

# НАНОКОЛОНИИ: ОБНАРУЖЕНИЕ, КЛОНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ

©2008 г. Е. В. ЧЕТВЕРИНА, А. Б. ЧЕТВЕРИН

*Институт белка РАН, Пущино, Московская область*

I. Введение. II. Изобретение метода нанокolonий. III. Изучение рекомбинации РНК. IV. Развитие метода нанокolonий. V. Молекулярная диагностика. VI. Клонирование и экспрессия генов вне клетки. VII. Изучение генов и их экспрессии. VIII. Перспективы нанокolonий. IX. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

Колонии молекул (или молекулярные колонии) образуются, если матричные нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) размножают при помощи матрице-зависимых полимераз не в жидкой, как обычно, а в иммобилизованной среде, например, в геле. Размеры молекул полинуклеотидов, из которых формируются колонии, находятся в нанометровом диапазоне, то есть РНК, ДНК являются наномолеку-

---

*Принятые сокращения:* 3D-pol – ген полиовирусной РНК полимеразы; AML1-ETO – химерная последовательность, состоящая из частей генов AML1 и ETO; FRET – флуоресцентный (ферстеровский) резонансный перенос энергии; GFP – зеленый флуоресцирующий белок; HBV – вирус гепатита В; HIV – вирус иммунодефицита человека; Q $\beta$ -репликаза – РНК-зависимая РНК-полимераза бактериофага Q $\beta$ ; RQ РНК – особый класс РНК, экспоненциально размножаемых Q $\beta$ -репликазой; Taq ДНК-полимераза – ДНК-зависимая ДНК-полимераза *Thermus aquaticus*; Tth ДНК-полимераза – ДНК-зависимая ДНК-полимераза *Thermus thermophilus*; RCA (Rolling Circle Amplification) – способ размножения по принципу катящегося кольца; SNP – однонуклеотидный полиморфизм, ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей ПЦР; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Адрес для корреспонденции: [helena@vega.protres.ru](mailto:helena@vega.protres.ru)

Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН, РФФИ, Федеральной целевой научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники», Медицинского института Говарда Хьюза, Европейского агентства ИНТАС, Международного научного фонда.

лами. Более того, матрикс геля образует трехмерную сеть с размером пор также в нанометровом диапазоне. Эти два обстоятельства позволяют называть молекулярные колонии колониями наномолекул или наноколониями.

Использование иммобилизованной среды является ключевым моментом, так как матрикс геля предотвращает конвекцию среды и препятствует диффузии наномолекул. В результате потомство каждой исходной наномолекулы не распространяется по всему реакционному объему, а концентрируется в ограниченной зоне вокруг родительской молекулы, то есть образует колонию. С другой стороны, матриксная сеть не влияет на диффузию более мелких молекул – субстратов реакции (нуклеозидтрифосфатов, олигонуклеотидных праймеров) и компонентов буфера. Поэтому осуществление реакции в геле не приводит к снижению размножения нуклеиновых кислот.

При использовании тонкого слоя геля нанокolonии располагаются в одной фокальной плоскости, что облегчает их наблюдение и скрининг. Число молекул в колонии определяется эффективностью ферментативной системы размножения и временем реакции (числом циклов размножения), а размер колонии и плотность упаковки в ней наномолекул – размером размножаемых молекул и плотностью (размером пор) геля. Регулируя эти параметры, всегда можно размножить отдельную матричную наномолекулу до количества, детектируемого используемым регистрирующим устройством. Крупные нанокolonии можно видеть невооруженным глазом после обработки, делающей бесцветные нанокolonии видимыми. Мелкие нанокolonии позволяют осуществлять скрининг огромного числа матричных наномолекул на небольшой площади геля, но для их обнаружения надо использовать микроскоп.

Так как практически каждая наноклония происходит из одной матричной молекулы, то использование этого метода позволяет обнаруживать, подсчитывать и идентифицировать одиночные молекулы ДНК или РНК. Кроме того, поскольку нанокolonии представляют собой потомство индивидуальных матричных молекул (молекулярные клоны), они позволяют осуществлять клонирование чистого генетического материала и прямой скрининг клонов. Размноженные ДНК или РНК могут служить матрицами для синтеза других наномолекул – белков, свойства которых можно исследовать прямо в колониях, которые, в отличие от клеток, не окружены мембраной.

Впервые способ получения нанокolonий был опубликован нами в 1991 г. в статье, посвященной природе «спонтанного синтеза» РНК. [1]. В той статье мы продемонстрировали, что можно «выра-

щивать» колонии РНК, и применили их для обнаружения в воздухе единичных молекул реплицирующихся РНК. Тогда же мы предложили выращивать колонии ДНК, а также использовать колонии нуклеиновых кислот с целью изучения химических реакций между одиночными молекулами, молекулярной диагностики, клонирования и экспрессии генов *in vitro*. Эти направления изложены в патентах на нанокolonии, полученных нами в России и США [2–7].

В последующих работах мы стали называть этот изобретенный нами метод «методом молекулярных колоний» (ММК) или «Molecular Colony Techniques» (МСТ).

В течение 10 лет, начиная с 1989 г., метод молекулярных колоний развивался исключительно усилиями нашей лаборатории. Ситуация изменилась, когда метод стали использовать в лаборатории Дж. Чёрча в Гарвардском университете (Бостон, США). В 1999 г. под названием метод «полоний» (то есть полимеразных колоний) Р. Митра и Дж. Чёрч опубликовали, без ссылки на наши работы, ПЦР в колониях ДНК [10], почти буквально воспроизводящую наш метод, изложенный в патентах [2–7], заявки на которые были поданы еще в 1992 г. Они ввели лишь одну несущественную модификацию – иммобилизовали на полиакриламидном матриксе с помощью акридитной группы один из праймеров. Под именем «полоний» молекулярные колонии теперь используют в Гарварде и других университетах США с целью анализа экспрессии генов и однонуклеотидного полиморфизма (SNP – single nucleotide polymorphism), высокопроизводительного секвенирования ДНК, исследования альтернативного сплайсинга, определения аллельных вариаций генов, картирования генов и определения числа их копий.

До последнего времени под названием «молекулярные колонии» изобретенный нами метод фигурировал в большинстве наших статей. *Новое название метода – «нанокolonии»* – более точно отражает природу этого явления, так как речь идет о колониях не любых молекул, а именно наномолекул.

В данном обзоре суммированы результаты как нашей, так и зарубежных лабораторий, достигнутые благодаря применению нанокolonий.

## II. ИЗОБРЕТЕНИЕ МЕТОДА НАНОКОЛОНИЙ

Принцип получения нанокolonий тот же, что был предложен Робертом Кохом в 1881 г. для выращивания бактериальных колоний [11]: размножение осуществляют в иммобилизованной среде, благодаря чему потомство (у Коха – бактерии, у нас – матричные наномолекулы) локализуется в определенном ограниченном пространстве.

Бактериальные колонии выращивают на твердой питательной среде, приготовленной на агаре или желатине. Аналогично получают колонии вирусов, образующие зоны лизиса в сплошном клеточном газоне, называемые «бляшками». Каждая колония представляет собой потомство единственной бактериальной клетки или вирусной частицы, локализуемое в том месте, где эта родительская клетка или частица была «посеяна». Метод Коха дает возможность идентифицировать возбудителя инфекции по виду и свойствам образуемых колоний, а также позволяет прямо, подсчитывая колонии, определять его титр; все это делает микробиологический анализ проще, быстрее и дешевле, а результат точнее. При достаточном разведении посевного материала колонии оказываются пространственно разделены и отдельные клетки или вирусы не мешают друг другу размножаться. Поэтому удается детектировать и определять точный титр возбудителя даже при исследовании сложных смесей микроорганизмов, в которых искомый инфекционный агент присутствует в следовых количествах или является неконкурентоспособным по отношению к быстрорастущим видам.

Для получения нанокolonий отдельные молекулы ДНК или РНК размножают в твердой гидратированной среде (например, в геле). В отличие от клеток, нуклеиновые кислоты размножаются не на поверхности, а внутри (в жидкой фазе) геля, содержащего подходящую полимеразу, нуклеозидтрифосфаты и – если необходимо – праймеры. Поэтому для размещения нанокolonий в одной плоскости размножение осуществляют в тонком слое геля.

В принципе, для выращивания нанокolonий можно использовать любую систему размножения нуклеиновых кислот. Чтобы нанокolonию можно было увидеть невооруженным глазом, она должна содержать до миллиарда копий исходной молекулы. Такое количество копий можно получить за разумное время только при использовании экспоненциальной системы размножения, позволяющей удваивать число матричных наномолекул в каждом цикле. Примерами экспоненциальных систем являются ПЦР (полимеразная цепная реакция) [12], 3SR (или SSSR, от Self-Sustained Sequence Replication, самоподдерживаемая репликация нуклеотидных последовательностей [13]), NASBA (от Nucleic Acid Sequence-Based Amplification [14]), SDA (от Strand Displacement Amplification, амплификация с вытеснением цепи) [15], LCR (от Ligase Chain Reaction, лигазная цепная реакция) [16, 17], RCA (от Rolling Circle Amplification, размножение по принципу катящегося кольца) [18].

Первые нанокolonии (колонии реплицирующихся РНК) были получены нами в январе 1989 г. с использованием Q $\beta$ -репликазы

(РНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага Q $\beta$ ) – уникального фермента, способного с рекордной скоростью размножить РНК *in vitro*, производя до 10<sup>10</sup> копий матричной РНК за 10 мин инкубации [19, 20]. Колонии РНК получали в слое агарозы, содержащем Q $\beta$ -репликазу, рибонуклеозидтрифосфаты (rNTP) и соответствующий буфер. После инкубации в течение 1 ч при 37 °С агарозу окрашивали бромистым этидием. Так как РНК образует с бромистым этидием интенсивно флуоресцирующий комплекс, на месте колоний РНК появлялись ярко светящиеся пятна, видимые при облучении ультрафиолетовым светом [21].

#### ПЕРВОЕ ПРИМЕНЕНИЕ НАНОКОЛОНИЙ

Не все РНК могут быть размножены Q $\beta$ -репликазой, а только геномная РНК фага Q $\beta$  и очень узкий класс относительно коротких (от нескольких десятков до нескольких сот нуклеотидов) матриц, называемых RQ РНК (от **R**eplicable by **Q** $\beta$  replicase) [19, 20]. В природе RQ РНК являются сателлитами фага Q $\beta$  [1]. Вероятность, что случайно выбранная РНК длиной 50–70 нт окажется RQ РНК, составляет  $\approx 10^{-12}$  [22].

В 1975 г. М. Эйген и сотрудники опубликовали сенсационное сообщение о том, что RQ РНК могут возникать «спонтанно» (в отсутствие добавленной матрицы) в инкубационной смеси, содержащей высокоочищенную Q $\beta$ -репликазу и все четыре rNTP [23]. Этот эксперимент послужил основанием для выдвижения концепции самозарождения RQ РНК, то есть их синтеза «*de novo*» путем беспорядочной конденсации нуклеотидов и последующей эволюции полирибонуклеотидов, способных к репликации, в эффективно размножающиеся молекулы [24, 25]. Авторы концепции рассматривали спонтанный синтез RQ РНК Q $\beta$ -репликазой как «основополагающую» экспериментальную модель для исследования возникновения генетической информации путем эволюции на молекулярном уровне [26]. Эта концепция доминировала до тех пор, пока с помощью нанокolonий мы не выяснили истинный источник реплицирующихся РНК.

Мы обратили внимание на то, что набор продуктов спонтанного синтеза зависит от того, в каком помещении проводится эксперимент. Это навело на мысль, что синтез может вызываться молекулами RQ РНК, попадающими в реакционную смесь из воздуха. Чтобы проверить эту возможность, Q $\beta$ -репликационную реакцию проводили, как и раньше, в агарозе, залитой в чашки Петри. Однако, чтобы следить за попаданием молекул РНК из воздуха, использовали два слоя ага-

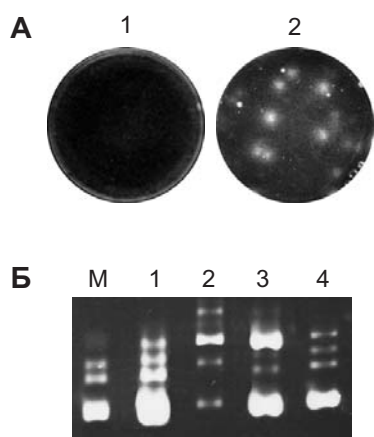


Рис. 1. Репликация RQ РНК в иммобилизованной среде (А) и в жидкости (Б).

А. Потомство каждой молекулы, размножаемой в иммобилизованной среде (агарозе), формирует отдельную колонию и потому не конкурирует с потомством других молекул.

Агарозные гели, содержащие полный набор реакционных компонентов, окрашены бромистым этидием либо до (1), либо после (2) инкубации в течение 1 часа при 25°C.

Б. Конкуренция RQ РНК, наблюдаемая при их размножении в жидкости, приводит к невоспроизводимости продуктов синтеза.

1, 2, 3, 4 – RQ РНК, синтезированные Q $\beta$ -репликазой в четырех разных пробирках при использовании одного и того же препарата RQ РНК (М) в качестве матрицы. Представлена электрофореграмма продуктов синтеза, гель окрашен бромистым этидием.

розы. Нижний слой содержал гНТФ, а верхний, заливаемый после застывания нижнего, – Q $\beta$ -репликазу (рис. 1А). Благодаря разделению гНТФ и полимеразы, размножение РНК могло происходить только после заливки ферментного слоя, на границе между слоями. Перед этим чашки с субстратным слоем выдерживали на столе в течение 1 ч, причем одна чашка была закрыта, а другая – открыта. После заливки верхнего ферментного слоя чашки инкубировали на льду до застывания агарозы, а затем в течение 1 ч при 25°C. Окрашивание агарозы бромистым этидием показало, что колоний РНК образуется больше в чашке, которая была открытой. Меньше всего колоний выросло в случае, если все процедуры проводили в помещении, где до этого с RQ РНК не работали [1, 27]. Эти эксперименты продемонстрировали, что молекулы RQ РНК присутствуют в лабораторном воздухе и могут заражать реакционную смесь, создавая впечатление спонтанного синтеза. Таким образом, отпала необходимость в привлечении концепции синтеза «*de novo*»; получил рациональное объяснение ряд «мистических» свойств спонтанного синтеза, таких, например, как почти полная идентичность RQ РНК, возникших в разных «спонтанных» реакциях; наконец, выстояла центральная догма молекулярной биологии [28], так как больше не надо было постулировать «создание генетической информации белковым ферментом [29]».

## ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА НАНОКОЛОНИЙ

Колонии RQ РНК, вырастающие в агарозе, весьма диффузны. Эту проблему удалось преодолеть путем замены субстратного слоя агарозы на смоченный раствором гНТР нейлоновый мембранный фильтр, который накладывали на агарозу, содержащую Q $\beta$ -репликазу [8]. Нейлоновая мембрана обратимо связывает нуклеиновые кислоты и, тем самым, препятствует их диффузии. Кроме того, поскольку в процессе размножения часть молекул РНК связывается с мембраной, ее можно использовать для обнаружения нанокolonий по включению меченых субстратов или по гибридизации с мечеными зондами. В то же время, поскольку значительная часть РНК остается в агарозе, можно изготавливать реплики нанокolonий с использованием новых мембран.

При использовании [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-меченных гНТР колонии РНК можно зарегистрировать по включению метки в пределах первых 10 мин инкубации при комнатной температуре. Исходя из удельной радиоактивности субстратов, времени экспозиции рентгеновской пленки и размера RQ РНК, можно заключить, что в среднем в каждой колонии образуется около 0,02 пмоль RQ РНК, или  $10^{10}$  молекул. Поскольку почти каждая наноклония происходит из единственной молекулы, это означает, что за 10 мин осуществляется около 30 циклов репликации и, следовательно, время дупликации RQ РНК составляет около 20 сек. Таким образом, скорость размножения RQ РНК в агарозе не меньше, чем в жидких средах, где время дупликации на экспоненциальной фазе роста было оценено в 30 сек [30, 31].

Если на агарозу высевать известные количества реплицирующейся РНК, то число колоний РНК увеличивается над спонтанным уровнем, причем прирост пропорционален и близок к числу посеянных молекул [8]. Выход нанокolonий от числа посеянных молекул RQ РНК сравним с долей жизнеспособных (бляшкообразующих) частиц (10%) в препаратах Q $\beta$  фага дикого типа [32].

При посеве смеси, содержащей разные виды RQ РНК, и последующем анализе колоний путем гибридизации с соответствующими мечеными зондами, оказалось, что разные колонии содержат разные RQ РНК [8]. Таким образом, колонии РНК идентичны посеянным молекулам RQ РНК. Это указывало на то, что каждая колония представляет собой потомство единственной молекулы RQ РНК, то есть молекулярный клон.

### III. ИЗУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАЦИИ РНК

Следующим приложением нанокolonий стало изучение рекомбинаций РНК – редких событий, приводящих к возникновению новых молекул, состоящих из ковалентно соединенных фрагментов родительских РНК.

Впервые о рекомбинации РНК было заявлено в начале 1960-х годов Г.Херстом и Н.Лединко, которые изучали обмен генетическими маркерами между родственными штаммами РНК-содержащего вируса полиомиелита (полиовируса) [33, 34]. В 1980 г. в лаборатории В.И.Агола было показано, что рекомбинация у полиовируса приводит к образованию химерного полипротеина, то есть действительно связана с перестройкой первичной структуры геномной РНК вируса, а в 1982 г. в лаборатории А.Кинга образование рекомбинантной вирусной РНК было установлено прямым секвенированием [35–37]. Считалось, что рекомбинация РНК – прерогатива вирусов высших организмов: животных и растений, пока в нашей лаборатории не были выделены из бактериальных лизатов два вида рекомбинантных RQ РНК – RQ120 и RQ135 (число отражает длину нуклеотидной последовательности), состоящих из фрагментов известных последовательностей [38,39].

Однако, поскольку все исследованные рекомбинантные РНК возникли в живых клетках или в грубых клеточных лизатах, ни в одном случае не была исключена возможность обратной транскрипции и, следовательно, всегда существовала вероятность, что рекомбинация происходит не между молекулами РНК, но между их ДНК-копиями, а рекомбинантные РНК возникают в результате транскрипции рекомбинантных кДНК [9, 40, 41].

Ситуацию, которая сложилась к началу наших исследований рекомбинации РНК, можно охарактеризовать следующими образом. Рекомбинантные РНК были обнаружены практически у всех РНК-содержащих вирусов. Рекомбинантные РНК могли быть как гомологичны, так и не гомологичны родительским молекулам в области перекреста. При этом гомологичная рекомбинация считалась правилом («законной»), а негомологичная – исключением («незаконной») [42]. Единственно возможным и доказанным считался механизм смены матриц [43, 44]. Однако все доказательства как механизма, так и самой рекомбинации на уровне РНК, были косвенными. Поэтому существовала настоятельная потребность в чистой бесклеточной системе рекомбинации РНК [44].



