ISSN 0868–5886 *НАУЧНОЕ ПРИБОРОСТРОЕНИЕ, 2012, том 22, № 4, с. 86–92*

УДК 543.426; 543.9

© Я. И. Алексеев, Ю. В. Белов, О. П. Малюченко, Ю. А. Монахова, А. Н. Натыров, В. А. Орехов, С. В. Коновалов, В. Е. Курочкин, А. И. Петров

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗАТОР ДЛЯ ФРАГМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДНК

Разработан макет генетического анализатора, в котором используется метод разделения молекул нуклеиновых кислот в жидкой полимерной фазе одновременно в 8 капиллярах под воздействием высокого напряжения с пятицветной лазер-индуцированной флуоресцентной детекцией. Разработаны наборы реактивов для спектральной калибровки анализатора и для фрагментного анализа ДНК.

Кл. сл.: ДНК, генетический анализатор, флуоресцентная детекция

ВВЕДЕНИЕ

Совокупность генетической информации, определяющей особенности организма, сосредоточена в его геноме в виде последовательностей нуклеотидов в составе информационных молекул (ДНК или РНК). Отдельные фрагменты информационных молекул, которые кодируют белки, называются генами.

В медицине данные о геноме позволяют точно идентифицировать возбудителей инфекционных заболеваний (вирусы, бактерии, паразиты), уточнять их биологические особенности (степень патогенности), а также определять тактику лечения и профилактики (например, устанавливать чувствительность к определенным лекарственным препаратам).

Автоматизированные приборы для чтения последовательностей нуклеотидов в ДНК (секвенирование ДНК) и анализа их отдельных фрагментов получили название генетических анализаторов (секвенаторов).

КОНСТРУКТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА

Восьмикапиллярый генетический анализатор разрабатывается в ИАП РАН на основе одноканиллярного анализатора НАНОФОР® 05 [1–4].

Создан макет анализатора, позволяющий выполнить одновременно генетический анализ восьми образцов. Внешний вид макета представлен на рис. 1. Технические решения защищены патентами [5, 6], патентообладатель — ИАП РАН.

Анализатор содержит компоненты, показанные на функциональной схеме (рис. 2).

Основными узлами анализатора являются:

– позиционер — система двигателей, обеспечивающих двухмерное перемещение планшета с пробами и вспомогательными растворами (вода, буфер);

– термостатируемая кассета — устройство, в котором закрепляется и термостатируется линейка капилляров;

– устройство заполнения капилляра гелем;

– высоковольтный источник (ВВИ), создающий электрическое поле в капилляре и обеспечивающий как внесение пробы в капилляр, так и разделение ДНК в капилляре;

– лазер-индуцированный флуориметрический детектор, состоящий из лазера, системы зеркал, фильтров, линз и фотоэлектронных умножителей.

