интеркаляции, что позволило значительно сократить длину пробы, и в то же время не дают гибридизационному зонду удлиниться ДНК-полимеразой. Авторы цитируемой работы сообщают, что в их экспериментах TaqMan/MGB-проба длиной 12 нт и стандартная TaqMan-проба из 27 нт имели одинаковые температуры отжига, при этом для первой отмечалась более высокая специфичность гибридизации.

Второй по популярности гибридной системой считаются так называемые «молекулярные биконы» (molecular beacons) [14], представляющие собой шпильчатые олигонуклеотиды, концевые последовательности которых спарены и несут флуорохром и тушитель флуоресценции. При появлении в реакционной смеси ампликонов, содержащих участок ДНК, комплементарный петлевой части зонда, происходит раскрытие олигонуклеотидной шпильки, приводящее к пространственному отдалению красителя и тушителя и, соответственно, к увеличению интенсивности флуоресценции (рис. 2, б). Преимуществами данной системы являются сближенное расположение красителя и тушителя, обеспечивающее максимально возможную эффективность тушения, и более высокая специфичность по сравнению с ИК, а недостатком – необходимость конструирования зондов и оптимизации условий ПЦР. Позже авторами [15] была усложнена конструкция зонда: на некотором расстоянии от первого красителя ими был размещен еще один. Образовавшаяся пара имела перекрывающиеся спектры испускания и возбуждения, что обеспечивало при раскрытии шпильки FRET-эффект. В схлопнутом же состоянии бикона тушитель, расположенный в непосредственной близости к красителю-донору, принимал на себя энергию флуоресценции, не позволяя ей перейти на второй репортерный краситель.

Весьма высокоспецифичными могут считаться системы Scorpion [16] и Duplex Scorpion [17], что обеспечивается необычным строением данных зондов, состоящих из двух последовательностей: затравочной и гибридной. Специфичный олигонуклеотид-затравка, расположенный в начале праймера, отделяется от расположенного рядом с ним гибридного зонда этиленгликольным спейсером, не позволяющим ДНК полимеразе ис-

пользовать в качестве матрицы гибридизационную часть праймера. Зонд Scorpion представляет собой шпильчатую структуру типа молекулярного бикона. На определенной стадии амплификации за счет образования в последовательности ампликона участка, комплементарного данному зонду, а также различий в энергии связей происходит раскрытие и разворачивание шпильки. Как у настоящего скорпиона, «хвост» этого составного праймера, разворачиваясь, «выбрасывается» вперед и отжигается на этом участке, приводя к пространственному разобщению тушителя и красителя и свечению последнего (рис. 2, в). В зонде Duplex Scorpion подавление флуоресценции обеспечивается не шпильчатой структурой, а тушителем, входящим в состав дополнительного олигонуклеотида, частично комплементарного гибридизационной части нецельного праймера, состоящего из двух отдельных частей.

Высокоспецифичным является также подход, названный PriProET (Primer-Probe-Energy Transfer) [18]. Его отличие заключается в использовании пробы и праймера с одним флуорохромом каждый, и перенос энергии происходит между красителями, входящими соответственно в состав праймера и гибридизационного зонда, отжигающегося на таком расстоянии от праймера, на котором возможен эффективный перенос энергии.

Особый тип гибридизационной пробы представляет MagiProbe [19], в которой в средней части в непосредственной близости друг к другу расположены флуорофор и тушитель (пирен), способный интеркалировать в бороздки дцДНК. Когда данный зонд находится в одноцепочечном состоянии, свечение красителя затушено, но стоит образоваться двуцепочечной структуре, как пирен интеркалирует в ДНК и, отдаляясь от флуорохрома, позволяет ему светиться. Во избежание удлинения зонда MagiProbe во время ПЦР он, как и большинство подобных зондов, несет на своем 3'-конце фосфат-

ную группу, а для исключения экзонуклеазного расщепления используется ДНК-полимераза, у которой данная активность отсутствует.

Существуют и более экономичные варианты гибридизационных проб, рассчитанные на проявление FRET-эффекта. Так способ ResonSense основан на использовании интеркалирующего красителя SYBR Gold в качестве донора и цианинового красителя Cy5 в качестве акцептора энергии [20], что несколько удешевляет стоимость анализа за счет незначительного количества модификаций. Очень просто устроены гибридизационные пробы HyBeacon [21], разработанные в связи с необходимостью идентифицировать ключевые генетические различия между индивидуумами – снипы (SNP). В одном из вариантов HyBeacon представляет собой линейный олигонуклеотид с остатком 2'-дезоксисуридина в средней части, к которому присоединен флуоресцентный краситель. Авторы показали, что в результате формирования дцДНК с участием данных гибридизационных проб происходит заметное увеличение свечения флуорохромов, которое можно регистрировать в режиме реального времени.

