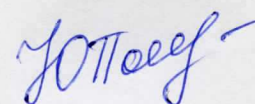


*На правах рукописи*



ПОБОЛЕЛОВА Юлия Илдаровна

**Колориметрические микрочипы для мультианализа  
генов карбапенемаз, обуславливающих устойчивость  
бактерий к бета-лактамным антибиотикам**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

03.01.04 – биохимия

Автореферат диссертации на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Москва - 2017

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии Химического факультета  
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Научные руководители:** академик РАН, доктор биологических наук, профессор

**Егоров Алексей Михайлович**

кандидат химических наук, в.н.с.

**Рубцова Майя Юрьевна**

**Официальные оппоненты:** доктор химических наук, профессор, заместитель директора по науке, заведующий лабораторией иммунобиохимии Института биохимии им. А.Н. Баха ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН».

**Дзантиев Борис Борисович**

доктор биологических наук, профессор РАН, заместитель генерального директора по научной работе ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ «ФНКЦ ФХМ ФМБА России)

**Ильина Елена Николаевна**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

Защита состоится « » 2017 года в 15-00 часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.59 по защите докторских и кандидатских диссертаций по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.11, МГУ, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, аудитория 202.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, и на сайте Химического факультета МГУ <http://www.chem.msu.ru>.

Автореферат разослан « » апреля 2017 года

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 501.001.59,

кандидат химических наук

Сакодынская И.К.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Бета-лактамы антибиотики с момента их открытия и до наших дней являются наиболее широко используемыми антибактериальными препаратами для лечения инфекционных заболеваний бактериальной природы. Однако появление бактерий, устойчивых к данной группе антибиотиков, существенно ограничивает возможности химиотерапии. Угрожающим в последние десятилетия является распространение резистентных возбудителей внутрибольничных инфекций. Основным механизмом устойчивости грамотрицательных микроорганизмов к бета-лактамам является продукция бактериальных ферментов бета-лактамаз, гидролизующих молекулу антибиотика. Карбапенемазы – новый вид бета-лактамаз, которые способны гидролизовать все бета-лактамы антибиотики, в том числе карбапенемы, использующиеся в лечебных учреждениях для лечения тяжелых инфекционных заболеваний. По своему строению карбапенемазы разнообразны и относятся к трем молекулярным классам А, В, D. По строению активного центра они разделяются на ферменты, содержащие серин, и металло-бета-лактамазы, содержащие один или два иона цинка. Благодаря плазмидной локализации генов, распространение карбапенемаз среди возбудителей инфекционных заболеваний человека происходит достаточно быстро. Согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения, смертность от внутрибольничной пневмонии, вызванной устойчивыми к карбапенемам штаммами *Klebsiella pneumoniae*, превышает 50%. В лечебных учреждениях РФ нечувствительными к действию карбапенемов являются уже около 14 % патогенных бактерий. Опасным является распространение бактерий, продуцирующих одновременно несколько ферментов: карбапенемазы совместно с сериновыми бета-лактамазами молекулярного класса А TEM, SHV и CTX-M типов. При терапии таких инфекций комбинацией антибиотиков с ингибиторами сериновых бета-лактамаз металло-бета-лактамазы остаются активными. При лечении азтреонамом, на который не действуют металло-бета-лактамазы, происходит его гидролиз под действием бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и, таким образом, терапия также становится неэффективной. Кроме того, мобильные элементы, на которых располагаются гены карбапенемаз, часто несут одновременно гены устойчивости к антибиотикам других классов – аминогликозидам, фторхинолонам и др. В результате совместной экспрессии таких генов получают панрезистентные бактерии, устойчивые ко всем известным антибиотикам.

В связи с многообразием и опасностью широкого распространения карбапенемаз актуальна задача поиска надёжных методов их определения,

доступных для клинических лабораторий различного уровня. Также необходим метод одновременной идентификации всех карбапенемаз совместно с бета-лактамазами молекулярного класса А. Биохимические и иммунохимические методы определения ферментов не могут обеспечить необходимую мультиплексность и селективность определения при идентификации множества бета-лактамаз. В последнее время для этих целей активно развиваются методы молекулярно-генетического анализа. Перспективными для одновременного определения множества генов являются методы гибридизационного анализа ДНК на олигонуклеотидных микрочипах. Данная технология позволяет проводить мультианализ на основе принципа высокоспецифичного молекулярного распознавания последовательности ДНК-мишени иммобилизованными олигонуклеотидными зондами. Ранее в лаборатории была разработана технология колориметрических микрочипов с детекцией на основе пероксидазы хрена. В качестве метки ДНК-мишени используется биотин, который выявляется в дуплексах ДНК на носителе конъюгатом стрептавидина с пероксидазой хрена. В результате ферментативной реакции образуется окрашенный нерастворимый продукт, адсорбирующийся на поверхности микрочипа в зоне реакции. Это существенно упрощает и удешевляет регистрацию результатов анализа с использованием оптических сканеров высокого разрешения.

**Цели и задачи исследования.** Целью исследования являлась разработка принципа и технологии гибридизационного анализа ДНК на колориметрических микрочипах для идентификации генов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D. В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

- разработка метода одновременной амплификации всех генов карбапенемаз в одной реакции; а также метода совместной амплификации генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А;
- выбор структур олигонуклеотидных зондов для идентификации карбапенемаз различных типов с дополнительным разделением на подгруппы;
- исследование влияния взаимного расположения зондов на эффективность сэндвич-гибридизации;
- разработка метода гибридизационного мультианализа ДНК в двух вариантах: гибридизации меченой биотином ДНК-мишени с иммобилизованными олигонуклеотидными зондами и сэндвич-гибридизации немеченой ДНК-мишени с двумя типами зондов; сравнение аналитических характеристик двух вариантов гибридизационного анализа;

- разработка колориметрических микрочипов для одновременной идентификации генов карбапенемаз и для одновременной идентификации генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А.

**Научная новизна.** Разработан принцип мультианализа разнородных и близкородственных генов на основе гибридизации ДНК-мишени с иммобилизованными на микрочипах олигонуклеотидными зондами.

Впервые разработан метод амплификации всех генов карбапенемаз в одной реакции, а также метод совместной амплификации генов карбапенемаз и трех основных типов бета-лактамаз молекулярного класса А с одновременным включением метки. Показаны преимущества использования генно-модифицированных ДНК-полимераз и технологии «горячего старта» для проведения высокоспецифичной мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Проведен молекулярный дизайн олигонуклеотидных зондов для идентификации восьми типов карбапенемаз с использованием меченой биотином ДНК-мишени и немеченой ДНК-мишени и двух типов зондов: «улавливающих» - иммобилизованных на поверхности носителя и «детектирующих» - меченных биотином для выявления образующихся при гибридизации дуплексов.

Исследовано влияние взаимного расположения олигонуклеотидных зондов на ДНК-мишени на чувствительность и специфичность гибридизационного мультианализа. На основе выявленных в работе закономерностей сформулированы рекомендации по молекулярному дизайну зондов для идентификации генов в сэндвич-варианте анализа.

Проведено сравнение двух способов проведения гибридизационного анализа с использованием меченой и немеченой ДНК-мишени. Показаны преимущества сэндвич-метода гибридизационного анализа для идентификации генов карбапенемаз.

### **Практическая значимость работы.**

В результате проведённых исследований разработана технология гибридизационного анализа на колориметрических микрочипах для одновременного определения разнородных и близкородственных генов.

Разработаны олигонуклеотидные микрочипы следующих типов:

- микрочип для идентификации всех генов карбапенемаз 8 типов с использованием немеченой ДНК-мишени и сэндвич-схемы гибридизации;
- интегрированный микрочип для одновременной идентификации генов карбапенемаз с дополнительным разделением на подгруппы и бета-лактамаз молекулярного класса А (TEM, SHV, CTX-M типов) с определением позиций однонуклеотидного полиморфизма (ОНП), определяющих расширение

профиля субстратной специфичности и устойчивость к ингибиторам бета-лактамаз. Проведена апробация микрочипов с использованием образцов ДНК, выделенных из 68 клинических штаммов грамотрицательных бактерий. Установлена 100% корреляция полученных результатов с данными фенотипирования, ПЦР в реальном времени и ДНК-секвенирования.

Преимущества разработанной технологии состоят в высокой мультиплексности (определении всех генетических детерминант устойчивости в одном анализе), высокой специфичности и снижении себестоимости анализа при использовании колориметрической детекции.

Разработанные микрочипы могут использоваться в диагностических лабораториях и в широкомасштабных эпидемиологических исследованиях для идентификации возбудителей инфекционных заболеваний, устойчивых к бета-лактамам антибиотикам.

**Апробация работы.** Основные результаты работы представлены на IX Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2017), V съезде биохимиков России (Дагомыс-Сочи, Россия, 2016), Международной конференции "Biocatalysis 2015: Fundamentals and Applications" (Московская область, 2015), 8 Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика» (Москва, 2014), Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2014), Международном Конгрессе европейских биохимических обществ «Биологические механизмы» (Санкт-Петербург, 2013), Московской международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (Москва, 2012), I международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Москва, 2010), XII международном конгрессе МАКМАХ/ESCMID по антимикробной терапии (Москва, 2010).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 16 работ, в том числе 3 статьи в изданиях, входящих в Перечень журналов ВАК, 13 тезисов докладов на международных и российских конференциях.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (3 главы), экспериментальной части, результатов и обсуждения (7 глав), заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 163 страницах, содержит 22 таблицы и 68 рисунков. Список литературы включает 244 ссылки.

