

обществе штампы, навешивание ярлыков, мешают людям, страдающим депрессией и другими невротическими расстройствами, обратиться за помощью к психиатру, психотерапевту, психологу. Эти больные вынуждены обратиться за помощью к колдунам и знахарям, что в нашем обществе не является предосудительным. Такая «помощь» не помогает, а только запутывает суждения и умозаключения в психике больного, приводит к иррациональному мышлению.

Психиатры должны взять на себя ответственность за стигматизацию психических расстройств, так как никто другой не возьмется решить эту социальную проблему. Мы должны стать активными защитниками людей с психическими расстройствами, стараться

улучшать качество жизни пациентов, отслеживать случаи их дискриминации в социуме.

Средства массовой информации могут стать важным источником знаний в освещении психиатрических проблем, формировании новых общественных отношений и установок. Телевизионные программы на эту тему должны быть живыми, яркими, динамичными, чтобы надолго оставаться в памяти, примерно так, как подают информацию на телеканалах «Discovery» и «National Geographic».

В последнее время доступным источником знаний становится Интернет, поэтому психиатры должны предоставлять доступную для понимания информацию о психических расстройствах, давать взвешенные факты

и опровергать неверную информацию.

Важнейшей задачей медицинского сообщества и государства является сегодня организация эффективной и гуманной помощи больным с психическими расстройствами, в том числе депрессией. Пациентам необходимы психологическая поддержка и социальная защита, поэтому знания о психическом здоровье человека следует распространять в обществе.

Литература

1. Колбасова Т. Поединок с ангедонией / Т. Колбасова // Медицинский вестник. - 2013. - № 1-2 (614-615). - С. 18.
2. Kolbasova T. The fight with anhedonia / T. Kolbasova // Medicinskij vestnik [Medical Bulletin] - 2013. - №. 1-2 (614-615). - P. 18.

НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ

А.А. Кузнецов, Н.Р. Максимова, Г.Н. Александров,
С.А. Смагулова

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ОКСИДА ГРАФЕНА В КАЧЕСТВЕ НАНОСТРУКТУРНОГО ТУШИТЕЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ РАЗРАБОТКЕ НОВЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДНК-ДИАГНОСТИКИ

УДК 53.06; 57.088; 577.1

Обзор посвящен описанию существующих в мире подходов к применению оксида графена в качестве наноструктурного тушителя флуоресценции для ДНК-диагностики однонуклеотидных полиморфизмов. Рассмотрены уникальные свойства оксида графена по отношению к ДНК, описаны варианты его использования в качестве замены молекулярным тушителям флуоресценции в классических тест-системах. Рассмотрен потенциал адаптации существующих подходов к применению в лабораторной ДНК-диагностике.

Ключевые слова: ДНК-диагностика, тест-системы, оксид графена, флуоресценция.

Review is devoted to the description of the world's approaches of using graphene oxide as a nanostructured quencher for DNA diagnostics of SNPs. The unique properties of graphene oxide with respect to DNA and detailed options for its use as a replacement for molecular quenchers in classical test systems are described. The potential for adaptation of existing approaches for the laboratory DNA-diagnostic is considered.

Keywords: DNA diagnostics, test systems, graphene oxide, fluorescence.

Введение. В современном мире немаловажную роль играют инновационные методы медицинской диагностики, основанные на передовых

разработках и принципах. В конце XX – начале XXI в. одним из таких методов стала ДНК-диагностика, открывающая недостижимые ранее горизонты в области предиктивной и профилактической медицины [10]. ДНК-диагностика широко применяется для выявления наследственных и мультифакториальных заболеваний, для диагностики инфекций, установления биологического родства, в судебно-медицинской практике и ветеринарии. Объем производства тест-систем для ДНК-диагностики в 2010 г. в России оценивался в 15,7 млн штук [2]. Значительная часть проводимых генетических медицинских исследований в настоящий момент направлена на диагностику моногенных

заболеваний, общее число которых на сегодняшний день составляет более 5000 нозологий [13].