К принципиально другому типу гибридизационных зондов, в отличие от всех вышеописанных, относится так называемая Light-up проба [22], представляющая собой последовательность не ДНК, а ПНК – пептидно-нуклеиновой кислоты. Такая проба не разрушается за счет экзонуклеазной активности Taq-полимеразы, при этом легко гибридизируется с мишенью и так же быстро с нее диссоциирует, не мешая протеканию ПЦР. Поскольку Light-up проба не является чисто нуклеиновой кислотой, пришитый к ней краситель тиазоловый оранжевый не светится до тех пор, пока не окажется в комплексе с ДНК в результате отжига зонда на комплементарном ему участке ампликона. Несмотря на свои преимущества, этот метод является дорогим и труднодоступным в связи с использованием ПНК.

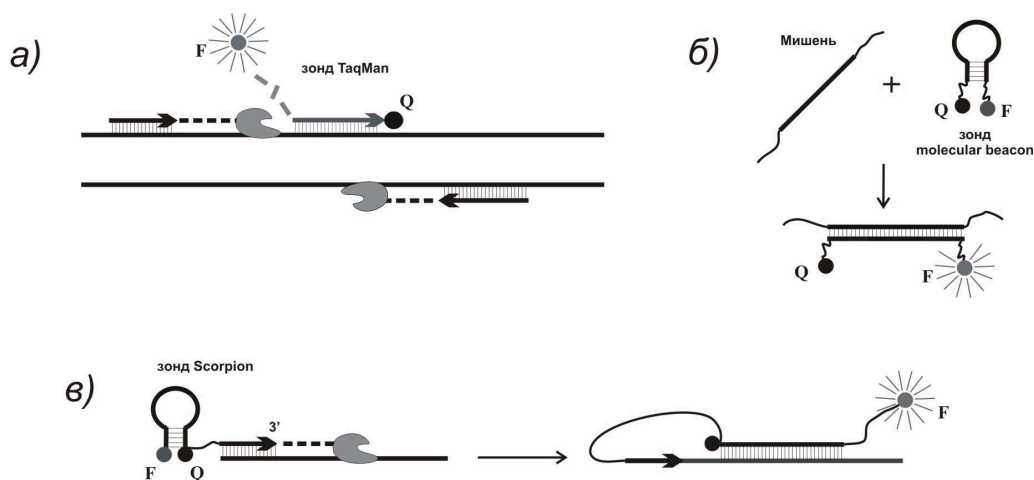


Рис. 2. Гибридизационные системы детекции: а) TaqMan; б) Molecular beacon; в) Scorpion.

Также высокой стоимостью наряду с высокой специфичностью характеризуется химерная LNA/DNA проба [23]. LNA (Locked Nucleic Acid) – относительно новый тип аналогов нуклеиновых кислот, результатом особого строения которых является сомкнутая 3'-эндоконформация рибозы, снижающая гибкость молекулы. Однако, образуемые ею гетеродуплексы с ДНК имеют более высокую температуру плавления (на 3–8 °С на модифицированном основании), что обуславливает преимущества при использовании таких проб. Сравнительный анализ эффективности TaqMan/MGB- и LNA/DNA-проб показал для них сопоставимые результаты [24].

#### **Методы детекции продуктов ПЦР-РВ с использованием одного меченого праймера**

Один из первых способов, разработанных для увеличения флуоресцентного сигнала реакционной смеси с помощью одного модифицированного праймера и второго обычного, изначально названный Sunrise [25], используется сейчас достаточно широко под названием Amplifluor. В системе Amplifluor модифицированный праймер формирует, помимо своей затравочной части, еще и шпильчатую структуру по типу молекулярного бикона и напоминает Scorpion (хотя, если соблюдать хронологию, Scorpion похож на Amplifluor). Однако в Amplifluor нет участка, прерывающего построение цепи ДНК, что в очередном цикле амплификации обеспечивает разворачивание шпильки, пространственное отдаление тушителя от красителя, приводящее к свечению.

Удешевление данного подхода было достигнуто тем, что первые раунды амплификации проводили с праймерами, один из которых был длиннее обычного и содержал участок для отжига третьего праймера, названного авторами UniPrimer [26]. Позднее был предложен более простой флуоресцентно меченый праймер, не несущий тушителя [27], содержащий короткую экстра-последовательность из 5–7 нуклеотидов, имевшую интрагомологию с основной частью праймера, второй или третий нуклеотид которого с 3'-конца был тиминном, несущим флуорохром. Было показано, что наименьшее свечение наблюдалось у праймера со вторичной структурой, затем оно возрастало при принятии праймером линейной структуры и еще более увеличивалось, когда праймер в результате амплификации становился частью двуцепочечной структуры. В настоящее время этот подход реализован в коммерческом продукте “LUX (Light-Upon eXtension)”.

