

presented. Twenty-nine isolates of Newcastle disease virus were recovered by OT-PCR followed by F gene fragment sequencing. It was shown that low virulent variants of Newcastle disease virus of genotypes I and II, as well as highly virulent variants of Newcastle disease virus of VIb genotype of «pigeon» line VIb2 and genotype VIId occurred in the territory of Russia.

УДК 543.068:577.113+535.394

РАСПОЗНАВАНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРОМЕТРА ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА «ПЛАЗМОН ППР-4М»

Рачков А.Э.¹, Холодова Ю.В.², Телегеев Г.Д.¹, Солдаткин А.П.¹

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

² Киевский национальный университет им. Т.Г. Шевченко

Для выявления возбудителей различных заболеваний в качестве эффективного способа их диагностики и профилактики предложен биосенсорный метод с использованием спектрометра поверхностного плазмонного резонанса (ППР) «Плазмон ППР-4м», разработанного украинскими исследователями. Иммуобилизация одноцепочечных олигонуклеотидов определенной последовательности на сенсорной поверхности такого прибора создает возможность их взаимодействия на этой поверхности с другими олигонуклеотидами в исследуемых образцах. Это вызывает прямой (без применения молекулярных меток) отклик сенсора в режиме реального времени. При введении исследуемых олигонуклеотидов в измерительную ячейку были получены биосенсорные отклики, величина которых соответствует степени их комплементарности к иммобилизованному олигонуклеотиду. Таким образом, была показана возможность распознавания олигонуклеотидов с помощью предложенного биосенсорного метода.

Достижения современной молекулярной биологии, особенно в области расшифровки геномов различных организмов (от вирусов и бактерий до млекопитающих и человека) открывают огромные возможности для изучения и выявления возбудителей различных заболеваний, разработки и использования эффективных способов их мониторинга, диагностики и профилактики. Для этих целей во многих случаях могли бы подойти такие средства современной аналитической биотехнологии как биосенсоры. Их конструктивной особенностью является соединение биоселективного элемента, который специфично реагирует с искомым аналитом, и физического преобразователя, который трансформирует результат биологического процесса в удобный для дальнейшей обработки и характеристики электрический сигнал. Если для формирования биоселективных элементов биосенсоров на поверхности физического преобразователя иммобилизуют одноцепочечные фрагменты ДНК и процесс гибридизации иммобилизированной пробы ДНК с комплементарными последовательностями нуклеиновых кислот, находящихся в анализируемом образце, является основой их селективности, то такие биосенсоры называются аффинными биосенсорами для детектирования специфических последовательностей нуклеиновых кислот или, коротко, ДНК-биосенсорами [1,2].

Все методические подходы для детектирования специфических последовательностей нуклеиновых кислот можно разделить на использующие молекулярные метки (флуоресцентные, ферментные и т.п.) и на прямые методы без использования молекулярных меток. Прямые методы значительно уменьшают затраты времени, материалов и финансовых средств. Кроме того они свободны от таких нежелательных эффектов, связанных с молекулярными метками, как их нестабильность и влияние на структуру и биологическую активность меченых биомолекул [3]. Одним из таких прямых подходов является спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [4]. Ряд фирм занимаются разработками аналитического оборудования, основанного на использовании этого явления. Наибольшую известность приобрели спектрометры ППР шведской компании "Biacore International AB" (недавно

она стала частью «GE Healthcare»). Однако необходимо отметить их очень высокую стоимость и громоздкость большинства коммерчески доступных инструментов [5].