Важным аспектом этой развивающейся области медицины должна стать ее массовость – широкое внедрение ДНК-диагностики в медицинскую практику позволит значительно снизить генетический груз популяции, улучшить генофонд, здоровье и качество жизни населения. Для ускорения этого процесса необходимо наличие современных и доступных тест-систем для ДНК-диагностики, позволяющих проводить быстрые, качественные и недорогие анализы.

Проблемы современных методов ДНК-диагностики. В настоящий мо-

Северо-Восточный федеральный ун-т им. М.К. Аммосова: **КУЗНЕЦОВ Артем Александрович** – инженер-исследователь УНЛ «Геномная медицина» Клиники МИ СВФУ им. М.К. Аммосова, н.с. ЯНЦ КМП, kuznecov.artem@mail.ru; **МАКСИМОВА Надежда Романовна** – д.м.н., зав. УНЛ «Геномная медицина» Клиники МИ; **АЛЕКСАНДРОВ Григорий Николаевич** – н.с. УНТЛ «Графеновые нанотехнологии» ФТИ СВФУ; **СМАГУЛОВА Светлана Афанасьевна** – зав. УНТЛ «Графеновые нанотехнологии» ФТИ СВФУ.

мент существует несколько основных принципов, позволяющих проводить молекулярную диагностику мутаций [1]. Среди них – классические методы ПЦР-ПДРФ с регистрацией результатов по электрофорезу; метод секвенирования ДНК по Сэнгеру, флуоресцентные методы: ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR) и ПЦР с регистрацией сигнала по конечной точке (End-Point PCR); а также методы исследования с применением биочиповой технологии. Но почти у всех из используемых стандартных методов анализа в настоящее время есть как достоинства, так и недостатки, ограничивающие потенциал их применения в области лабораторной ДНК-диагностики.

На текущий момент в области практической медицины большую популярность имеют флуоресцентные методы ДНК-диагностики полиморфизмов: метод ПЦР с регистрацией сигнала по конечной точке и метод ПЦР в режиме реального времени [6], позволяющие непосредственно определять ампликоны непосредственно в процессе ПЦР. В течение последних пяти лет флуоресцентные методы успешно применяются в крупнейших диагностических и научно-исследовательских центрах развитых стран мира благодаря простоте и экспрессности выполнения анализа, высокой надежности получаемых результатов, экономии производственных площадей, уменьшению количества персонала и востребованности количественного определения ДНК/РНК. Благодаря этим преимуществам происходит постепенное вытеснение из практики классического метода ПЦР-ПДРФ. Однако лучшие существующие флуоресцентные тест-системы для ДНК-диагностики полиморфизмов основаны на использовании сложных схем с применением различных ДНК-зондов (TaqMan, LightCycler, Scorpion, Molecular Beacons). В состав этих зондов, как правило, входят фрагменты молекул флуорофора и тушителя флуоресценции.

Тушитель флуоресценции обеспечивает отсутствие флуоресцентного сигнала в случае, если зонд не встраивается в структуру ампликонов (нужной амплификации не происходит). Если амплификация проходит успешно и зонды встраиваются в ампликоны в процессе ПЦР, то исследователь видит накопление флуоресцентного сигнала. Применение такой структуры действительно обеспечивает высокую достоверность получаемых результатов и позволяет проводить даже количественную ДНК-диагностику,

оценивая кинетику накопления флуоресцентного сигнала в случае ПЦР в режиме реального времени.

Однако у подобных флуоресцентных тест-систем есть один существенный недостаток – сложная структура ДНК-зондов, которая приводит к проблемам со стабильностью и к удорожанию стоимости самой тест-системы из-за сложного процесса синтеза и очистки зондов. Это приводит к достаточно высокому соотношению цена/качество для подобных тест-систем и тормозит их массовое внедрение в область практического здравоохранения [16]. Но в настоящий момент именно флуоресцентные методы являются наиболее перспективными (в качественном и экономическом плане) и доступными для внедрения в клинической медицине. Поэтому актуальной на сегодняшний день задачей является развитие их потенциала – создание тест-систем, основанных на улучшенных или новых принципах работы, позволяющих одновременно получать качественные результаты и улучшить экономическую рентабельность диагностики.