Другой способ временного тушения флуоресценции праймера был предложен американскими авторами [28]. Ими был синтезирован псевдоциклический олигонуклеотид, названный Cyclicon, который они охарактеризовали как «праймер-проба». Этот цикликон длиной 20 нт состоял из затравочного участка и комплементарных его 3'-концу шести-восьми дополнительных нуклеотидов, которые были соединены не обычной 5'→3', а 5'→5'-фосфодиэфирной связью, что вело к прерыванию синтеза новой цепи

ДНК. На нерабочем 3'-конце короткого дополнительного олигонуклеотида был помещен флуоресцентный краситель, а один из нуклеотидов основной последовательности, за счет интрамолекулярной гомологии оказывающийся близко расположенным к красителю, нес тушитель флуоресценции. Таким образом, до того, как в реакционной смеси появлялась более протяженная для спаривания мишень, свечение красителя за счет интрамолекулярной гомологии было затушено и началось расти в ходе амплификации.

Интересный, хотя и весьма сложный и недостаточно специфичный метод, названный DzyNA, основан на дезоксирибозимном расщеплении химерного ДНК-РНК-ДНК-зонда, несущего краситель и тушитель [29]. Принцип метода заключается в том, что праймер, помимо затравочной части, несет участок, представляющий собой антисенс-последовательность дезоксирибозима 10–23 [30], которая в ходе амплификации превращается в активный дезоксирибозим, разрушающий по РНК-участку химерный зонд, что приводит к разобщению тушителя и красителя.

Необычные варианты генерации и усиления сигнала флуоресценции при анализе однонуклеотидных замен в режиме реального времени описаны в [31]. Для генерации флуоресценции использованы меченые ДНК-РНК-ДНК-химерные олигонуклеотидные зонды (рис. 3), которые отжигаются на ДНК-мишени, образующейся в ходе аллель-специфического лигирования «С-зонда» и последующей изотермической амплификации по методу «катящегося кольца», и разрушаются в ходе реакций ферментативного и дезоксирибозимного расщепления. Основные на совмещении реакций аллель-специфического лигирования, амплификации «по кольцу» и технологии циклической пробы, эти варианты имеют ряд преимуществ перед традиционно используемыми. Во-первых, изотермический характер проводимых реакций обуславливает уменьшение скорости дезактивации ферментов и увеличение скорости анализа, поскольку не затрачивается время на этапы изменения температуры в реакционном блоке. Во-вторых, постоянное увеличение количества мишеней в ходе амплификации наряду с параллельно протекающим на них процессом разрушения зондов обеспечивают высокую скорость накопления продуктов и увеличение чувствительности процесса в целом по сравнению с отдельно взятыми реакциями. При этом выбор типа зондов и соответственно варианта его расщепления может определяться в зависимости от возможностей исследователя и решаемых им задач.

Принцип «два в одном» – совмещения амплификации и рестрикции – был предложен австралийскими авторами [32]. В этом случае один из праймеров удлинен последовательностью сайта узнавания термостабильной рестриктазы, разделяющей тушитель и краситель. В результате амплификации сайт узнавания становится двуцепочечным и подвергается расщеплению, тушитель с красителем разобщаются и происходит рост флуоресценции.