Экспериментальный макет спектрометра «Плазмон ППР-4м», разработанный в Институте физики полупроводников им. В.Е. Лашкарева НАН Украины, не уступая зарубежным аналогам в чувствительности, выгодно отличается от них не только значительно меньшими размерами и стоимостью, но также и широкими возможностями для экспериментатора при выборе условий и параметров измерений [6,7]. Если на сенсорной поверхности такого прибора иммобилизовать одноцепочечные олигонуклеотиды определенной последовательности, то (при наличии комплементарных последовательностей нуклеиновых кислот в исследуемом образце) на ней будет происходить процесс гибридизации. Формирование двуцепочечных структур приводит к изменению диэлектрических свойств сенсорной поверхности, что и вызывает прямой отклик сенсора в режиме реального времени. Таким образом, зная структуру генов того или иного патогена и выбрав соответствующие последовательности нуклеиновых кислот в качестве пробы для иммобилизации на сенсорной поверхности, можно разработать прямые (без применения молекулярных меток) биосенсорные методы выявления и мониторинга различных заболеваний.

Целью данной работы является изучение возможности получения специфического отклика при взаимодействии различных олигонуклеотидов на сенсорной поверхности спектрометра «Плазмон ППР-4м».

Материалы и методы. В работе были использованы следующие одноцепочечные дезоксиолигонуклеотиды, синтезированные «Sigma-Genosys» (Германия): модифицированный сульфгидрильной группой **mod-Ph** (GCTGAAGGGCTTTT-GAACTGTGCT), полностью комплементарный к **mod-Ph P1** (AGCAGAGTTCAAAGCCCTTCAGC), частично комплементарный **Bcrex14** (CCACTGGATTTAAGCAGAGTTCAA) и некомплементарный **N2** (GATCTTCGTCCAGATCATCC). Кроме того, использовали 6-меркапто-1-гексанол («Fluka», Швейцария), мочевины («Хеликон», Россия) и цитрат натрия («Sigma», США). Все растворы готовили на деионизированной воде Milli Q.

Спектрометр «Плазмон ППР-4м» (Институт физики полупроводников им. В.Е. Лашкарева НАН Украины) – это оптоэлектронный прибор, использующий явление ППР в оптической конфигурации Кречмана. В тонкой пленке золота на поверхности стеклянной пластинки поляризованный луч полупроводникового лазерного диода ($\lambda = 650$ нм) возбуждает колебания электронной плазмы (поверхностный плазмон). Необходимые условия для возбуждения плазмона создаются специальной призмой, которая может вращаться на контролируемый компьютером угол.

Результаты работы. Для получения сенсорного отклика при взаимодействии олигонуклеотидов на сенсорной поверхности спектрометра «Плазмон ППР-4м» были взяты олигонуклеотиды (Рис. 1), первичная последовательность которых соответствует участку стыковки экзона 14 гена *bcr* и экзона 2 гена *abl* при формировании мРНК гибридного гена *bcr-abl* [8-10]. Один из них – **mod-Ph** был модифицирован сульфгидрильной группой для иммобилизации на поверхности золота, т.е., для применения в роли пробы. Вторым – (комплементарный к **mod-Ph** олигонуклеотид **P1**) использовали в роли специфической мишени. Кроме того, в роли мишени использовали олигонуклеотид **Bcrex14**, который содержал только фрагмент экзона 14 гена *bcr* и поэтому был комплементарен пробе **mod-Ph** лишь наполовину, и практически некомплементарный неспецифический олигонуклеотид **N2**.

Степень гибридизации исследуемых олигонуклеотидов, представленная на Рис. 1, а также термодинамические параметры их взаимодействий, представленные в таблице, были получены на основании теоретических расчетов с помощью сервера DINAMelt [11-13]. Следует сразу заметить, что величина изменения свободной энергии Гиббса (ΔG) процесса гибридизации определенной пары олигонуклеотидов не зависит от концентрации, но на значение температуры плавления (T_m) их двуспиральной структуры концентрация обоих олигонуклеотидов оказывает суще-

свидетельствовало об успешной иммобилизации. После удаления несвязавшегося материала проводили пассивацию (блокирование свободных от **mod-Ph** участков поверхности золота с целью уменьшения неспецифической сорбции немодифицированных олигонуклеотидов) путем введения в проточную измерительную ячейку 1 мМ водного раствора 6-меркапто-1-гексанола и инкубации в течение 30 мин.