Уникальные свойства оксида графена для применения во флуоресцентных тест-системах. Исследования ученых в последние годы привели к открытию новых материалов, обладающих уникальными свойствами, в том числе – свойствами тушителей флуоресценции [7]. В частности, ученые обнаружили, что графен и его производные могут быть весьма эффективными тушителями флуоресценции различных органических флуорофоров [11] и квантовых точек [8]. По сравнению с другими тушителями флуоресценции графен показал наивысший эффект гашения различных флуорофоров с низким фоном и высоким отношением сигнал/шум [9,12]. Данный эффект обуславливается адсорбцией флуорофоров на поверхности оксида графена и реализацией FRET-эффекта в виде переноса энергии возбуждения с молекулы флуорофора на поверхность оксида графена с ее дальнейшим рассеиванием.

Ключевой особенностью некоторых производных графена (в частности его оксида) также является их высокая афинность по отношению к одноцепочечным молекулам ДНК в отличие от двуцепочечных [15] (рис.1).

Благодаря наличию этих свойств у оксида графена, существует возможность разрабатывать на его основе различные биосенсорные тест-системы – более эффективные в

качественном и экономическом плане аналоги флуоресцентных систем для ДНК-диагностики мутаций на основе методов ПЦР в реальном времени и ПЦР с регистрацией результатов по конечной точке.

Подходы к разработке флуоресцентных тест-систем на основе оксида графена для ДНК-диагностики однонуклеотидных полиморфизмов. Активные исследования по разработке принципов работы подобных тест-систем в мире ведутся последние 2-3 года. К настоящему моменту опубликованы различные подходы к осуществлению диагностики точечных мутаций в ДНК, к которым приводят наследственные и онкологические заболевания; заложены общие идеи и принципы по созданию прототипов биосенсорных тест-систем с использованием оксида графена. Далее будут рассмотрены несколько таких подходов, разработанных за последние несколько лет.

Один из самых простых подходов к разработке подобных тест-систем заложен в работе S. He с соавт. [3]. Исследователи применили схему, в которой используется реакция гибридизации в растворе флуоресцентно меченых олигонуклеотидных зондов (P5-P7) с молекулой-мишенью (T7) с последующим добавлением в раствор суспензии оксида графена (рис. 2)

В результате гибридизации полностью комплементарных олигонуклеотидов образуется молекула двуцепочечной ДНК, которая не адсорбируется на поверхность оксида графена, что приводит к наличию у конечного раствора флуоресцентного сигнала, характерного для гибридизованной метки.

Ученые выяснили, что разница в 1 нуклеотид в молекулах-мишенях (M1-M3) уже не приводит к их полной гибридизации с зондом P1 (рис. 3), что позволяет регистрировать любые точечные мутации в структуре ДНК с помощью флуоресцентного сигнала по вышеописанной схеме.

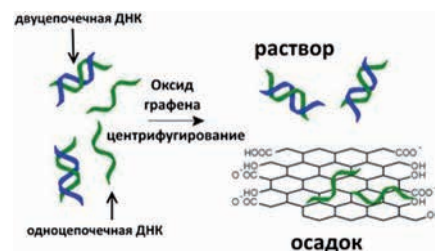


Рис.1. Различная афинность дву- и одноцепочечных молекул ДНК к оксиду графена

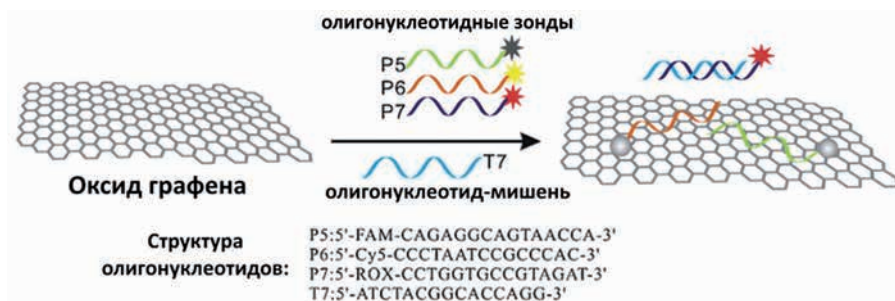


Рис. 2. Работа тест-системы с использованием оксида графена и олигонуклеотидов, меченых различными флуорофорами