Рис. 1. Внешний вид макета генетического анализатора

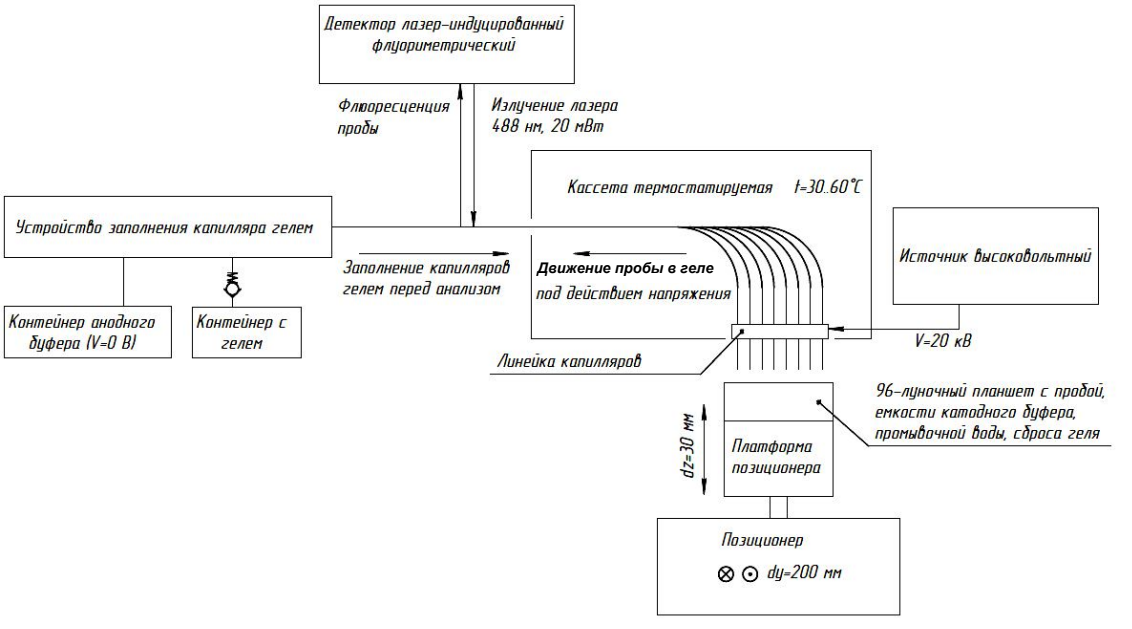


Рис. 2. Функциональная схема макета генетического анализатора

Для электрофоретического разделения фрагментов нуклеиновых кислот использованы кварцевые капилляры, заполненные раствором геля. Капилляры с электродами опускаются в лунки планшета с растворами исследуемых образцов, и высоковольтный источник тока обеспечивает электрокинетическое введение пробы в капилляр (отрицательно заряженная ДНК движется из раствора в гель к положительно заряженному электроду, находящемуся на противоположном конце капилляра). Далее под действием электрического поля происходит разделение внесенных в капилляр фрагментов ДНК. Ранее при проведении реакции секвенирования в состав разделяемых фрагментов нуклеиновых кислот введены флуоресцентные красители. При достижении флуоресцентно-меченными фрагментами ДНК оптического окна, находящегося вблизи конца капилляра (более короткие фрагменты достигают его быстрее, а более длинные — медленнее), лазером производится возбуждение флуоресцентных красителей в составе ДНК, а регистрация флуоресценции — детектором. При этом в случае разделения секвенсной смеси отдельный цвет пика на электрофореграмме соответствует определенному нуклеотиду, а последовательность пиков представляет собой последовательность расшифровываемого (секвенируемого) участка ДНК. Полученные от детектора данные обрабатываются с помощью специального программного обеспечения и выдаются пользователю в заданном виде. Данный метод является очень точным и обеспечивает эффективное разделение отличающихся лишь на один нуклеотид фрагментов ДНК в диапазоне длин от 20 до 1000 нуклеотидов.

Основным отличием вновь разработанного анализатора является наличие устройства сканирования капилляров. В этом устройстве использован кулачковый привод платформы, на которой установлены микрообъектив и зеркало.

Для фокусирования лазера на капиллярах и сбора флуоресценции используется конфокальная оптическая схема. Устройство сканирования обеспечивает возбуждение флуоресцентных красителей и одновременную регистрацию флуоресценции последовательно при совпадении фокуса микрообъектива с центром каждого капилляра. Регистрация флуоресценции осуществляется одноканальными фотоэлектронными умножителями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Макет разработанного анализатора позволяет регистрировать флуоресценцию красителей в пяти каналах детекции, суммированных в таблице.

Интерференционные фильтры каналов № 1–4 соответствуют максимумам флуоресценции красителей, используемых при анализе продуктов реакции секвенирования и фрагментном анализе, а фильтр канала № 5 — красителю, входящему в состав фрагментов маркера молекулярного веса.

