

RSP

VII Съезд

Российского фотобиологического общества

пос. Шепси, 14–20 сентября 2014 г.

Материалы съезда

Пушкино 2014

РЕПОЗИТОРИЙ БГПУ

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАЯКИ НА ОСНОВЕ УНТ: ДЕТЕКТИРОВАНИЕ SNP

Алла Веллигура^{*}, Валентина Егорова, Галина Крылова, Владимир Крот

Белорусский государственный педагогический университет, Минск, 220005, Беларусь
^{*} e-mail: alla.veligura@mail.ru; Fax: +375172262024

Однонуклеотидные замены (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) являются наиболее часто встречающимися генетическими вариациями генома. Огромное количество SNP делает их уникальными генетическими маркерами для превентивной медицины и биомедицинской диагностики. Тактика использования молекулярных маяков (ММ) – один из наиболее чувствительных способов обнаружения SNP. Однако при использовании ММ для дискриминирования SNP были выявлены и существенные недостатки такого типа зондов (наличие остаточной флуоресценции и неустойчивость к действию внутриклеточных нуклеаз), что приводило к появлению неспецифического сигнала в образце. Эта проблема может быть решена при использовании наноструктурированных материалов для модифицирования ММ.

Показано, что связывание малослойных углеродных нанотрубок (мУНТ) с АМ-меченным олигонуклеотидом позволяет углеродным нанотрубкам функционировать в качестве эффективных нанотушителей флуорофора FAM [1].

В данной работе мы исследовали возможность использования этого эффекта при разработке нового подхода к выявлению SNP на основе тушения флуоресценции при комплексообразовании FAM-олигонуклеотида с мУНТ с последующим восстановлением флуоресценции в результате гибридизации FAM-олигонуклеотида с целевой ДНК-последовательностью в растворе.

Комплексообразование осуществлялось методом ультразвуковой обработки смеси из мУНТ и FAM-олигонуклеотида, суспендированных в TE буфере. Структурно-функциональные свойства полученных комплексов мУНТ/FAM-олигонуклеотид детально охарактеризованы с использованием растровой электронной микроскопии (РЭМ) и метода гетероструктурного анализа (ГА).

На РЭМ-изображениях мУНТ однородно распределены и полностью покрыты плотными самоорганизованными олигонуклеотидными слоями. Методом ГА продемонстрировано, что присутствие в растворе комплементарной целевой последовательности приводит к диссоциации комплекса мУНТ/FAM-олигонуклеотид с последующим формированием гибридизационного гомодуплекса, что подтверждается восстановлением флуоресценции флуорофора, которая по интенсивности в несколько раз превышает флуоресценцию свободного FAM-олигонуклеотида. Кроме этого, наличие SNP в целевой олигонуклеотидной последовательности приводит к пятикратному снижению интенсивности флуоресценции флуорофора и уменьшению электрофоретической подвижности гетеродуплекса, содержащего одиночный mismatch.

Таким образом, комплексы мУНТ/FAM-олигонуклеотид могут быть использованы для создания высокочувствительных ДНК-биосенсоров, функционирующих по принципу молекулярных маяков, с целью детектирования SNP.

1. Веллигура А.А., Егоров А.С., Егорова В.П., Крылова Г.В., Липневич И.В., Шулицкий Б.Г., Научный вестник Ужгородского университета. Серия Физика, 2013, 32, 94.