## РЕКОМБИНАЦИЯ РНК В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ

*Прямая рекомбинация между молекулами РНК возможна*

Нанокolonии, получаемые с помощью Q $\beta$ -репликазы, позволили исследовать реакции между молекулами РНК в чистой системе, где отсутствуют ДНК, dNTP, обратные транскриптазы, ДНК-зависимые РНК-полимеразы и ферменты, ответственные за рекомбинацию ДНК, и, следовательно, исключена возможность образования рекомбинантных РНК через ДНК-интермедиаты. В качестве субстратов рекомбинации мы использовали взаимодополняющие 5'- и 3'-фрагменты минус-цепи RQ135 РНК [RQ135(-) РНК], снабженные чужеродными довесками (рис. 2А) [9]. Поскольку господствовало убеждение, что рекомбинантная РНК всегда образуется в результате смены матриц [43, 44], чужеродные довески специально сделали гомологичными, чтобы повысить вероятность такого события. Отдельные фрагменты RQ135 РНК не способны к репликации, но их объединение в ковалентно непрерывную молекулу с восстановлением правильной взаимной ориентации могло приводить к формированию рекомбинантной RQ РНК, способной размножаться Q $\beta$ -репликазой. Тем самым обеспечивалась позитивная селекция рекомбинантных молекул, подобно тому, как происходит селективное размножение жизнеспособных рекомбинантных вирусов.

Рекомбинантные молекулы детектировали путем выращивания колоний RQ РНК [8]: смесь фрагментов высевали на слой агарозы, содержащий Q $\beta$ -репликазу, который затем накрывали нейлоновой мембраной, смоченной раствором гNTP, инкубировали при 22°C в течение 60 мин, после чего мембрану гибридизовали с <sup>32</sup>P-меченным зондом. В качестве зонда использовали 5'-фрагмент RQ135(-)РНК или олигодезоксирибонуклеотид, гомологичный чужеродному довеску. Каждый из этих зондов способен гибридизоваться с (+)-цепью ожидаемого продукта рекомбинации, которая при экспоненциальном размножении синтезируется наряду с (-)-цепью. О возникновении рекомбинантов судили по образованию гибридизующихся с зондом колоний RQ РНК, число которых отражало частоту рекомбинаций.

Оказалось, что колонии РНК действительно образуются, причем тогда и только тогда, когда на агарозу высевали смесь 5'- и 3'-фрагментов, но не каждый из них по отдельности (рис. 2Б). Это стало первым доказательством того, что прямая рекомбинация между молекулами РНК возможна. Частота рекомбинации очень низка, но возрастает, если перед посевом фрагменты не просто проинкубировать, а отжечь; при этом фрагменты ассоциируют – вероятно, за счет Уотсон-Криковских взаимодействий между комплементарными участками [9].



Следует отметить, что без использования нанокolonий обнаружить и выделить рекомбинантные молекулы, а тем более исследовать механизм рекомбинации было практически невозможно из-за очень низкой частоты рекомбинации и конкуренции со стороны «спонтанного» синтеза. При размножении в жидкости даже природных RQ РНК, отобранных на высокую эффективность репликации, набор продуктов не воспроизводится: в разных пробирках доминируют разные виды молекул (рис. 1Б). С размножением же рекомбинантных РНК дело обстоит значительно хуже. Если рекомбинация и приведет к появлению реплицирующихся молекул, то большинство из них окажутся дефектными (если только рекомбинация не привела к точному восстановлению природной последовательности) и не смогут составить конкуренцию примесным природным RQ РНК. Напротив, при размножении в геле разные молекулы RQ РНК находятся в разных нанокolonиях и не мешают размножению друг друга (рис. 1А). Это позволяет размножить и подсчитать даже слабо реплицирующиеся молекулы на фоне эффективно реплицирующихся РНК.

*Механизм рекомбинации РНК может отличаться  
от смены матриц*

Экстрагированные из колоний рекомбинантные RQ РНК клонировали в виде кДНК в составе плазмидного вектора и секвенировали (рис. 3А). Все рекомбинанты содержали целый 5'-фрагмент, а также целый или укороченный с 5'-конца 3'-фрагмент. Несмотря на наличие гомологичных довесков, во всех случаях рекомбинация фрагментов произошла по негомологичным участкам, то есть все рекомбинанты оказались негомологичными.

В соответствии с гипотезой смены матриц, которая на тот момент была единственной обсуждаемой моделью рекомбинации РНК, сначала синтезируется комплементарная копия (или ее часть) первой матрицы (в нашем случае – 3'-фрагмента), которая затем служит праймером для копирования второй матрицы (5'-фрагмента). Существование такого механизма было доказано для РНК-зависимых ДНК-полимераз ретровирусов [45]. Действительно, в результате инкубации той же смеси РНК-фрагментов в присутствии обратной транскриптазы вируса миелобластома птиц (AMV) и ее субстратов (dNTP), образовывался гомологичный рекомбинант (рис. 3Г) [9]. Следовательно, фрагменты, использованные в наших экспериментах, способны служить субстратами для гомологичной рекомбинации, однако Q $\beta$ -репликаза эту возможность не использует. Более того, частота рекомбинации в присутствии Q $\beta$ -репликазы не изменялась, если

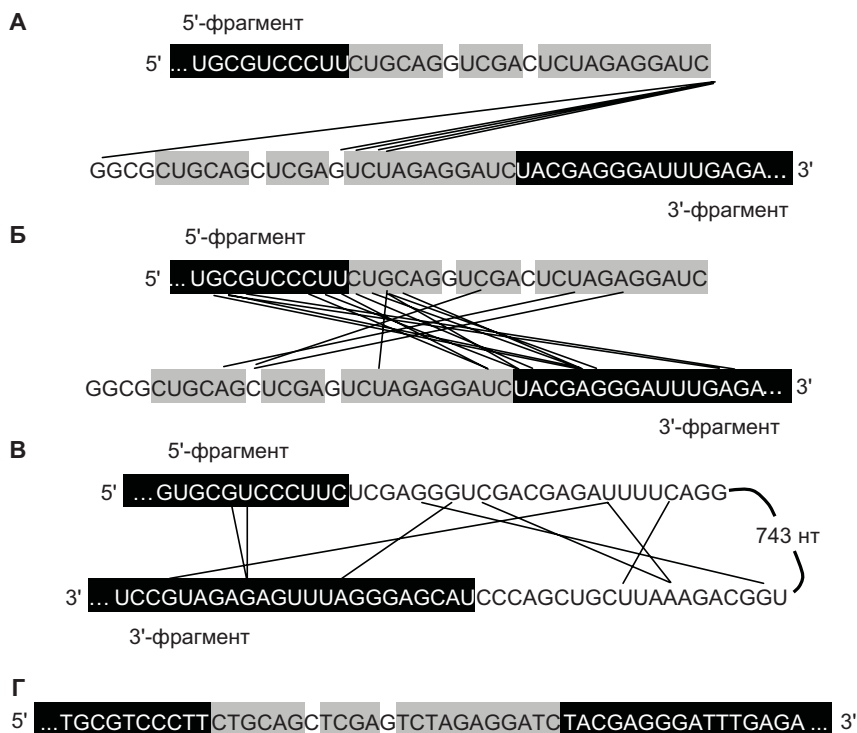


Рис. 3. Нуклеотидные последовательности продуктов рекомбинации.

Последовательность RQ135 РНК изображена частично (белые буквы на черном фоне). Чужеродные довески (А, Б, Г) или вставка (В) обозначены черными буквами: гомологичные участки – на сером фоне. Прямые линии соединяют нуклеотиды, оказавшиеся соседними в рекомбинантных молекулах.

А. Рекомбинация между 5'- и 3'-фрагментами RQ135(-) РНК, осуществляемая Q $\beta$ -репликазой.

Б. Спонтанная рекомбинация между 5'- и 3'-фрагментами RQ135(-) РНК.

В. Внутримолекулярная спонтанная рекомбинация, приводящая к делеции мРНК-вставки из RQ-мРНК, кодирующей хлорамфениколацетилтрансферазу.

Г. Гомологичный рекомбинант, образовавшийся при проведении обратной транскрипции смеси 5'- и 3'-фрагментов RQ135(-) РНК (продукт реакции – рекомбинантная кДНК).

дovesки 5'- и 3'-фрагментов меняли на негомологичные. Более того, все рекомбинанты имели такую же структуру, что и рекомбинанты, произошедшие из фрагментов с гомологичными довесками, то есть содержали целиком 5'-фрагмент и часть 3'-фрагмента [46].

Условия, при которых наблюдается рекомбинация (рН, температура, концентрации солей и  $Mg^{2+}$ ), полностью соответствуют внутриклеточным; поэтому можно ожидать, что подобная рекомбинация происходит и в клетке. Экстраполяция к концентрации Q $\beta$ -РНК в инфицированных клетках *E. coli* ( $10^{-5}$  М, как определено Ч. Вайсманом [47]) позволяет предположить, что в клетке аналогичный процесс должен происходить с частотой  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  на нуклеотид за 1 ч (что примерно равно продолжительности инфекционного цикла). Это согласуется с наблюдаемой частотой негомологичной рекомбинации у РНК-содержащих бактериофагов *in vivo* и является косвенным свидетельством того, что и в клетках рекомбинантные молекулы образуются путем реакций между молекулами РНК, без привлечения ДНК-интермедиатов [21].

#### *Роль 3'-концевых гидроксильных групп в рекомбинации РНК*

Учитывая, что 5'-фрагмент входит в рекомбинант целиком, мы предположили, что рекомбинанты могут образовываться в результате реакции трансэстерификации, при которой свободный гидроксил 3'-конца 5'-фрагмента атакует внутренний фосфат 3'-фрагмента.

Дальнейшие исследования показали, что наблюдаемая рекомбинация действительно требует наличия свободных гидроксильных групп на 3'-конце 5'-фрагмента: она полностью подавляется, если 5'-фрагмент окислен периодатом, что приводит к окислению 2',3'-дигликольной группировки на 3'-конце РНК с разрывом рибозного кольца и образованием диальдегида, или если его концевой 3'-гидроксил блокирован фосфатной группой. Удаление этой фосфатной группы с помощью щелочной фосфатазы восстанавливает рекомбинацию до исходного уровня. Аналогичная модификация 3'-конца 3'-фрагмента не оказывает существенного влияния на эффективность рекомбинации [9].

#### СПОНТАННАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ РНК

##### *Разделение стадий рекомбинации и размножения рекомбинантов*

Используя окисление 5'-фрагмента для подавления рекомбинации в присутствии Q $\beta$ -репликазы, удалось отделить собственно рекомбинацию (образование рекомбинантов) от размножения продуктов рекомбинации в виде нанокolonий. С этой целью смесь фрагментов РНК сначала инкубировали в выбранных условиях, а перед посевом на агарозу окисляли периодатом и расплавляли, предварительно связав все свободные ионы  $Mg^{2+}$  хелатором (ЭДТА) [48]. Расплавление помогло понизить уровень остаточной рекомбинации, обусловленной

неполным окислением РНК, благодаря разрушению нековалентных комплексов между фрагментами. Такая обработка практически полностью предотвращала дальнейшую рекомбинацию и в то же время не мешала росту колоний, если в образце присутствовал готовый рекомбинант. Следовательно, колонии РНК могли образоваться лишь при условии, что рекомбинация произошла до окисления и расплавления смеси фрагментов.

Такой подход, то есть запрещение рекомбинации в процессе роста колоний, дает возможность выяснить, может ли рекомбинация происходить в отсутствие Q $\beta$ -репликазы, а также позволяет исследовать роль репликазы и других ферментов в рекомбинации РНК.

#### *Межмолекулярная рекомбинация*

Оказалось, что фрагменты РНК могут рекомбинировать и в отсутствие Q $\beta$ -репликазы и гНТР, образуя реплицирующиеся молекулы. Единственным, но обязательным условием является наличие двухвалентных катионов – Mg<sup>2+</sup> (рис. 2В, слева). Однако частота такой «спонтанной» рекомбинации на несколько порядков ниже, чем в присутствии репликазы: обнаружить спонтанную рекомбинацию можно лишь после инкубации смеси фрагментов в присутствии Mg<sup>2+</sup> при 37°C в течение 16–64 ч. Отличается и механизм спонтанной рекомбинации: она не требует наличия свободных гидроксильных групп, так как одинаково эффективна при любой модификации 3'-конца 5'-фрагмента [48].

Секвенирование РНК, экстрагированных из колоний, показало, что рекомбинация происходит по внутренним участкам фрагментов, с частичной потерей последовательности как 3'-, так и 5'-фрагмента (рис. 3Б). Для рекомбинации не нужна гомология последовательностей, так как эффективность рекомбинации фрагментов с гомологичными и негомологичными довесками одинакова и все рекомбинанты негомологичны. Наконец, места рекомбинаций более или менее случайным образом распределены по нуклеотидной последовательности 5'- и 3'-фрагментов в пределах  $\pm 10$ –20 нуклеотидов от мест стыка последовательностей RQ135 РНК и чужеродных довесок [48]. (По-видимому, отсутствие рекомбинации за пределами этих участков является следствием отбора: Q $\beta$ -репликаза плохо размножает как рекомбинанты, у которых сильно повреждена исходная структура RQ135 РНК, так и рекомбинанты, несущие слишком длинные вставки.) Отсюда следует, что за наблюдаемую рекомбинацию не отвечают не только белки, но и какие-либо рибозимоподобные структуры. Иными словами, способность к рекомбинациям является неотъемлемым свойством самих полирибонуклеотидов.

### Внутримолекулярная рекомбинация

Аналогичные эксперименты уже не с фрагментами, а с длинными производными RQ РНК (650–930 нуклеотидов), внутрь которых были встроены последовательности различных мРНК, показали, что спонтанная рекомбинация может происходить и внутримолекулярно. Такие RQ мРНК не способны размножаться Q $\beta$ -репликазой [49], но в процессе инкубации в присутствии Mg<sup>2+</sup> происходят рекомбинации «*in cis*», приводящие, как показало секвенирование, к делеции вставок с образованием реплицирующихся молекул, выявляемых с помощью нанокolonий (рис. 2В, рис. 3В).

Вероятно, спонтанная рекомбинация происходит по механизму, включающему негидролитический разрыв сахарофосфатного остова РНК с образованием концов, несущих 2',3'-циклофосфат и 5'-гидроксил, с последующим обращением реакции с участием концов разных молекул (кросс-лигированием). Другой возможный механизм – межмолекулярная атака межнуклеотидного фосфата 2'-гидроксилом, приводящая к образованию лариата (разветвленной молекулы). Если репликаза умеет копировать такие структуры, то прочитывание ею лариата может привести к образованию линейной рекомбинантной РНК. Поскольку оба этих механизма требуют наличия 2'-гидроксильных групп, спонтанная рекомбинация является, по всей видимости, свойством, присущим исключительно РНК, и не должна происходить между молекулами ДНК [40].

### Свойства спонтанной рекомбинации

Использование нанокolonий позволило качественно и количественно охарактеризовать свойства спонтанной рекомбинации РНК [48]. Оказалось, что число рекомбинантных молекул нарастает линейно: к 64 часам инкубации их образуется в  $4.0 \pm 1.8$  раз больше, чем к 16 часам ( $n = 10$ ). Спонтанная рекомбинация РНК является реакцией псевдопервого порядка, то есть не зависит от концентрации рекомбинирующих фрагментов в исследованном диапазоне концентраций (5–500 нМ). Причиной как линейности кинетики, так и независимости рекомбинации от концентрации фрагментов является то, что скорость нековалентной ассоциации фрагментов РНК в условиях реакции существенно выше, чем скорость собственно химического процесса. Скорость рекомбинации увеличивается в  $\approx 3$  раза при повышении температуры на 10°C. Такое значение коэффициента Вант-Гоффа характерно для некатализируемых (неэнзиматических) химических реакций. Константа скорости реакции составит  $\approx 10^{-9}$  ч<sup>-1</sup> на 1 фосфодиэфирную связь при 37°C.

*Возможная биологическая роль спонтанной рекомбинации РНК*

Так как для спонтанной рекомбинации не требуется ничего, кроме самой РНК и  $Mg^{2+}$ , она должна повсеместно и постоянно происходить в природе. Хотя в «чистой» (все компоненты которой известны; в отличие от, например, лизатов, состав которых не возможно контролировать) бесклеточной системе скорость спонтанной рекомбинации значительно ниже, чем скорость негомологичной рекомбинации у вирусов, она достаточно высока, чтобы играть определенную эволюционную роль как в пребиотическом «мире РНК», так и в настоящее время. На первый взгляд, скорость спонтанной рекомбинации чрезвычайно мала. Без использования нанокolonий продукты этой реакции практически невозможно зарегистрировать, особенно на фоне огромного избытка непрорекомбинировавших фрагментов. Тем не менее спонтанные перестройки молекул РНК могут играть важную роль в эволюции как РНК-, так и ДНК-геномов. Даже не будучи промотированной клеточными РНК-связывающими белками, спонтанная рекомбинация должна приводить к появлению новой рекомбинантной РНК в одной эукариотической клетке каждую минуту. Это означает, что, например, в течение жизни в организме человека должно произойти до  $10^{20}$  таких событий.

Весьма вероятно, что ферменты, кодируемые мобильными элементами геномов [50, 51], могут копировать рекомбинантные РНК и встраивать их кДНК-копии в хромосому. Это предположение поддерживается тем, что в геномах млекопитающих были обнаружены псевдогены, представляющие собой химеры ДНК-копий клеточных РНК [52]. Интеграция в геном даже очень небольшой доли образовавшихся рекомбинантных последовательностей может привести к его значительному изменению. В этом процессе могут участвовать как ферментный аппарат ретротранспозонов [52], так и клеточные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы, в той или иной степени способные использовать РНК в качестве матрицы [53].

С учетом перечисленных возможностей, саморекомбинацию следует рассматривать как важный фактор, влияющий на изменчивость генома и вероятность онкогенной трансформации [54]. Необходимо также иметь в виду, что некоторые клеточные белки, особенно РНК-связывающие, могли бы неспецифически стимулировать самопроизвольную рекомбинацию РНК, как они стимулируют действие ряда рибозимов [55, 56].

Кроме того, спонтанная рекомбинация РНК могла играть важную роль в формировании и развитии мира РНК [21, 54, 57–59]. Добавим также, что способность к саморекомбинации является дополнительным



аргументом в пользу идеи первичности РНК по отношению к ДНК, высказанной впервые в 1957 г. А.Н.Белозерским [см. 58].

#### *Разнообразие механизмов нерепликативной рекомбинации РНК*

Спонтанная рекомбинация является нерепликативной, так как не требует синтеза (репликации) РНК и происходит в отсутствие репликазы. После опубликования нами первых результатов по рекомбинации между фрагментами RQ РНК *in vitro* [9, 48] (рис. 2), аналогичные эксперименты с фрагментами вирусных РНК и их различных модификаций были проведены *in vivo*. С этой целью фрагменты РНК, полученные с помощью транскрипции *in vitro*, вводили в клетки путем трансфекции. С использованием фрагментов генома полиовируса в лаборатории В.И. Агола и вируса диареи крупного рогатого скота в лаборатории П. Бехера было показано, что и в клетках рекомбинация РНК может происходить нерепликативно (в отсутствие активной репликазы) [60–62]. Секвенирование образовавшихся жизнеспособных вирусов выявило как негомологичные, так и гомологичные рекомбинанты. Относительно высокое содержание гомологичных рекомбинантов в этом случае (по сравнению с экспериментами *in vitro*), вероятно, является результатом отбора вследствие их большей жизнеспособности.