Данный подход является развитием идеи, заложенной в работе 2009 г. [4], однако, в отличие от старой идеи, позволяет проводить мультиплексный анализ: используя различные зонды, меченые флуорофорами с различными длинами волн эмиссии (P5-P7), можно с высоким соотношением сигнал/шум определять различные олигонуклеотиды-мишени. В данном случае каждому добавляемому в раствор олигонуклеотиду-мишени будет соответствовать только тот флуорофор, который связан с полностью комплементарным олигонуклеотидным зондом.

Авторы также установили, что порядок добавления оксида графена к олигонуклеотидам для данной тест-

системы может быть любым (рис. 4, а,б): даже при добавлении раствора молекулы-мишени T1 к раствору оксида графена с адсорбированными на его поверхности молекулами зонда P1. Спустя некоторое время конечный раствор приобретает флуоресцентные свойства благодаря гибридизации зонда с мишенью с образованием плохо адсорбируемого дуплекса ДНК и его дальнейшей десорбции с поверхности оксида графена.

Вышеописанный подход также получил свое развитие в работе [14]. В ней исследователи создали тест-систему, используя ковалентную пришивку флуоресцентно меченых олигонуклеотидных зондов к поверхности оксида гра-

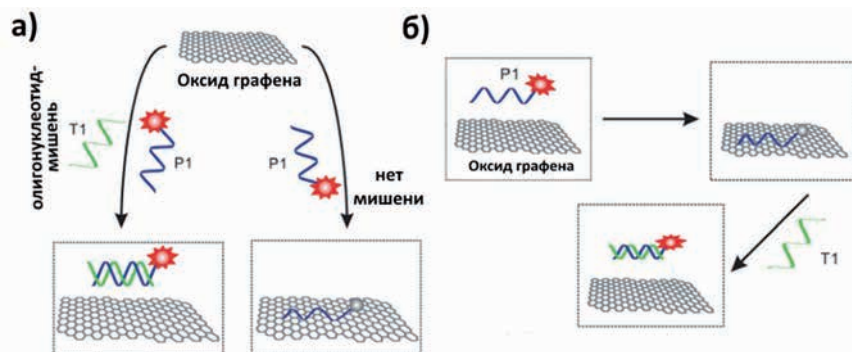


Рис. 4. Проведение ДНК-анализа для флуоресцентно меченого олигонуклеотидного зонда P1 и олигонуклеотида-мишени T1: а) при гибридизации до добавления оксида графена, б) при гибридизации после добавления оксида графена к зонду P1

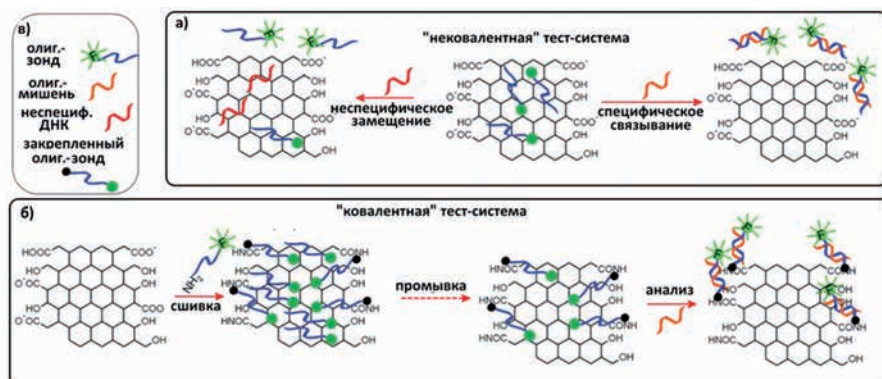


Рис. 5. Проведение ДНК-анализа с использованием флуоресцентных тест-систем а) «нековалентной», б) «ковалентной», в) расшифровка используемых обозначений