Каналы детекции сигнала флуоресценции

№	Длина волны максимума пропускания фильтра, нм	Детектируемые флуоресцентные красители
1	520	FAM, R110, AlexaFluoro-488
2	550	R6G, JOE, VIC, HEX
3	580	TAMRA, NED, Cy3
4	610	ROX
5	650	LIZ, Cy5, DY632

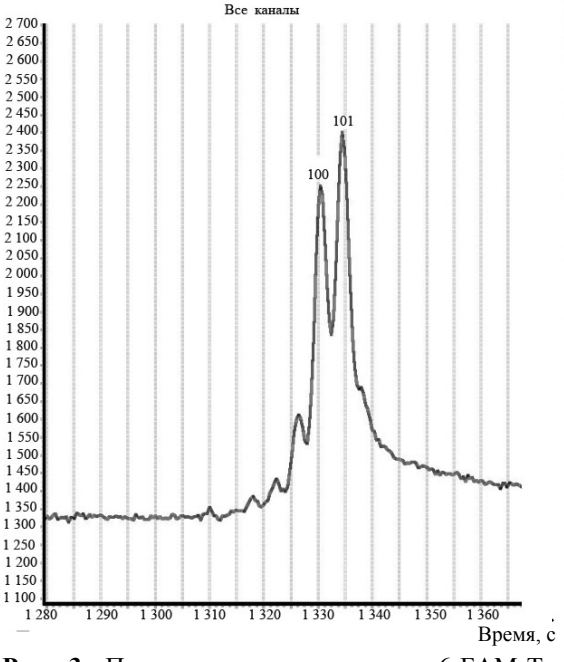


Рис. 3. Пример разделения смеси 6-FAM-T_{100} и 6-FAM-T_{101} в 6 % ПДМА.
Напряженность электрического поля — 250 В/см

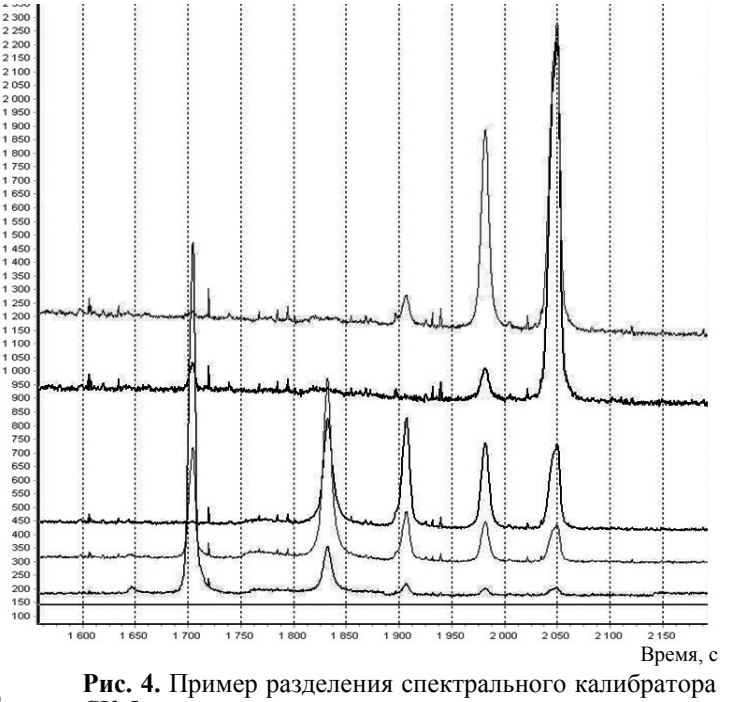


Рис. 4. Пример разделения спектрального калибратора СК-5.
Напряженность электрического поля — 280 В/см

Для обеспечения процесса разделения фрагментов ДНК в капилляре был приготовлен специальный гель — водный раствор линейного полидиметилакриламида (ПДМА). Линейный ПДМА был получен путем свободнорадикальной полимеризации диметилакриламида по стандартной методике, описанной ранее [7]. Был приготовлен раствор ПДМА с содержанием геля 6 %. Разрешающую способность полимера оценивали с помощью тестовой смеси синтетических фрагментов олиготимидилатов длиной 100 и 101 нуклеотидов, содержащих на 5'-конце флуоресцентный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) (рис. 3). Разрешающую способность раствора полимера рассчитывали по формуле