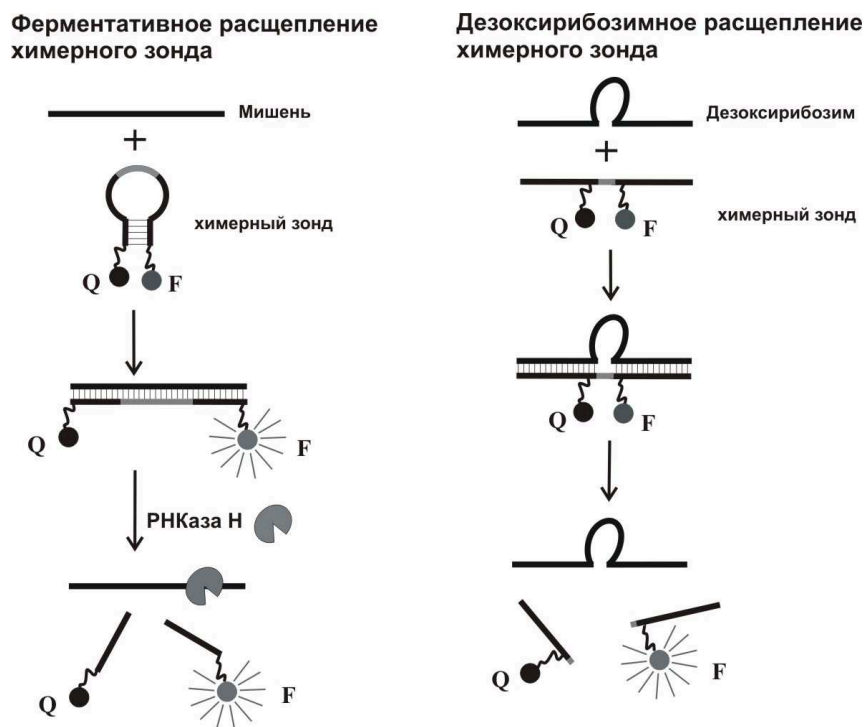


Рис. 3. Варианты генерации флуоресценции с помощью химерных зондов [31].

Многолетние усилия Benner с соавт. по созданию новых неприродных азотистых оснований [33, 34] привели к разработке способа Plexog [35], весьма недешевого и не очень специфичного, но заслуживающего внимания благодаря неординарности. Ключевым моментом является использование неприродной пары азотистых оснований – isoC и isoG, обозначаемых как F и J. Авторы расположили isoC на 5'-конце праймера с флуорохромом, что приводит к включению в процессе амплификации в другую цепь ДНК комплементарного ему isoG, присутствующего в смеси в виде дезоксинуклеотидтрифосфата и несущего универсальный тушитель.

Несколько ранее был предложен не менее дорогостоящий метод – AEGIS (An Expanded Genetic Information System), в котором также используется неприродная пара азотистых оснований F и J [36]. Один из праймеров состоит из двух частей, одна из которых затравочная, а вторая служит местом отжига гибридационной пробы с флуорохромами. На границе этих двух частей располагаются рядом друг с другом isoC и isoG. При построении цепи ДНК Taq-полимераза в отсутствие в реакционной смеси isoCTP и isoGTP включает напротив isoG практически любое азотистое основание, но преимущественно T. Однако ни один из обычных нуклеотидов не образует водородных связей с isoG, поэтому он будет «висящим». Комплементарным азотистым основанием напротив isoC Taq-полимераза способна включить только isoG, поэтому цепь по достижении полимеразой isoC обрывается. На следующем этапе происходит отжиг гибридационной пробы с isoG в составе, спариваю-

щимся с isoC и одновременно разделяющим тушитель и краситель. При этом флуоресцентный краситель располагается на 5'-конце зонда, и в результате отжига 5'-концевой нуклеотид также становится «висящим». Далее Taq-полимераза за счет 5'→3'-экзонуклеазной активности удаляет «висящий» нуклеотид с флуоресцентным красителем, что и приводит к росту флуоресценции реакционной смеси. Недавно предложено в ПЦР-смесь вместо TTP вводить 2-тиоTTP, который не может встроиться напротив isoG, что повышает специфичность амплификации [37].

Принципы изначального тушения флуорохрома в составе гибридационной пробы были одновременно использованы в работах двух разных групп авторов. Одни назвали свой подход «асимметричный набор флуоресцентных проб» [38], другие – «комплексная проба» [39]. Суть обоих подходов заключается в том, что гибридационный зонд мечен флуоресцентным красителем по 5'-концу, и его тушение обеспечивается более коротким олигонуклеотидом, несущим тушитель на 3'-конце и отжигающимся на зонде так, что краситель и тушитель оказываются максимально сближенными. В результате амплификации и появления в реакционной смеси молекул ДНК, гомологичных зонду на большем протяжении, чем тушащая проба, происходит смена мишени. В итоге гибридационный зонд, отжегшись на основном ампликоне, подвергается разрушению за счет экзонуклеазной активности Taq-полимеразы.

Попытки удешевления TaqMan-системы часто приводили к снижению специфичности. Было разработано несколько способов, в которых один

и тот же TaqMan-зонд мог использоваться для детекции разных ампликонов. Так, способ под названием Three-STAR основан на использовании удлиненных праймеров, в составе одного из которых предусмотрены три специфические последовательности [40]. Расположенный на его 3'-конце участок выполняет роль первоначального праймера, специфичного к искомой последовательности. К нему примыкает участок, предназначенный для отжига TaqMan-пробы, и через несколько нуклеотидов от него на 5'-конце – место для отжига праймера, выступающего в качестве основного при проведении ПЦР. Второй праймер является двойным, поскольку в нем отсутствует последовательность для отжига гибрида зонда. Несмотря на то, что в этом способе зонд для всех мишеней и рабочие праймеры одинаковы, удешевление оказывается достаточно мнимым, поскольку стоимость праймеров заметно выше за счет их большей длины. Более того, фактически утроенная и удвоенная длина праймеров существенно снижает специфичность их отжига. Схожая работа, ставящая целью использовать универсальную TaqMan-пробу, была проделана другими авторами [41]. Один праймер у них был обычным, а второй – несколько удлиненным и нес в своем составе место для отжига универсальной пробы, названной ими UT-probe (Universal Template).