**Используемые сокращения.** БЛРС – бета-лактамазы расширенного спектра, ОНП – одонуклеотидный полиморфизм, н. – нуклеотиды, ПЦР – полимеразная цепная реакция, ПХ – пероксидаза хрена.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

### 1. Амплификация генов карбапенемаз методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Основной задачей данного этапа работы являлась оптимизация метода мультиплексной ПЦР для одновременной амплификации генов карбапенемаз восьми типов (KPC, VIM, IMP, SPM, NDM, SIM, GIM и OXA) в одной реакции без метки и с одновременным включением биотина в качестве метки. Для решения этой задачи были подобраны последовательности 24 праймеров и оптимизированы условия проведения реакции. Однако из-за сильной разнородности генов карбапенемаз, их одновременная амплификация в процессе одной мультиплексной ПЦР проходила с очень низким выходом, который дополнительно снижался при одновременном введении метки-биотина. Для увеличения выхода продуктов реакции использовали следующие подходы: использование вырожденных праймеров, разделение реакции на две отдельные мультиплексные ПЦР, использование генно-инженерной модификации Taq полимеразы с применением технологии «горячего старта». Третий способ показал лучший выход продуктов реакции, при этом амплификация была наиболее специфичной. Электрофореграмма продуктов амплификации генов карбапенемаз из 11 образцов ДНК, выделенной из контрольных штаммов грамотрицательных микроорганизмов, представлена на рисунке 1. Наблюдалась специфичная амплификация всех исследованных типов и подгрупп генов карбапенемаз в одной мультиплексной ПЦР. Выход продуктов амплификации составил 40-80 нг/мкл.

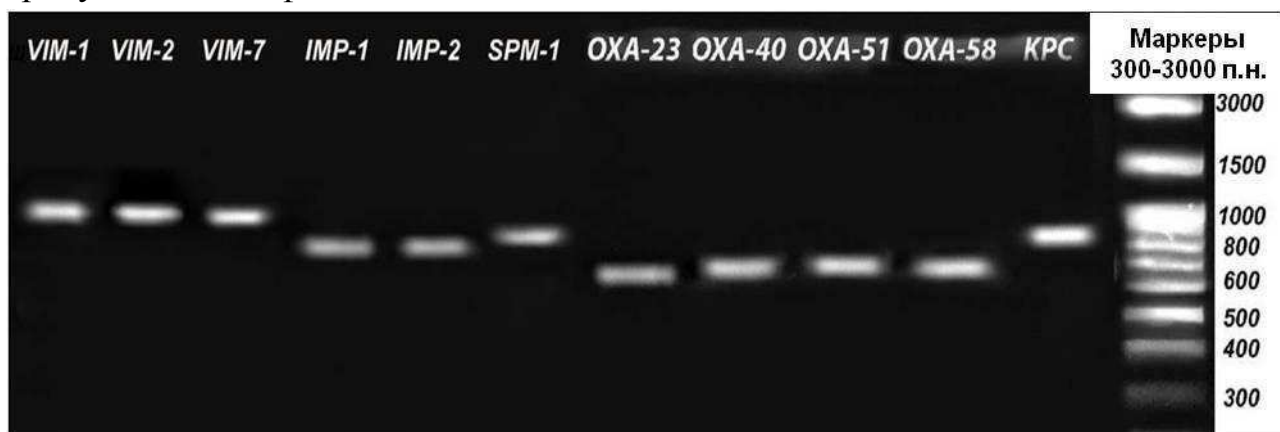


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации генов карбапенемаз в процессе одной мультиплексной ПЦР.

### 2. Молекулярный дизайн олигонуклеотидных зондов для идентификации карбапенемаз

Одной из основных задач при разработке олигонуклеотидных микрочипов для идентификации генов является проведение молекулярного

дизайна зондов. Сложность дизайна зондов состояла в необходимости подбора структур олигонуклеотидных зондов, которые будут эффективно и специфично гибридизоваться с ДНК-мишенью в одних экспериментальных условиях.

Задача идентификации генов всех карбапенемаз состоит в необходимости одновременного распознавания, как разнородных генов (разных типов), так и близкородственных генов (разных подгрупп). Были выбраны последовательности зондов для идентификации восьми типов генов карбапенемаз (VIM, IMP, NDM, SPM, GIM, SIM, KPC, OXA), наиболее гетерогенные типы дополнительно делили на подгруппы. Выбор зондов осложнялся низкой степенью гомологии нуклеотидных последовательностей внутри некоторых типов карбапенемаз.

Принцип выбора последовательностей зондов для идентификации каждого типа и подгруппы карбапенемаз изображен на рисунке 2. В качестве тип-специфических олигонуклеотидных зондов выбирали участки нуклеотидной последовательности генов карбапенемаз, комплементарным гомологичным консервативным участкам генов данного типа. Для распознавания подгрупп генов использовали участки нуклеотидных последовательностей, не содержащие мутаций внутри подгруппы и при этом наиболее сильно отличающие представителей данной подгруппы от других подгрупп и карбапенемаз других типов. Для идентификации подгрупп генов подбирали структуры зондов, соответствующие нескольким участкам нуклеотидных последовательностей.

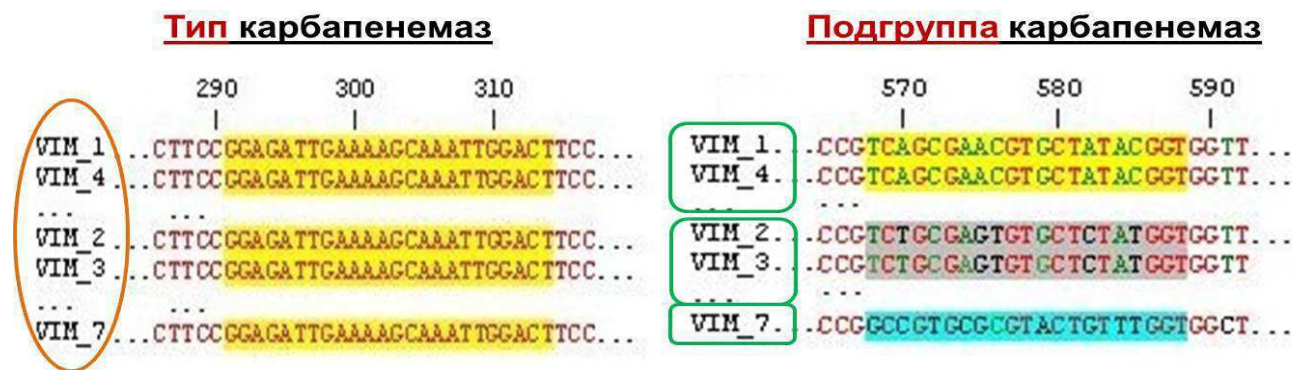


Рис. 2. Принцип молекулярного дизайна тип-специфических и подгрупп-специфических олигонуклеотидных зондов для идентификации карбапенемаз на примере генов карбапенемаз VIM типа.

Для идентификации генов карбапенемаз на микрочипах было предложено изучить использование двух схем проведения гибридизационного анализа ДНК:

- 1) прямую схему гибридизации меченой ДНК-мишени с иммобилизованными на поверхности микрочипа зондами (рис. 3А);
- 2) сэндвич-схему гибридизации немеченой ДНК-мишени с двумя зондами: один зонд, «улавливающий», иммобилизован на микрочипе, второй зонд,



«детектирующий», содержит метку и служит для выявления образующихся дуплексов (рис. 3Б).

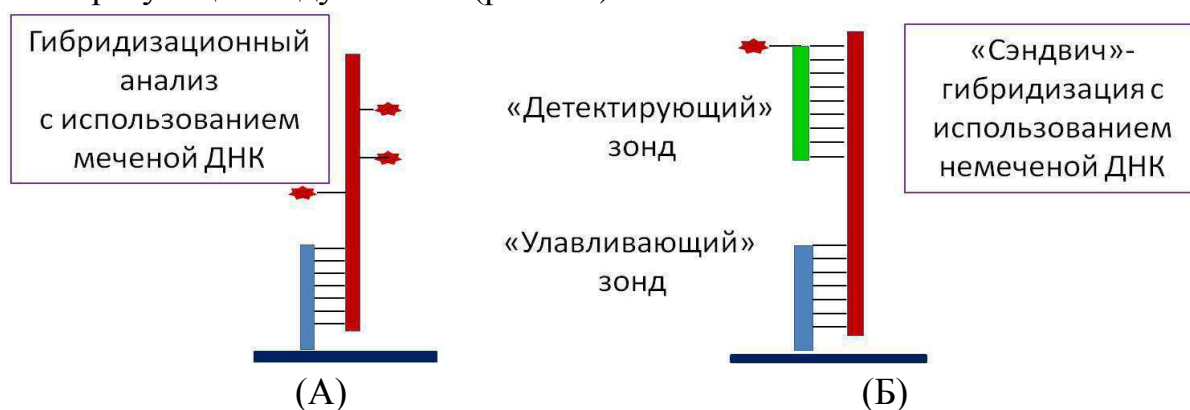


Рис. 3. Две схемы гибридного анализа ДНК-мишени: прямая (А) и сэндвич-гибридизация (Б).

## 2.1. Выбор последовательностей «улавливающих» зондов для идентификации меченой биотином ДНК-мишени по прямой схеме

Для идентификации каждого типа и подгруппы карбапенемаз было протестировано по 3-4 олигонуклеотидных зонда, выбранных на разных участках нуклеотидной последовательности генов. На микрочип наносили одновременно зонды для идентификации разных типов и подгрупп карбапенемаз. Далее проводили гибридизацию с ДНК-мишенью, меченой биотином, и после этого выявляли биотин в дуплексах с использованием конъюгата стрептавидин-ПХ и последующей колориметрической детекцией ПХ. Гибридизацию проводили с использованием различных ДНК-мишеней, меченных биотином. При анализе результатов учитывали как интенсивность гибридизации каждого зонда со специфической для него ДНК-мишенью, так и интенсивность перекрестной гибридизации с другими ДНК-мишенями. На рис. 4 приведены результаты тестирования зондов для идентификации карбапенемаз подгруппы IMP-2, нормированные на интенсивность фона. Для дальнейших исследований выбирали зонды, характеризовавшиеся отношениями сигнал/фон  $> 8$  для специфической гибридизации и сигнал/фон  $< 2$  для неспецифической гибридизации с другими ДНК-мишенями.