Частота нерепликативной рекомбинации в клетках оказалась на порядок выше, чем частота спонтанной рекомбинации, катализируемой ионами  $Mg^{2+}$  (41), что указывает на возможное участие клеточных ферментов. Действительно, практически во всех видах клеток присутствуют гидролитические ферменты, расщепляющие РНК с образованием 5'-гидроксила и 2',3'-циклофосфата, а также РНК-лигазы, сшивающие фрагменты с такими группами на концах [63]. Более того, один и тот же фермент может и фрагментировать РНК, и лигировать фрагменты, как это показано для рибонуклеазы T1 [64]. Необходимый для лигирования 2',3'-циклофосфат может быть образован из 3'-концевой фосфатной группы с помощью циклазы [63]. Весьма вероятно существование и других механизмов рекомбинации РНК, если учесть, что в клетке существует много ферментов, способных неспецифически расщеплять и лигировать РНК [65].

#### МЕХАНИЗМЫ РЕПЛИКАТИВНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ

Экспериментальный подход, с помощью которого были продемонстрированы спонтанные рекомбинации (то есть, разделение стадий образования и размножения рекомбинантов), был использован и для изучения влияния на рекомбинацию вирусных РНК-зависимых

РНК-полимераз [66]. В этом случае перед выращиванием наноклоновой инкубационную смесь не только окисляли, но и подвергали фенольной экстракции для удаления белков.

*Рекомбинация в присутствии Q $\beta$ -репликазы  
является репликативной*

Эксперименты по инкубации смеси 5'- и 3'-фрагментов с добавлением компонентов репликационной смеси в разных сочетаниях показали, что существенно увеличить скорость рекомбинации по сравнению со спонтанным уровнем удается только при добавлении всех компонентов системы репликации, то есть Q $\beta$ -репликазы, Mg<sup>2+</sup> и всех четырех rNTP (ATP, CTP, GTP и UTP). При этом изменяется механизм рекомбинации: она подавляется окислением 5'-фрагмента [66]. Отсюда следовало, что рекомбинация РНК, обнаруженная нами в первой работе [9], осуществлялась самой Q $\beta$ -репликазой и что, по-видимому, для рекомбинации необходим синтез РНК.

В экспериментах с использованием кордицепинтрифосфата (3'-дезоксид-АТФ, терминатора синтеза РНК), было установлено, что для рекомбинации необходим не просто синтез РНК, а синтез довольно протяженных участков. Даже когда 3'-дезоксид-АТФ включался в растущую цепь наряду с АТФ в пропорции 1 : 5, рекомбинация оказывалась существенно подавлена [66]. Иными словами, рекомбинация, осуществляемая Q $\beta$ -репликазой, является репликативной.

*Разнообразие механизмов репликативной рекомбинации РНК*

Классическим объектом наблюдения рекомбинации РНК *in vivo* является полиовирус. Для объяснения гомологичной рекомбинации именно у этого вируса в 1974 г. был впервые постулирован П.Купером механизм смены матриц вирусной репликазой (РНК-зависимой РНК-полимеразой) [67]. С тех пор гипотеза смены матриц применялась для объяснения всех случаев рекомбинации РНК, хотя, в отличие от смены матриц при обратной транскрипции, не была доказана экспериментально. Более того, понятия «смена матриц» и «репликативная рекомбинация» использовали как синонимы.

После выхода нашей работы по рекомбинации РНК *in vitro* в присутствии Q $\beta$ -репликазы, поставившей механизм смены матриц под сомнение, Р.Перец-Берков и сотрудники провели эксперимент *in vitro*, в котором клетки трансфецировали плазмидой, кодирующей полно-размерный геном полиовируса. Транскрипция плазмиды давала РНК, направляющую синтез активной репликазы, но не способную к реп-

ликации из-за двух точечных мутаций в 5'-нетранслируемой области [68]. При совместной трансфекции с фрагментом полиовирусной РНК, несущим интактную 5'-нетранслируемую область, благодаря рекомбинации образовывался инфекционный вирус. В то же время, рекомбинация не происходила, если фрагмент РНК, несущий 5'-нетранслируемую область, нес на 3'-конце кордицепин (3'-деоксиаденозин) и, следовательно, не имел свободного 3'-гидроксила. Таким образом, как и в наших экспериментах *in vitro* [9], рекомбинация *in vivo* требовала наличия 3'-гидроксила на 5'-субстрате.

Поскольку все рекомбинанты были гомологичными и образовывались в присутствии активной репликазы, авторы предложили механизм «гибридизации и удлинения праймера», который по своей сути является составной частью механизма репликативной смены матриц. По мнению авторов, истинными субстратами рекомбинации являются РНК разной полярности (разных знаков); применительно к нашей экспериментальной схеме – 5'-фрагмент и комплементарная копия 3'-фрагмента. Эти фрагменты гибридизуются комплементарными участками, и далее один из фрагментов или они оба служат праймерами: удлиняются полимеразой, использующей другой фрагмент в качестве матрицы [68]. Естественно, при этом получается гомологичный рекомбинант. Частота такой рекомбинации должна зависеть от стабильности гибрида, а следовательно, от длины комплементарных участков праймера и матрицы.

Поскольку наши исследования показали, что рекомбинация РНК, осуществляемая Q $\beta$ -репликазой, не является гомологичной, хотя и является репликативной, важно было прямо сравнить влияние Q $\beta$ -репликазы и полиовирусной репликазы (белка 3D-pol) на рекомбинацию РНК в одинаковых условиях. Обим репликазам были предложены одни и те же субстраты рекомбинации и оптимальные реакционные условия, которые оказались похожими. Использовали также одну и ту же систему детекции рекомбинантов – Q $\beta$ -репликазную версию нанокolonий.

Для того, чтобы облегчить образование рекомбинантов по механизму «гибридизации и удлинения праймера», в качестве субстратов рекомбинации использовали пары фрагментов RQ135 РНК разной полярности, включающие 5'-фрагмент и комплемент 3'-фрагмента («3'-фрагмент») с довесками разной длины. Внутри каждой пары довески комплементарны (в соответствующих парах фрагментов одной полярности они гомологичны), но так как довески имеют разную длину, то и длины комплементарных участков различаются (рис. 4, слева).

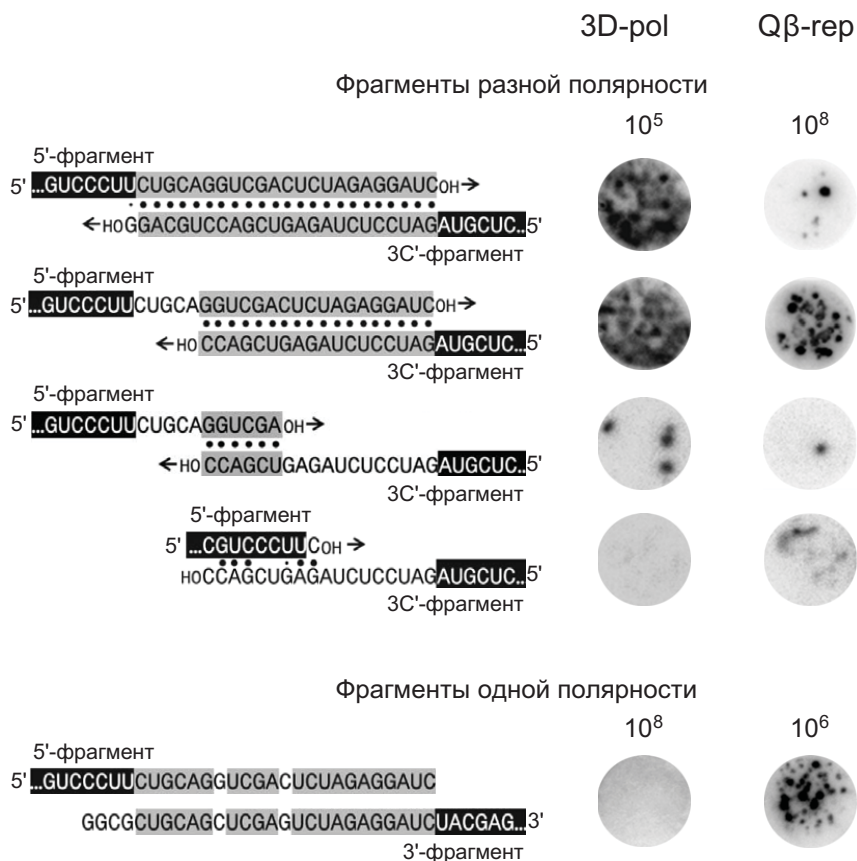


Рис. 4. Сравнение эффективностей рекомбинаций, осуществляемых полиовирусной полимеразой (3D-pol) и Q $\beta$ -репликазой (Q $\beta$ -rep).

Слева приведена нуклеотидная последовательность субстратов рекомбинации. Последовательность RQ135 РНК изображена частично (белые буквы на черном фоне). Чужеродные довески обозначены черными буквами: гомологичные участки (фрагменты одной полярности) или комплементарные участки (фрагменты разной полярности) – на сером фоне. Комплементарные пары обозначены точками. 3'С – комплемент 3'-фрагмента.

Справа – колонии РНК, выросшие в результате посева на гель, содержащий Q $\beta$ -репликазу, отожженной смеси фрагментов, либо без инкубаций и обработок (рекомбинация в присутствии Q $\beta$ -репликазы – Q $\beta$ -rep), либо инкубированной в течение 30 мин в условиях, оптимальных для полиовирусной полимеразы, и прошедшей обработку, запрещающую рекомбинацию во время роста колоний (рекомбинация в присутствии полиовирусной полимеразы – 3D-pol). Цифры указывают число молекул каждого из пары фрагментов в посеянной смеси.

Оказалось, что рекомбинация между фрагментами разной полярности, осуществляемая полиовирусной репликазой, очень эффективна и полностью согласуется с механизмом «гибридизации и удлинения праймера»: пары фрагментов с более длинными комплементарными участками рекомбинируют с большей частотой (рис. 4, колонка «3D-rol») и все рекомбинанты гомологичны [66]. В то же время рекомбинация между теми же фрагментами, осуществляемая Q $\beta$ -репликазой, на 3–4 порядка менее эффективна, нет корреляции между частотой рекомбинации и протяженностью комплементарных участков (рис. 4, колонка «Q $\beta$ -гер») и все рекомбинанты негомологичны [66].

Вопреки механизму «гибридизации и удлинения праймера» рекомбинация, осуществляемая Q $\beta$ -репликазой между фрагментами разной полярности, на 2–3 порядка менее эффективна, чем между фрагментами одной полярности (рис. 4). Для ее подавления недостаточно окисления 5'-фрагмента (как при реакции между фрагментами одной полярности), а необходимо окисление обоих фрагментов [66]. В отличие от Q $\beta$ -репликазы, полиовирусная РНК-полимераза не образует детектируемых количеств рекомбинантов при реакции между фрагментами одной полярности (см. рис. 4).

Таким образом, наноклонии помогли установить, что разные РНК-зависимые РНК-полимеразы используют разные механизмы для осуществления рекомбинации РНК: полиовирусная РНК-полимераза использует механизм «гибридизации и удлинения праймера», в то время как Q $\beta$ -репликаза его отвергает.

*Возможные механизмы рекомбинации РНК,  
осуществляемой Q $\beta$ -репликазой*

Рекомбинанты, полученные при рекомбинации между парами фрагментов, один из которых был окислен перйодатом, были секвенированы. Оказалось, что почти все рекомбинанты содержат оба фрагмента целиком с дополнительными вставками различной длины между фрагментами. Последовательности вставок зависели от того, какой фрагмент был окислен, и оказались частично комплементарны участкам чужеродных довесков. На основании этих наблюдений и учитывая, что Q $\beta$ -репликаза может наращивать РНК с 3'-конца, образуя шпильки [69, 70], мы предположили, что вставки образуются путем удлинения 3'-конца фрагмента и частичного копирования этого же фрагмента. Далее, возможны два пути развития событий: либо 3'-гидроксил удлиненного 3'С-фрагмента атакует межнуклеотидный 5'-фосфат на копии 5'-фрагмента (реакция трансэстерификации), либо 3'С-фрагмент удлинится дальше, используя 5'-фрагмент в качестве

матрицы. Иными словами, второй механизм предусматривает удлинение праймера, не гибризованного с матрицей. В свете ряда аргументов, первый механизм выглядит предпочтительнее [66].

Пока непонятно, зачем нужен синтез РНК при рекомбинации фрагментов одной полярности, когда оба субстрата готовы к рекомбинации с самого начала. Одна из возможностей состоит в том, что для осуществления реакции трансэстерификации Q $\beta$ -репликаза должна быть в активной конформации, приобретение которой происходит только в процессе синтеза. В этой связи следует отметить, что предполагаемая реакция трансэстерификации, заключающаяся в атаке межнуклеотидного фосфата одной РНК 3'-концевым гидроксиллом другой РНК, химически аналогична атаке  $\alpha$ -фосфата присоединяемого нуклеотида 3'-гидроксиллом растущей цепи, то есть аналогична реакции, которая является основной функцией всех полимераз [53].

#### ПРИМЕНЕНИЕ НАНОКОЛОНИЙ В ХИМИИ ОДИНОЧНЫХ МОЛЕКУЛ

С помощью чистой бесклеточной системы рекомбинации РНК, созданной на основе нанокolonий, удалось получить следующие основные результаты. Доказано, что рекомбинация происходит на уровне РНК, без участия ДНК-интермедиатов. Рекомбинация РНК значительно богаче в плане молекулярных механизмов, чем представлялось ранее. Она может быть как репликативной, так и нерепликативной. РНК способна к саморекомбинации в физиологических условиях с биологически значимой скоростью, без участия белков и рибозимов. Разные полимеразы осуществляют рекомбинацию РНК по разным механизмам. Вопреки предыдущим представлениям, рекомбинация РНК может происходить без смены матриц.

Проведенные эксперименты продемонстрировали, что с помощью нанокolonий можно изучать химические реакции между одиночными молекулами РНК. В принципе, нанокolonии можно использовать для исследования и иных редких химических реакций или редких реакционных интермедиатов. Для этого необходимо лишь, чтобы продукты или интермедиаты реакции обладали достаточно сложной поверхностью, чтобы образовать минимум две высокоаффинные области связывания, как обсуждается в разделе «Детекция молекул нуклеиновой природы».

#### IV. РАЗВИТИЕ МЕТОДА НАНОКОЛОНИЙ

##### ОГРАНИЧЕНИЯ Q $\beta$ -РЕПЛИКАЗНОЙ ВЕРСИИ НАНОКОЛОНИЙ

Демонстрация способности Q $\beta$ -репликазы размножать чужеродные последовательности в составе RQ РНК [31, 71] породила надежду, что колонии РНК можно будет использовать для диагностики, а также для клонирования чужеродного генетического материала, например, мРНК, внедряя его внутрь природной реплицирующейся молекулы.

На этом основаны схемы диагностики с использованием Q $\beta$ -репликазы, предложенные в лаборатории Ф.Крамера. В первоначальном варианте [72] в RQ РНК внедряли нуклеотидную последовательность, комплементарную участку детектируемой ДНК или РНК (мишени), и такую искусственную рекомбинантную РНК смешивали с исследуемым образцом. Затем образец обрабатывали магнитными частицами с иммобилизованным на них олигонуклеотидным зондом, комплементарным другому участку мишени. Если образец содержал молекулы мишени, они «вылавливались» магнитными частицами и увлекали за собой рекомбинантную РНК, которая затем размножалась Q $\beta$ -репликазой. По кинетике синтеза РНК судили о наличии и количестве мишени в образце: чем больше молекул мишени содержал образец, тем раньше регистрировался синтез. Однако из-за неспецифической сорбции до 10 000 молекул рекомбинантных РНК вылавливались магнитными частицами даже в отсутствие мишени, что делало метод крайне нечувствительным.

В усовершенствованной схеме [73] вместо целой рекомбинантной РНК использовали ее взаимодополняющие фрагменты, снабженные в месте разрыва нуклеотидными последовательностями, комплементарными соседним участкам мишени, и образец дополнительно инкубировали с ДНК-лигазой фага T4 (которая может сшивать фрагменты РНК, гибридизованные «встык»). Таким образом, реплицирующаяся рекомбинантная РНК формировалась непосредственно в образце в зависимости от того, содержал ли образец мишень. По утверждению авторов, в этом случае чувствительность метода составляла  $\approx 40$  молекул мишени.

Мы пытались использовать колонии РНК для диагностики вирусных инфекций по описанной выше схеме. К сожалению, выяснилось, что применимость такого подхода весьма ограничена. Во-первых, чужеродные вставки, даже короткие, часто ингибируют репликацию природных матриц репликазы [20, 74] и, следовательно, такой подход не является универсальным. Во-вторых, рекомбинация РНК, особенно в присутствии репликазы (см. выше), приводит к появлению реплици-

рующихся молекул и, как результат, многочисленных нанокolonий, независимо от присутствия в образце детектируемой мишени.

Применение же данного подхода для клонирования мРНК оказалось полностью бесперспективным, так как RQ-мРНК неспособны к экспоненциальному размножению [49], а спонтанные делеции мРНК-вставок приводят к образованию эффективно размножающихся RQ РНК [48].

#### КОЛОНИИ ДНК

В отличие от Q $\beta$ -репликазы, ПЦР является более подходящей для диагностики и клонирования, т.к. позволяет размножить любую последовательность с помощью пары олигонуклеотидных праймеров. Однако ПЦР нельзя проводить в агарозном геле, так как она требует периодического нагревания среды до  $\approx 100^\circ\text{C}$ .

Мы разработали способ осуществления ПЦР в термоустойчивом полиакриламидном геле. Этот способ позволяет получать колонии ДНК [2–7, 75, 76]. В качестве исходных матриц могут служить как ДНК, так и РНК, которые следует сначала перевести в форму кДНК с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы). Гель приготавливают в подходящем контейнере, например, в лунке, сделанной в предметном стекле для микроскопии.

Первоначально гель полимеризовали в присутствии всех компонентов ПЦР, включая ДНК-полимеразу [2–7], и этот способ был воспроизведен в лаборатории Дж. Чёрча в Гарвардском университете (США) [10]. Однако оказалось, что лучшие результаты дает другой подход: сначала гель полимеризуют, затем вымачивают в воде для удаления всех растворимых веществ, автоклавируют и сушат, а непосредственно перед экспериментом пропитывают полной реакционной смесью, включающей dNTP, олигонуклеотидные праймеры, термостабильную ДНК-зависимую ДНК-полимеразу и исследуемый образец. В этом случае полностью сохраняется активность ДНК-полимеразы и уничтожаются молекулы ДНК, которые могли попасть в гель в процессе его приготовления. При впитывании реакционной среды гель полностью восстанавливает исходный объем и механические свойства. Объем геля, приготовленного в лунке диаметром 14 мм и глубиной 0,4 мм, составляет 65 мкл (то есть, расход реактивов почти такой же, как в стандартной ПЦР объемом 50 мкл).

Для осуществления ПЦР гель герметизируют и помещают в ДНК-амплификатор с плоским нагревательным элементом (такой ДНК-амплификатор обычно используют для ПЦР *in situ*). Далее проводят реакцию примерно в таком же температурном режиме, как при



стандартной ПЦР в пробирках, лишь увеличивая продолжительность стадии отжига на 10–20 с.

#### МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ НАНОКОЛОНИЙ

Выросшие в геле нанокolonии невидимы простым глазом, но их можно обнаружить разными способами. Например, по окончании амплификации гель можно окрасить интеркалирующими красителями, такими как бромистый этидий [1, 8] или SYBR Green I [10]. Однако при этом окрашиваются как специфические нанокolonии (продукты размножения анализируемой мишени), так и неспецифические, образованные «димерами» праймеров (продуктами удлинения праймеров в результате гибридизации между собой) или продуктами размножения посторонней ДНК – процесса, происходящего по причине ошибочной гибридизации праймеров с чужими матрицами.

Специфические нанокolonии можно выявить путем гибридизации с зондом, комплементарным внутреннему участку размноженной мишени, на мембранном фильтре после переноса путем промокания (блотинга) геля. В первых экспериментах для выявления нанокolonий мы использовали радиоактивно меченные зонды [8, 9, 48]. Недостатками таких зондов являются необходимость использования вредных для здоровья радиоактивных веществ ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$  или  $^{35}\text{S}$ ), которые к тому же имеют короткий период полураспада, и длительность процедуры получения радиоавтографа, часто более суток.

В другом известном способе, использующем мишень-специфические зонды, нанокolonии гибридизуют *in situ* (в геле, где они были выращены) с флуоресцентными зондами или с немечеными олигонуклеотидными зондами, которые затем метят путем концевого включения флуоресцентных нуклеотидов [77]. Благодаря применению флуоресцентных меток отпадает необходимость использования радиоактивных материалов и время получения изображения сокращается до нескольких минут. Однако осуществление гибридизации в геле существенно усложняет и удорожает процедуру, так как размноженные нуклеиновые кислоты необходимо ковалентно иммобилизовать на матриксе геля (для чего иммобилизуют один из используемых для размножения олигонуклеотидных праймеров). Более того, необходимо удалять из геля одну из комплементарных цепей размноженной мишени, для чего используют расшиваемый гель, после размножения осуществляют частичную расшивку с целью облегчения диффузии нуклеиновых кислот, а для ускорения удаления неиммобилизованных цепей используют электрофорез. Кроме того,

при гибридизации в геле мишени оказываются менее доступными зондам и удаление несвязанных зондов из геля происходит медленнее, чем при гибридизации на мембране.

*Обнаружение нанокolonий путем гибридизации  
с флуоресцентными зондами на мембране*

Гибридизация с флуоресцентными зондами на нейлоновых мембранах могла бы стать решением проблемы, однако из литературных данных следовало, что это вряд ли возможно из-за слишком низкого содержания нуклеиновых кислот в колонии и слишком высокого уровня фоновой флуоресценции мембран. По оценкам разных лабораторий, в одной колонии диаметром 0,2–0,5 мм, образующейся при осуществлении ПЦР в геле, содержится около  $10^8$  молекул ДНК [10, 75]. При блотинге на мембрану переносится около 10% [78], то есть  $10^7$  молекул или  $\approx 10$  аттомоль ДНК. Неоднократно утверждалось, что обнаружить такие количества иммобилизованных на нейлоновой мембране нуклеиновых кислот посредством гибридизации с флуоресцентными зондами невозможно из-за высокой собственной флуоресценции нейлона [79–83].

Тем не менее нам удалось разработать гибридизацию нанокolonий на мембране с флуоресцентными зондами, общая продолжительность которой (от фиксации колоний до получения результата сканирования) занимает менее 1 ч [84, 85].

Гибридизация нанокolonий с флуоресцентными зондами на мембране позволяет быстро обнаруживать одиночные молекулы и определять титр ДНК- и РНК-мишеней. Судя по тому, что число колоний совпадает, в пределах статистического разброса, с числом молекул ДНК, введенных в гель до начала ПЦР, можно заключить, что выявляются все колонии ДНК. Более того, мембрану можно гибридизовать со смесью флуоресцентных зондов и получать информацию отдельно о гибридизации каждого из зондов при условии, что спектральные характеристики меток различаются достаточно, чтобы обеспечить избирательную регистрацию флуоресценции каждого из них, как это наблюдается для флуорофоров Cy3 и Cy5. Смесью зондов, меченных этими флуорофорами, использовали для обнаружения разных частей химерной молекулы кДНК AML1-ETO, состоящей из частей генов AML1 и ETO (химерная мРНК AML1-ETO является маркером часто встречающегося лейкоза [86]): Cy5-меченный зонд специфичен к AML-части, а Cy3-меченный зонд специфичен к ETO-части последовательности AML1-ETO (рис. 5А, В). Гибридизация обоих зондов с одной и той же нанокolonией свидетельствует



о том, что данная наноклония образована химерными молекулами. Это дает возможность повысить специфичность диагностики путем отсекаания наноклоний, образованных нехимерными молекулами, содержащимися в нормальных лейкоцитах.

Гибридизацию одновременно с несколькими флуоресцентными зондами, различающимися как нуклеотидными последовательностями, так и флуорофорами, можно использовать и в других целях, например, для раздельного определения сразу нескольких мишеней либо для определения вариантов последовательности одной мишени, в частности, для определения так называемого однонуклеотидного полиморфизма (SNP).

#### *Обнаружение наноклоний в режиме «реального времени»*

Мы показали, что растущие наноклонии можно наблюдать в реальном времени [87, 88], применяя различные гомогенные системы детекции (то есть, позволяющие обнаружить ДНК без удаления несвязанного флуорофора), использующие интеркалирующие красители, гибридизационные зонды или различные комбинации таковых. Для наблюдения растущих колоний ДНК ПЦР проводили как обычно: в таком же полиакриламидном геле, приготовленном в лунках предметного стекла и закрытом покровным стеклом. Чтобы обеспечить регистрацию флуоресценции геля, покровное стекло заклеивали липкой фольгой с отверстием, вырезанным по размеру лунки. Использование гомогенных систем позволяет обнаруживать наноклонии без открывания геля и переноса колоний на мембрану и не требует осуществления специальной стадии гибридизации по завершении ПЦР.

Оказалось, что любой из ныне известных принципов гомогенной флуоресцентной детекции [89, 90] может быть использован для обнаружения наноклоний. Наивысшая чувствительность детекции получена при использовании пары рядом гибридизующихся зондов, на сближенных концах которых находятся флуорофоры флуоресцеин (FAM) и цианин-5 (Cy5), между которыми возможен FRET – флуоресцентный резонансный перенос энергии (рис. 5Б, Г). Увеличение длины размножаемого фрагмента приводит к более позднему появлению колоний, но они становятся мельче, что позволяет увеличить разрешение метода (рис. 5Г).

Наноклонии также можно выявить, используя «молекулярный бакен» (олигонуклеотидный зонд, имеющий структуру шпильки и несущий на тесно сближенных концах флуорофор и группу, которая гасит флуоресценцию флуорофора, когда зонд свободен, но

перестает гасить, когда зонд вытягивается в результате гибридизации с мишенью) или комбинацию интеркалирующего флуоресцентного красителя и специфического зонда, несущего флуоресцентную группу, максимум возбуждения которой совпадает с максимумом излучения красителя [87, 88].

Хотя детектируемые нанокolonии образуются и при обычной (симметричной) ПЦР, чувствительность детекции можно увеличить, используя режим асимметричной ПЦР, для осуществления которой концентрации праймеров подбирают так, чтобы синтезировалось больше тех цепей, которые комплементарны флуоресцентным зондам. При асимметричной ПЦР колонии флуоресцируют значительно ярче благодаря тому, что часть ДНК нанокolonий остается в однострочной форме и, следовательно, является более доступной для гибридизации с зондами [87, 88].

В приведенных примерах флуоресцентные изображения получены при фиксированной (комнатной) температуре по завершении стадии элонгации. Очевидно, что изображения можно регистрировать при разных температурах и на разных стадиях ПЦР-цикла. Поскольку температура гибридизации падает на 4–8°C при наличии даже одиночного нарушения комплементарности мишени и зонда, анализ кривой гибридизации (плавления) позволяет обнаруживать точечные мутации мишени, если они произошли в участке, с которым гибридизуется зонд [91]. Сдвиги в значениях температуры, при которой изображение колоний появляется или исчезает, могут быть использованы как инструмент SNP-анализа.

Для детекции нанокolonий, вероятно, можно адаптировать методы, использующие деградацию зонда для удаления флуорофора от его гасителя (принцип, примененный в зонде «TaqMan»), если флуоресцентную группу зонда иммобилизовать на матрикс геля, чтобы предотвратить ее диффузию в геле. В такой ситуации матрикс геля будет флуоресцировать после гидролиза зонда в месте, где была колония, даже после того, как продукты размножения диффундировали или оказались вымыты из геля; поэтому такой гель можно хранить и использовать как документальное свидетельство анализа [92].

## V. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Обнаружение реплицирующихся РНК в воздухе, доказавшее матричную природу «спонтанного» синтеза [1], стало, фактически, первым применением нанокolonий для диагностики. Эти эксперименты продемонстрировали, что в виде нанокolonий можно обнаруживать

«инфекционные» молекулы и определять их число. Осуществление ПЦР в наноклониях и разработка нерадиоактивных способов детекции наноклоний перевело применение наноклоний для диагностики в практическую плоскость.

#### ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ПРОЦЕДУРА

Помимо выращивания наноклоний и их детекции, диагностическая процедура включает целый ряд других операций, в том числе консервацию клинического материала, выделение нуклеиновых кислот и обратную транскрипцию (если анализируемой мишенью является РНК).

Нами были разработаны методы, обеспечивающие выделение нуклеиновых кислот с выходом около 100% из клинических образцов, в том числе, из нефракционированной цельной крови: метод выделения ДНК [75] и универсальный метод, обеспечивающий одновременное выделение и РНК, и ДНК [93]. Было также показано, что при хранении образцов цельной крови в виде лизатов, содержащих 4 М тиоцианат гуанидина, высокомолекулярные РНК и ДНК сохраняются в течение 3 суток при комнатной температуре и, по крайней мере, в течение 2 недель при +4°C и больше года при -20°C [94, 95]. Такой способ консервации обеспечивает хранение и транспортировку образцов при температуре окружающей среды и полностью совместим с процедурой последующего выделения нуклеиновых кислот.

В ходе оптимизации обратной транскрипции мы обнаружили, что нуклеиновые кислоты в больших концентрациях ингибируют обратную транскриптазную активность Tth ДНК-полимеразы, которую часто используют для обнаружения РНК [96], и показали, что при анализе образцов с низким титром РНК-мишеней предпочтительно для синтеза кДНК использовать обратную транскриптазу вируса мышиной лейкемии (М-MLV), лишенную активности РНКазы Н [93].

#### ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ НАНОКЛОНИЙ

##### *Чувствительность детекции ДНК и РНК*

Чтобы иметь возможность детектировать молекулы как ДНК, так и РНК, в первых экспериментах мы использовали универсальную реакционную смесь с ДНК-полимеразой *Thermus thermophilus* (Tth ДНК-полимеразой). В присутствии  $Mn^{2+}$  эта полимеразы способна использовать в качестве матрицы не только ДНК, но и РНК, синтезируя кДНК [96]. Перед ПЦР гель, пропитанный такой реакционной смесью, инкубировали в течение 30 мин при температуре  $\approx 60^\circ\text{C}$ , обеспечивающей обратную транскрипцию. В такой системе

чувствительность обнаружения молекул мишени составила 98% ( $\pm 21\%$ ) для HBV ДНК, 13% ( $\pm 3\%$ ) для HIV РНК и 15% ( $\pm 3\%$ ) для Q $\beta$ -РНК [75]. Стандартное отклонение в этом случае отражает ошибку последовательных разведений и статистику случайного распределения малого числа молекул между образцами, а не ошибку метода нанокolonий. Столь же эффективно молекулы ДНК обнаруживаются при размножении с помощью Taq-ДНК-полимеразы в присутствии Mg<sup>2+</sup>.

Таким образом, нанокolonии позволяют выявить около 100% молекул ДНК. Меньший процент выявления молекул РНК отражает выход стадии обратной транскрипции. Тем не менее число нанокolonий всегда пропорционально числу посеянных молекул РНК, а следовательно, и в этом случае метод позволяет определить точный титр мишени. В последующих экспериментах выход обратной транскрипции мы повысили до 50%, используя обратную транскриптазу M-MLV [93], что позволило выявлять каждую вторую молекулу РНК.

*Отсутствие конкуренции  
между одновременно размножаемыми мишенями*

В клинических исследованиях часто используют одновременное обнаружение сразу нескольких мишеней (то есть, проводят «мультиплексную» ПЦР). Чтобы определить, в какой мере нанокolonии позволяют избежать конкуренции между размножаемыми молекулами, был проведен эксперимент, в котором 300 молекул HIV-1 РНК размножали одновременно с HBV ДНК, начальное количество которой изменяли от 0 до миллиарда молекул (рис. 6А) [75]. После реакции мембрану сначала гибридизовали с зондом, специфичным к размножаемому фрагменту генома HIV-1. Затем этот зонд отмывали и ту же мембрану гибридизовали с зондом, специфичным к размножаемому фрагменту HBV ДНК. Из рисунка видно, число и размер колоний одной мишени (HIV-1) не зависят от того, растет ли в том же геле в миллионы раз больше колоний другой мишени (HBV).

Хотя эти мишени используют разные праймеры, они используют одну и ту же ДНК-полимеразу, количество которой меньше количества праймеров, что является фактором, ограничивающим размножение ДНК. Полное отсутствие конкуренции между мишенями показывает, что полиакриламидный гель имеет очень высокую разрешающую способность. В терминах «цифровой ПЦР» [97], используемый здесь гель диаметром 14 мм эквивалентен по разрешающей способности ПЦР-планшете с миллиардом лунок.

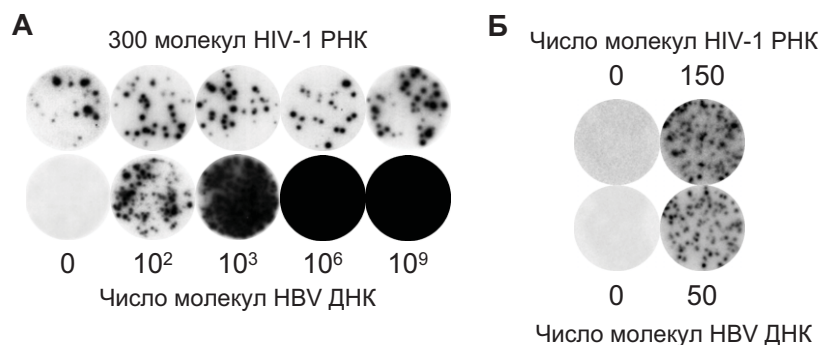


Рис. 6. Диагностический потенциал нанокolonий.

А. Отсутствие конкуренции между мишенями, размножаемыми в одном геле.

Показаны колонии ДНК, выросшие в результате проведения ОТ-ПЦР в полиакриламидном геле, содержащем, в том числе,  $MnCl_2$  и *Tth* ДНК-полимеразу (способную в присутствии ионов  $Mn^{2+}$  осуществлять и обратную транскрипцию, и ПЦР), 300 молекул фрагмента РНК вируса иммунодефицита человека (HIV-1), указанное число молекул фрагмента ДНК вируса гепатита В (HBV), а также HIV-1- и HBV-специфичные праймеры. По окончании ПЦР мембраны сначала гибридизовали с радиоактивно меченым HIV-1-специфичным зондом (верхний ряд), а затем – с HBV-специфичным зондом (нижний ряд).

Б. Одновременное обнаружение HIV-1 РНК и HBV ДНК в цельной крови человека.

Из образца донорской крови объемом 100 мкл, в который либо не добавляли мишень, либо добавили в момент лизиса 150 молекул HIV-1 РНК и 50 молекул HBV ДНК, выделили суммарные нуклеиновые кислоты и весь полученный препарат использовали для синтеза кДНК с помощью обратной транскриптазы M-MLV SuperScript™ II и последующей ПЦР в геле с помощью Taq ДНК-полимеразы. Нанокolonии выявляли посредством гибридизации мембраны с радиоактивно мечеными зондами, сначала HIV-1-специфичным (верхний ряд), а затем – HBV-специфичным (нижний ряд). В серии из 7 экспериментов в виде нанокolonий выявлено  $78 \pm 18$  молекул HIV-1 РНК и  $53 \pm 11$  молекул HBV ДНК.

#### *Отсутствие помех со стороны неспецифического синтеза*

Так как помимо искомой мишени, клинический образец обычно содержит большое количество других нуклеиновых кислот, при осуществлении ПЦР в жидкости велика вероятность помех со стороны неспецифического (не обусловленного мишенью) синтеза ДНК. Неспецифический синтез является следствием ограниченной специфичности гибридизации используемых для размножения мишени олигонуклеотидов, так как с некоторой вероятностью вместо мишени



олигонуклеотид гибридизуется с не вполне комплементарной последовательностью – другим олигонуклеотидом или посторонней ДНК. Хотя вероятность одиночного события такого рода мала, она почти всегда реализуется при анализе биологических образцов, так как концентрация олигонуклеотидов и посторонних нуклеиновых кислот в анализируемом образце гораздо выше, чем мишени. Так, при размножении в жидкости 1000 молекул HBV ДНК количество специфического продукта уменьшалось, а неспецифического – возрастало в присутствии 0,4 мкг нуклеиновых кислот (выделенных из 15 мкл цельной крови), что соответствует  $10^9$ -кратному избытку нуклеиновых кислот человека над мишенью размером 392 п.о. [98]. В то же время ни яркость, ни число специфических колоний ДНК не изменялись при размножении в геле 50 молекул той же мишени в присутствии 5 мкг нуклеиновых кислот (выделенных из 100 мкл крови) [75], что соответствует в 200 раз большему ( $2 \times 10^{11}$ -кратному) избытку нуклеиновых кислот человека над мишенью.

*Обнаружение одиночных молекул вирусных ДНК и РНК  
в цельной крови*

Имитирующие клиническую диагностику модельные эксперименты, в которых к 100 мкл неинфицированной крови добавляли HBV ДНК, а затем анализировали выделенную из крови суммарную ДНК, показали, что число HBV-специфичных нанокolonий равно (в пределах статистического разброса) числу добавленных в кровь молекул мишени [75]. Таким образом, нанокolonии позволяют снизить предел детекции ДНК-содержащих вирусов в крови до абсолютного минимума – 1 молекула, что в 500 раз превосходит современный уровень ПЦР-диагностики [98].

Аналогичный результат получен при одновременном обнаружении HIV-1 РНК и HBV ДНК в цельной крови человека (рис. 6Б). В этом случае в 100 мкл крови человека выявляется  $106 \pm 20\%$  молекул ДНК и  $50 \pm 12\%$  молекул РНК (такая чувствительность обнаружения РНК отражает выход стадии обратной транскрипции при использовании обратной транскриптазы М-MLV) [93]. Иными словами, нанокolonии позволяют выявить 1 молекулу ДНК и 2 молекулы РНК. Помимо того, что эти результаты демонстрируют недостижимую прежде чувствительность диагностики, они показывают, что разработанные нами способы выделения нуклеиновых кислот обеспечивают выход, близкий к 100%, и практически полное удаление из образца примесей, ингибирующих обратную транскрипцию и ПЦР.