Наиболее экономичные гибридационные пробы были предложены практически одновременно в работах ряда авторов [42–44]. Все они основаны на способности гуанина тушить большинство флуорохромов. С целью регистрации изменения базового уровня флуоресценции в ходе амплификации были синтезированы олигонуклеотидные зонды, содержащие один остаток цитозина, меченый флуоресцентным красителем. При этом рядом могли быть расположены еще несколько цитозинов. В ходе амплификации происходило построение цепи ДНК, комплементарной данным зондам, и отжиг гибридационной пробы, сопровождающийся спариванием цитозинов с гуанинами и тушением флуоресценции красителя. Причем было показано, что остаток одного гуанина тушил свечение на 25%, а дополнительные гуанины увеличивали этот показатель до 40% [42]. Недостатком подхода является то, что в нем определяется не рост флуорес-

ценции, а снижение и лишь у той части зондов, которые могут найти комплементарные участки для отжига, тогда как в реакционной смеси всегда присутствует большой избыток молекул, флуоресценция которых не меняется.

Другой экономичный тип гибридационных зондов функционирует на обратном принципе – на эффекте детушения флуорохромов [45]. Авторами был синтезирован ряд зондов с флуоресцентными красителями на 3'- или 5'-концах, с которыми соседствовали два остатка гуанина, вызывающие тушение, однако при формировании в ходе амплификации двуцепочечной ДНК за счет комплементарных цитозинов эффект тушения снижался, приводя к эффекту детушения флуоресценции.

#### Сближенное расположение праймеров

В классической ПЦР анализ реакционной смеси после амплификации проводится с помощью электрофореза. В этом случае удобнее детектировать продукты ПЦР размером от 150–200 пн в агарозном геле. Однако при планировании ПЦР-РВ желательно, чтобы размер ампликонов был небольшим. Так, во многих высокоспецифичных вариантах размер амплифицируемого фрагмента ДНК укорочен до 70–80 пн, из которых 40–50 пн приходятся на места отжига праймеров, остальная последовательность с двух-трех нуклеотидными брешами соответствует месту отжига гибридационного зонда.

Нами был разработан вариант полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на платформе «УФА/UFA» (Универсальная Флуоресцентная Амплификация/Universal Fluorescent Amplification) [46, 47], особенностью которого является максимально сближенное расположение флуоресцентно меченых в цепь прямого и обратного праймеров, которое обеспечивает FRET-эффект. Способ с нарастающим тушением флуорохрома разработан нами также для термоциклеров, для которых отсутствует возможность регистрации FRET-эффекта. В варианте ПЦР-РВ на платформе «УФА» праймеры отжигаются или встык, или с зазором, или с перекрытием в один-два нуклеотида, что дает несколько большую свободу экспериментатору при выборе детектируемого участка ДНК.

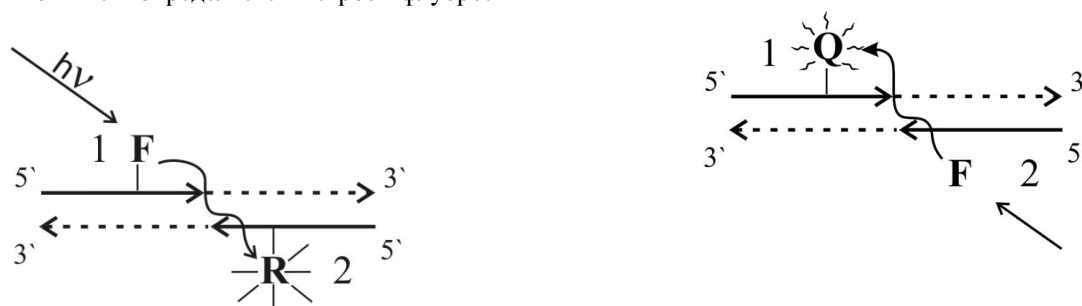


Рис. 4. Схема протекания ПЦР-РВ с FRET-эффектом между донорным (F) и акцепторным (R) красителями и с эффектом тушения флуоресценции красителя (F) универсальным тушителем (Q). Волнистой стрелкой показан перенос энергии.