## 2.2. Выбор последовательностей «детектирующих» зондов для идентификации ДНК-мишени по сэндвич-схеме

Для детекции немеченой ДНК были использованы «улавливающие» зонды, подобранные для анализа ДНК-мишени по прямой схеме. Задачей данного раздела работы был выбор последовательностей «детектирующих» зондов и анализ влияния взаимного расположения двух зондов относительно ДНК-мишени на эффективность гибридизации.

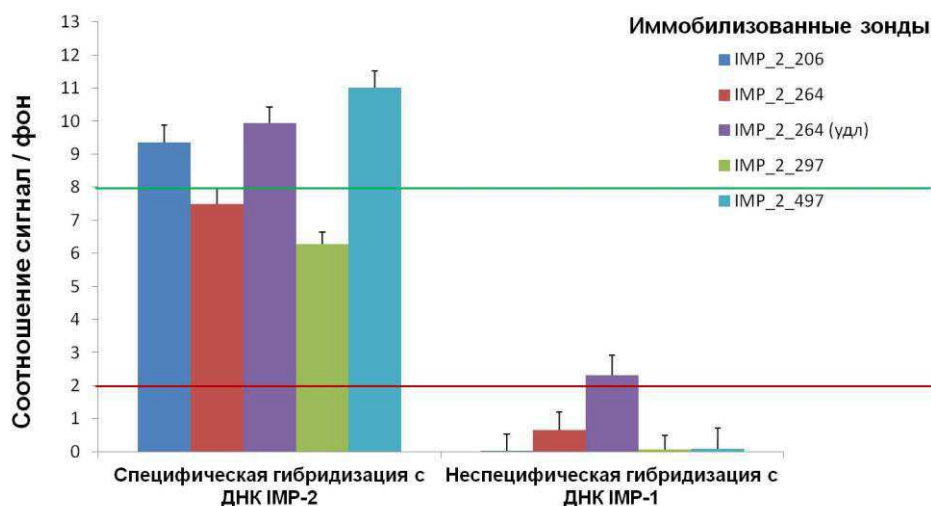


Рис. 4. Нормированные интенсивности гибридизационных сигналов взаимодействия «улавливающих» зондов для карбапенемазы IMP-2 со специфической ДНК-мишенью (IMP-2) и неспецифической ДНК-мишенью (IMP-1).

### 2.2.1 Влияние взаимного расположения «улавливающего» и «детектирующего» олигонуклеотидных зондов

Были исследованы следующие параметры взаимного расположения зондов: расстояние между зондами и положение зондов относительно цепи (ближе к 5' или 3' концу последовательности гена).

Для каждого типа металло-бета-лактамаз и карбапенемаз ОХА-типа были выбраны по 2-4 варианта «улавливающих» и «детектирующих» зондов, расположенных на расстоянии от 0 н. до 500 н. друг от друга. Всего было исследовано 96 вариантов сочетаний зондов с различным расстоянием. Анализ результатов гибридизационного анализа с использованием немеченой ДНК-мишени (рис. 5) показал, что при близком положении зондов (расстояние между ними не более 100 н.) наблюдаемая интенсивность сигнала была выше, чем в случае удалённого расположения зондов. Последовательное расположение зондов прямо друг за другом (расстояние 0 н.) приводило к значительному увеличению гибридизационного сигнала практически для всех исследованных зондов.

Критерием выбора зондов для включения в микрочип являлись высокий гибридизационный сигнал и низкий уровень неспецифической гибридизации. Для сравнения результатов экспериментов, полученных на разных микрочипах, абсолютные значения сигналов нормировали на интенсивность фонового сигнала (рис. 5Б). При выборе оптимального расстояния между зондами использовали критерий отношения сигнал/фон  $> 8$ , соответствующий гибридизационным сигналам с высокой интенсивностью. При использовании последовательно расположенных «улавливающего» и «детектирующего»

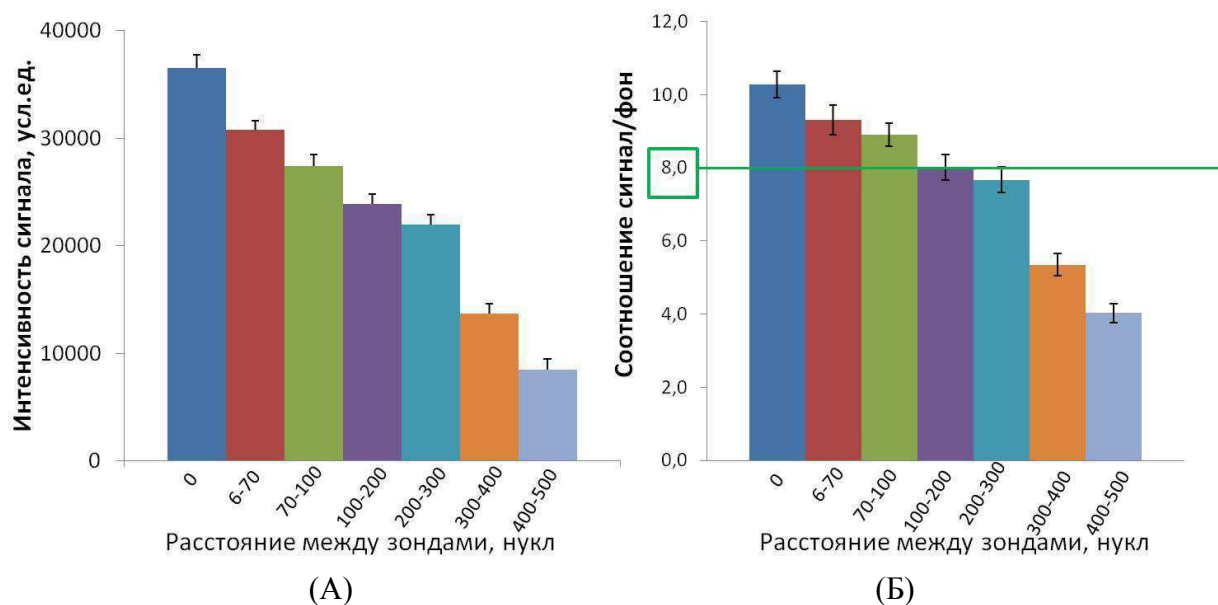


Рис. 5. Зависимость абсолютных (А) и нормированных (Б) интенсивностей гибридационных сигналов от расстояния между «улавливающим» и «детектирующим» зондами на примере гена карбапенемазы VIM-4.

зондов на расстоянии менее 100 н. удалось провести идентификацию всех восьми типов генов карбапенемаз с разделением на подгруппы. При расстоянии между зондами более 300 нуклеотидов интенсивность сигнала гибридизации резко уменьшалась, и обнаружить все гены карбапенемаз не удавалось.

Таким образом, для достоверной идентификации генов методом сэндвич-гибридизационного анализа нужно подбирать зонды на небольшом расстоянии друг от друга, лучше всего использовать зонды, расположенные строго друг за другом. По-видимому, близкое расположение зондов друг за другом создаёт дополнительный эффект укладки оснований между двумя зондами, что проявляется как кооперативный эффект гибридизации при образовании ДНК-дуплекса с участием концевых нуклеотидов прилегающих зондов.

### 2.2.2. Влияние положения «улавливающего» зонда на ДНК-мишени на специфичность и чувствительность определения генов

Далее исследовали влияние различных положений «улавливающего» зонда на ДНК-мишени на эффективность гибридизации. Было выбрано несколько последовательностей зондов, различающихся расположением на цепи ДНК-мишени: ближе к 3'концу определяемой цепи, примерно в середине цепи, а также ближе к 5'концу цепи ДНК-мишени (рис. 6). Зная о влиянии расстояния между «улавливающим» и «детектирующим» зондами на гибридационный сигнал, старались выбирать зонды, расположенные на максимально близком (не более 50 н.) расстоянии друг от друга.

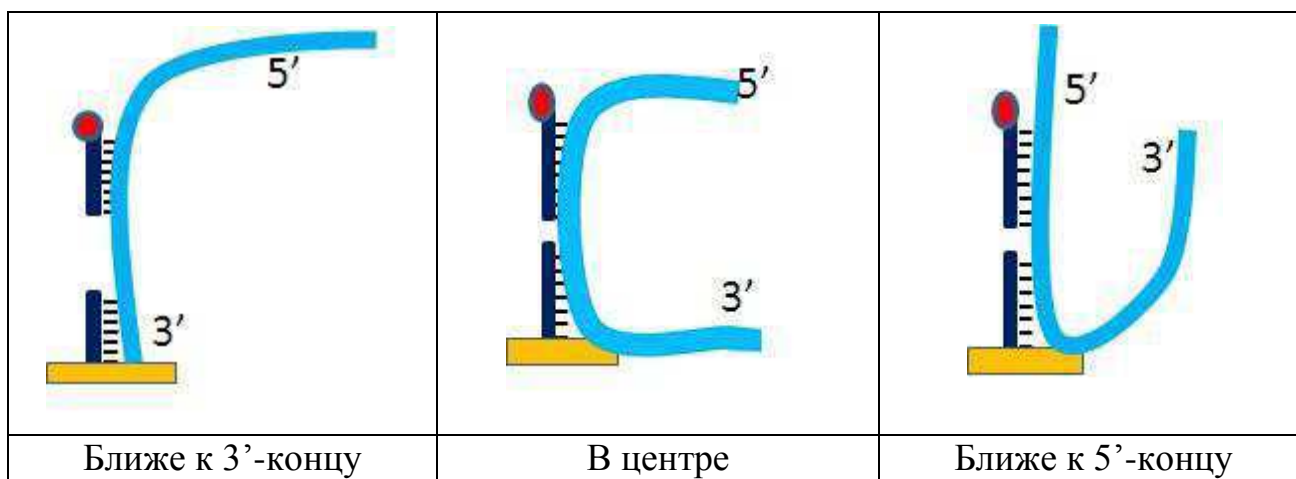


Рис. 6. Расположение пары олигонуклеотидных зондов на последовательности ДНК-мишени.