$$R_s = 1/2\cdot(W_{h1} + W_{h2}) / \Delta X\cdot\Delta M,$$

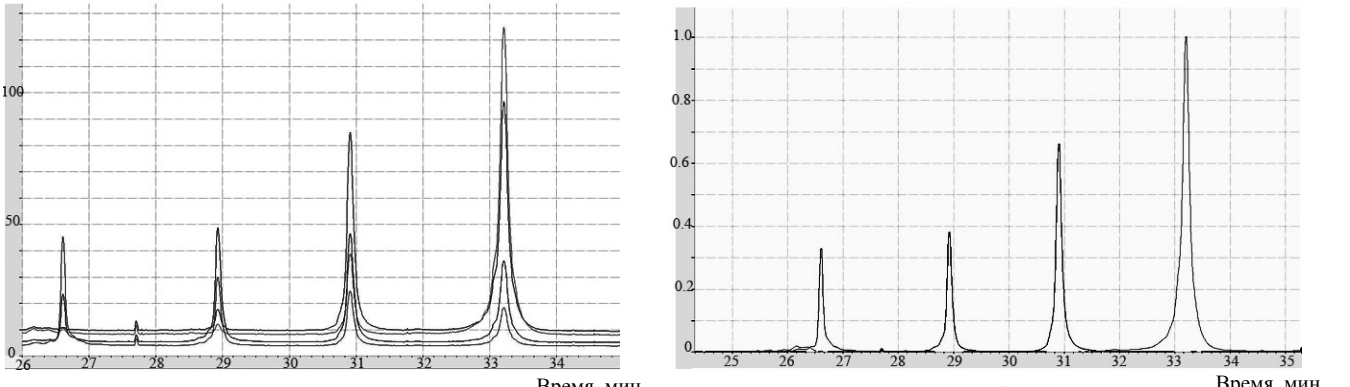
где R_s — разрешение; W_{h1} и W_{h2} — ширина на половине высоты пиков 1 и 2, с; ΔM — разность размеров фрагментов в нуклеотидах; ΔX — расстояние между пиками, с.

Рассчитанное значение разрешающей способности смеси 6-FAM-T_{100} и 6-FAM-T_{101} в 6 % ПДМА составило 1.58.

Для учета и нормализации свечения флуоресценции красителей в соседние каналы детектирования, так называемой спектральной калибровки генетического анализатора, было разработано два

набора флуоресцентно-меченных фрагмента ДНК. Один, предназначенный для калибровки с целью проведения фрагментного анализа, состоит из пяти фрагментов ДНК длиной 62, 82, 94, 106, 120 нуклеотидов, меченных красителями DY632, ROX, TAMRA, R6G и FAM — спектральный калибратор 5 (СК-5). Результаты разделения этого спектрального калибратора представлены на рис. 4.

Второй калибратор, предназначенный для анализа продуктов реакции секвенирования, состоит из четырех фрагментов ДНК длиной 21, 32, 47 и 66 нуклеотидов, содержащих красители с резонансным переносом энергии флуоресценции FAM-ROX, FAM-TAMRA, FAM-R6G и FAM [8] — спектральный калибратор 4 (СК-4). Результат его разделения представлен на рис. 5.



а б

Рис. 5. Пример разделения спектрального калибратора СК-4.
а — сырые данные, б — данные после обработки. Напряженность электрического поля — 280 В/см

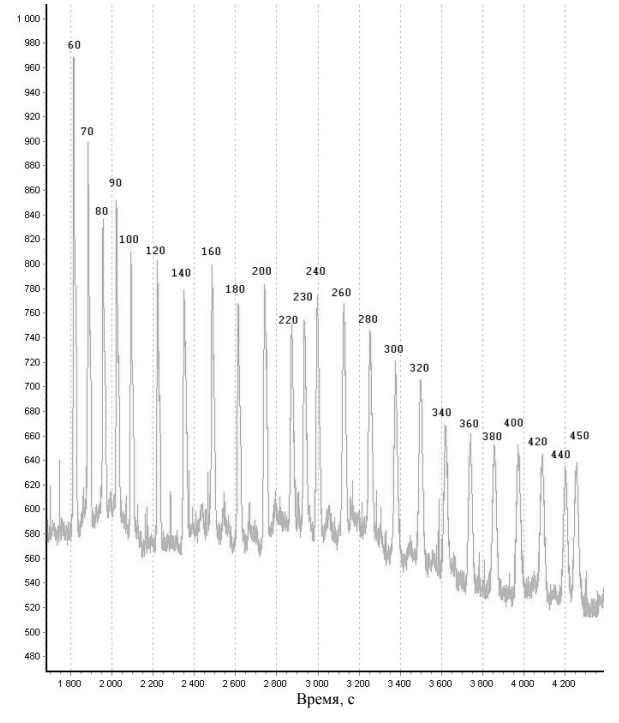


Рис. 6. Пример разделения маркера молекулярного веса М-450.
Напряженность электрического поля — 280 В/см

