

Фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды как перспективные инструменты для создания высококочувствительных гомо- и гетерофазных систем выделения и анализа нуклеиновых кислот

Дмитриенко Е.*, Булгакова А., Чубаров А., Ломзов А., Пышный Д.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

* elena.dmitrienko@niboch.nsc.ru

Ключевые слова: Нуклеиновые кислоты; фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды; ПЦР; диагностика; зонды; биосенсоры; система детекции НК-биомаркеров

Мотивация и цель: Нуклеиновые кислоты (НК), их аналоги и производные являются молекулярными инструментами для научных молекулярно-биологических исследований, а также используются для решения практических задач биомедицины, биотехнологии и молекулярной диагностики. Выделение нуклеиновых кислот из биологических образцов и их анализ различными методами представляет собой одну из самых значимых проблем глобального здравоохранения, так как крайне необходимо для клинической диагностики и выявления патологий и возбудителей социально значимых инфекций. Однако низкая эффективность и специфичность выделения НК значительно усложняют дальнейший анализ и приводит к ложноотрицательным или ложноположительным результатам. Введение химических модификаций в состав олигонуклеотидов позволяет направленно изменять их структуру, свойства, взаимодействие с биологически активными соединениями. Синтетические аналоги нуклеиновых кислот часто обладают улучшенными физико-химическими, молекулярно-биологическими и биологическими свойствами. Применение модифицированных олигонуклеотидов, конструирование на их основе диагностических и терапевтических систем, а также использование их в различных гетерофазных форматах для эффективного выделения и анализа позволяет решить проблемы современной диагностики НК.

Методы и алгоритмы: Дизайн и синтез набора нативных и модифицированных ДНК, содержащих в заданных положениях одну или несколько, включая полностью модифицированные, фосфорилгуанидиновых (ФГ) модификаций по межнуклеотидной фосфатной группе проведен методами твердофазного амидофосфитного синтеза на автоматическом НК-синтезаторе. Полученные производные выделены, очищены и охарактеризованы методами ВЭЖХ, электрофореза, ESI либо MALDI TOF масс-спектрометрии, а также спектрофотометрическими методами. Изучены свойства ФГ-содержащих зондов в системах аллель-специфического ПЦР-анализа. Иммуобилизацию ФГ-содержащих олигонуклеотидов на различные поверхности, включая наночастицы, проводили с использованием введения функциональных групп в состав олигонуклеотидов, бифункциональных реагентов и функционализированных силанов. Полученные результаты использованы для апробации различных вариантов систем гомофазного и гетерофазного анализа НК при разработке биосенсоров.

Результаты: Проведено детальное исследование влияния количества и положения ФГ-модификаций в составе праймеров на эффективность протекания реакции удлинения цепи с помощью Taq ДНК-полимеразы. Был проведен дизайн и синтез более 40 модельных олигонуклеотидов, содержащих ФГ-модифицированные звенья в различном количестве и в разных положениях от 3'-конца. Все синтезированные олигонуклеотиды были исследованы, как в качестве праймеров при ферментативном удлинении в составе дуплексов с комплементарной 30-звенной матрицей с помощью Taq-ДНК-полимеразы, так и в качестве матриц в составе дуплексов с комплементарной 8-звенной последовательностью флуоресцентно-меченного олигонуклеотида. Для ФГ-модифицированных олигонуклеотидов, которые дают максимальный и минимальный выход продукта, как в случае праймера, так и в случае матрицы, показано возможность их применения в качестве праймеров для амплификации гена eGFP в режиме реального времени с использованием нативного обратного праймера. С учетом полученных данных осуществлен дизайн и синтез набора модифицированных праймеров, содержащих все возможные варианты ближайших соседей и мисматчей непосредственно рядом с введением фосфорилгуанидиновой модификации, для систематического исследования выявления однонуклеотидных полиморфизмов в процессе аллель-специфической полимеразной цепной реакции. Показано, что некоторые пары праймеров ингибируют ПЦР в случае наличия мисматча, и при этом наличие ФГ-модификации приводит к еще большему ингибированию, чем в его отсутствии. Проанализирован пул полученных продуктов ПЦР методом высокопроизводительного секвенирования. В случае использования библиотеки праймеров без мисматча в 3'-положении, наличие ФГ-модификации полностью ингибирует образование несовершенных продуктов. Показано, что включение ФГ-модификации в праймеры для ПЦР приводит к усилению различия между ДНК дикого типа и мутированной ДНК, обеспечивая высокую дискриминирующую способность праймеров в аллель-специфической полимеразной цепной реакции в реальном времени (АС-ПЦР). Разработана система гетерофазного гибридационного анализа НК с использованием ФГ-зондов. Исследованы методы иммобилизации нативных и модифицированных олигонуклеотидов на различные твердотельные поверхности, в том числе кремниевые микропроволоки, и эффективность гетерофазной молекулярной гибридизации. Разработаны подходы к иммобилизации ФГ-зондов на разные типы поверхности. Показано, что использование ФГ-зондов увеличивает эффективность гетерофазной гибридизации нуклеотидных маркеров в низкосолевых (10 mM фосфатный буфер, pH 7.4) и в бессолевых условиях. Апробированы протоколы пробоподготовки анализата с использованием композитного материала на основе магнитных наночастиц оксида железа и полимера нейлона-6. Разработана система гетерофазного гибридационного анализа на КНИ-биосенсоре. Показано, что использование карбонилдимидазола в качестве активирующего агента позволяет с большей чувствительностью выявлять матрицу в сравнении с активирующим агентом 3-глицидоксипропилтриметоксисилоном. При этом выявление протяженной рРНК матрицы оказалось более эффективным по сравнению с короткой синтетической ДНК-матрицей. Продемонстрирована чувствительность КНИ-биосенсора на аттомолярном уровне.