Результаты гибридизационного анализа пяти генов карбапенемаз в зависимости от положения зондов на ДНК-мишени приведены на рисунке 7. Самый высокий гибридизационный сигнал был получен в случае последовательного расположения зондов у 5'-конца определяемой цепи (обратной), при гибридизации зондов посередине цепи сигнал был средний. Самый низкий сигнал получен при расположении зондов у 3'-конца определяемой цепи. Таким образом, рекомендуется выбирать зонды для улавливания ДНК-мишени таким образом, чтобы они гибридизовались ближе к 5'-концу определяемой цепи. Это значит, что при проведении молекулярного дизайна зондов по прямой цепи для получения хорошего гибридизационного сигнала следует в первую очередь проанализировать область ближе к 3' концу гена или амплифицируемого фрагмента.

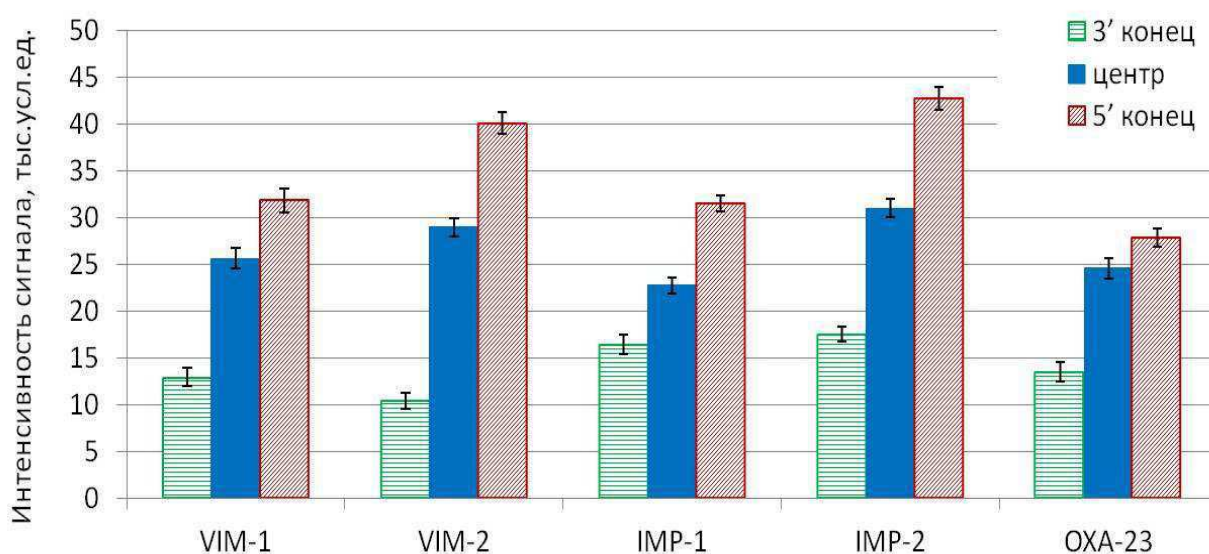


Рис. 7. Зависимость интенсивности гибридизационных сигналов от положения пары «детектирующего» и «улавливающего» зондов на ДНК-мишени.

### 2.2.3. Влияние величины «свободного» участка ДНК-мишени на эффективность гибридизации

При улавливании ДНК-мишени близко к одному из концов большая часть ДНК-мишени остаётся свободной, не связанной с зондами (рис. 8). В работе

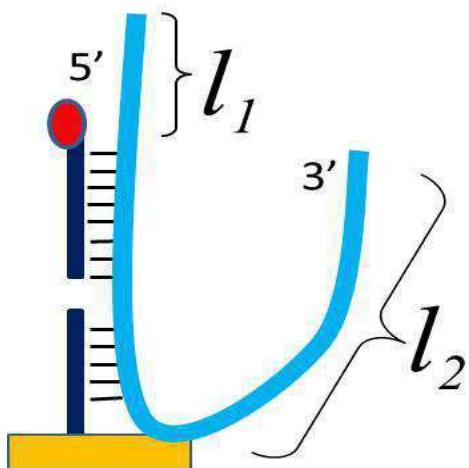


Рис. 8. Схематическое изображение ДНК-дуплекса и «свободных» участков ДНК-мишени.

исследовано влияние длины «свободного» участка ДНК-мишени на эффективность гибридизации. Для этого для карбапенемаз VIM типа были амплифицированы 8 фрагментов разной длины (от практически полного гена (731 п.н.) до небольшого фрагмента (136 п.н.), в котором зонды располагаются сразу за праймером и длина «свободного» участка ДНК-мишени в этом случае минимальна).

Результаты гибридизационного анализа генов VIM-1, VIM-2 и VIM-4 с использованием полученных ампликонов представлены на рисунке 9.

В целом, гибридизационные сигналы уменьшались с увеличением длины ампликона. В случае гибридизации полноразмерного гена, сигнал был значительно ниже, чем при гибридизации более коротких фрагментов гена. Причём интенсивность гибридизационного сигнала зависела как от длины участка ДНК-мишени  $l_1$  и от длины участка  $l_2$ . На рисунке 10 приведены

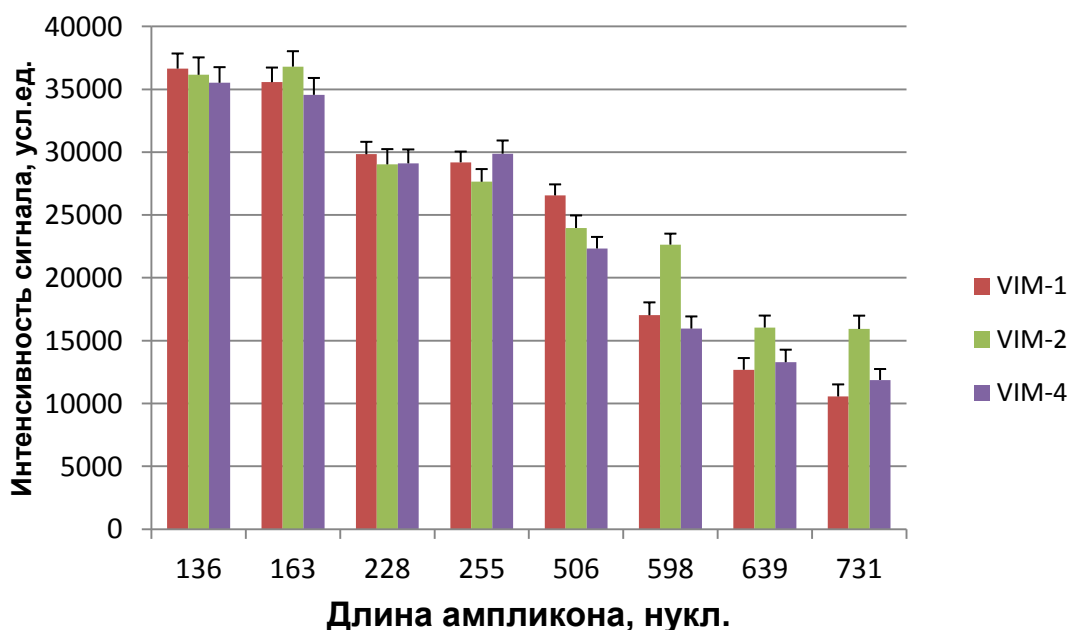


Рис. 9. Зависимость интенсивности гибридизационных сигналов от длины ДНК-мишени на примере трех генов карбапенемаз VIM типа.

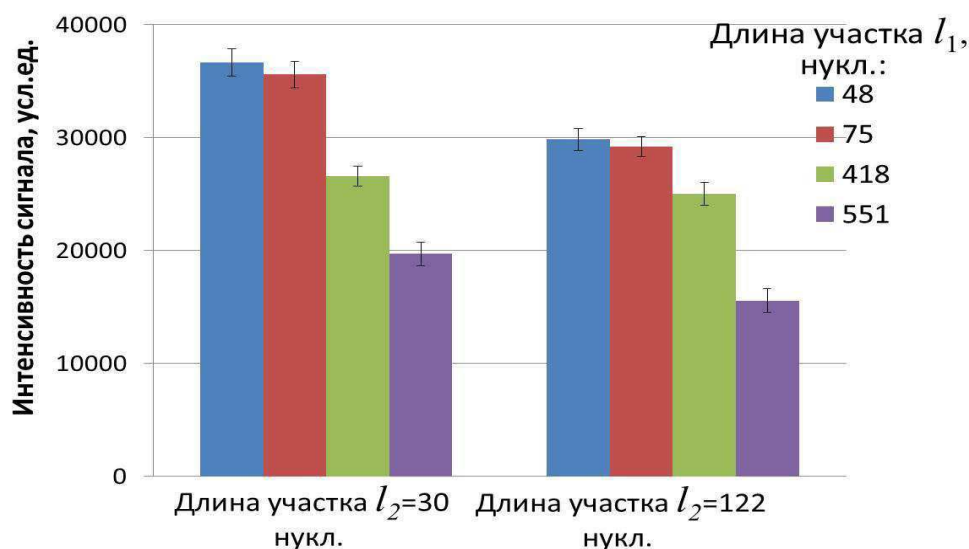


Рис. 10. Зависимость интенсивностей гибридационных сигналов от длины «свободных» участков  $l_1$  и  $l_2$  на примере гена карбапенемазы VIM-1.

результаты идентификации гена карбапенемазы VIM-1 с использованием ДНК-мишеней разной длины, характеризовавшихся различными значениями  $l_1$  и  $l_2$ . Максимальная интенсивность гибридационных сигналов наблюдалась, когда длины свободных фрагментов не превышали 75 н. Таким образом, для распознавания генов с низкой степенью гомологии можно выбирать и амплифицировать небольшие фрагменты гена (от 130 оснований). Для распознавания близкородственных генов необходимо амплифицировать более протяженные фрагменты (от 300 до 500 оснований) и использовать несколько «улавливающих» зондов для увеличения специфичности анализа. Выбор праймеров для амплификации ДНК-мишеней нужно проводить на участках гена, близких к расположению «улавливающего» и «детектирующего» зондов таким образом, чтобы «свободные» участки ДНК-мишеней имели минимальную длину.