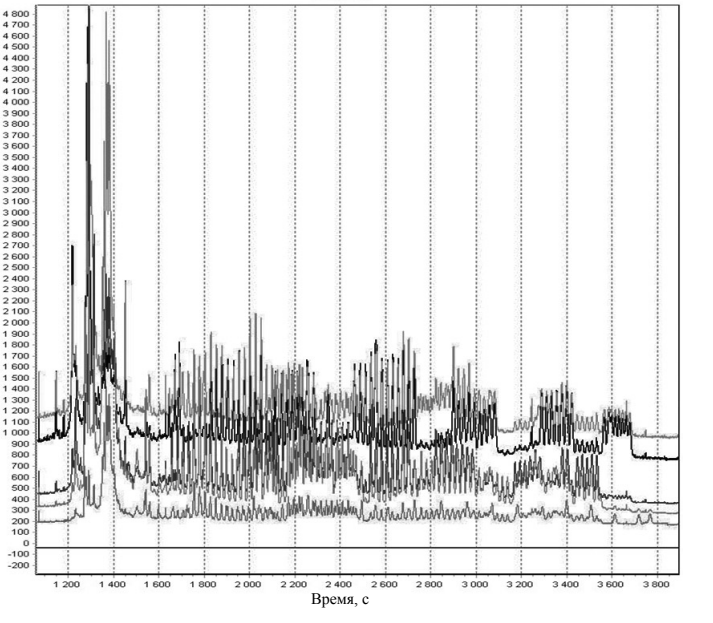


Рис. 7. Пример разделения "аллельной лестницы".
Напряженность электрического поля — 280 Вт/см

Для определения длин анализируемых фрагментов ДНК в диапазоне 60–450 нуклеотидов был разработан маркер молекулярного веса М-450, состоящий из 24 фрагментов различной длины, каждый из которых на 5’-конце содержал флуоресцентный краситель DY632. Пример разделения маркера М-450 приведен на рис. 6.

На рис. 7 приведены результаты электрофоретического анализа "аллельной лестницы" — фрагментов ДНК, представляющих собой полный набор вариантов коротких тандемных повторов 19 генов человека, используемых в международных панелях для генетической идентификации личности. Данные получены с помощью набора COrDIS Plus, производства ООО "Гордиз", Россия.