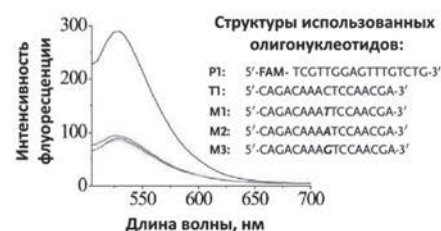


Рис. 3. Спектры флуоресценции для конечных растворов рассматриваемой тест-системы (после добавления оксида графена), а также структуры использованных при проведении исследования олигонуклеотидов. P1 – флуоресцентно меченый олигонуклеотидный зонд, T1 – олигонуклеотид-мишень, полностью комплементарный P1, M1-M3 – олигонуклеотиды-мишени, содержащие по 1 мутации. Спектры флуоресценции: черный – P1+T1, красный – P1+M1, синий – P1+M2, зеленый – P1+M3

фена (рис. 5, б). Такой подход, в отличие от остальных (рис. 5, а), позволяет повысить качество получаемых результатов, нивелируя вероятность неспецифического замещения зондов, адсорбированных на поверхности оксида графена, в процессе проведения анализа.

Исследователи использовали карбодиимидный метод пришивки зондов к оксиду графена, что позволило получить многоразовую тест-систему для ДНК-диагностики полиморфизмов за счет возможности ее «отмывки». Важно отметить, что с точки зрения многоразового использования оксида графена для ДНК-диагностики данная работа пока является уникальной.

Исследуя кинетику возникновения флуоресценции от раствора модифицированного таким образом оксида графена при добавлении к нему олигонуклеотида-мишени (с мутацией и без), авторы смогли получить соотношение интенсивностей, равное ~1,5, для полностью комплементарной и мутантной мишени (рис. 6). Передел

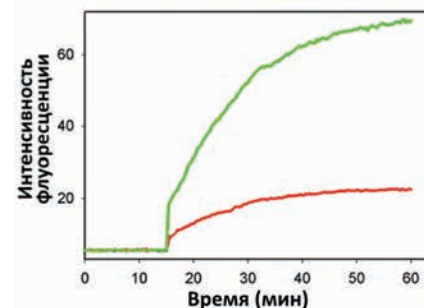


Рис. 6. Кинетика возникновения флуоресцентного сигнала при гибридизации закрепленного на поверхности оксида графена олигонуклеотида-пробы P1 с полностью комплементарной мишенью (зеленый график) и мишенью с 1 мутацией (красный график)

обнаружения комплементарной мишени для данной тест-системы составил $1,5 \cdot 10^{-10} \text{M}$, что является хорошим показателем на фоне тест-системы с «нековалентным» способом закрепления олигонуклеотидов.

Авторы другой работы [5] разработали идею с применением флуоресцентного интеркалирующего агента типа SYBR Green (взамен флуоресцентных зондов) и суспензии оксида графена для регистрации мутаций. Ученые установили, что при добавлении смеси полностью комплементарных друг другу олигонуклеотидов (зонда и мишени) вместе с SYBR Green к суспензии оксида графена в конечном растворе сохраняется флуоресценция, что говорит о встраивании флуоресцентного агента в двойную спираль образованного дуплекса ДНК. В случае же наличия мутации в исходных молекулах, полной гибридизации не происходит, и молекула флуорофора адсорбируется на поверхности оксида графена, что приводит к отсутствию флуоресценции у конечного раствора (рис. 7).

Эксперименты показали, что при регистрации однонуклеотидных мутаций с использованием суспензии оксида графена достигается огромное значение показателя сигнал/шум (25-90) при концентрации олигонуклеотидов 10 нМ, что обеспечивает высокую чувствительность для данного метода анализа (рис. 8).

Используя полученный в ходе данных исследований опыт, авторы создали прототип флуоресцентного чипа, способного различать количественный состав анализируемой смеси олигонуклеотидов (рис. 9).