### 3. Сравнение двух схем проведения гибридационного анализа с использованием меченой и немеченой ДНК-мишени для идентификации генов карбапенемаз на олигонуклеотидных микрочипах

Мы провели сравнение двух схем проведения гибридационного анализа на микрочипах: прямой схемы с использованием «улавливающих» зондов и меченой биотином ДНК-мишени и сэндвич-схемы с использованием немеченой ДНК-мишени и двух типов зондов, «улавливающих» и меченых «детектирующих».

При идентификации подгрупп генов карбапенемаз IMP типа с использованием меченой ДНК-мишени для некоторых олигонуклеотидных

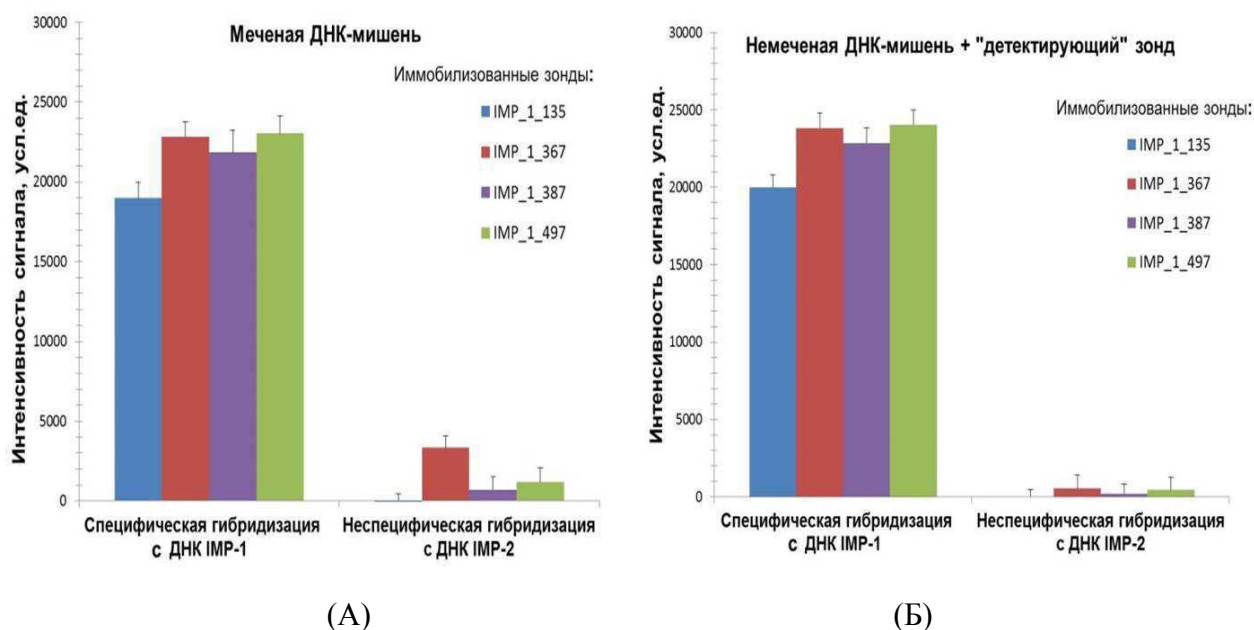


Рис. 11. Результаты гибридизационного анализа генов карбапенемаз подгруппы IMP-1. (а) – гибридизация меченых ДНК-мишеней по прямой схеме, (б) гибридизация немеченых ДНК-мишеней по сэндвич-схеме.

зондов наблюдали перекрёстную гибридизацию с ДНК-мишенями других подгрупп (рис. 11). При проведении гибридизационного анализа по схеме «сэндвич» с применением немеченой ДНК-мишени и меченого «детектирующего» зонда подгрупповая идентификация генов карбапенемаз с использованием тех же «улавливающих» зондов на поверхности олигонуклеотидного микрочипа проводилась более специфично, неспецифического связывания не было выявлено. Таким образом, введение второго зонда в гибридизацию повышает специфичность выявления генов карбапенемаз.

Для сравнения чувствительности гибридизационного анализа с использованием двух схем гибридизации были проварьированы концентрации анализируемой ДНК-мишени (от 0,1 до 2 нг/мкл) и построены градуировочные зависимости интенсивности гибридизационных сигналов от концентрации ДНК. Полученные градуировочные графики для гена карбапенемазы VIM-2 приведены на рис. 12. Гибридизационные сигналы были выше при использовании сэндвич-схемы анализа.

Для двух схем гибридизационного анализа с использованием меченой и немеченой ДНК-мишеней были рассчитаны пределы обнаружения и коэффициенты вариации. Они приведены в таблице 1. Предел обнаружения ДНК в анализе по сэндвич-схеме был меньше в два раза.

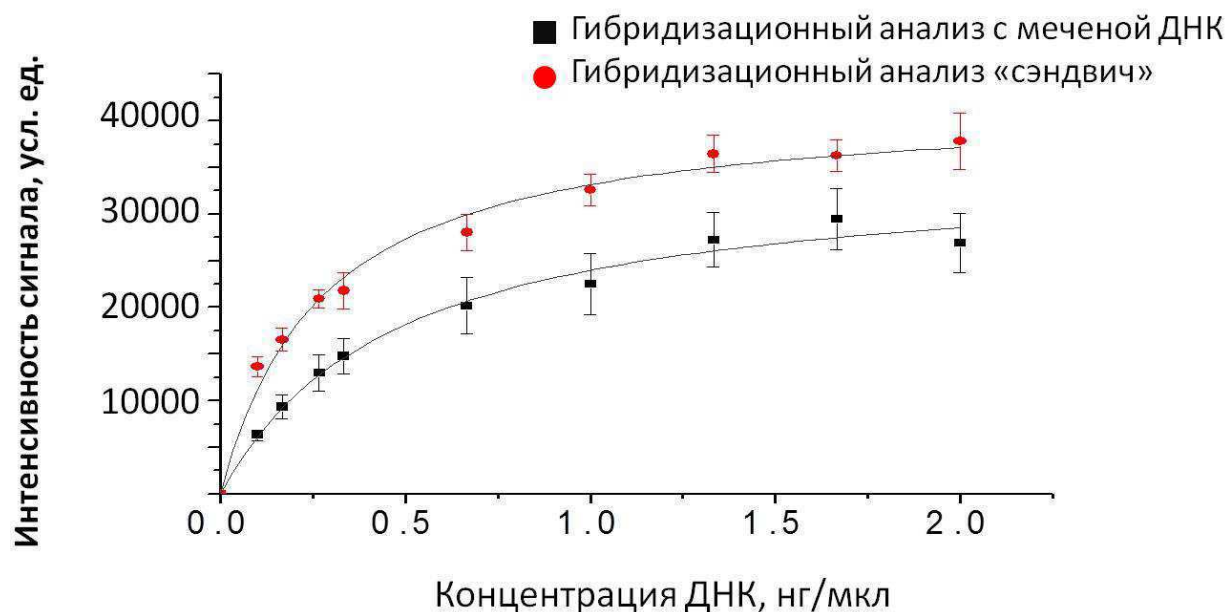


Рис. 12. Градуировочные графики определения гена карбапенемазы VIM-2 методом гибридного анализа на колориметрических микрочипах с использованием двух схем гибридации.

Таблица 1.

Аналитические характеристики определения гена карбапенемазы VIM-2 методом гибридного анализа на колориметрических микрочипах

Схема гибридации	Предел обнаружения, нг/мкл	Коэффициент вариации, %
Прямая схема	0,04	15
Сэндвич схема	0,02	9

Таким образом, введение второго зонда в реакцию гибридации приводит к увеличению чувствительности и специфичности анализа. Преимущества сэндвич-схемы состоят также в большем выходе немеченой ДНК-мишени в реакции амплификации. Далее для проведения идентификации карбапенемаз методом гибридного анализа на олигонуклеотидных микрочипах использовали сэндвич-схему гибридации.

#### 4. Олигонуклеотидный микрочип для идентификации карбапенемаз

Общий вид разработанного олигонуклеотидного микрочипа изображён на рис. 13. Он содержит зонды для идентификации в типов карбапенемаз (KPC, VIM, IMP, SPM, NDM, SIM, GIM и OXA), а также зонды дополнительного типирования генов ферментов по 13 подгруппам (VIM-1, VIM-2, VIM-7, IMP-1, IMP-2, IMP-5, IMP-11, IMP-12, OXA-23, OXA-40, OXA-48, OXA-51, OXA-58). Общее количество специфических зондов 42: по два идентификационных зонда на каждый из восьми типов карбапенемаз и по два олигонуклеотидных зонда для дополнительного типирования генов по подгруппам. Также каждый



микрочип содержит три типа контрольных олигонуклеотидов: контроль иммобилизации (олигонуклеотид, меченный биотином), положительный контроль гибридизации (олигонуклеотид, нуклеотидная последовательность которого комплементарна меченному биотином олигонуклеотиду, добавляемому к гибридизационной смеси), отрицательный контроль гибридизации (олигонуклеотид со случайной последовательностью оснований). Для повышения воспроизводимости анализа каждый олигонуклеотидный зонд наносился на микрочип в трех повторах.