*Определение маркерной РНК при онкологических заболеваниях*

Нанокolonии были применены нами для детекции мРНК альфа-фето-протеина [99], являющейся маркером гепатоклеточной карциномы и некоторых опухолей репродуктивной системы [100], а также для выявления химерного транскрипта AML1-ETO [84] – маркера лейкоза, ассоциированного с транслокацией t(8;21)(q22;q22) [86].

Разработанная диагностическая процедура была испытана путем определения абсолютного титра мРНК AML1-ETO в клинических образцах, взятых у больных данным типом лейкоза на разных стадиях заболевания [101]. Оказалось, что с помощью нанокolonий появление онкомаркера в крови и костном мозге пациентов, находящихся на стадии ремиссии, удастся обнаружить за несколько месяцев до всплеска его титра, что может быть использовано для своевременного проведения повторного цикла химиотерапии.

Результаты, полученные с использованием нанокolonий, были сопоставлены с результатами стандартной (жидкостной) ПЦР в реальном времени. При высоком титре РНК-мишени в крови или костном мозге больных наблюдалось удовлетворительное совпадение результатов, полученных с помощью этих двух методов. Однако на стадии ремиссии, когда титр РНК-мишени низкий, чувствительности стандартной ПЦР не всегда хватает для обнаружения минимальной остаточной болезни («Минимальной остаточной болезнью» называется состояние пациента во время ремиссии, при котором в его организме сохраняется небольшое число лейкоэмических клеток. Появление РНК-маркера или увеличение его количества во время гематологической ремиссии называется «молекулярным рецидивом» и является предвестником клинического рецидива).

Дополнительный резерв для увеличения специфичности заключается в способности нашего метода различать колонии ДНК, образованные химерными РНК и их нехимерными предшественниками, присутствующими в нормальных клетках. Химерные колонии должны гибридизоваться с каждым из зондов, специфичных к генам, составляющих химеру (см. рис. 5), тогда как нехимерные колонии могут гибридизоваться лишь с одним из них. Аналогичного эффекта можно добиться, используя зонды, гибридизующиеся с составными частями химерной матрицы в месте их стыка и несущие флуорофоры, способные к резонансному переносу энергии (FRET). Так как FRET возможен лишь тогда, когда флуорофоры находятся в непосредственной близости друг от друга [102], FRET-опосредованная флуоресценция нанокolonий доказывает, что они состоят из химерных последовательностей, способных к гибридизации с обоими зондами (см. рис. 5).

Таким образом, разработанная процедура обнаружения минимальной остаточной болезни при лейкозе путем выявления РНК-маркера с помощью наноклоний намного превосходит по чувствительности и надежности существующие способы, в том числе ПЦР в реальном времени.

#### ПРЕОДОЛЕНИЕ ПРОБЛЕМ ЖИДКОСТНОЙ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ

На сегодняшний день ПЦР – наиболее чувствительный инструмент диагностики. Однако при проведении этой реакции в жидкости по ряду причин могут быть получены неверные результаты, например, из-за конкуренции со стороны другой размножаемой мишени и/или со стороны неспецифического синтеза, из-за отклонения кинетики реакции от расчетных кривых, из-за возможности ложного появления мишени в результате рекомбинации [76, 98]. Основные проблемы жидкостной ПЦР – конкуренция между ампликонами и трудность количественного определения – по существу те же, с которыми в свое время столкнулся Р. Кох: как преодолеть конкуренцию между разными микроорганизмами и как определить их точный титр. Эти проблемы Роберт Кох успешно решил, изобретя твердую питательную среду.

Наноклонии позволяют преодолеть все проблемы жидкостной ПЦР (равно как и иных жидкостных систем экспоненциального размножения) и сделать молекулярную диагностику высоко чувствительной, количественной и надежной. Наблюдение растущих наноклоний в реальном времени позволяет осуществить весь перечень диагностических приложений, заявленный для ПЦР в реальном времени [103], с той разницей, что обеспечивается гораздо большая чувствительность и точность результатов.

Использование наноклоний по целому ряду параметров превосходит методы, основанные на размножении нуклеиновых кислот в растворах. Благодаря пространственному разделению наноклоний, значительно снижается конкуренция между мишенями при одновременном определении нескольких мишеней, а также существенно уменьшаются помехи со стороны неспецифического синтеза, вызванного ошибочной гибридизацией праймеров с посторонними ДНК и РНК. Наноклонии позволяют обнаруживать нуклеиновые кислоты с абсолютной чувствительностью: выявляют 1 молекулу ДНК-мишени даже на фоне огромного избытка посторонних нуклеиновых кислот. Подсчет числа наноклоний позволяет прямо определять число молекул мишени, превращая, таким образом, молекулярную диагностику в цифровой метод, что значительно повышает ее надежность. Эффект плато, невоспроизводимость условий реакции, неодинаковые скорости размножения разных

мишеней при мультиплексной ПЦР, влияющие на размер колоний, не изменяют их число. Для надежной диагностики достаточно просто зарегистрировать наноконию (получить ответ «да» или «нет») без измерения интенсивности сигнала.

Размножение в разных нанокониях исключает рекомбинацию между матрицами, которая часто наблюдается при проведении ПЦР в жидкости [104–107]. Тем самым удается избежать появления артефактных последовательностей и, таким образом, повысить надежность диагностики. Хотя есть способы уменьшения этой рекомбинации (сводящие условия денатурации, увеличение продолжительности элонгации [105, 108]), полностью устранить возможность рекомбинации при проведении ПЦР в жидкости нельзя, поскольку рекомбинация может происходить не только в результате отжига и последующего удлинения недостроенных цепочек [109] (аналогично механизму «гибридизации и удлинения праймера» при рекомбинации РНК), но и как следствие смены матриц на стадии элонгации [110].

Особенно важно учитывать возможность рекомбинации ДНК в процессе ПЦР в ситуациях, когда задачей является выявление различий между гомологичными последовательностями. Такая проблема возникает при анализе аллелей одного гена или соответствующих этим аллелям мРНК [109], а также когда анализируют частично деградированную ДНК (например, ДНК из археологических образцов) [106, 111]. К тому же амплификация частично фрагментированной ДНК приводит к вставкам одиночных нуклеотидов [106], что вызывает сдвиг рамки считывания в кодирующих последовательностях и делает невозможным реконструкцию аминокислотной последовательности или последующий синтез правильного белка при анализе экспрессии гена.

Метод наноконий лишь немного сложнее, чем стандартная ПЦР: единственное отличие заключается в том, что реакционную смесь вносят не в пробирку, а в лунку с пленкой сухого полиакриламидного геля. Важно и то, что ПЦР в нанокониях не дороже, чем стандартная ПЦР: объем геля в представленных экспериментах составлял всего 65 мкл; то есть, расход реактивов здесь почти такой же, как в стандартной ПЦР объемом 50 мкл. Фактически же технология наноконий дешевле, так как позволяет многократно сократить общее число проб, требуемых для проведения анализа.

#### ОТЛИЧИЯ ОТ ТВЕРДОФАЗНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

В серии статей утверждается, что в результате так называемой «твердофазной амплификации» (SPA – «solid phase amplification») можно получить колонии ДНК [112–114]. Эти «колонии» принци-

пиально отличаются от нанокolonий, так как при SPA компоненты ПЦР находятся не в иммобилизованной среде, а в жидкости, а иммобилизованы только праймеры – через ковалентную связь с поверхностью предметного стекла. Хотя в методе SPA оба праймера и, следовательно, продукты ПЦР ковалентно связаны со стеклянной поверхностью, значительная доля продуктов размножения мигрирует от родительской матрицы из-за нестабильности этой связи. Мигрирует и сама матрица. Несмотря на то, что стабильность связи удалось существенно увеличить по сравнению с исходным вариантом метода, «утечка» праймеров во время ПЦР все равно составляет до 60% [115]. Сами разработчики метода SPA отмечают, что нестабильность связи приводит к снижению выхода ПЦР и перемешиванию содержимого колоний (которые, таким образом, перестают быть молекулярными клонами) [115]. В результате метод лишается преимуществ перед жидкостной ПЦР. В частности, становится невозможным определить титр мишени, так как из-за миграции матриц и продуктов размножения число колоний неконтролируемо нарастает в процессе реакции.

## VI. КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ВНЕ КЛЕТКИ

Как отмечалось выше, каждая наноклония представляет собой молекулярный клон, то есть генетически однородное потомство единственной родительской молекулы. Недавно, с помощью ПЦР в наноклониях нами была реализована идея клонирования генов (точнее, белок-кодирующих последовательностей ДНК, окруженных всеми элементами, необходимыми для транскрипции и трансляции), их экспрессии в наноклониях, а также *in situ*-скрининга клонов по функции кодируемого белка [78, 116, 117]. Иными словами, удалось осуществить истинно молекулярное клонирование – в отличие от традиционного клонирования генов, которое, хотя его и называют «молекулярным клонированием», является, по существу, клонированием не молекул, а клеток или размножаемых в клетках вирусов.

В качестве моделей для клонирования и экспрессии в наноклониях мы использовали гены билюминесцентных белков. Преимуществом этих белков является то, что их легко детектировать по функциональной активности: по хемилюминесценции (например, обелин из гидроидного полипа *Obelia longissima* [118] и люциферазу светлячка *Luciola mingrelica* [119]) или по флуоресценции (например, GFP – зеленый флуоресцирующий белок из медузы *Aequorea victoria*) [120].

*Размножение генов в виде нанокolonий*

Если для детекции специфической последовательности, как, например, при диагностике различных заболеваний, достаточно размножить относительно короткий фрагмент, то для клонирования генов необходимо размножение длинных последовательностей. Логично было предположить (так оно и оказалось), что в менее плотной среде ПЦР и реакции экспрессии генов (транскрипция и трансляция) будут эффективнее. В то же время гель должен обладать достаточной плотностью, чтобы колонии оставались компактными. Оптимальным оказался 5-процентный акриламид при соотношении акриламида и сшивающего агента (метиленабисакриламид) равном 100 : 1 [78]. Использование в ПЦР смеси термостабильных ДНК-полимераз: из *Thermus aquaticus* (*Taq* ДНК-полимераза) и из гипертермофила *Pyrococcus woesei* (*Pwo* ДНК-полимераза) – также привело к заметному увеличению продукта в колониях. Проведение ПЦР при размножении генов в присутствии *Pwo* ДНК-полимеразы полезно еще и из-за наличия у этой полимеразы 3'→5'-корректирующей активности: размножение генов оказывается более точным, с меньшим числом ошибок [121].

В результате удалось получить нанокolonии, содержащие до  $10^8$  и более копий генов. При этом число колоний совпадает, в пределах статистического разброса, с числом посеянных молекул ДНК (рис. 7А), что дает возможность клонировать и тестировать до 100% элементов генетической библиотеки (против 0,0001–0,01% при клонировании в клетках [122]).

*Внеклеточное клонирование кДНК из биологического материала*

На примере РНК люциферазы *Luciola mingrelica* была продемонстрирована способность метода клонировать из природного биологического материала кДНК длиной до 2 тысяч п.о. При этом клоны удается выделить без предварительного размножения генетического материала из порции суммарной РНК, соответствующей единственной клетке, что практически невозможно при использовании традиционных способов клонирования.

Полученные клоны удалось экспрессировать *in situ*. Для осуществления транскрипции ПЦР-гель просто высушивали и пропитывали раствором, содержащим транскрипционный буфер, ДНК-зависимую РНК-полимеразу и гНТР. Инкубация геля в течение 2 ч при 37°C приводила к синтезу в колониях, по крайней мере, 10 копий РНК длиной до 1700 нт на каждую копию ДНК [78]. Этот вариант метода позволяет осуществлять клонирование и прямую селекцию молекул РНК, таких как рибозимы и аптамеры.

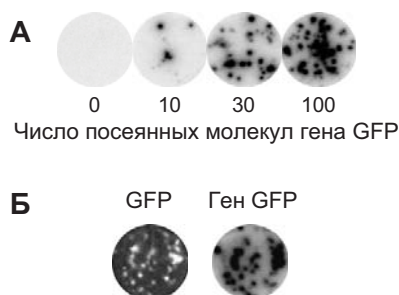


Рис. 7. Клонирование и экспрессия генов в нанокolonиях.

А. Размножение гена GFP (ДНК длиной 1570 п.о. включает последовательность, кодирующую белок, и элементы, необходимые для экспрессии гена) в виде нанокolonий.

Колонии ДНК, выросшие при проведении ПЦР в полиакриламидном геле, выявляли посредством гибридизации на мембране с радиоактивно меченым зондом.

Б. Экспрессия гена GFP в виде нанокolonий.

После проведения ПЦР гель последовательно промывали спиртово-солевым раствором и 50% спиртом с целью удаления компонентов ПЦР, высушивали, пропитывали компонентами бесклеточной системы транскрипции-трансляции и инкубировали при 25°C в течение 30 мин. «GFP» – колонии зеленого флуоресцентного белка. Флуоресценцию белка регистрировали непосредственно в геле с использованием синего лазера (488 нм) и зеленого эмиссионного фильтра (508 нм). «Ген GFP» – колонии ДНК с геном GFP в этом же геле. Показан радиоавтограф мембраны, гибридизованной с меченым зондом.

### Экспрессия генов в нанокolonиях

Для осуществления синтеза белка в нанокolonиях процедуру пришлось модифицировать, так как оказалось, что компоненты ПЦР (прежде всего, буфер с относительно высоким значением pH) ингибируют трансляцию. Проблему удалось преодолеть вымачиванием геля в спиртово-солевом растворе, впервые примененном нами для экстракции ингибиторов обратной транскрипции и ПЦР из спиртовых осадков при выделении нуклеиновых кислот из клинических образцов [75]. При такой обработке из геля вымывались все ингибиторы трансляции, но полностью сохранялись колонии ДНК. После этого гель высушивали и пропитывали смесью, содержащей все компоненты, необходимые для совмещенной транскрипции-трансляции.

Экспрессия гена зеленого флуоресцирующего белка (GFP) из *Aequorea victoria* в нанокolonиях привела к синтезу функционально активного (а, следовательно, правильно свернутого) полипептида (рис. 7Б, слева). Флуоресценцию синтезируемого в колониях GFP

можно наблюдать в реальном времени. Колонии становятся детектируемыми через 30 мин, а их флуоресценция достигает максимума через 2 часа после начала реакции совмещенной транскрипции-трансляции. Скорость накопления флуоресцирующего GFP определяется как скоростью синтеза полипептида, так и скоростью созревания белка, в том числе, формированием хромофора [123]. Из сопоставления скоростей этих процессов в жидкости и в геле следует, что иммобилизованная среда не ингибирует ни трансляцию, ни созревание белка [78].

Число флуоресцирующих пятен коррелирует с числом молекул гена GFP, введенных в гель перед ПЦР. Кроме того, расположение флуоресцирующих пятен практически совпадает с расположением GFP-специфических колоний ДНК, выявляемых в этом же геле посредством гибридизации с радиоактивно меченным зондом (рис. 7Б, справа). В среднем в колонии синтезируется около  $10^9$  молекул белка, что достаточно для его обнаружения *in situ*, в том числе, по связыванию с антителами или лигандами, а также по ферментативной активности.

#### ПРЕИМУЩЕСТВА КЛОНИРОВАНИЯ В НАНОКОЛОНИЯХ

Классическим и общепринятым методом клонирования генов является клонирование *in vivo*, включающее в себя встраивание гена в векторную молекулу, трансформацию бактериальных или эукариотических клеток полученной генетической конструкцией (например, плазмидой) и выращивание колоний трансформированных клеток (клонов) на твердой среде (например, на агаре в чашке Петри) [121]. Помимо исследуемого гена, такие клоны содержат компоненты самих клеток, что обуславливает необходимость выделения плазмидной ДНК. Кроме того, в процессе клонирования исследуемый ген неизбежно подвергается естественному отбору. И, наконец, одним из наиболее существенных ограничений является эффективность встраивания генов в вектор и собственно трансформации: только 0,0001%–0,01% исходного препарата ДНК (содержимого геной библиотеки) дает начало индивидуальным клонам [122].

Клонирование генов в наноклониях обладает рядом преимуществ по сравнению с клонированием *in vivo*. Во-первых, клонирование и экспрессия генов в наноклониях возможны в отсутствие естественного отбора и в присутствии неприродных нуклеотидов и аминокислот. Во-вторых, наноклонии позволяют осуществлять прямой скрининг генов по свойствам продуктов их экспрессии, так как нет клеточных стенок и мембран. В-третьих, условия анализа свойств



продукта экспрессии наноклоний могут отличаться от условий транскрипции-трансляции: состав реакционной среды может быть легко изменен путем пропитывания геля подходящим раствором. В-четвертых, наноклония представляет собой генетически чистую ДНК, которая может быть непосредственно использована для генетических манипуляций, минуя стадию выделения. Наконец, совмещая ген и продукт его экспрессии, наноклонии позволяют осуществлять молекулярный дисплей. В отличие от фагового и иных форм генетического дисплея, здесь для привязки белка к его гену не требуется модифицировать белок тэг-последовательностью или «сливать» его с другим белком, что может влиять на структуру и функцию искомого белка. Иными словами, клонирование в наноклониях может делать все, что и традиционное клонирование в живых клетках, и много больше.

Клонирование генов в наноклониях обладает рядом преимуществ и по сравнению с бесклеточным клонированием в жидкости [21]. Был предложен целый ряд способов клонирования молекул путем размножения ДНК в жидкости, с использованием которых можно, в принципе, получить индивидуальные клоны. Эти подходы основаны на истощающем разведении раствора матриц, так чтобы в реакцию размножения попадали единичные молекулы. В качестве реакционного компартмента могут выступать пробирка или ячейка планшета [97, 124], элемент микрочипа [125], микрошарик [126] или капля водно-масляной эмульсии [127, 128].

Хотя каждый из этих методов может привести к выделению клонов, клональная чистота полученных препаратов не гарантируется и должна быть установлена независимыми методами. Из распределения Пуассона следует, что если матрицу развести так, что в среднем на 1 реакционный компартмент (например, лунку) придется по 1 молекуле, то 36.8% лунок окажутся пустыми, 36.8% будут содержать одну молекулу, а в 26.4% лунок попадет по 2 и более молекул [21]. Приемлемая вероятность выделения чистого клона (99.5%) ожидается при средней заселенности лунок не более 0,01 (то есть, при разведении матрицы до 1 молекулы на 100 лунок).

В случае же наноклоний нет дискретных компартментов. Конечно, при посеве на гель более одной молекулы существует вероятность того, что колонии перекроются. При диаметре колонии  $\approx 0,5$  мм и диаметре геля 14 мм (рис. 7) вероятность того, что выделенная ДНК окажется не клоном, равна 0,02% при посеве двух молекул и 0,5% при посеве 25 молекул [21]. При этом надо иметь в виду, что, увеличивая плотность геля и длину размножаемого фрагмента, диаметр

нанокolonий можно существенно уменьшить – до 10 мкм и менее [10]. Это позволяет на геле диаметром 14 мм разрешить десятки тысяч клонов.