Подбор праймеров для ПЦР-РВ на платформе «УФА» ведется с таким расчетом, чтобы они обеспечивали специфичность реакции, ограничивали собой фрагмент последовательности ДНК или РНК размером 40–50 нт и могли быть помечены флуоресцентными красителями и тушителями, составляющими эффективные пары донор/акцептор. Репортерные группы должны быть расположены после амплификации в целевом двуцепочечном продукте на таком расстоянии друг от друга, чтобы перенос энергии или ее тушение эффективно детектировались (рис. 4).

ПЦР-РВ на платформе «УФА» имеет несколько преимуществ. Во-первых, расположение праймеров обеспечивает эффективный перенос энергии между хромофорными группами вследствие их пространственной близости. Во-вторых, до минимума сокращается время удлинения праймера, в связи с чем этап элонгации становится не нужен, поскольку построение второй цепи ДНК успевает произойти полностью еще на этапе отжига или в ходе повышения температуры для денатурации ампликонов. В-третьих, из-за малого размера целевого продукта существенно снижается температура денатурации, что также приводит к экономии времени в целом и к сокращению времени пребывания ДНК полимеразы при высоких температурах, что продлевает ее работоспособность. В-четвертых, близкое расположение праймеров способно обеспечить амплификацию коротких фрагментов (обломков) молекул ДНК или РНК, которые с большей вероятностью могут сохраняться в старых или подвергнувшихся сильному разрушительному воздействию образцах. В-пятых, благодаря расположению праймеров встык число значимых нуклеотидов, исходя из которых рассчитывается количество возможных комбинаций, увеличивается вдвое. Данное обстоятельство обеспечивает высокую специфичность процесса, поскольку случаи фальш-праймирования, вызванные неверным одновременным отжигом сразу обоих праймеров, практически невозможны. Следует отметить, что присутствующие в растворе в большом избытке олигонуклеотидные праймеры, несущие соответствующие красители, не вносят никакого вклада в результат детекции, поскольку свечение донорного красителя не регистрируется, а свечение акцепторного появится лишь после переноса энергии к нему от донорного. Для этого красители должны быть между собой физически связаны, и, следовательно, несущий их фрагмент ДНК должен составлять единое целое.

#### Заключение

В настоящее время из перечисленных выше способов детекции результатов ПЦР наиболее востребованными и массово эксплуатируемыми можно считать только шесть, а именно: метод с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green I, TaqMan-систему, Molecular Beacon, Scorpion, Amplifluor и LUX-системы. Остальные описанные нами подходы оказались либо забытыми в силу их

явных недостатков, либо еще не получили своего должного развития.

Выбор варианта детекции продуктов амплификации в ПЦР-РВ определяется задачами, которые стоят перед исследователями, к какой бы отрасли это ни относилось – фундаментальным научным исследованиям, практической медицине, фармакологии, криминалистике, аграрной и пищевой промышленности, мониторингу окружающей среды и др. В течение последних лет ПЦР-РВ успешно применяется не только в крупнейших диагностических и научно-исследовательских центрах, но и в региональных научных центрах и образовательных учреждениях. Уже сейчас она становится стандартной процедурой, благодаря востребованности количественного определения ДНК и РНК, упрощенной организации ПЦР-лабораторий и снижению количества задействованного в таких анализах персонала, снятию проблемы субъективной оценки результатов электрофоретического анализа, автоматической интерпретации полученных результатов и другим достоинствам описанного метода.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Higuchi R., Dollinger G., Walsh S., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences // *Biotechnology*. 1992. V.10. P. 413–417.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions // *Biotechnology*. 1993. V.11. P. 1026–1030.
- Heid C. A. Real-time quantitative PCR // *Genome Research*. 1996. №6. P. 986–994.
- Рубин А. Б. Биофизика. М.: Изд-во МГУ. 2004. т. 1. 464 с.
- Карпова Ю. О., Гарафутдинов Р. Р., Чемерис А. В., Талипов Р. Ф. Новые азокрасители – потенциальные тушители флуоресценции как основа создания олигонуклеотидных гибридных зондов // *Вестник Башкирского университета*. 2010. №4. с. 1116–1121.
- Cardullo R. A., Agrawal S., Flores C., Zamecnik P. C., Wolf D. E. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1988. V. 85. P. 8790–8794.
- Wittwer C. T., Herrmann M. G., Moss A. A., Rasmussen R. P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification // *Biotechniques*. 1997. V. 22. P. 134–138.
- Monis P. T., Giglio S., Saint C. P. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis // *Analytical Biochemistry*. 2005. V.340. P. 24–34.
- Zhou L., Myers A. N., Vandersteen J. G., Wang L., Wittwer C. T. Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye // *Clinical Chemistry*. 2004. V.50. P. 1328–1335.
- Wittwer C. T., Reed G. H., Gundry C. N., Vandersteen J. G., Pryor R. J. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen // *Clinical Chemistry*. 2003. V.49. P. 853–860.
- Holland M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1991. V.88. P. 7276–7280.
- Gelfand D. H., Holland P. M., Saiki R. K., Watson R. M. Homogeneous assay system using the nuclease activity of a nucleic acid polymerase. 1993. US patent 5,210,015.
- Kutyavin I. V., Afonina I. A., Mills A., Gorn V., Lukhtanov E. A., Belousov E. S., Singer M. J., Walburger D. K., Lokhov S.