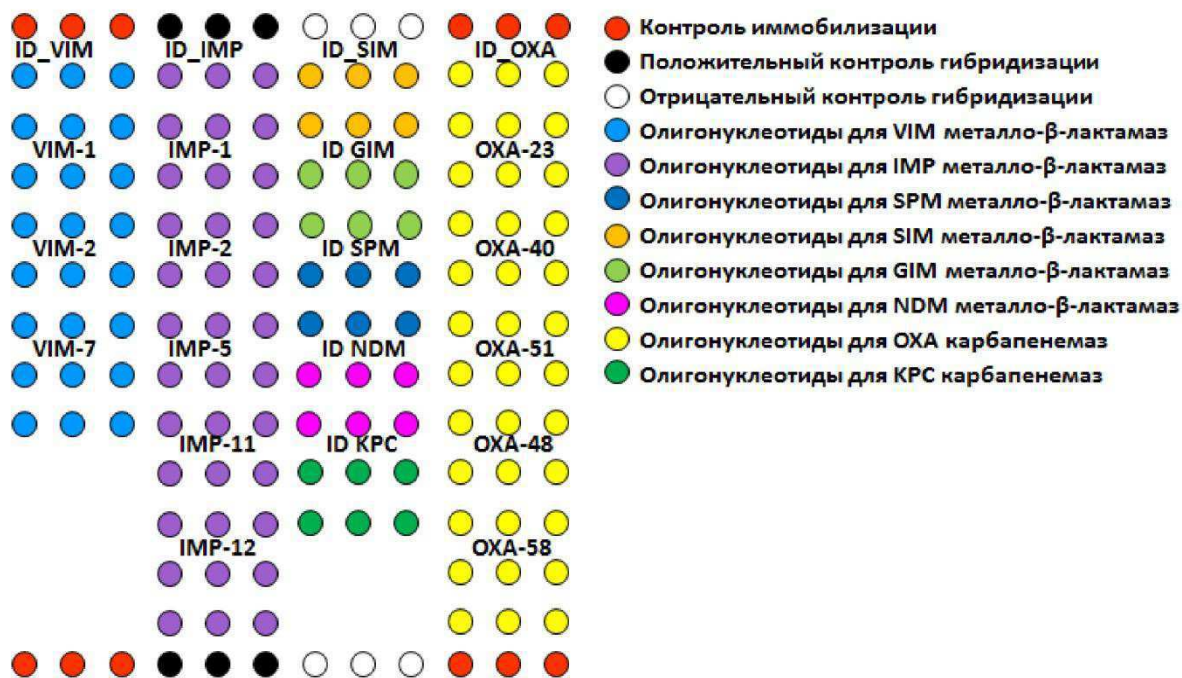


Рис. 13. Расположение специфических «улавливающих» и контрольных олигонуклеотидных зондов на микрочипе для определения генов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D.

Разработанный олигонуклеотидный микрочип имеет следующие параметры: размер микрочипа: 8мм×11мм, диаметр одной точки: 350 мкм, количество точек: 150.

При проведении анализа в гибридизационную смесь к ДНК-мишени добавляются 12 «детектирующих» зондов для выявления образующихся в процессе гибридизации ДНК-дуплексов «улавливающих» зондов с анализируемой ДНК: 6 зондов для детекции шести типов металло-бета-лактамаз (молекулярный класс В), один зонд для обнаружения генов ферментов КРС типа (молекулярный класс А) и по одному зонду на каждую подгруппу ОХА-карбапенемаз (молекулярный класс D).

Олигонуклеотидные микрочипы были протестированы с использованием 13 образцов ДНК, выделенной из охарактеризованных контрольных штаммов микроорганизмов - продуцентов карбапенемаз различных типов (VIM-1, VIM-4,

VIM-2, VIM-7, IMP-1, IMP-2, SPM-1, NDM-1, OXA-23, OXA-40, OXA-51, OXA-58, OXA-48, KPC-3). Во всех образцах гены карбапенемаз были правильно идентифицированы. Разработанный микрочип позволяет успешно распознавать гены карбапенемаз в смеси, что продемонстрировано на примере тестирования образцов ДНК, в которых одновременно присутствовали гены двух карбапенемаз подгрупп OXA-40 и OXA-51.

## **5. Интегрированный микрочип для одновременной идентификации генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А**

Далее был разработан интегрированный олигонуклеотидный микрочип для идентификации генов всех карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А (TEM, SHV и CTX-M типов). Для этого был использован набор зондов для идентификации типа и позиций ОНП бета-лактамаз молекулярного класса А, разработанный в нашей лаборатории ранее. Для получения ДНК-мишеней была оптимизирована методика совместной амплификации генов карбапенемаз восьми типов (KPC, VIM, IMP, SPM, NDM, SIM, GIM, OXA) и трех типов бета-лактамаз молекулярного класса А (TEM, SHV, CTX-M) в процессе одной мультиплексной ПЦР с одновременным включением биотина в качестве метки. Удалось добиться амплификации всех исследуемых генов с достаточным для проведения последующей гибридизации выходом не менее 30 нг/мкл. Для идентификации на интегрированном микрочипе была выбрана прямая схема гибридизационного анализа с использованием фрагментированной меченой ДНК-мишени, так как сэндвич-схема не позволяет эффективно определять ОНП в генах.

Интегрированный микрочип содержит 116 специфических олигонуклеотидных зондов: 19 зондов для идентификации 11 типов бета-лактамаз, 30 зондов для определения 17 подгрупп ферментов, 67 зондов для определения ОНП: 8 - в бета-лактамазах TEM типа, 6 - в бета-лактамазах SHV типа, 2 - в бета-лактамазах подгруппы CTX-M-1, 5 - в бета-лактамазах подгруппы CTX-M-2 и 3 - в бета-лактамазах подгруппы CTX-M-9. Помимо специфических зондов каждый микрочип содержал 3 типа контрольных олигонуклеотидов. Каждый олигонуклеотид наносился на микрочип в 3-х повторах.

Тестирование интегрированного микрочипа проводилось с использованием образцов ДНК, выделенной из контрольных штаммов-продуцентов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А. Одним из главных преимуществ олигонуклеотидных микрочипов является способность идентификации нескольких генов в одном образце. Возможность одновременной детекции генов данных ферментов была исследована на

искусственно приготовленных смесях ДНК различных бета-лактамаз. Все смеси бета-лактамаз правильно и достоверно идентифицировались на олигонуклеотидном микрочипе. На рис. 15 представлены примеры анализа смесей образцов ДНК, выделенной из контрольных штаммов-продуцентов, в которых были специфично идентифицированы гены карбапенемазы NDM типа и бета-лактамазы расширенного спектра типа СТХ-М, подгруппы СТХ-М-9 (рис. 15А) и карбапенемазы подгруппы ОХА-48 и БЛРС типа SHV (рис. 15Б).

## 6. Влияние состава ДНК-мишени на специфичность гибридационного анализа на олигонуклеотидных микрочипах

Для идентификации генов на интегрированном микрочипе предлагается использовать разработанную в данной работе мультиплексную ПЦР. Однако мультиплексная ПЦР в присутствии смеси большого числа праймеров может сопровождаться синтезом неспецифических продуктов реакции. Представляло интерес изучение влияния состава ДНК-мишени и наличия в образце побочных продуктов амплификации на специфичность гибридационного анализа на микрочипах.

Мы провели гибридационный анализ на микрочипах образцов генов бета-лактамаз после их амплификации методом ПЦР со специфическими праймерами и после амплификации методом мультиплексной ПЦР, в результате которой образуется как целевой продукт, так и побочные продукты. Результаты электрофореза продуктов специфической и мультиплексной амплификации гена карбапенемазы VIM-2, а также результаты гибридационного анализа на микрочипах образца гена карбапенемазы VIM-2, амплифицированного в процессе ПЦР со специфическими праймерами и в мультипраймерной ПЦР, приведены на рис. 14 и 16.

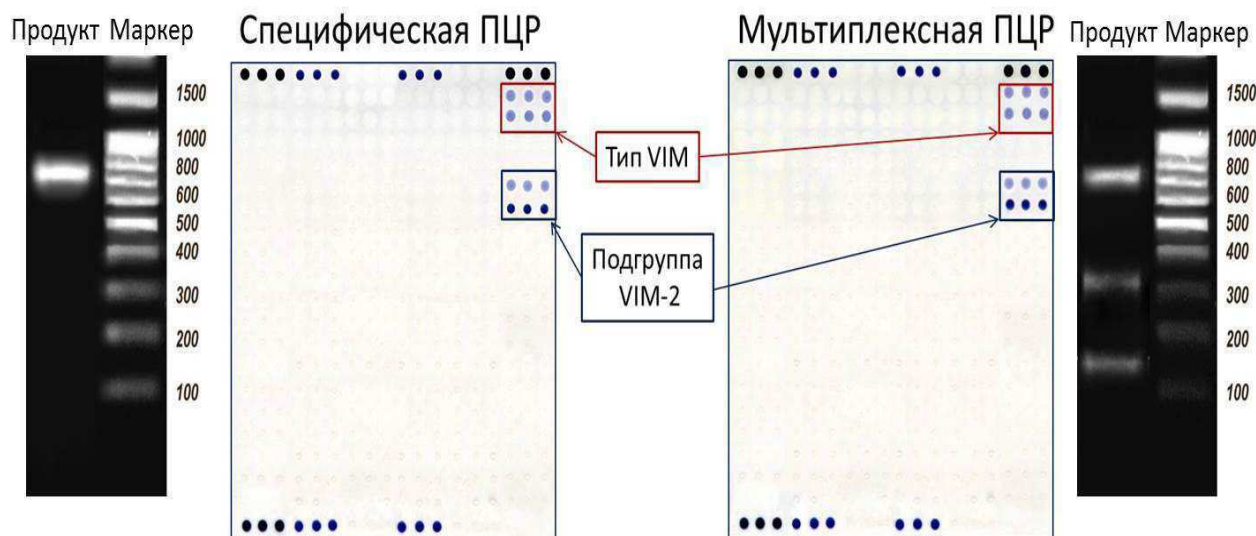


Рис. 14. Результаты гибридационного анализа и электрофореза продуктов амплификации карбапенемазы VIM-2 в ПЦР со специфическими праймерами и в мультиплексной ПЦР.