## VII. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОВ И ИХ ЭКСПРЕССИИ

### СЕКВЕНИРОВАНИЕ В НАНОКОЛОНИЯХ

#### *Секвенирование путем синтеза*

В 2003 г. Дж. Чёрч с соавторами продемонстрировали, что ДНК можно секвенировать прямо в нанокolonиях [129]. С этой целью они создали библиотеку коротких фрагментов ДНК, фланкированных праймер-связывающими участками, и размножили эти фрагменты с использованием ПЦР в нанокolonиях. Один из праймеров был ковалентно «пришит» к гелю, поэтому его удлинение приводило к иммобилизации на матриксе геля одной из цепочек синтезированных ДНК. После ПЦР ДНК денатурировали в формамиде и удаляли непришитую комплементарную цепочку с помощью электрофореза.

Секвенирование проводили одновременно во всех колониях по методу «секвенирования путем синтеза», разработанному ранее фирмой *Affimetrix* для обнаружения однонуклеотидных замен [130]. Иммобилизованную ДНК гибридизовали с праймером, комплементарным фланкирующему участку с известной последовательностью, затем праймер удлиняли при помощи ДНК-полимеразы флуоресцентно меченным нуклеотидом. Далее гель отмывали от невключенного нуклеотида и сканировали. Таким образом определяли, в какую колонию данный нуклеотид включился и, следовательно, какой нуклеотид находится в матрице напротив него. Для возможности наращивать цепочку («прочитывать» больше одного основания) использовали нуклеотиды со свободной 3'-гидроксильной группой. А для того, чтобы флуоресцентная метка из предыдущего цикла не мешала детекции нуклеотидов, введенных в последующих циклах, флуорофор пришивали к нуклеотиду расщепляемой связью: дисульфидной [131] или фотолабильной [132] – и после сканирования геля флуорофор удаляли обработкой меркаптоэтанолом или облучением ультрафиолетом. Затем цикл удлинения-сканирования-расщепления повторяли с другим флуоресцентно меченным нуклеотидом.

Теоретически, циклы могут быть повторены сколь угодно долго, до полного установления последовательности иммобилизованной ДНК, лежащей перед гибридизованным праймером, в каждой из колоний. Выход одного цикла составляет 99,8%, что позволяет прочитать до 150 нуклеотидов. На практике же процедура ограничивалась

10–14 циклами из-за отслаивания геля от стекла. Но, вероятно, это всего лишь техническая проблема, которая может быть решена разными способами. Например, можно проводить секвенирование на нейлоновой мембране после переноса на нее содержимого нанокolonий [84]. Так как на мембране можно иммобилизовать ДНК в одноцепочечном виде после ее денатурации (например, в щелочи), то отпадает необходимость в иммобилизации одного из праймеров на матриксе геля, а также в удалении из геля неиммобилизованных цепей ДНК с помощью электрофореза.

Другая проблема – гомонуклеотидные участки, прочитывание которых может приводить к удлинению праймера на несколько нуклеотидов за один цикл. Измерение интенсивности флуоресценции колоний не позволяет точно определить число одновременно включенных нуклеотидов. Одним из решений этой проблемы может быть использование флуоресцентных нуклеотидов с обратимо блокированным 3'-гидроксилем, действующим как терминатор элонгации [133]. В этом случае, независимо от длины гомонуклеотидного участка, в каждом цикле может быть добавлен только один нуклеотид.

Секвенирование нанокolonий как в геле, так и на мембране можно ускорить, удлиняя праймеры смесью дезоксинуклеотидов, где каждому виду основания соответствует свой цвет флуорофора (рис. 8). Такой метод уже разработан для секвенирования на ДНК-чипах [134] и нет никаких противопоказаний к применению его для секвенирования нанокolonий.

Альтернативным подходом может служить перенос материала нанокolonии в капилляр при помощи электрофореза и последующее секвенирование с использованием традиционного капиллярного электрофореза [135].

#### *Секвенирование путем лигирования олигонуклеотидов*

Вместо многократных последовательных удлинений гибризованного праймера прилегающая последовательность матрицы может быть определена путем лигирования праймера со всеми возможными флуоресцентно мечеными олигонуклеотидами, комплементарными этой последовательности. В недавней работе [136] осуществимость такого подхода была продемонстрирована на примере секвенирования фрагментов ДНК, размноженных с помощью метода RCA и иммобилизованных на микрогранулах, внедренных в слой полиакриламидного геля. Праймер лигировали с набором смесей флуоресцентно меченных олигонуклеотидов длиной 9 нт, вырожден-

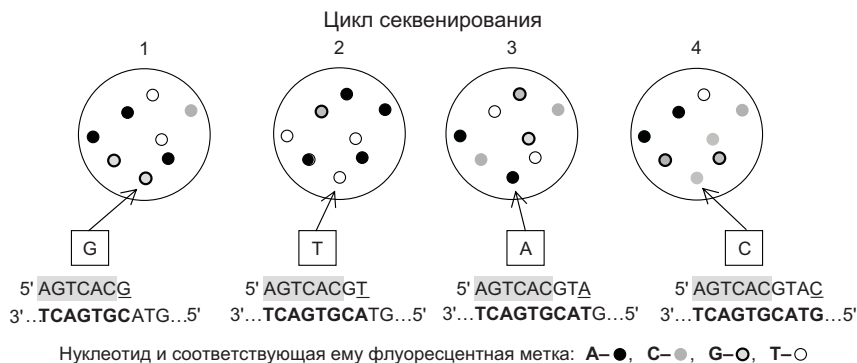


Рис. 8. Принцип секвенирования путем синтеза.

Показаны изображения геля с наноклониями после первых четырех циклов. Для удлинения праймера (буквы на сером фоне) используют смесь всех четырех видов гНТР, меченных флуорофорами разного цвета. Цвет колонии указывает, какой нуклеотид был включен ДНК-полимеразой в растущую цепь в данном цикле. На схеме под каждым изображением геля подчеркнут нуклеотид, включенный на данном цикле в отмеченную стрелкой колонию; прочитанная последовательность матрицы выделена жирным шрифтом.

ных в одном из 9 положений. В каждой смеси цвет флуорофора соответствовал одному из четырех возможных оснований в вырожденном положении.

Один цикл секвенирования состоял из гибридизации иммобилизованных на микрогранулах цепей ДНК с праймером и одной из 9 смесей меченых олигонуклеотидов, лигирования, отмывки невключенных меченых олигонуклеотидов, сканирования геля при четырех длинах волн и удаления продукта лигирования. Следующий цикл проводили со смесью меченых олигонуклеотидов, вырожденных в другом положении. Оказалось, что матрица может быть прочитана таким образом на расстоянии 6–7 нуклеотидов от места лигирования с праймером.

С помощью описанного метода был ре-секвенирован геном *E. coli*. Поскольку секвенированные фрагменты были получены путем расщепления генома *E. coli* случайным образом, эти фрагменты перекрывались, что позволило реконструировать полный геном. Было найдено несколько различий с последовательностью генома *E. coli*, находящейся в GeneBank.

Так как в одном геле могут быть различимы десятки тысяч наноклоний [10, 137], данный подход может потенциально существенно увеличить производительность и понизить стоимость секвенирования. Поскольку прочитываются относительно короткие после-

довательности, лучше всего секвенирование в нанокolonиях подходит для ре-секвенирования уже известных геномов с целью уточнения и нахождения индивидуальных различий.

#### АНАЛИЗ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА

Индивидуальные особенности геномов разных людей, как и любых других биологических видов, часто представляют собой однонуклеотидные замены (SNP). SNP-картирование важно для идентификации генов, связанных с генетическими заболеваниями, для детекции диагностических маркеров, для предсказания лекарственной устойчивости инфекционных возбудителей [130].

#### *Определение гаплотипа*

Недавние исследования показали, что во многих случаях SNP обладают *cis*-эффектом, то есть влияют на экспрессию гена или функцию кодируемого белка, только если определенная комбинация нескольких SNP присутствует в одной и той же молекуле ДНК [138]. Набор SNP в одной хромосоме называют гаплотипом. Как правило, SNP передаются по наследству большими гаплотипическими блоками, длиной более 100 тысяч п.о. (средний размер гена), и в популяции циркулирует ограниченное число вариантов каждого такого блока [139–141]. Было обнаружено, что структура гаплотипических блоков консервативна среди млекопитающих [142]. Определение гаплотипа имеет диагностическое и прогностическое значение, однако это технически сложная задача, прежде всего из-за трудностей разделения сестринских хромосом диплоидного генома. Первая гаплотипическая карта человека, с детальной SNP-структурой десяти областей длиной 500 тысяч п.о., была недавно составлена усилиями большого международного консорциума [143]. Стоимость этого проекта составила 100 миллионов долларов [144].

Дж. Чёрч с коллегами первыми продемонстрировали, что использование нанокolonий позволяет определить гаплотип легко и быстро, и без необходимости разделения сестринских хромосом [77]. Это возможно благодаря тому, что размножение в геле *cis*-элементов (двух и более участков одной молекулы ДНК, например, локусов одной и той же хромосомы) приводит к образованию смешанной нанокolonии. В то же время при амплификации участков разных молекул (например, разных хромосом) образуются отдельные нанокolonии. Принадлежность двух или более SNP одной колонии можно установить с помощью секвенирования путем синтеза или путем лигирования (см. выше), либо путем гибридизации колоний с олиго-

нуклеотидными зондами в условиях, когда одна мутация приводит к существенной дестабилизации гибрида.

Недавно Дж. Чёрч с коллегами картировали SNP на участке седьмой хромосомы человека длиной  $153 \times 10^6$  п.н. [145]. С этой целью они внедряли в полиакриламидный гель конденсированные хромосомы (размером менее 1 мкм), затем удаляли белки с помощью протеиназы К и разрушали хромосомную ДНК до относительно коротких фрагментов путем замораживания и оттаивания геля. В результате фрагментирования ДНК увеличивался выход ПЦР-продукта в колониях, но при этом не нарушалась связь между SNP, принадлежащими одной хромосоме, так как фрагменты были иммобилизованы в геле. Было продемонстрировано, что с помощью нанокolonий в одном геле можно различить группы SNP, принадлежащие разным 414 хромосомам, и точно определить гаплотипы даже при анализе гетерогенного образца, представляющего собой смесь хромосом нескольких десятков человек.

Авторы утверждают, что в одном геле можно определить 14-локусные гаплотипы 50 человек, что заменяет 2600 аллель-специфичных жидкостных ПЦР, увеличивая, таким образом, производительность анализа на три порядка. Как указывают авторы, с помощью такого удаленного гаплотипирования могут быть обнаружены и охарактеризованы рекомбинации, возникающие в одиночных клетках при мейозе, и даже более редкие рекомбинации, возникающие при митозе, а также хромосомные транслокации, приводящие к трансформации нормальных клеток в раковые.

#### *Определение лекарственной устойчивости вирусов*

Другой пример использования нанокolonий – поиск SNP, обуславливающих лекарственную устойчивость, в популяции вируса иммунодефицита человека (HIV) у конкретного пациента [137]. Эта работа проведена в университете Дьюка (США). Было продемонстрировано, что одношаговое секвенирование нанокolonий путем синтеза (см. выше) позволяет обнаруживать минорные варианты вируса, обладающие множественной лекарственной устойчивостью, даже если они составляют 0,01% всей популяции. Это на 3 порядка выше чувствительности, достигаемой прямым секвенированием РНК вируса (20%). Выявление лекарственно устойчивых вариантов вируса позволяет выбрать более адекватную схему лечения данного пациента. Среди преимуществ такого подхода по сравнению с другими существующими методами авторы отмечают отсутствие ложноположительных результатов, возникающих в результате рекомбинаций при использовании жидкостной ПЦР.

Подобный подход был применен для количественного определения известных мутаций лекарственной устойчивости в слитом (химерном) гене тирозин-киназы BCR-ABL, экспрессирующемся при одном из типов хронической миелоидной лейкемии [146]. Девять мутаций в киназном домене химерного гена BCR-ABL обуславливают более 90% случаев устойчивости к ингибитору киназы – иманитибу, широко используемому для химиотерапии [147]. Применение нанокolonий позволяет обнаружить одну устойчивую к иманитибу клетку среди  $10^4$  чувствительных клеток [148].

Нанокolonии, полученные с использованием изотермического размножения ДНК по методу RCA, применили для количественного анализа метилирования гена P16 в клетках опухоли желудка [149]. Предварительная обработка ДНК бисульфитом приводит к превращению немодифицированного цитозина в урацил, не затрагивая метилированные цитозины. Образовавшиеся в результате такой обработки замены C→U детектировали с помощью гибридизации нанокolonий с флуоресцентными зондами.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА

Аналогично детекции *cis*-комбинаций SNP на одной хромосоме возможны поиск и количественное измерение разных вариантов сплайсинга, так как экзоны, принадлежащие одной молекуле мРНК, будут присутствовать в одной нанокolonии.

Вариантов альтернативного сплайсинга одного и того же транскрипта может быть много. Если присутствие или отсутствие одного экзона дает всего лишь 2 варианта мРНК, то 10 экзонов могут образовывать до  $2^{10}$  (или 1024) комбинаций, в которых каждый экзон может либо присутствовать, либо отсутствовать. При стандартном анализе альтернативного сплайсинга с помощью жидкостной ОТ-ПЦР минорные варианты могут оставаться недектируемыми и необходим трудоемкий анализ для обнаружения всех вариантов и определения их пропорции. Кроме того, при анализе в жидкости возможно появление ложных вариантов сплайсинга в результате рекомбинаций, происходящих в процессе как обратной транскрипции, так и ПЦР.

Дж. Чёрч с коллегами [150] продемонстрировали, что нанокolonии позволяют преодолеть эти проблемы (рис. 9). После проведения обратной транскрипции и последующей ПЦР в геле с парой праймеров, соответствующих концевым константным эксонам и позволяющих размножить все варианты мРНК, нанокolonии детектировали путем гибридизации с экзон-специфичными зондами. В результате, для каждой колонии было установлено, какие экзоны в ней присутствуют

и какие отсутствуют. Это дало возможность в одном геле обнаружить все варианты сплайсинга и точно определить число копий каждого варианта. В этой работе для идентификации экзонов в наноклониях последние гибридизовали с немечеными олигонуклеотидными зондами, которые затем метили *in situ* путем удлинения одним флуоресцентно меченным нуклеотидом (см. выше). Однако ту же информацию можно легче и быстрее получить путем гибридизации наноклоний с заранее мечеными флуоресцентными зондами на нейлоновой мембране. Такую мембрану можно многократно использовать для последовательных гибридизаций с разными зондами (или с разными наборами зондов) [84].

Эффективность наноклоний в изучении альтернативного сплайсинга была продемонстрирована на примере сплайсинга первичного транскрипта гена мышечного CD44 [150] – гликопротеина, экспонированного на поверхности клетки и участвующего в межклеточных взаимодействиях. Все 10 экзонов, кодирующих внеклеточную часть этого белка, являются вариabельными. Анализ  $\approx 9000$  наноклоний выявил 69 видов мРНК с разным экзонным составом, что более чем в 2 раза превышает число изоформ, обнаруженных ранее. При сравнении экзонного состава мРНК в нормальных и трансформированных клетках выяснилось, что раковая трансформация приводит к статистически чрезвычайно достоверным изменениям в профиле сплайсинга ( $P < 10^{-10}$ ), которые могли бы служить в качестве диагностического признака. Однако изменяется содержание только минорных изоформ и лишь в несколько раз. Такие изменения было бы невозможно достоверно установить с помощью нецифровых методов анализа, таких как жидкостная ОТ-ПЦР. Эти результаты подтверждают, что изоформы альтернативного сплайсинга могут служить маркерами онкологических заболеваний, но только при условии использования цифрового метода для их точного количественного определения.

Другой группой исследователей наноклонии были применены для определения относительного уровня двух продуктов альтернативного сплайсинга онкогена *K-ras*: K-RAS2A и K-RAS2B [151]. Наноклонии позволили достоверно обнаружить связанные с болезнью Альцгеймера изменения в экзонном составе мРНК белка  $\tau$ , играющего важную роль в морфологии нейронов, хотя эти изменения не выявляются при проведении ПЦР в жидкости [152]. Также с помощью наноклоний была продемонстрирована сцепленность определенной *cis*-комбинации SNP с одним из вариантов альтернативного сплайсинга мРНК гена белка выживания моторного нейрона (SMN – survival motor neuron) при спинальной мышечной атрофии [150].



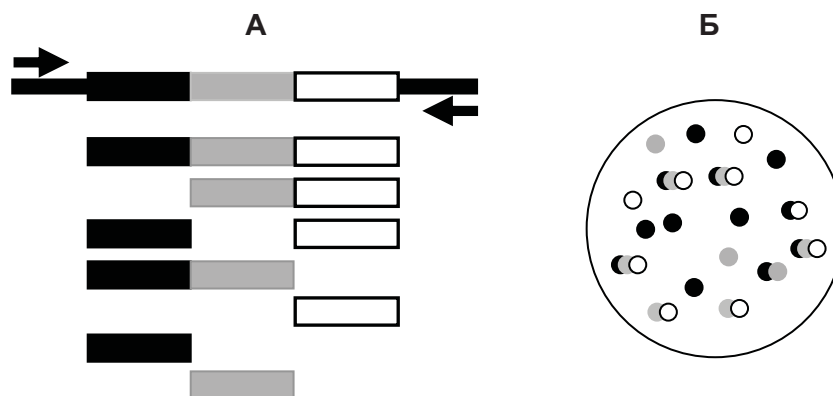


Рис. 9. Обнаружение и количественное определение вариантов альтернативного сплайсинга с использованием нанокolonий.

А. Возможные комбинации экзонов.

Черной линией обозначена последовательность РНК за пределами вариативных экзонов; черным, серым и белым прямоугольниками обозначены 3 вариативных экзона, стрелки указывают места отжига ПЦР-праймеров.

Б. Гибридизация нанокolonии с зондами, обозначенными теми же цветами, что и экзоны, означает, что все эти экзоны присутствуют в молекуле, давшей начало данной колонии.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОПИЙНОСТИ АЛЛЕЛЕЙ И мРНК

Поскольку нанокolonии можно прямо подсчитывать, они позволяют точно определять число копий индивидуальных ДНК и РНК с помощью процедуры, разработанной нами для определения титра вирусов и онкомаркеров. При этом для обнаружения нанокolonий можно использовать любой удобный метод, включая гибридизацию на мембране или в геле (с использованием гомогенных систем детекции), а также удлинение праймера меченым нуклеотидом.

В одной из первых работ такого рода нанокolonии использовали для определения соотношения индивидуальных штаммов дрожжей при их конкурентном росте. В этом эксперименте смешивали и выращивали вместе 8 штаммов, несущих плазмиды, кодирующие разные мутанты фосфоглицераткиназы. Изменение соотношения индивидуальных штаммов в результате их совместного роста определяли путем подсчета числа колоний, содержащих соответствующие SNP, выросших при посеве на гель суммарной плазмидной ДНК [153]. Тот же подход был позже использован для количественного анализа конкуренции между 54 штаммами дрожжей, продуцирующими разные мутантные формы человеческой глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [154].