Перспективы и возможности адаптации существующих подходов для лабораторной ДНК-диагностики наследственных заболеваний. В целом за последние 3-4 года в зарубежной литературе было описано уже более десяти совершенно различных подходов к разработке флуоресцентных тест-систем на основе оксида графена для ДНК-диагностики мутаций. Во всех работах оксид графена используется для двух основных целей:

1) для логического распознавания одно- и двуцепочечных молекул ДНК, благодаря различной аффинности по отношению к ним;

2) в качестве наноструктурного тушителя флуоресценции взамен молекулярных тушителей, распространенных в ДНК-зондах современных флуоресцентных тест-систем.

Необходимо отметить, что до сих

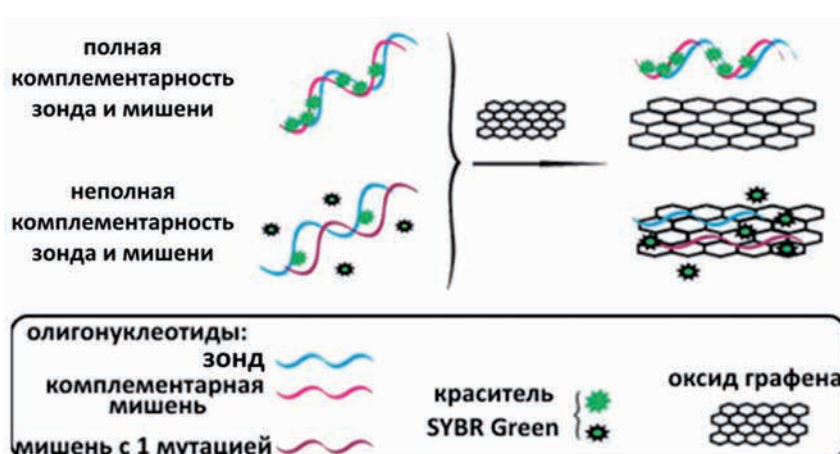


Рис. 7. Проведение ДНК-анализа с использованием оксида графена и флуоресцентного красителя типа SYBR Green

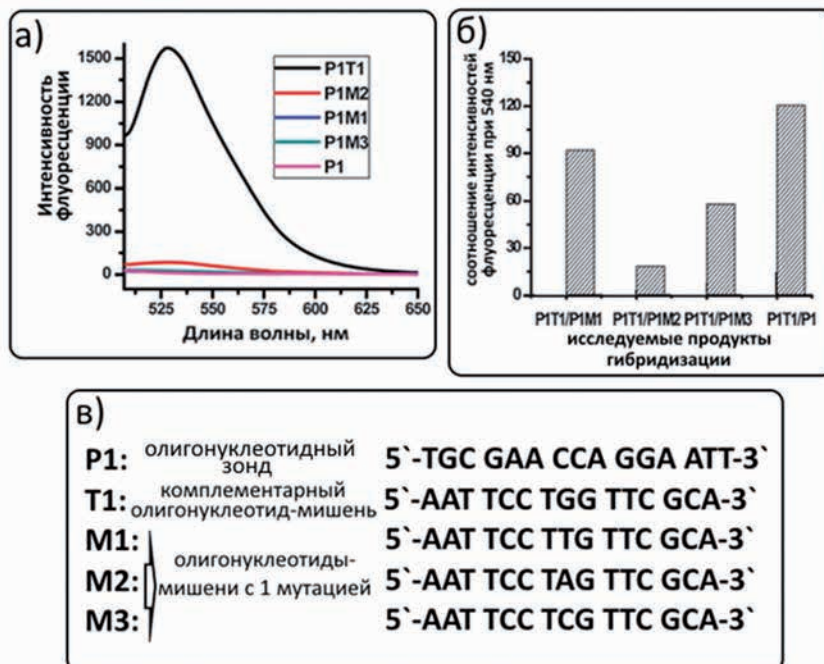


Рис. 8. Результаты регистрации мутаций в олигонуклеотидах с использованием тест-системы на основе оксида графена: а) спектры флуоресценции комплексов SYBRGreen с различными продуктами гибридизации олигонуклеотидов в присутствии оксида графена, б) соотношение интенсивностей флуоресценции для данных комплексов при длине волны эмиссии 540 нм, в) структуры использованных для проведения гибридизации олигонуклеотидов