Для получения сенсорного отклика при гибридизации в проточном режиме в ячейку вводили по 120 мкл 200 нМ растворов **P1**, **Vcrex14** или **N2** в рабочем буферном растворе SSC (15 мМ цитрат натрия, 150 мМ NaCl, pH 7.0) и промывали тем же рабочим буферным раствором. Рис. 2 показывает, что введение в ячейку комплементарного **P1** вызывает изменение сигнала ППР более чем на 20 мград, которое практически не уменьшается при промывке рабочим буферным раствором. Это свидетельствует о формировании стабильных двуспиральных структур на сенсорной поверхности. Если теперь ввести в ячейку раствор мочевины, которая вызывает разрушение межцепочечных водородных связей, то вследствие дегибридации сигнал ППР возвращается к исходному уровню, что позволяет использовать сенсорную поверхность для исследования следующих образцов. Введение в ячейку неспецифического **N2** не вызывает изменения сигнала ППР, а введение частично комплементарного **Vcrex14** вызывает появление сенсорного сигнала, но значительно меньшего, чем в случае комплементарного **P1**. Эти экспериментальные данные, полученные при гибридизации исследуемых олигонуклеотидов на сенсорной поверхности, хорошо согласуются с результатами теоретических расчетов (таблица).

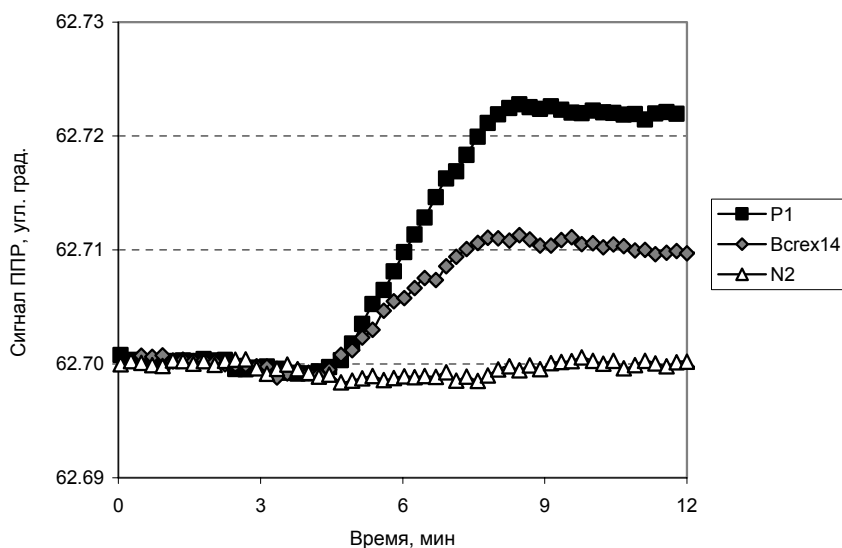


Рис. 2. Сенсорные отклики, полученные в процессе взаимодействия между иммобилизированным на поверхности золота **mod-Ph** и тремя исследуемыми олигонуклеотидами

Таким образом, с помощью спектрометра “Плазмон ППР-4м” без использования молекулярных меток при гибридизации олигонуклеотидов на его сенсорной поверхности удалось получить отклики, величина которых соответствует степени комплементарности исследуемых последовательностей нуклеиновых кислот. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение различных факторов (ионная сила, концентрация и объем образцов, скорость подачи раствора и т.п.), которые могут влиять на величину и специфичность сенсорного отклика, на его воспроизводимость и другие операционные характеристики разрабатываемого биосенсорного метода на основе поверхностного плазмонного резонанса.