В другой работе нанокolonии использовали для обнаружения делеций, приводящих к потере гетерозиготности (LOH – loss of heterozygosity) [155]. Если LOH затрагивает ген-супрессор опухолевого роста и при этом оставшаяся копия гена неактивна (например, из-за точечной мутации), клетка может трансформироваться в раковую. Поэтому LOH генов-супрессоров рака используют в качестве диагностического признака. Используя нанокolonии для анализа линии панкреатических клеток (Panc-1), авторы обнаружили, что число колоний гена *K-ras2* в  $\approx 2$  раза превышало число колоний гена *p53*, что указывает на LOH в отношении гена *p53*.

Одно из перспективных приложений нанокolonий – это цифровой мониторинг экспрессии генов путем подсчета числа копий транскрипта в индивидуальных клетках или в группе клеток в данный момент времени. Такой подход позволяет с высокой чувствительностью улавливать небольшие, но статистически достоверные и биологически значимые изменения экспрессии генов. Потенциал нанокolonий был продемонстрирован при измерении экспрессии 14 генов, вовлеченных в метаболизм галактозы в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, выращиваемых в среде, минимальной по глюкозе или по галактозе [156]. Авторы статьи пришли к выводу, что нанокolonии предоставляют неограниченные возможности в области функциональной геномики, так как такой способ измерения экспрессии генов является цифровым по своей природе и поэтому наиболее точным из всех существующих. Они также отметили, что метод нанокolonий имеет более широкий динамический диапазон по сравнению с другими методами изучения профилей экспрессии генов: он позволяет с одинаковой точностью измерять уровни экспрессии наименее и наиболее активных генов.

В недавней работе с использованием нанокolonий измеряли число копий некоторых мРНК в ограниченном числе эмбриональных стволовых клеток [157]. Количество РНК, выделенного из 1/5 одного бластоцита, оказалось достаточно для статистически достоверного определения в одном геле титров трех разных мРНК, содержание которых отличается на порядок.

Наконец, нанокolonии позволяют точно измерять относительный уровень экспрессии разных аллелей одного и того же гена. Аллельные варианты мРНК детектировали так же, как и при SNP-анализе: гибридизацией нанокolonий с немеченым праймером, который метили *in situ* путем включения флуоресцентного нуклеотида. Простым подсчетом колоний, меченных разными флуорофорами, точно определяли соотношение активностей аллелей. Этот подход

был испытан на измерениях относительного уровня экспрессии протеинкиназы D2 у 8 гетерозиготных пациентов с SNP 4208G/A [158]. В качестве контроля определяли соотношение самих аллелей, которое оказалось равным 1 : 1. Авторы указывают, что нанокolonии позволяют измерять абсолютные уровни экспрессии аллелей, в то время как при использовании других методов результаты нормируют на усредненное соотношение экспрессии аллелей, которое принимают равным 1 : 1.

### VIII. ПЕРСПЕКТИВЫ НАНОКОЛОНИЙ

С помощью нанокolonий можно определять уровень экспрессии генов в единичных клетках, определять количество индивидуальных ДНК и РНК во многих клетках одновременно, осуществлять селекцию генов по разнообразным свойствам кодируемых ими РНК или белков, изучать функциональные взаимодействия белков, обнаруживать наномолекулы ненуклеиновой природы.

#### *Изучение экспрессии генов в единичных клетках*

Чувствительность и количественность метода нанокolonий позволяют с высокой точностью анализировать содержимое одной клетки и, более того, анализировать нуклеиновые кислоты при отборе материала с помощью манипулятора из разных частей одной клетки (ядра, органелл, различных зон цитоплазмы). Такой подход даст возможность изучать экспрессию генов и распределение матричных и других РНК внутри клеток в процессе дифференцировки, на разных стадиях клеточного цикла, при различных патологиях и воздействиях на клетку.

#### *Количественный in situ-анализ*

Недавно нами был предложен метод количественного *in situ*-анализа – QISA (от Quantitative In Situ Assay) [88, 92], использующий нанокolonии и позволяющий количественно определять содержание нуклеиновых кислот в каждой из множества клеток, иммобилизованных в одном геле.

При наблюдении роста нанокolonий в режиме реального времени практически все колонии становятся видимыми одновременно (рис. 4). Так происходит потому, что каждая наноклония стартует с одной молекулы. Если же наноклония образуется на месте кластера молекул, то она становится видимой на более ранних циклах ПЦР [88, 92]. Строго говоря, такая колония уже не является молекулярным клоном,

так как представляет собой смешанное потомство разных молекул. Начальное число молекул в каждой колонии может быть определено аналогично тому, как это делается при обычной количественной ПЦР, осуществляемой в жидкости, для определения количества мишени в пробирке – по номеру цикла, в котором флуоресцентный сигнал достигает определенной (пороговой) величины.

Для осуществления QISA отдельные клетки или группы клеток (например, срезы тканей) внедряют в гель в процессе его приготовления. В геле же клетки лизируют (например, пропитывая гель раствором SDS или тиоцианата гуанидина), после чего лизирующие реагенты и большую часть клеточных компонентов отмывают с помощью спиртово-солевой смеси, вызывающей преципитацию высокомолекулярных РНК и ДНК в том месте, где перед лизисом находилась клетка. После удаления соли спиртом и высушивания, в геле осуществляют ПЦР. Если определяют РНК, то предварительно в геле осуществляют обратную транскрипцию [88, 92].

На первый взгляд, QISA похожа на хорошо известный метод – ПЦР *in situ* [159, 160], однако эти методы отличаются несколькими принципиальных моментов. В традиционном ПЦР *in situ*, амплификацию проводят в жидкости, клетки при этом либо суспендированы в растворе, либо прикреплены к твердой поверхности. Основная проблема этого метода – как доставить компоненты реакции (dNTP, праймеры, полимеразу) в клетку, но при этом не допустить выхода из клетки нуклеиновых кислот (ДНК- или РНК-мишени и ПЦР-продуктов). На практике эта проблема не имеет удовлетворительного решения. Клетку обрабатывают, делая ее оболочку проницаемой для добавляемых компонентов ПЦР, но это же приводит к утечке из клетки нуклеиновых кислот и их миграции в другие клетки. Поэтому нельзя ни точно локализовать изучаемую мишень, ни измерить ее количество.

QISA включает полный лизис иммобилизованных в геле клеток, что обеспечивает полную доступность клеточных полинуклеотидов компонентам реакции размножения. Из-за иммобилизации среды как клеточные полинуклеотиды, так и продукты их размножения остаются в том месте, где была клетка, а наблюдение нанокolonий в реальном времени позволяет измерить количество мишени одновременно в каждой из клеток.

QISA применим для обнаружения и определения титра патогенных микроорганизмов в клинических образцах, например, в крови или кале. QISA можно использовать для диагностики рака, например, для обнаружения среди нормальных лейкоцитов клеток, продуцирующих

химерную мРНК AML1-ETO [86], а также для измерения уровня экспрессии химерного гена в индивидуальных лейкоэмических клетках. С помощью QISA можно определять локализацию и локальную концентрацию мРНК в срезах тканей. Анализ серии последовательных срезов позволил бы реконструировать трехмерную карту экспрессии определенного гена или группы генов в ткани, органе и даже целом организме, например, в эмбрионе.

#### *Селекция генов по функциям кодируемых РНК и белков*

Нанокolonии являются видом генетического дисплея, так как совмещают в пространстве ген и продукт его экспрессии. Это позволяет выделять из генетической библиотеки те гены или их варианты, продукты экспрессии которых (РНК и белок) обладают искомыми функциями.

Транскрипцию нанокolonий можно использовать для прямой селекции молекул РНК с заданными свойствами, например, рибозимов или аптамеров. Поскольку нанокolonия уже содержит клон ДНК, кодирующий отобранную РНК, обратная транскрипция этой РНК и клонирование ее кДНК *in vivo* становятся излишними.

На примере GFP мы продемонстрировали, что при экспрессии генов в нанокolonиях можно получать функционально активный белок. Таким же образом можно осуществить скрининг библиотеки вариантов GFP и других флуоресцирующих белков, отбирая нанокolonии по цвету и интенсивности флуоресценции. Отбирать нанокolonии можно также по способности продуцируемых ими белков или пептидов связывать определенные лиганды, антитела, клеточные рецепторы или катализировать определенные химические реакции. В последнем случае скрининг удобно проводить, если в результате реакции образуется ярко окрашенный или флуоресцирующий продукт.

Дополнительные возможности открывает использование систем трансляции, собранных из очищенных компонентов. Такая система была недавно создана в лаборатории Т. Уэда из трансляционных компонентов *Escherichia coli*. Она включает очищенные рибосомы, факторы трансляции, все аминоксил-тРНК-синтетазы и все тРНК [161]. Преимуществами чистой бесклеточной системы трансляции является её более высокая продуктивность при использовании ПЦР-продукта в качестве матрицы (в частности, из-за отсутствия нуклеаз) и возможность контролировать состав реакционной смеси. Это позволяет, используя химически модифицированные аминоксил-тРНК, включать в продукт трансляции производные аминоксилот, проводить трансляцию в отсутствие каких-либо компонентов (напри-

мер, факторов терминации, что позволяет зафиксировать синтезированный белок на матрице) или, наоборот, в присутствии каких-либо дополнительных веществ.

Использование чистой бесклеточной системы транскрипции-трансляции позволит расширить набор признаков, по которым можно вести селекцию белка, синтезированного в наноклониях. При использовании обычных систем транскрипции-трансляции, приготовленных на основе грубых клеточных экстрактов, скрининг наноклоний невозможен, если сам экстракт содержит ферментативную или иную активность, по которой проводится отбор. Использование клеточного экстракта может также препятствовать скринингу наноклоний по связыванию с определенными лигандами или антителами из-за высокого неспецифического фона. Чистая бесклеточная система экспрессии лишена этих недостатков.

#### *Изучение функциональных взаимодействий белков*

Еще одна возможность использования экспрессии генов в наноклониях – изучение функциональных взаимодействий белков. Фактически, экспрессия наноклоний позволяет изготавливать белковые микрочипы. Обработка геля или его реплики (например, мембраны) меченым белком, полинуклеотидом или низкомолекулярным лигандом пометит также наноклонии, если те синтезируют белки, обладающие средством к меченому веществу. Чтобы уменьшить диффузию синтезируемого белка, можно иммобилизовать его на матриксе геля, например, снабдив синтезируемые белки олигогистидиновыми довесками, а матрикс геля модифицировав группами, хелирующими ионы цинка или никеля.

#### *Детекция молекул ненуклеиновой природы*

Потенциально наноклонии могут быть использованы для обнаружения одиночных молекул веществ, отличных от ДНК и РНК. Можно обнаружить белок, способный одновременно связывать два лиганда, например, два разных антитела [162]. С этой целью лиганды пришивают к двум фрагментам ДНК. В результате связывания лигандов с белком эти фрагменты оказываются сближенными, что делает возможным их объединение в одну молекулу с помощью ДНК-лигазы. Размножение в геле объединенной молекулы ДНК, являющейся суррогатом исходной мишени, приведет к образованию наноклонии. Помимо антител, роль белок-специфических реагентов могут играть ДНК- или РНК-аптамеры, а также лиганды, например, аналоги субстратов или кофакторов ферментов. Очевидно, что подобный подход

может быть применен для обнаружения одиночных молекул любого вещества, обладающего достаточно сложной поверхностью, чтобы сформировать два или больше высокоаффинных участка связывания. Такой подход может быть применен как в диагностических целях (например, для обнаружения одиночных молекул наркотика или допинга), так и для обнаружения редких продуктов или интермедиатов химических реакций.

## IX. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Различные приложения нанокolonий основаны на их уникальной способности разделять в пространстве (компарментализовать) амплификацию и экспрессию индивидуальных молекул ДНК или РНК. Из этой основополагающей способности непосредственно следуют три группы приложений, применяемых уже сегодня: (1) клонирование матричных наномолекул, (2) обнаружение и количественное определение индивидуальных молекул, (3) идентификация *cis*-элементов сложных молекул, то есть элементов, ковалентно связанных между собой как результат принадлежности одной и той же молекуле.

*Клонирование* – наиболее естественное применение нанокolonий, так как по своему происхождению каждая индивидуальная колония представляет собой молекулярный клон (то есть, копии одной молекулы ДНК или РНК). Клонирование в нанокolonиях несравненно более эффективно, чем методы, основанные на исчерпывающем разведении матрицы. При сочетании с экспрессией *in situ*, клонирование в нанокolonиях может быть использовано для установления взаимосвязи между геном и кодируемой им функцией (осуществляемой белком и/или РНК), для идентификации групп генов, кодирующих взаимодействующие белки и/или РНК, для выявления регуляторных сетей, а также, как универсальный инструмент для создания новых белков, конструирования аптамеров и поиска лекарств.

Способность *обнаруживать и количественно определять индивидуальные молекулы* делает нанокolonии мощным инструментом для многочисленных аналитических приложений. Примерами таких приложений являются обнаружение продуктов редких химических реакций, абсолютное количественное определение копий индивидуальных генов, их аллелей, любых РНК, и, в том числе, в одиночных клетках, и, несомненно, любой вид количественной молекулярной диагностики (диагностика инфекционных и онкологических заболеваний, мониторинг окружающей среды, решение задач

судебной медицины, обнаружение следовых количеств генетически модифицированных организмов).

В отличие от стандартных методов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот в жидкости, диагностика с помощью нанокolonий не требует измерения интенсивности сигнала; важно только присутствие или отсутствие детектируемой колонии, независимо от числа составляющих ее молекул. Это означает, что метод нанокolonий по своей природе является цифровым и, следовательно, более надежным по сравнению с «аналоговыми» методами, основанными на измерении величины сигнала.

Другая важная особенность нанокolonий – пространственное разделение размножения индивидуальных молекул ДНК или РНК, присутствующих в образце. Это практически исключает конкуренцию между одновременно размножаемыми матрицами при мультиплексном анализе, а также помехи со стороны неспецифического синтеза, который в случае размножения в жидкости является фактором, ограничивающим чувствительность обнаружения мишени в клинических образцах. В результате метод нанокolonий проявляет непревзойденную чувствительность, позволяющую детектировать 1 молекулу ДНК и 2 молекулы РНК в присутствии триллион-кратного избытка посторонних нуклеиновых кислот.

Наконец, *возможность идентифицировать cis-элементы*, образующие смешанные колонии, делает нанокolonии уникальным инструментом для картирования генов и определения гаплотипа, выяснения экзонного состава РНК, секвенирования *in situ*.

Таким образом, применение нанокolonий может быть весьма полезным для различных областей фундаментальной науки, биотехнологии и медицины, таких как химия одиночных молекул, бесклеточное клонирование и скрининг генов, секвенирование, молекулярная диагностика. В каждом из этих направлений нанокolonии демонстрируют выдающиеся результаты. Это позволяет сделать вывод о том, что метод нанокolonий становится развитой технологией, обладающей уникальными возможностями и высоким потенциалом для решения научных и прикладных задач.

Авторы благодарят своих коллег, участвовавших в развитии метода нанокolonий в России: Т.Р.Саматова, М.В.Фалалееву, В.И.Угарова, А.В.Кравченко.



## ЛИТЕРАТУРА

1. *Chetverin, A.B., Chetverina, H.V., Mumishkin, A.V.* (1991) *J. Mol. Biol.*, **222**, 3–9.
2. *Четверин А.Б., Четверина Е.В.* (1995) Способ размножения нуклеиновых кислот, способ их экспрессии и среда для их осуществления. Патент РФ № 2048522.
3. *Четверин А.Б., Четверина Е.В.* (1998) Способ клонирования нуклеиновых кислот. Патент РФ № 2114175.
4. *Четверин А.Б., Четверина Е.В.* (1998) Способ диагностики нуклеиновых кислот. Патент РФ № 2114915.
5. *Chetverin, A.B., Chetverina, H.V.* (1997) Method for amplification of nucleic acids in solid media. U.S. Patent 5,616,478.
6. *Chetverin, A.B., Chetverina, H.V.* (1999) Solid medium for amplification and expression of nucleic acids as colonies. U.S. Patent 6,001,568.
7. *Chetverin, A.B., Chetverina, H.V.* (1999) Method for amplification of nucleic acids in solid media and its application for nucleic acid cloning and diagnostics. U.S. Patent 5,958,698.
8. *Chetverina, H.V., Chetverin, A.B.* (1993) *Nucleic Acids Res.*, **21**, 2349–2353.
9. *Chetverin, A.B., Chetverina, H.V., Demidenko, A.A., Ugarov, V.I.* (1997) *Cell*, **88**, 503–513.
10. *Mitra, R.D., Church, G.M.* (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, e34.
11. *Koch, R.* (1881) *Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte.*, **1**, 1–48.
12. *Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N.* (1985) *Science*, **230**, 1350–1354.
13. *Guatelli, J.C., Whitfield, K.M., Kwoh, D.Y., Barringer, K.J., Richman, D.D., Gingeras, T.R.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**, 1874–1878.
14. *Compton, J.* (1991) *Nature*, **350**, 91–92.
15. *Walker, G.T., Little, M.C., Nadeau, J.G., Shank, D.D.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 392–396.
16. *Wu, D.Y., Wallace, R.B.* (1989) *Genomics*, **4**, 560–569.
17. *Barany, F.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 189–193.
18. *Fire, A., Xu, S.-Q.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4641–4645.
19. *Четверин А.Б.* (1998) Успехи биол. химии, **38**, 3–75.
20. *Chetverin, A.B., Spirin, A.S.* (1995) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **51**, 225–270.
21. *Четверин А.Б., Четверина Е.В.* (2007) *Молекуляр. биология.*, **41**, 284–296.
22. *Brown, D., Gold, L.* (1995) *Biochemistry*, **34**, 14775–14782.
23. *Sumper, M., Luce, R.* (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 162–166.
24. *Biebricher, C.K., Eigen, M., Luce, R.* (1981) *J. Mol. Biol.*, **148**, 369–390.
25. *Biebricher, C.K., Eigen, M., Luce, R.* (1986) *Nature*, **321**, 89–91.
26. *Biebricher, C.K., Eigen, M., McCaskill, J.S.* (1993) *J. Mol. Biol.*, **231**, 175–179.
27. *Четверин А.Б.* (1996) *Молекуляр. биология*, **30**, 981–990.
28. *Crick, F.H.* (1958) *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **12**, 138–163.
29. *McCaskill, J.S., Bauer, G.J.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4191–4195.
30. *Biebricher, C.K., Eigen, M., Luce, R.* (1981) *J. Mol. Biol.*, **148**, 391–410.
31. *Lizardi, P.M., Guerra, C.E., Lomeli, H., Tussie-Luna, I., Kramer, F.R.* (1988) *BioTechnology*, **6**, 1197–1202.