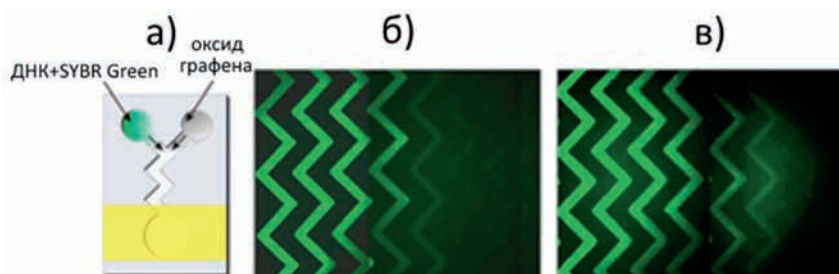


Рис. 9. Разработанный флуоресцентный микрочип для проведения ДНК-анализов: а) дизайн микрочипа. Снимки флуоресценции для смеси P1T1+SYBRGreen в присутствии оксида графена: б) при варьировании конечной концентрации T1 (250, 200, 100, 50, 25, 10, 5, 0 нМ), в) при моделировании различных аллельных частот T1/(T1+M1) (100, 80, 60, 40, 20, 10, 5, 0%), использованные концентрации: по 500 нМ для P1 и (T1+M1)

пор все вышеупомянутые исследования в целом направлены на демонстрацию потенциала использования оксида графена при создании тест-систем и пока не нашли применения в области лабораторной ДНК-диагностики заболеваний. Опубликованные подходы нуждаются в серьезной адаптации для применения в лабораторной ДНК-диагностике по двум главным причинам:

1) Во всех разработанных на данный момент подходах используются одноцепочечные олигонуклеотиды, в то время как в процессе стандартной ПЦР – ключевой стадии любой процедуры ДНК-диагностики – образуются двуцепочечные молекулы ДНК (ампликоны).

2) Все разработанные тест-системы созданы для работы с достаточно короткими олигонуклеотидами (15-25 н.), в то время как ампликоны, образующиеся в процессе классической ПЦР, не могут иметь длину, меньшую 50 п.н. ввиду самой сути ПЦР.

Отличительной характеристикой оксида графена является простота и дешевизна его синтеза, а также высокая стабильность коллоидных суспензий. Для сравнения: исходя из данных вышеописанных подходов к ДНК-диагностике с применением оксида графена [3-5,14], количество последнего, необходимое для тушения 1 нМ флуорофора, составляет от 0,1 до 1 мг. В тест-системах с молекулярными тушителями флуоресценции (TaqMan, LightCycler) используются эквивалентные между собой количества флуорофора и тушителя: для 1 нМ флуорофора 1 нМ тушителя. Соотношение средней коммерческой стоимости 1 мг оксида графена (например европейской марки «Graphenea») и 1 нМ тушителя флуоресценции (например типа Black Hole от российской компании «Синтол») составляет примерно 1:3. При этом доля стоимости тушителей флуоресценции, как правило, составляет 10-15% от общей стоимости тест-системы. Поэтому применение

оксида графена в качестве наноструктурного тушителя флуоресценции может привести к созданию нового класса флуоресцентных тест-систем, удешевить стоимость и улучшить качество проведения ДНК-диагностики по сравнению с существующими флуоресцентными тест-системами, в которых используются дорогие в синтезе и малостабильные при использовании молекулярные тушители флуоресценции.

Выводы. Таким образом, несмотря на активные исследования возможностей применения оксида графена при создании тест-систем для ДНК-диагностики мутаций, в настоящий момент еще не создано тест-систем с использованием оксида графена, предназначенных для лабораторной ДНК-диагностики. Проведение исследований по поиску новых и адаптации уже созданных подходов для разработки и внедрения тест-систем на основе оксида графена в клиническую лабораторную практику представляется интересной задачей для исследователей.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 — 2020 годы» (соглашение № 14.575.21.0015).