Выводы: Таким образом, получен набор данных, в еще большей степени раскрывающих потенциал использования фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов для разработки современных систем анализа нуклеиновых кислот, и разработаны алгоритмы направленного конструирования высокоспецифичных зондов и праймеров, позволяющих решать наиболее сложные прикладные задачи в области молекулярной диагностики НК.

Финансирование: Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (№ 22-24-00996) и государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (№ 121031300042-1).

Phosphorylguanidine derivatives of oligonucleotide as perspective tools for development of highly sensitive systems for nucleic acids diagnostics

Dmitrienko E.*, Bulgakova A., Chubarov A., Lomzov A., Pyshnyi D.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* elena.dmitrienko@niboch.nsc.ru

Key words: Nucleic acids; phosphoryl guanidine oligonucleotides; PCR diagnostics; probes; biosensors; detection of NA-biomarkers

Motivation and Aim: Nucleic acids (NA), their analogues and derivatives are molecular tools for scientific molecular biological research and are also used to solve practical problems in biomedicine, biotechnology and molecular diagnostics. The isolation of nucleic acids from biological samples and their analysis by various methods represents one of the most significant problems of global health, as it is essential for clinical diagnosis and detection of pathologies and pathogens of socially important infections. However, the low efficiency and specificity of NA isolation significantly complicate further analysis and lead to false negatives or false positives.

Introduction of chemical modifications into the composition of oligonucleotides allows to change their structure, properties, and interaction with biologically active compounds. Synthetic analogues of nucleic acids often have improved physicochemical, molecular-biological and biological properties. The use of modified oligonucleotides, construction of diagnostic and therapeutic systems based on them, as well as their use in various heterophase formats for efficient isolation and analysis allows solving the problems of modern NA diagnostics.

Methods and Algorithms: The design and synthesis of a set of native and modified DNAs containing one or more (including fully modified) phosphorylguanidine (PG) modifications on the inter-nucleotide phosphate group at given positions were carried out by solid-phase amidophosphite synthesis on an automatic NA synthesizer. The obtained derivatives were isolated, purified and characterized by HPLC, electrophoresis, ESI or MALDI TOF mass spectrometry and spectrophotometric methods. The properties of PG-containing probes in allele-specific PCR assay systems were studied. Immobilisation of PG-containing oligonucleotides on various surfaces, including nanoparticles, was carried out using the introduction of functional groups into the oligonucleotide composition, bifunctional reagents and functionalized silanes. The results obtained were used to validate different variants of homophase and heterophase NA analysis systems for the development of biosensors.

Results: The detailed study of the influence of the number and position of PG modifications in the primers on the efficiency of the chain extension reaction using Taq DNA polymerase was carried out. The design and synthesis of more than 40 model oligonucleotides containing PG-modified units in varying quantities and in different positions from the 3' end were carried out. All synthesized oligonucleotides were studied both as primers for enzymatic extension as part of duplexes with a complementary 30-mer template using Taq-DNA polymerase, and as templates in duplexes with a complementary 8-mer sequence of a fluorescently labeled oligonucleotide. For PG-modified oligonucleotides, which give the maximum and minimum product yield, both in the case of a primer and in the case of a template, the possibility of their use as primers for amplification of the eGFP gene in real time using a native reverse primer has been shown. Taking into account the obtained data, a set of modified primers was designed and synthesized, containing all possible variants of nearest neighbors and mismatches directly next to the introduction of phosphorylguanidine modification, for a systematic study of the detection of single nucleotide polymorphisms in the process of allele-specific polymerase chain reaction. It has been shown that some pairs of primers inhibit PCR in the presence of a mismatch, and the presence of the PG modification leads to even greater inhibition than in its absence. The pool of obtained PCR products was analyzed using high-throughput sequencing. When using a primer library without a mismatch in the 3' position, the presence of the PG modification completely inhibits the formation of imperfect products. It has been shown that the inclusion of PG modification in PCR primers leads to increased discrimination between wild-type and mutated DNA, providing high discriminatory ability of primers in allele-specific real-time polymerase chain reaction (AS-PCR). A system for heterophase hybridization analysis of NA using PG probes has been developed. Methods for immobilization of native and modified oligonucleotides on various solid surfaces, including silicon microwires, and the efficiency of heterophasic molecular hybridization were studied. Approaches to the immobilization of PG probes on different types of surfaces have been developed. It has been shown that the use of PG probes increases the efficiency of heterophase hybridization of nucleotide markers in low-salt (10 mM phosphate buffer, pH 7.4) and in salt-free conditions. Protocols for analyte sample preparation using a composite material based on magnetic iron oxide nanoparticles and nylon-6 polymer have been tested. A system for heterophase hybridization analysis on a SOI biosensor has been developed. It has been shown that the use of carbonyldiimidazole as an activating agent makes it possible to detect the matrix with greater sensitivity in comparison with the activating agent 3-glycidoxypyltrimethoxysilane. At the same time, identifying an extended rRNA template turned out to be more effective compared to a short synthetic DNA template. The sensitivity of the SOI biosensor at the attomolar level has been demonstrated.

Conclusion: Thus, we have obtained a set of data that further reveal the potential of using phosphorylguanidine oligonucleotides for the development of modern nucleic acid analysis systems, and developed algorithms for the directed design of highly specific probes and primers to solve the most complex applied problems in the field of molecular diagnostics of NA.

Funding: The study is supported by the Russian Science Foundation (grant No. 22-24-00996) and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (state registration No. 121031300042-1).