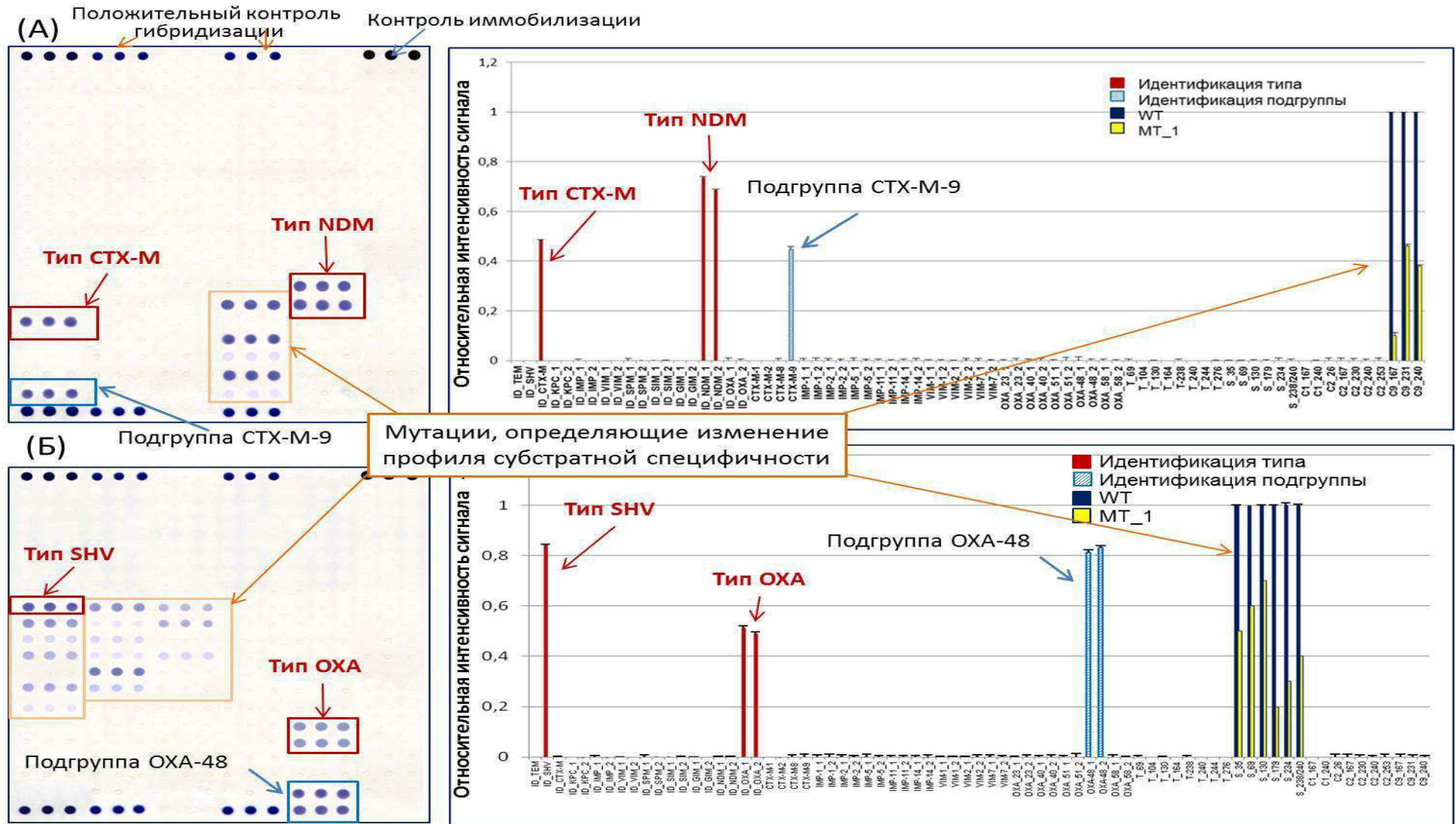


Рис. 15. Результаты гибридизационного анализа смесей ДНК, выделенной из контрольных штаммов-продуцентов карбапенемазы типа NDM и БЛРС подгруппы СТХ-М-9 (А), карбапенемазы подгруппы OXA-48 и БЛРС типа SHV (Б) на интегрированном микрочипе.

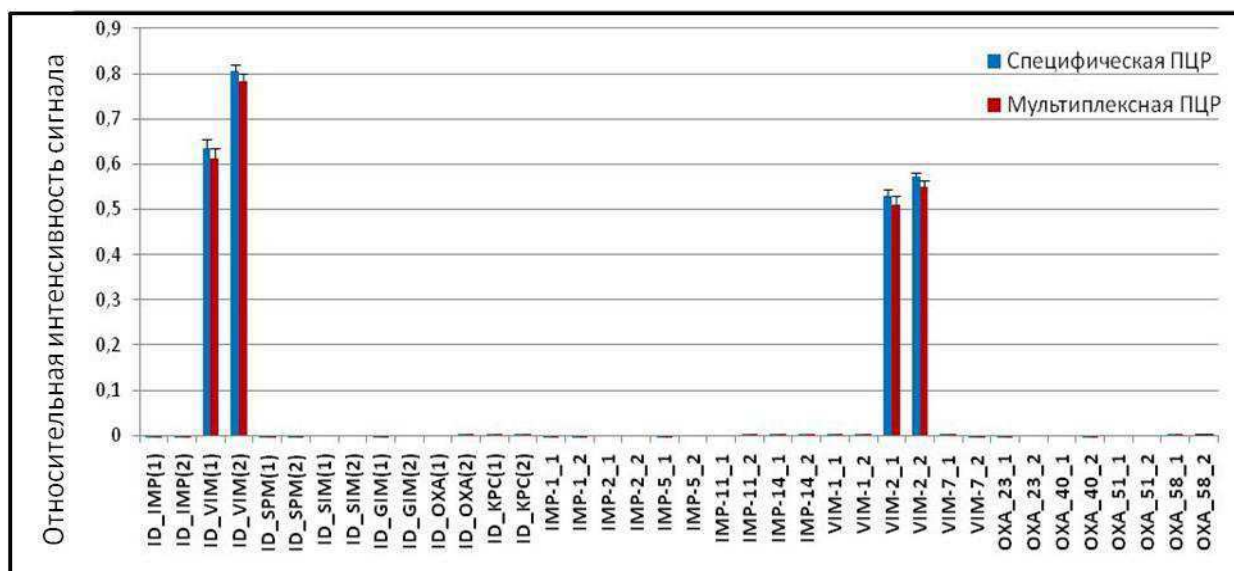


Рис. 16. Результаты гибридизационного анализа на колориметрических микрочипах образца карбапенемазы VIM-2 после ПЦР со специфическими праймерами и после мультиплексной ПЦР.

Специфичность идентификации генов на олигонуклеотидных микрочипах была одинаково высокой для обоих типов амплификации – ПЦР со специфическими праймерами или для мультиплексной ПЦР с образованием неспецифических побочных продуктов. Таким образом, было показано, что метод гибридизационного анализа на олигонуклеотидных микрочипах характеризуется высокой специфичностью идентификации генов даже при использовании ПЦР-продуктов низкой специфичности.

## 7. Анализ образцов ДНК, выделенной из клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов, на олигонуклеотидных микрочипах

Важной стадией разработки анализа является апробация его эффективности на реальных объектах. В процессе данной работы созданы два олигонуклеотидных микрочипа:

1. Олигонуклеотидный микрочип для идентификации генов карбапенемаз восьми типов методом гибридизационного анализа в сэндвич-варианте с использованием немеченой ДНК-мишени;
2. Интегрированный олигонуклеотидный микрочип для одновременной идентификации генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А (TEM, SHV, CTX-M типов) с использованием меченой ДНК-мишени.

Были изготовлены экспериментальные серии олигонуклеотидных микрочипов двух типов и проведена их апробация с использованием 68 образцов ДНК, выделенной из клинических образцов грамотрицательных микроорганизмов.

Результаты анализа образцов ДНК на интегрированном микрочипе представлены на рисунке 17. При тестировании 19 образцов ДНК, выделенной из штаммов микроорганизмов, чувствительных к действию карбапенемов и цефалоспоринов 3-4 поколений, в 5 образцах идентифицированы гены пенициллиназ TEM-1 и SHV-1, в 14 образцах гены бета-лактамаз исследуемых типов не обнаружены. При анализе 22 образцов ДНК бактерий, устойчивых к действию карбапенемов, в 12 образцах идентифицированы гены одной карбапенемазы (типа VIM (n=11), или NDM (n=1)), в 10 образцах идентифицированы гены одновременно двух карбапенемаз типа OXA. Среди 27 образцов ДНК бактерий, устойчивых к цефалоспорином 3-4 поколений, в 19 образцах идентифицированы гены одной бета-лактамазы расширенного спектра (типа CTX-M (n=18) или SHV (n=1)), в 8 образцах идентифицированы гены одновременно двух БЛРС.

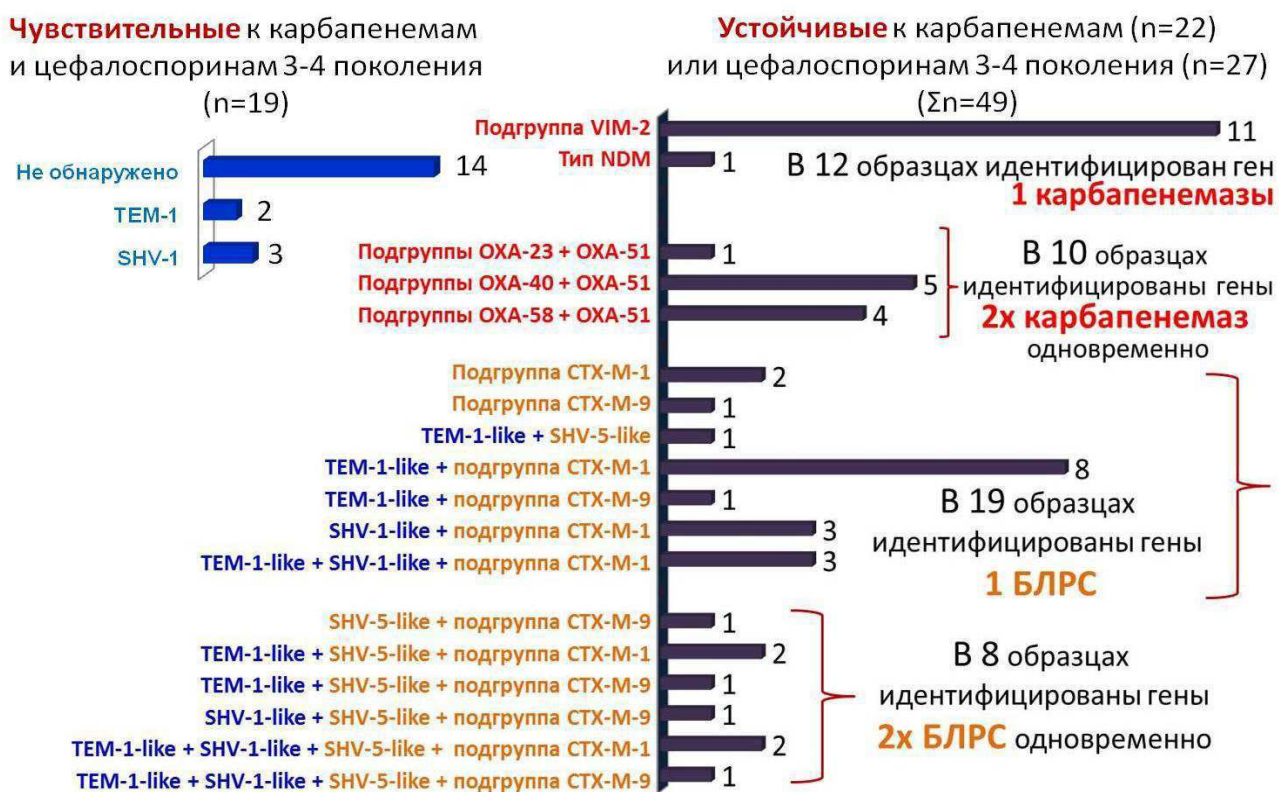


Рис. 17. Результаты анализа образцов ДНК, выделенных из клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов на интегрированном микрочипе.