- G., Gall A. A., Dempcy R., Reed M. W., Meyer R. B., Hedgpeth J. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures // *Nucleic Acids Research*. 2000. V. 28. P. 655–661.
14. Tyagi S., Kramer F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization // *National Biotechnology*. 1996. V.14. P. 303–308.
15. Tyagi S., Marras S. A., Kramer F. R. Wavelength-shifting molecular beacons // *National Biotechnology*. 2000. V.18. P. 1191–1196.
16. Whitcombe D., Brownie J., Gillard H. L., McKechnie D., Theaker J., Newton C.R., Little S. A homogenous fluorescence assay for PCR amplicons: its application to real-time, single-tube genotyping // *Clinical Chemistry*. 1998. V.44. P. 918–923.
17. Solinas A., Brown L. J., McKeen C., Mellor J. M., Nicol J., Thelwell N., Brown T. Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications // *Nucleic Acids Research*. 2001. V.29. e96.
18. Rasmussen T. B., Uttenthal A., de Stricker K., Belak S., Storgaard T. Development of a novel quantitative real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection of all serotypes of foot-and-mouth disease virus // *Archives of Virology*. 2003. V.148. P. 2005–2021.
19. Yamane A. MagiProbe: a novel fluorescence quenching-based oligonucleotide probe carrying a fluorophore and an intercalator // *Nucleic Acids Research*. 2002. V.30. P. 97.
20. Lee M. A., Siddle A. L., Page R. H. ResonSense: simple linear fluorescent probes for quantitative homogenous rapid polymerase chain reaction // *Analytica Chimica Acta*. 2002. V.457. P. 61–70.
21. French D. J., Archard C. L., Brown T., McDowell D. G. HyBeacon probes: a new tool for DNA sequence detection and allele discrimination // *Molecular and Cellular Probes*. 2001. V.15. P. 363–374.
22. Svanvik N., Stahlberg A., Sehlstedt U., Sjoback R., Kubista M. Detection of PCR products in real time using light-up probes // *Analytical Biochemistry*. 2000. V.287. P. 179–182.
23. Costa J. M., Ernault P., Olivi M., Gaillon T., Arar K. Chimeric LNA/DNA probes as a detection system for real-time PCR // *Clinical Biochemistry*. 2004. V.37. P. 930–932.
24. Letertre C., Perelle S., Dilasser F., Arar K., Fach P. Evaluation of the performance of LNA and MGB probes in 5'-nuclease PCR assays // *Molecular and Cellular Probes*. 2003. V.17. №6. P. 307–311.
25. Nazarenko I. A., Bhatnagar S. K., Hohman R. J. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer // *Nucleic Acids Research*. 1997. V.25. P. 2516–2521.
26. Nuovo G. J., Hohman R. J., Nardone G. A., Nazarenko I. A. In situ amplification using universal energy transfer-labeled primers // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1999. V.47. P. 273–279.
27. Nazarenko I., Lowe B., Darfler M., Schuster D., Rashtchian A. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore // *Nucleic Acids Research*. 2002. V.30. P. 37.
28. Kandimalla E. R., Agrawal S. «Cylicons» as hybridization-based fluorescent primer-probes: Synthesis, properties and application in real-time PCR // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2000. V.8. PP. 1911–1916.
29. Todd A. V., Fuery C. J., Impey H. L., Applegate T. L., Haughton M. A. DzyNA-PCR: use of DNazymes to detect and quantify nucleic acid sequences in a real-time fluorescent format // *Clinical Chemistry*. 2000. V. 46. P. 625–630.
30. Santoro S. W., Joyce G. F. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1997. V.94. P. 4262–4266.
31. Гарафутдинов Р. Р., Никоноров Ю. М., Чемерис Д. А., Постригань Б. Н., Чубукова О. В., Талипов Р. Ф., Вахитов В. А., Чемерис А. В. Новые способы генерации сигнала флуоресценции при анализе однонуклеотидных за- мен с помощью химерных гибридационных зондов в реальном времени // *Биоорганическая химия*. 2009. Т.35. №5. С. 665–673.