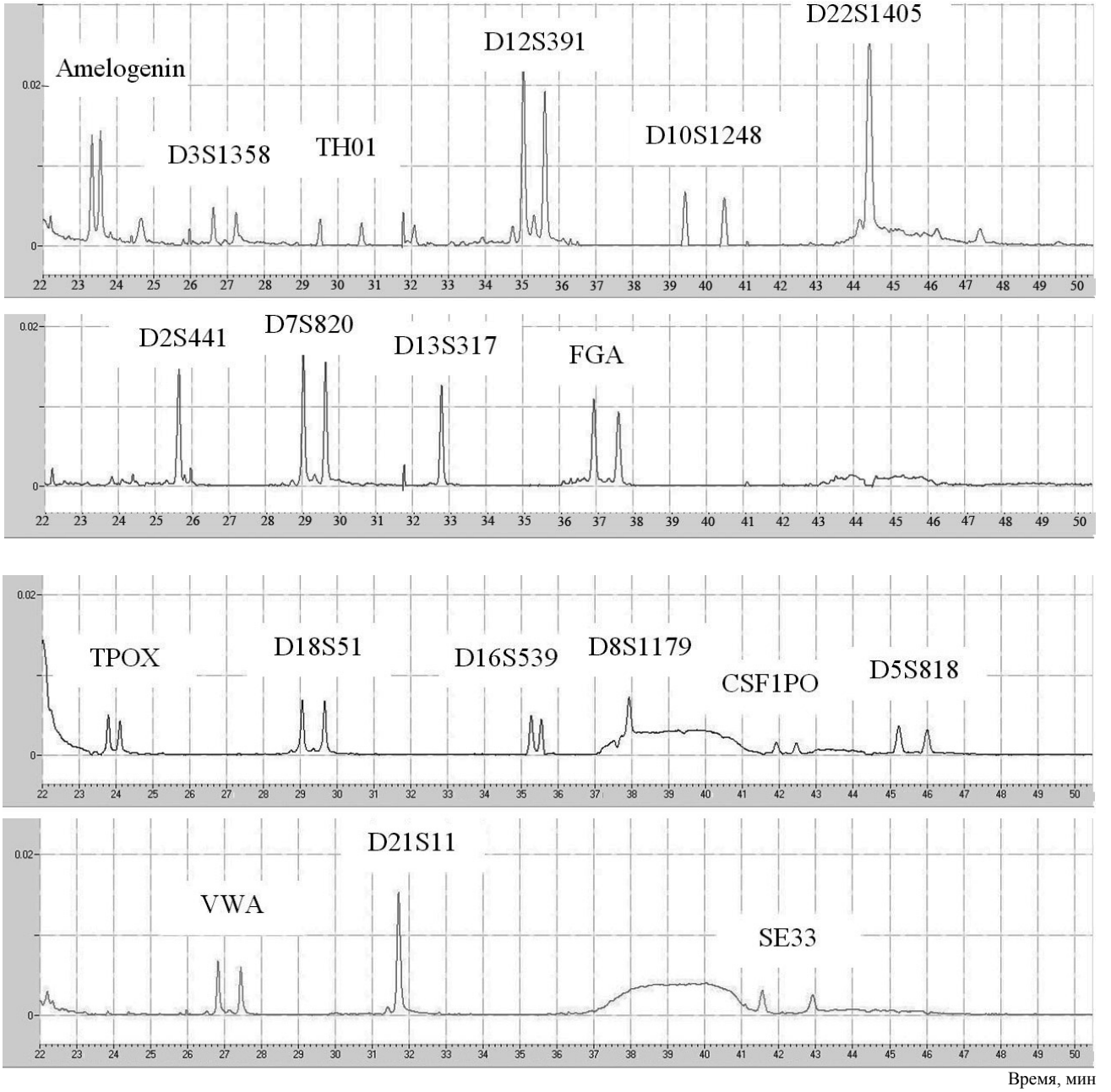


Рис. 8. Пример разделения продуктов амплификации образца МК-1, полученных с использованием набора COrDIS Plus

На рис. 8 показан результат разделения образца МК-5, представляющего собой смесь продуктов мультиплексной амплификации 20 локусов контрольной ДНК человека, входящей в состав набора COrDIS Plus. На электрофореграмме в форме пиков изображены амплифицированные фрагменты ДНК, соответствующие аллелям 19 STR-маркеров и пол-специфичного локуса амелогенина. Совокупность длин аллельных фрагментов описывает индивидуальный генетический профиль, уникальный для каждого человека за исключением монозиготных близнецов. Все маркеры, представленные на рис. 8, активно используются в судебной генетике и входят в состав двух стандартных международных панелей маркеров CODIS и ESS. Генетический профиль в данном формате может быть использован экспертами-генетиками для идентификации личности, анализа родства и сравнения следов биологического происхождения с криминалистической базой ДНК-профилей. Представленные результаты демонстрируют возможность использования прибора НАНОФОР® 05 для решения этих задач.

Полученная в результате проведенных экспериментов скорость фрагментного анализа составляет 13.8 нуклеотидов в минуту или 830 нуклеотидов в час при напряженности электрического поля 280 В/см. При этом точность анализа составила ± 1 нуклеотид в диапазоне длин до 450 нуклеотидов.