Список литературы

1. Wang, J. From DNA biosensors to gene chips // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – 28, N 16. – P. 3011 – 3016.
2. Teles, F.R.R., Fonseca L.P. Trends in DNA biosensors // *Talanta.* – 2008. – 77, N 2. – P. 606-623. 3. Gabig-Ciminska, M. Developing nucleic acid-based electrical detection systems // *Microbial Cell Factories.* – 2006. – 5. – P. 1-9. 4. Homola, J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2003. – 377, N 3. – P. 528-539. 5. Lazcka, O., Del Campo F. J., Munoz F. X. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors // *Biosens. Bioelectron.* – 2007. – 22, N7. – P. 1205-1217. 6. Vasjari, M., Shirshov, Yu.M., Samoylov, A.V., Mirsky, V.M. SPR investigation of mercury reduction and oxidation on thin gold electrodes // *J. Electroanal. Chem.* – 2007. – 605, N 1. – P. 73-76. 7. Бенілова І.В., Солдаткін О.П., Рачков О.Е., Ушенін Ю.В., Чегель В.І., Мартле К., Жаффрезік-Рено, Н. Дослідження ефективності іммобілізації нюхових рецепторів людини на сенсорному чипі за допомогою спектрометра ППР «Плазмон ППР 4м» // Дослідження у галузі сенсорних систем та технологій. – Київ, 2006. За ред. Єльської Г.В., Походенка В.Д. – С. 41-50. 8. Nowell, P.C. Hungerford D.A. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1960. – 25, N 1. – P. 85-109. 9. Rowley, J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining // *Nature.* – 1973. – 243, N 5405. – P. 290-293. 10. Телегеев, Г.Д., Дубровская, А.Н., Дыбков М.В. Роль белка BCR / ABL в лейкогенезе // *Экспериментальная онкология.* – 1999. – 21, N 3 – 4. – P. 182-194. 11. Markham, N.R., Zuker, M. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – 33, Web Server issue. – P. W577-W581. 12. Markham, N. R., Zuker, M. UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization // *Bioinformatics, Volume II. Structure, Functions and Applications, number 453 in Methods in Molecular Biology, chapter 1, Humana Press, Totowa, NJ, 2008, ed. Keith J.M.* – P. 3-31.

OLIGONUCLEOTIDE RECOGNITION USING SURFACE PLASMON RESONANCE SPECTROMETER «PLASMON SPR-4M»

Rachkov A.E.¹, Holodova Yu.V.², Telegееv G.D.¹, Soldatkin A.P.¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics NASU, Kiev

² Kiev National University named after T. Shevchenko

It has been proposed the biosensor method for detection of various pathogenic agents as an efficient way of diagnostics and preventive health care using surface plasmon resonance (SPR) spectrometer "Plasmon SPR-4m", which was developed by Ukrainian researchers. Immobilization of single-stranded oligonucleotides of known sequence on the sensor surface of the device creates the possibility for their interactions on this surface with oligonucleotides from the samples under study. It generates real-time label-free sensor response. Following the introduction of the oligonucleotides under study into the measuring cell the biosensor responses were obtained which values correspond to the extent of their complementarities to the immobilized oligonucleotide. Thus, the possibility of oligonucleotide recognition by the proposed biosensor method has been shown.

УДК 619:615:371:578.832.1:619.5

ІМУННА ВІДПОВІДЬ У КУРЧАТ НА ВВЕДЕННЯ АНТИГЕНІВ З РІЗНОЮ АКТИВНІСТЮ ГЕМАГЛЮТИНІНУ ВІРУСУ ГРИПУ ПТИЦІ

Рула О.М.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

У статті наведені результати досліджень щодо імунної відповіді в курчат на введення інактивованого антигену з різною активністю гемаглютиніну високопатогенного грипу птиці. Дослідження проводились шляхом дворазового щеплення курчат 40-добового віку та наступним серологічним моніторингом щодо наявності антитіл до вірусу. Були проаналізовані отримані дані досліджень та встановлено, що інактивовані антигени з титром гемаглютинінів 1:1024 — 128 в організмі імунізованих курчат здатні викликати утворення антитіл до вірусу високопатогенного грипу на протективному рівні зі значним запасом.

Експерти FAO/WHO/OIE розглядають вакцинацію, як доповнення до заходів з контролю грипу птиці, яка вже використовувалась у багатьох країнах Європи, Азії та Південної Америки, а саме Італії (H7N1 і H7N3), Мексиці (H5N2), Пакистані