Идентификация генов бета-лактамаз на ДНК-микрочипах позволяет осуществлять быструю диагностику резистентных бактерий: анализ от выделения ДНК из культуры клеток до получения конечного результата занимает около 4 ч. Преимущества разработанной технологии состоят в высокой мультиплексности (определении всех генов в одном анализе), высокой специфичности и снижении себестоимости анализа при использовании колориметрической детекции.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан принцип одновременной идентификации генов карбапенемаз (KPC, VIM, IMP, SPM, NDM, SIM, GIM, OXA типов) с дополнительным разделением на подгруппы на микрочипах с колориметрической детекцией.
2. Оптимизирован метод мультиплексной ПЦР для получения немеченой и меченой биотином ДНК-мишени с выходом продукта реакции 40-80 нг/мкл.
3. Проведен молекулярный дизайн олигонуклеотидных зондов для одновременной идентификации 8 типов и 13 подгрупп генов карбапенемаз. Исследовано влияние структурных параметров «улавливающих» и «детектирующих» зондов на специфичность и чувствительность мультианализа генов.
4. Проведено сравнение двух схем анализа: гибридизации меченой биотином ДНК-мишени с «улавливающими» зондами и гибридизации немеченой ДНК-мишени с «улавливающими» и «детектирующими» зондами. Метод сэндвич-гибридизации характеризовался более высокой чувствительностью и специфичностью анализа.
5. Разработан микрочип для идентификации 8 типов генов карбапенемаз (KPC, VIM, IMP, SPM, NDM, SIM, GIM, OXA) с использованием сэндвич-гибридизационного анализа. Проведена апробация олигонуклеотидных микрочипов на 31 образце ДНК, выделенной из клинических штаммов *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacteriaceae spp.*
6. Разработан интегрированный микрочип для идентификации карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А (TEM, SHV, CTX-M типов). Показана высокая специфичность идентификации нескольких генетических детерминант устойчивости у мультирезистентных бактерий. Проведена апробация интегрированного микрочипа на 68 образцах ДНК, выделенной из клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов. Установлена 100% корреляция результатов идентификации с данными микробиологического фенотипирования, ПЦР в реальном времени и секвенирования.

## СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ulyashova M.M., **Khalilova Yu.I. (Pobolelova)**, Rubtsova M.Yu., Edelstein M.V., Alexandrova I.A., Egorov A.M. Oligonucleotide microarray for the identification of carbapenemase genes of molecular classes A, B and D. *Acta naturae*, 2010, V. 2, № 3, P. 101-109. (Уляшова М.М., **Халилова Ю.И. (Поболелова)**, Рубцова М.Ю., Эйдельштейн М.В., Александрова И.А., Егоров А.М. Олигонуклеотидный микрочип для идентификации генов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D. *Acta naturae*, 2010, Т. 2, № 3, P. 116-125).
2. **Pobolelova Yu.I.**, Ulyashova M.M., Rubtsova M.Yu, Egorov A.M. Multiplex PCR for joint amplification of carbapenemase genes of molecular classes A, B and D. *Biochemistry (Moscow)*, 2014, V. 79, № 6, P. 566-570. (**Поболелова Ю.И.**, Уляшова М.М., Рубцова М.Ю., Егоров А.М. Мультиплексная ПЦР для совместной амплификации генов бактериальных ферментов - карбапенемаз молекулярных классов А, В и D. *Биохимия*, 2014, Т. 79, № 6, С. 718-723).
3. Ulyashova M.M., Presnova G.V., **Pobolelova Y.I.**, Filippova A.A., Egorov A.M., Rubtsova M.Yu. Screening of bacterial genes responsible for resistance to beta-lactam antibiotics using microarrays with enzymatic detection *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2016, V. 71, P. 232-242. (Уляшова М.М., Преснова Г.В., **Поболелова Ю.И.**, Филиппова А.А., Егоров А.М., Рубцова М.Ю. Скрининг бактериальных генов, ответственных за устойчивость к бета-лактамам с использованием микрочипов с ферментативной детекцией. *Вестник Московского университета. Серия 2*, 2016, Т. 57, № 4, С. 245-252).
4. Ulyashova M.M., **Pobolelova Yu.I.**, Rubtsova M.Yu, Pisarev V.V., Egorov A.M. A set of DNA microarrays for rapid determination of bacterial resistance towards  $\beta$ -lactam antibiotics. *FEBS Journal*, 2013, V. 280, P. 284.
5. Рубцова М.Ю., Уляшова М.М., Преснова Г.В., **Поболелова Ю.И.**, Игнатенко О.В., Филиппова А.А., Егоров А.М. Платформа олигонуклеотидных биочипов с ферментативной детекцией для диагностики устойчивости бактерий к бета-лактамам. *Acta naturae*, Спецвыпуск, 2016, С. 133.
6. **Поболелова Ю.И.**, Рубцова М.Ю., Эйдельштейн М.В., Александрова И.А., Егоров А.М. Выявление генов бактериальных ферментов – карбапенемаз на микрочипах с колориметрической детекцией методом сэндвич-гибридизации. Сборник трудов 8 Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика», Москва, март 2014, Т. 2, С. 370.
7. **Поболелова Ю.И.**, Уляшова М.М., Рубцова М.Ю., Егоров А.М. Молекулярный дизайн олигонуклеотидных зондов для



мультипараметрического определения генов  $\beta$ -лактамаз методом сэндвич-гибридизации на ДНК-микрочипах. Материалы Московской международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии», Москва, 20-22 марта 2012, С. 251.

8. Ulyashova M.M., Rubtsova M.Yu, **Khalilova Yu.I. (Pobolelova)**, Edelstein M.V., Alexandrova I.A., Egorov A.M. Microarray-based assay for the rapid detection of genes encoding extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases of A, B and D classes. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases and 27th International Congress of Chemotherapy, Milan, Italy, 7-10 May 2011, R2498.

9. **Халилова Ю.И. (Поболелова)**, Уляшова М.М., Рубцова М.Ю., Егоров А.М. Идентификация генов бактериальных ферментов - карбапенемаз методом гибридного анализа на ДНК-микрочипах. Материалы VI Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 21-25 марта 2011, Т. 1, С. 301.

10. **Халилова Ю.И. (Поболелова)**, Уляшова М.М., Рубцова М.Ю., Егоров А.М. Метод гибридного анализа на ДНК-микрочипах для определения устойчивости микроорганизмов к карбапенемам. Материалы I международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», Москва, 17-19 ноября 2010, С. 73.

11. Рубцова М.Ю., Уляшова М.М., **Халилова Ю.И. (Поболелова)**, Егоров А.М. Олигонуклеотидные микрочипы для определения генетических детерминант резистентности микроорганизмов к бета-лактамам антибиотикам. Сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2010», Москва, 24-26 ноября 2010, Т. 4, С. 344-347.

12. **Халилова Ю.И. (Поболелова)**. Определение устойчивости грамотрицательных бактерий к карбапенемам методом гибридного анализа на ДНК-микрочипах. Материалы докладов XVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2011", секция Химия - Химия живых систем, нанобиоматериалы и нанобиотехнологии, Москва, 11-15 апреля 2011, С. 39.

13. **Халилова Ю.И. (Поболелова)**, Уляшова М.М., Рубцова М.Ю., Егоров А.М. Диагностические ДНК-микрочипы для определения устойчивости микроорганизмов к карбапенемам. Вестник МИТХТ, 2011, Т. 6, № 1, С. 123.

14. **Халилова Ю.И. (Поболелова)** Диагностические ДНК-микрочипы для определения устойчивости микроорганизмов к карбапенемам. Материалы III

Международной конференции для студентов, аспирантов и молодых ученых «Нанобиотехнологии: проблемы и перспективы», Белгород, 6-9 октября 2010, С. 152-153.

15. Уляшова М.М., Рубцова М.Ю., Халилова Ю.И. (Поболелова), Эйдельштейн М.В., Александрова И.А., Егоров А.М. ДНК-микрочип для диагностики устойчивости грамотрицательных бактерий к бета-лактамам, вызванной продукцией наиболее распространенных бета-лактамаз. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2010, Т. 12, № 2. Тезисы XII международного конгресса МАКМАХ/ESCMID по антимикробной терапии, Москва, 18-20 мая 2010, С. 51.

16. **Поболелова Ю.И.**, Уляшова М.М., Рубцова М.Ю., Егоров А.М. Метод «сэндвич» гибридизации на ДНК-микрочипах для выявления бактериальных ферментов – карбапенемаз. X Конкурс проектов молодых учёных: тезисы докладов. Москва, РХТУ им. Д.И. Менделеева, 20 сентября 2016, С. 38-39.