Для генетического анализатора разработано программное обеспечение, которое рассчитано на работу в среде Windows XP и выше и позволяет задавать и контролировать значения высокого напряжения, тока через капилляры, температуры кассеты, времени анализа, скорости приема данных, а также детектировать флуоресценцию из пяти световых каналов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Подтверждены технические характеристики макета генетического анализатора:

– 5-цветная детекция красителей;

– возможность анализа фрагментов ДНК со скоростью 830 нуклеотидов в час и точностью ± 1 нуклеотид в диапазоне длин до 450 нуклеотидов.

2. Для макета генетического анализатора разработаны следующие материалы и наборы реагентов:

– гель для разделения фрагментов ДНК;

– спектральный калибратор для фрагментного анализа;

– спектральный калибратор для секвенирования ДНК;

– маркер молекулярного веса.

Генетический анализатор разрабатывается при выполнении ОКР "Разработка генетического анализатора для секвенирования и фрагментного анализа ДНК" на основании Государственного контракта № 16.522.12.2014 от 10 октября 2011 г. по заказу Министерства образования и науки РФ в рамках федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы" (шифр заявки "2011-2.2-522-014-001").

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Беленький Б.Г., Евстрапов А.А., Козулин Р.А.* Влияние отраженного капилляром излучения лазера на чувствительность флуориметрического детектора капиллярного электрофореза // Научное приборостроение. 2001. Т. 11, № 2. С. 21–25.
2. *Беленький Б.Г., Козулин Р.А., Курочкин В.Е., Золотарев В.М.* Приборы аналитического контроля на основе комбинированного метода капиллярного электрофореза и флуоресценции // Оптический журнал. 2002. Т. 69, № 3. С. 69–77.
3. *Беленький Б.Г., Козулин Р.А., Курочкин В.Е., Золотарев В.М.* Аналитический метод определения последовательности ДНК (секвенирование) по спектральным флуоресцентным меткам // Оптический журнал. 2003. Т. 70, № 1. С. 65–68.
4. Генетический анализатор НАНОФОР® 05. URL: (http://www.iai.rssi.ru/nanofor03.php).
5. Флуориметрический детектор. Патент РФ на изобретение № 2182329 от 10.05.2002 г. Патентообладатель Институт аналитического приборостроения РАН.
6. Способ удаления внешнего полиимидного покрытия кварцевого капилляра. Патент РФ на изобретение № 2391303 от 05.11.2008 г. Патентообладатель Институт аналитического приборостроения РАН.
7. *Chiari M., Riva S., Gelain A., Vitale A., Turati E.* Separation of DNA fragments by capillary electrophoresis in N-substituted polyacrilamides // J. Chromatogr. A. 1997. V. 781. P. 347–355.
8. *Lee L.G., Spurgeon S.L., Heiner C.R. et al.* New energy transfer dyes for DNA sequencing // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 2816–2822.

ЗАО "СИНТОЛ", Москва (*Алексеев Я.И., Малюченко О.П., Монахова Ю.А., Натыров А.Н.*)

Институт аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург (*Белов Ю.В., Коновалов С.В., Курочкин В.Е., Петров А.И.*)

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии, Москва (*Алексеев Я.И., Малюченко О.П., Натыров А.Н.*)

ООО "Гордиз", Москва (*Орехов В.А.*)

Контакты: *Белов Юрий Васильевич*,
bel3838@mail.ru

Материал поступил в редакцию 18.10.2012

GENETIC ANALYSER FOR DNA FRAGMENT ANALYSIS

Ya. I. Alekseev[1,3], Yu. V. Belov[2], O. P. Malyuchenko[1,3], Yu. A. Monakhova[1], A. N. Natyrov[1,3], V. A. Orekhov[4], S. V. Konovalov[2], V. E. Kurochkin[2], A. I. Petrov[2]

[1]*JSC Syntol, Moscow*
[2]*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg*
[3]*All-Russia Research Institute of Agriculture Biotechnology, Moscow*
[4]*Gordis, LLC, Moscow*

The genetic analyser model was developed in which is used the method of nucleic acid molecules separation in the liquid polymer phase simultaneously in 8 capillaries, under the influence of the high voltage with five-colour laser-induced fluorescence detection. The reagents kits for spectral calibration of the analyser and for DNA fragment analysis were developed.

Keywords: DNA, genetic analyser, fluorescence detection