32. *Paranchych, W.* (1975) RNA Phages Ed, N. D. Zinder. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 85–111.
33. *Hirst, G.K.* (1962) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **27**, 303–309.
34. *Ledinko, N.* (1963) Virology, **180**, 107–119.
35. *Romanova, L.I., Tolskaya, E.A., Kolesnikova, M.S., Agol, V.I.* (1980) FEBS Lett., **118**, 109–112.
36. *King, A.M.Q., McCahon, D., Slade, W.R., Newman, J.W.I.* (1982) Cell, **29**, 921–928.
37. *Tolskaya, E.A., Romanova, L.I., Kolesnikova, M.S., Agol, V.I.* (1983) Virology, **124**, 121–132.
38. *Munishkin, A.V., Voronin, L.A., Chetverin, A.B.* (1988) Nature, **333**, 473–475.
39. *Munishkin, A.V., Voronin, L.A., Ugarov, V.I., Bondareva, L.A., Chetverina, H.V., Chetverin, A.B.* (1991) J. Mol. Biol., **221**, 463–472.
40. *Четверин А.Б.* (1999) Молекуляр. биология, **33**, 985–996.
41. *Chetverin, A.B.* (1999) FEBS Lett., **460**, 1–5.
42. *Lai, M.M.C.* (1992) Microbiol. Rev., **56**, 61–79.
43. *Kirkegaard, K., Baltimore, D.* (1986) Cell, **47**, 433–443.
44. *Agol, V.I.* (1997) Semin. Virol., **8**, 77–84.
45. *Diaz, L., DeStefano, J.J.* (1996) Nucleic Acids Res., **24**, 3086–3092.
46. *Четверина Е.В.* (2007) Молекулярные колонии. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, М: МГУ им. М.В. Ломоносова, 328 с.
47. *Weissmann, C.* (1974) FEBS Lett., **40**, S10–S18.
48. *Chetverina, H.V., Demidenko, A.A., Ugarov, V.I., Chetverin, A.B.* (1999) FEBS Lett., **450**, 89–94.
49. *Morozov, I.Yu., Ugarov, V.I., Chetverin, A.B., Spirin, A.S.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 9325–9329.
50. *Гвоздев В.А.* (1993) Молекуляр. биология, **27**, 1205–1217.
51. *Пасюкова Е.Г., Нурждин С.В., Филатов Д.А., Гвоздев В.А.* (1999) Молекуляр. биология, **33**, 26–37.
52. *Гогвадзе Е.В., Буздин А.А.* (2005) Молекуляр. биология, **39**, 364–373.
53. *Власов В.А., Дымищ Г.М., Лаврик О.И.* (1998) Молекуляр. биология, **32**, 5–18.
54. *Chetverin, A.B.* (2004) FEBS Lett., **567**, 35–41.
55. *Herschlag, D., Khosla, M., Tsuchihashi, Z., Karpel, R.L.* (1994) EMBO J., **13**, 2913–2924.
56. *Coetzee, T., Herschlag, D., Belfort, M.* (1994) Genes Dev., **8**, 1575–1588.
57. *Spirin, A.S.* (2002) FEBS Lett., **530**, 4–8.
58. *Спирин А.С.* (2005) Молекуляр. биология, **39**, 550–556.
59. *Спирин А.С.* (2005) Палеонтол. журнал, **39**, 25–32.
60. *Gmyl, A.P., Belousov, E.V., Maslova, S.V., Khitrina, E.V., Chetverin, A.B., Agol, V.I.* (1999) J. Virol., **73**, 8958–8965.
61. *Gmyl, A.P., Korshenko, S.A., Belousov, E.V., Khitrina, E.V., Agol, V.I.* (2003) RNA, **9**, 1221–1223.
62. *Gallei, A., Pankraz, A., Thiel, H.-J., Becher, P.* (2004) J. Virol., **78**, 6271–6281.
63. *Filipowicz, W., Billy, E., Drabikowski, K., Genschik, P.* (1998) Acta Biochim Pol., **45**, 895–906.
64. *Tsagris, M., Tabler, M., Sanger, H.L.* (1991) Nucleic Acids Res., **19**, 1605–1612.
65. *Гмыль А.П., Агол В.И.* (2005) Молекуляр. биология, **39**, 618–632.

66. *Chetverin, A.B., Kopein, D.S., Chetverina, H.V., Demidenko, A.A., Ugarov, V.I.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 8748–8755.
67. *Cooper, P.D., Steiner-Pryor, S., Scotti, P.D., Delong, D.* (1974) *J. Gen. Virol.*, **23**, 41–49.
68. *Pierangeli, A., Bucci, M., Forzan, M., Pagnotti, P., Equestre, M., Perez Bercoff, R.* (1999) *J. Gen. Virol.*, **80**, 1889–1897.
69. *Biebricher, C.K., Luce, R.* (1992) *EMBO J.*, **11**, 5129–5135.
70. *Ugarov, V.I., Demidenko, A.A., Chetverin, A.B.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 44139–44146.
71. *Miele E.A., Mills D.R., Kramer F.R.* (1983) *J. Mol. Biol.*, **71**, 281–295.
72. *Lomeli, H., Tyagi, S., Pritchard, C.G., Lizardi, P.M., Kramer, F.R.* (1989) *Clin. Chem.*, **35**, 1826–1831.
73. *Tyagi, S., Landegren, U., Tazi, M., Lizardi, P., Kramer, F.R.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5395–5400.
74. *Axelrod, V.D., Brown, E., Priano, C., Mills, D.R.* (1991) *Virology*, **184**, 595–608.
75. *Chetverina, H.V., Samatov, T.R., Ugarov, V.I., Chetverin, A.B.* (2002) *BioTechniques*, **33**, 150–156.
76. *Четверин А.Б., Четверина Е.В.* (2002) *Молекуляр. биология*, **36**, 320–327.
77. *Mitra, R.D., Butty, V.L., Shendure, J., Williams, B.R., Housman, D.E., Church, G.M.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5926–5931.
78. *Samatov, T.R., Chetverina, H.V., Chetverin, A.B.* (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, e145.
79. *Caldwell, K.D., Chu, T.-J., Pitt, W.G.* (1992) *DNA sequencing using fluorescence background electroblotting membrane*. US Patent 5,112,736.
80. *Weiss, R.B., Kimball, A.W., Gesteland, R.F., Ferguson, F.M., Dunn, D.M., Di Sera, L.J., Cherry J.L.* (1995) *Automated hybridization/imaging device for fluorescent multiplex DNA sequencing*. US Patent 5,470,710.
81. *Guerasimova, A., Ivanov, I., Lehrach, H.* (1999) *Nucleic Acids Res.* **27**, 703–705.
82. *Guerasimova, A., Nyarsik, L., Girnus, I., Steinfath, M., Wruck, W., Griffiths, H., Herwig, R., Wierling, C., O'Brien, J., Eickhoff, H., Lehrach, H., Radelof, U.* (2001) *Biotechniques*, **31**, 490–495.
83. *Andreoli, R., Amin, M., Meyering, M., Chesterson, R., Ostreicher, E.* (2004) *Low fluorescence nylon/glass composites for micro-analytical diagnostic applications*. US Patent 6,734,012.
84. *Четверина Е.В., Кравченко А.В., Фалалева М. В., Четверин А.Б.* (2007) *Биоорганик. химия*, **33**, 456–463.
85. *Четверина Е.В., Четверин А.Б., Кравченко А.В.* (2006) *Обнаружение молекулярных колоний посредством гибридизации на мембранах с флуоресцентными зондами*. Заявка на получение патента РФ № 2006108053.
86. *Miyoshi, H., Kozu, T., Shimizu, K., Enomoto, K., Maseki, N., Kaneko, Y., Kamada, N., Ohki, M.* (1993) *EMBO J.*, **12**, 2715–2721.
87. *Samatov, T.R., Chetverina, H.V., Chetverin, A.B.* (2006). *Anal. Biochem.*, **356**, 300–302.
88. *Chetverin, A.B., Samatov, T.R., Chetverina, H.V.* (2007) *Non-invasive molecular colony methods, kits and apparatus*. PCT Publication WO2007111639.
89. *Mackay, I.M., Arden, K.E., Nitsche, A.* (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1292–1305.
90. *Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P.* (1997) *BioTechniques*, **22**, 130–138.
91. *Bernard, P.S., Ajioka, R.S., Kushner, J.P., Wittwer, C.T.* (1998) *Am. J. Pathol.*, **153**, 1055–1061.

92. Четверин А.Б., Саматов Т.Р., Четверина Е.В. (2006) Бесконтактные способы обнаружения молекулярных колоний, наборы реагентов и устройство для их осуществления. Заявка на получение патента РФ № 2006109271.
93. Chetverina, H.V., Falaleeva, M.V., Chetverin, A.B. (2004) *Anal. Biochem.*, **334**, 376–381.
94. Четверина Е.В., Четверин А.Б., Кравченко А.В. (2005) Способ консервации биологических образцов, обеспечивающий сохранность нуклеиновых кислот. Заявка на получение патента РФ № 2005138583.
95. Кравченко А.В., Четверина Е.В., Четверин А.Б. (2006) *Биоорганическая химия*, **32**, 609–614.
96. Myers, T.W., Gelfand, D.H. (1991) *Biochemistry*, **30**, 7661–7666.
97. Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**, 9236–9241.
98. Четверин А.Б., Четверина Е.В. (2003) *Молекуляр. медицина*, **2**, 30–40.
99. Русинова А.В., Четверина Е.В., Четверин А.Б. (2005) Сборник тезисов 9-й Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушкино, 168.
100. Абелев Г.И. (1994) Альфа-фетопротеин: Биология, биохимия, молекулярная генетика. *Иммунология*, **3**, 4–9.
101. Фалалеева М.В., Четверина Е.В., Кравченко А.В., Заболотнева Ю.А., Саматов Т.Р., Бобрынина В.О., Масчан М.А., Четверин А.Б. (2006) Научно-практическая конференция «Живые системы» в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники в 2002–2006 гг.», Сборник докладов, 238–243.
102. Cardullo, R.A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P.C., Wolf, D.E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 8790–8794.
103. Klein, D. (2002) *Trends Mol. Med.*, **8**, 257–260.
104. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988) *Science*, **239**, 487–491.
105. Meyerhans, A., Vartanian, J.P., Wain-Hobson, S. (1990) *Nucleic Acids Res.*, **18**, 1687–1691.
106. Poddbo, S., Irwin, D.M., and Wilson, A.C. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 4718–4721.
107. Zaphiropoulos, P.G. (1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2843–2848.
108. Yu, W., Rusterholtz, K.J., Krummel, A.T., Lehman, N. (2006) *Biotechniques*, **40**, 499–507.
109. Jansen, R., Ledley, F.D. (1990) *Nucleic Acids Res.*, **18**, 5153–5156.
110. Odelberg, S.J., Weiss, R.B., Hata, A., White, R. (1995) *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2049–2057.
111. Marton, A., Delbecchi, L., Bourgaux, P. (1991) *Nucleic Acids Res.*, **19**, 2423–2426.
112. Adessi, C., Matton, G., Ayala, G., Turcatti, G., Mermod, J.J., Mayer P., Kawashima E. (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, e87.
113. Mercier, J.F., Slater, G.W. (2005) *Biophys J.*, **89**, 32–42.
114. Turcatti, G., Romieu, A., Fedurco, M., Tairi, A.P. (2008) *Nucleic Acids Res.*, **36**, e25.
115. Fedurco, M., Romieu, A., Williams, S., Lawrence, I., Turcatti, G. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, e22.
116. Саматов Т.Р., Четверина Е.В., Четверин А.Б. (2006) *Вестник биотехнол.*, **2**, 45–49.
117. Chetverin, A.B., Samatov, T.R., Chetverina, H.V. (2008) *Cell-Free Protein Synthesis* (Spirin, A. S., and

- Swartz, J. R., Eds.), Wiley-VCH, Weinheim, 191–206.
118. *Высоцкий Е.С., Маркова С.В., Франк Л.А.* (2006) Молекуляр биология, **40**, 404–417.
119. *Угарова Н.Н., Малошенок Л.Г., Упоров И.В., Кокшаров М.И.* (2005) Биохимия, **70**, 1534–1540.
120. *Зубова Н.Н., Булавина А.Ю., Савицкий А.П.* (2003) Успехи биол. химии, **43**, 163–224.
121. *Sambrook, J., Russell, D.W.* (2001) Molecular cloning, third edition, CSHL Press, Cold Spring Harbor.
122. *Roberts, R.W., Ja, W.W.* (1999) Curr. Opin. Struct. Biol., **9**, 521–529.
123. *Верхуша В.В., Аковбян Н.А., Ефременко Е.Н., Варфоломеев С.Д., Вржещ П.В.* (2001) Биохимия, **66**, 1656–1667.
124. *Lukyanov, K.A., Matz, M.V., Bogdanova, E.A., Gurskaya, N.G., Lukyanov, S.A.* (1996) Nucleic Acids Res., **24**, 2194–2195.
125. *Chetverin, A.B., Kramer, F.R.* (1994) BioTechnology, **12**, 1093–1100.
126. *Brenner, S., Williams, S.R., Vermaas, E.H., Storck, T., Moon, K., McCollum, C., Mao, J.-I., Luo, S., Kirchner, J.J., Eletr, S., DuBridge, R.B., Burcham, T., Albrecht, G.* (2000) Proc. Natl Acad. Sci. USA, **97**, 1665–1670.
127. *Tawfik, D.S., Griffiths, A.D.* (1998) Nat. Biotechnol., **16**, 652–656.
128. *Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K.W., Vogelstein, B.* (2003) Proc. Natl Acad. Sci. USA, **100**, 8817–8822.
129. *Mitra, R.D., Shendure, J., Olejnik, J., Krzymanska-Olejnik, E., Church, G.M.* (2003) Anal Biochem., **320**, 55–65.
130. *Shapero, M.H., Leuther, K.K., Nguyen, A., Scott, M., Jones, K.W.* (2001) Genome Res., **11**, 1926–1934.
131. *Shimkus, M.L., Guaglianone, P., Herman, T.M.* (1986) DNA, **5**, 247–255.
132. *Olejnik, J., Krzymanska-Olejnik, E., Rothschild, K.J.* (1998) Methods Enzymol., **291**, 135–154.
133. *Welch, M.B., Burgess, K.* (1999) S Nucleosides Nucleotides, **18**, 197–201.
134. *Ju, J., Kim, D.H., Bi, L., Meng, Q., Bai, X., Li, Z., Li, X., Marma, M.S., Shi, S., Wu, J., Edwards, J. R., Romu, A., Turro, N.J.* (2006) Proc. Natl Acad. Sci. USA, **103**, 19635–19640.
135. *Kosobokova, O., Gavrilov, D.N., Khozikov, V., Stepukhovich, A., Tsupryk, A., Pan'kov, S., Somova, O., Abanshin, N., Gudkov, G., Tcherevishnik, M., Gorfinkel, V.* (2007). Electrophoresis, **28**, 3890–3900.
136. *Shendure, J., Porreca, G.J., Reppas, N.B., Lin, X., McCutcheon, J.P., Rosenbaum, A.M., Wang, M.D., Zhang, K., Mitra, R.D., Church, G.M.* (2005) Science, **309**, 1728–1732.
137. *Cai, F., Chen, H., Hicks, C.B., Bartlett, J.A., Zhu, J., Gao, F.* (2007) Nat. Methods, **4**, 123–125.
138. *Davidson, S.* (2000) Nat. Biotechnol., **18**, 1134–1135.
139. *Daly, M.J., Rioux, J.D., Schaffner, S.F., Hudson, T.J., Lander, E.S.* (2001) Nat. Genet., **29**, 229–232.
140. *Patil, N., Berno, A.J., Hinds, D.A., Barrett, W.A., Doshi, J.M., Hacker, C.R., Kautzer, C.R., Lee, D.H., Marjoribanks, C., McDonough, D.P., Nguyen, B.T., Norris, M.C., Sheehan, J.B., Shen, N., Stern, D., Stokowski, R.P., Thomas, D.J., Trulson, M.O., Vyas, K.R., Frazer, K.A., Fodor, S.P., Cox, D.R.* (2001) Science, **294**, 1719–1723.
141. *Gabriel, S.B., Schaffner, S.F., Nguyen, H., Moore, J.M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., DeFelice, M., Lochner, A., Faggart, M., Liu-Cordero, S.N., Rotimi, C., Adeyemo, A., Cooper, R., Ward, R., Lander, E.S., Daly, M.J., Altshuler, D.* (2002) Science, **296**, 2225–2229.

142. Guryev, V., Smits, B.M.G., van de Belt, J., Verheul, M., Hubner, N., Cuppen, E. (2006) PLoS Genet., **2**, e121.
143. The International HapMap Consortium. (2005) Nature, **437**, 1299–1320.
144. Couzin, J. (2002) Science, **298**, 941–942.
145. Zhang, K., Zhu, J., Shendure, J., Porreca, G.J., Aach, J.D., Mitra, R.D., Church, G.M. (2006) Nat Genet., **38**, 382–387.
146. Daley, G.Q., Van Etten, R.A., Baltimore, D. (1990) Science, **247**, 824–830.
147. Hughes, T., Deininger, M., Hochhaus, A., Branford, S., Radich, J., Kaeda, J., Baccarani, M., Cortes, J., Cross, N.C., Druker, B.J., Gabert, J., Grimwade, D., Hehlmann, R., Kamel-Reid, S., Lipton, J.H., Longtine, J., Martinelli, G., Saglio, G., Soverini, S., Stock, W., Goldman, J.M. (2006) Blood, **108**, 28–37.
148. Nardi, V., Raz, T., Cao, X., Wu, C.J., Stone, R.M., Cortes, J., Deininger, M.W., Church, G., Zhu, J., Daley, G.Q. (2008) Oncogene, **27**, 775–782.
149. Zhou, D., Zhang, R., Fang, R., Cheng, L., Xiao, P., Lu, Z. (2008) Electrophoresis, **29**, 626–633.
150. Zhu, J., Shendure, J., Mitra, R.D., Church, G.M. 2003. Science, **301**, 836–838.
151. Butz, J.A., Roberts, K.G., Edwards, J.S. (2004) Biotechnol Prog., **20**, 1836–1839.
152. Conrad, C., Zhu, J., Conrad, C., Schoenfeld, D., Fang, Z., Ingelsson, M., Stamm, S., Church, G., Hyman, B. T. (2007) J. Neurochem., **103**, 1228–1236.
153. Merritt, J., DiTonno, J.R., Mitra, R.D., Church, G.M., Edwards, J.S. (2003) Nucleic Acids Res., **31**, e84.
154. Merritt, J., Butz, J.A., Ogunnaike, B.A., Edwards, J.S. (2005) Biotechnol. Bioeng. **92**, 519–531.
155. Butz, J., Wickstrom, E., Edwards, J.S. (2003) BMC Biotechnol., **3**, 11.
156. Mikkilineni, V., Mitra, R.D., Merritt, J., DiTonno, J.R., Church, G.M., Ogunnaike, B., Edwards, J.S. (2004) Biotechnol. Bioeng. **86**, 117–124.
157. Rieger, C., Poppino, R., Sheridan, R., Moley, K., Mitra, R., Gottlieb, D. (2007) Nucleic Acids Res., **35**, e151.
158. Butz, J.A., Yan, H., Mikkilineni, V., Edwards, J.S. (2004) BMC Genet., **5**, 3.
159. Haase, A.T., Retzel, E.F., Staskus, K.A. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 4971–4975.
160. Uhlmann, V., Silva, I., Luttich, K., Picton, S., O'Leary, J.J. (1998) Mol. Pathol., **51**, 119–130.
161. Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Ueda, T. (2001) Nat. Biotechnol., **19**, 751–755.
162. Gustafsdottir, S.M., Schallmeiner, E., Fredriksson, S., Gullberg, M., Soderberg, O., Jarvius, M., Jarvius, J., Howell, M., Landegren, U. (2005) Anal. Biochem., **345**, 2–9.