Литература

- Иллариошкин С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование / С.Н. Иллариошкин. – М.: МИА, 2004. – 207 с.
- Иллариошкин С.Н. DNA diagnostics and medical-genetic counseling / S.N. Illarioshkin. – Moscow: MIA, 2004. – 207 p.
- Рынок диагностических ПЦР-тест-систем в 2009-2010 годах [Электронный ресурс]. URL: <http://abercade.ru/research/reports/7116.html> (Дата обращения: 24.09.2014).
- Market of test kits for PCR diagnostic in 2009-2010 [electronic resource]. URL: <http://abercade.ru/research/reports/7116.html> (Date of access: 09.24.2014).
- A Graphene Nanoprobe for Rapid, Sensitive, and Multicolor Fluorescent DNA Analysis / S. He,

B. Song, D. Li [et al.] // Adv. Funct. Mater. – 2012. – Vol. 20. – P. 453–459.

4. A Graphene Platform for Sensing Biomolecules / C.H. Lu, H.H. Yang, C.L. Zhu [et al.] // Angew. Chem. Int. Ed. – 2009. – Vol. 48. – P.4785–4787.

5. A power-free microfluidic chip for SNP genotyping using graphene oxide and a DNA intercalating dye / J. Li, Y. Huang, D. Wang [et al.] // Chem. Commun. – 2013. – Vol. 49. – P.3125–3127.

6. Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Rev. / M. Arya, I.S. Shergill, M. Williamson [et al.] // Mol. Diagn. – 2005. – Vol.5. – P. 209–219.

7. Balcioglu M. DNA-Length-Dependent Quenching of Fluorescently Labeled Iron Oxide Nanoparticles with Gold, Graphene Oxide and MoS₂ Nanostructures / M. Balcioglu, M. Rana, N. Robertson, M.V. Yigit // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2014. – Vol. 6. – P. 12100–12110.

8. Fluorescence Resonance Energy Transfer between Quantum Dots and Graphene Oxide for Sensing Biomolecules / H. Dong, W. Gao, F. Yan [et al.] // Anal. Chem. – 2010. – Vol. 82, №13. – P.5511–5517.

9. Highly Efficient Fluorescence Quenching with Graphene / A. Kasry, A.A. Ardakani, G.S. Tulevski [et al.] // J. Phys. Chem. C. – 2012. – Vol. 116, №4. – P. 2858–2862.

10. Landegren U. Consulting the source code: prospects for gene-based medical diagnostics / U. Landegren // Journal of Internal Medicine. – 2002. – Vol. 248. – P. 271–276.

11. Miguel M. Graphene as a Quencher of Electronic Excited States of Photochemical Probes / M. Miguel, M. Alvaro, H. Garcia // Langmuir. – 2012. – Vol. 28, №5. – P. 2849–2857.

12. Nanomaterial-Based Fluorescent DNA Analysis: A Comparative Study of the Quenching Effects of Graphene Oxide, Carbon Nanotubes, and Gold Nanoparticles / F. Li, H. Pei, L. Wang [et al.] // Adv. Funct. Mater. – 2013. – Vol. 23. – P.4140–4148.

13. OMIM Gene Map Statistics. [Электронный ресурс]. URL: <http://omim.org/statistics/entry> (Дата обращения: 24.09.2014).

14. Po-Jung J.H. Molecular Beacon Lighting up on Graphene Oxide / J.H. Po-Jung, J. Liu. // Anal. Chem. – 2012. – Vol. 84. – P. 4192–4198.

15. Po-Jung J.H. Separation of Short Single- and Double-Stranded DNA Based on Their Adsorption Kinetics Difference on Graphene Oxide / J.H. Po-Jung, J. Liu // Nanomaterials. – 2013. – Vol. 3. – P. 221–228.

16. Smith C.J. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology / C.J. Smith, A.M. Osborn // FEMS Microbiology Ecology. – 2009. – Vol. 67. – P. 6–20.