32. Cairns M. J., Turner R., Sun L. Q. Homogeneous real-time detection and quantification of nucleic acid amplification using restriction enzyme digestion // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004. V.318. P. 684–690.
33. Piccirilli J. A., Krauch T., Moroney S. E., Benner S. A. Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA extends the genetic alphabet // *Nature*. 1990. V.343. P. 33–37.
34. Switzer C. Y., Moroney S. E., Benner S. A. Enzymatic recognition of the base pair between isocytidine and isoguanosine // *Biochemistry*. 1993. V.32. P. 10489–10496.
35. Sherrill C. B., Marshall D. J., Moser M. J., Larsen C. A., Daude-Snow L., Prudent J. R. Nucleic acid analysis using an expanded genetic alphabet to quench fluorescence // *Journal of American Chemical Society*. 2004. V.126. P. 4550–4556.
36. Moser M. J., Marshall D. J., Grenier J. K., Kieffer C. D., Killeen A. A., Pacin J. L., Richmond C. S., Roesch E. B., Scherrer C. W., Sherrill C. B., Van Hout C. V., Zanton S. J., Prudent J. R. Exploiting the enzymatic recognition of an unnatural base pair to develop a universal genetic analysis system // *Clinical Chemistry*. 2003. V.49. P. 407–414.
37. Sismour A. M., Benner S. A. The use of thymidine analogs to improve the replication of an extra DNA base pair: a synthetic biological system // *Nucleic Acids Research*. 2005. V.33. P. 5640–5646.
38. Koo K., Jaykus L. A. Detection of single nucleotide polymorphisms within the *Listeria* genus using an 'asymmetric' fluorogenic probe set and fluorescence resonance energy transfer based-PCR // *Letters of Applied Microbiology*. 2002. V.35. P. 513–517.
39. Shengqi W., Xiaohong W., Suhong C., Wei G. A new fluorescent quantitative polymerase chain reaction technique // *Analytical Biochemistry*. 2002. V.309. PP. 206–211.
40. Whitcombe D., Brownie J., Gillard H. L., McKechnie D., Theaker J., Newton C. R., Little S. A. Homogeneous fluorescence assay for PCR amplicons: its application to real-time, single-tube genotyping // *Clinical Chemistry*. 1998. V.44. №5. P. 918–923.
41. Zhang Y., Zhang D., Li W., Chen J., Peng Y., Cao W. A novel real-time quantitative PCR method using attached universal template probe // *Nucleic Acids Research*. 2003. V.31. P. 123.
42. Crockett A. O., Wittwer C. T. Fluorescein-labeled oligonucleotides for real-time pcr: using the inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides // *Analytical Biochemistry*. 2001. V.290. P. 89–97.
43. Vaughn C. P., Elenitoba-Johnson K.S. Intrinsic deoxyguanosine quenching of fluorescein-labeled hybridization probes: a simple method for real-time PCR detection and genotyping // *Laboratory Investigation*. 2001. V. 81. P. 1575–1577.
44. Kurata Sh., Kanagawa T., Yamada K., Torimura K., Yokomaku T., Kamagata Y., Kurane R. Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY FL-labeled probe or primer // *Nucleic Acids Research*. 2001. V.29. №6. e34.
45. Vaughn C. P., Elenitoba-Johnson K. S. Hybridization-induced dequenching of fluorescein-labeled oligonucleotides: a novel strategy for PCR detection and genotyping // *American Journal of Pathology*. 2003. V.163. P. 29–35.
46. Чемерис А. В., Никоноров Ю. М., Чемерис Д. А., Гарафутдинов Р. Р., Романенкова М. Л., Матниязов Р. Т., Гималов Ф. Р., Малеев Г. В., Вахитов В. А. ПЦР, ЛЦР и ГЦР – цепные реакции нуклеиновых кислот в режиме реального времени // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии*. 2005. Т.1, №2. С. 5–14.
47. Chemeris A. V., Nikonorov Yu. M., Romanenkova M. L., Chemeris D. A., Garafutdinov R. R., Magazova R. A., Maleev G. V., Vakhitov V. A., Vasilov R. G. Novel methods of amplifying DNA or RNA with real-time PCR // *United States Patent Application Publication No 2007/0117125 A1*, May, 24. 2007.

Поступила в редакцию 25.01.2012 г.