Вирусы и клетка

УДК 579.61:616—078

**В. А. Адаричев, Г. М. Дымшиц,
Е. С. Мишина, Р. И. Салганик, Т. Л. Соханенкова**

НЕРАДИОАКТИВНЫЙ ГИБРИДИЗАЦИОННЫЙ ТЕСТ НА ЗАРАЖЕНИЕ ЧЕЛОВЕКА PLASMODIUM FALCIPARUM

Описан нерадиоактивный ДНК-гибридизационный способ определения P. falciparum в периферической крови человека. Для иммобилизации ДНК как на капроновых, так и на нитроцеллюлозных мембранах использовали освещение ультрафиолетом. Нерадиоактивно меченный (биотинилированный) зонд приготовлен оригинальным способом, основанным на химической модификации двуцепочечной ДНК. Коэффициент корреляции между данными микроскопического анализа и нерадиоактивной гибридизации при плотностях заражения более 25 паразитов на 1000 лейкоцитов составляет 0.96.

Введение. В диагностике малярии микроскопический метод исследования продолжает играть решающую роль. Однако при явных достоинствах, таких как высокая чувствительность (до 1 паразита на 10^6 эритроцитов), видо- и стадиеспецифичность, количественность результатов, возможность получения информации о жизнеспособности паразитов [1], микроскопия обладает и определенными недостатками: необходимостью в квалифицированном микроскописте, трудоемкостью, длительностью анализа, возрастающей при малых уровнях заражения.

В настоящее время для выявления малярийного заражения в банках крови в клинике требуется тест с чувствительностью, сравнимой с микроскопией, но имеющий гораздо бо́льшую производительность. Таким тестом может служить молекулярная гибридизация специфичной для паразита нуклеотидной последовательности с суммарной ДНК периферической крови человека. Метод пригоден не только для анализа малярийного заражения крови [2—4], но и в эпидемиологических исследованиях комаров — переносчиков малярии [5].

Известно несколько зондов для обнаружения наиболее патогенного паразита человека — *P. falciparum*. Так, клон *pRF14* позволяет определять до 10 пг очищенной ДНК *P. falciparum* и не гибридизуется с ДНК человека, а также с ДНК других видов плазмодия; *P. vivax* и *P. cynomolgi* [2]. Зонд *Rep2* — нетранскрибируемый тандемный повтор из 21 п. н., выделенный из танзанийского изолята *P. falciparum* и составляющий около 1 % генома паразита, не гибридизуется с ДНК человека и выявляет малярийное заражение с высокой чувствительностью (25 пг ДНК *P. falciparum* или 1 паразит на 10^5 эритроцитов) [3, 6]. Существуют и другие видоспецифичные зонды. В качестве универсального зонда для выявления малярийного заражения можно использовать суммарную ДНК *P. falciparum*. Поллак и др. сообщают [4] о чувствительности, превышающей таковую видоспецифичных зондов (одна кольцевая форма на 10^6 эритроцитов) при отсутствии гибридизации с ДНК человека.

Применение гибридизационных тестов на малярию в клинической практике сдерживается отсутствием не только недорогих и технологичных способов подготовки анализируемых образцов, но и отсутствием простого, не использующего радионуклидов, легко масштабируемого способа приготовления зонда.

Настоящая статья описывает нерадиоактивный гибридизационный

© В. А. АДАРИЧЕВ, Г. М. ДЫМШИЦ, Е. С. МИШИНА, Р. И. САЛГАНИК, Т. Л. СОХАНЕНКОВА, 1993

тест для выявления малярийного заражения с помощью химического мечения полинуклеотида [7], позволяющего получать значительные количества ДНК-зонда, что необходимо для массового скрининга зараженных образцов. Для иммобилизации ДНК на микропористых мембранах применяли освещение ультрафиолетом как универсальный метод для различных типов твердых подложек [8].

Материалы и методы. В работе использовали соли и растворители квалификации «чда» и «осч». Конъюгат стрептавидина со щелочной фосфатазой фирмы «Calbiochem» (США); дигидрохлорид 4-аминооксибутиламина производства «Импульс» (НПО «Вектор», Россия); твин-20, казеин, метабисульфит натрия, *n*-нитротетразолиевый голубой (NBT), толундиновая соль 5-бромо-4-хлороиндолилфосфата (BCIP), N-гидроксисукцинимидный эфир *D*-биотинил-ε-аминокапроновой кислоты (Bio-X-NOS) и протеиназа К производства «Sigma» (США); тритон X-305 фирмы «Ferrak» (ФРГ); лаурилсульфат натрия (SDS) и РНКаза А фирмы «Serva» (ФРГ); бычий сывороточный альбумин (BSA) фирмы «Fluka» (Швейцария); нитроцеллюлозные мембраны с размером пор 0,45 мкм типа HAWP фирмы «Millipore» (США); микропористые капроновые мембраны МИФИЛ с размером пор 0,2 мкм производства «Хийу Калур» (Эстония).

Микроскопический анализ крови и выделение ДНК. Кровь забирали из пальца в количестве 50 мкл в гепаринизированные микрокапилляры и исследовали микроскопически на наличие паразитов. ДНК из крови человека и из культуры *P. falciparum* выделяли по [3]. Кровь обрабатывали в течение 2 ч при 50 °С протеиназой К (100 мкг/мл) в присутствии 0,2 % SDS, затем осуществляли две экстракции фенолом и одну — хлороформом, ДНК из водной фазы осаждали этанолом. Осадок растворяли в 10 мМ трис-HCl, 0,5 мМ ЭДТА, pH 7,5 (ТЕ). РНК деградировали РНКазой А (100 мкг/мл) в течение 1 ч при 37 °С. После фенольных экстракций и спиртового осаждения концентрацию полинуклеотида определяли спектрофотомстрически по поглощению при 260 нм, принимая молярный коэффициент поглощения равным 6600 $М^{-1}$ $см^{-1}$ [9]. Рекомбинантная плазмида *pBR322*, содержащая видоспецифичный повтор из *P. falciparum* (Rep2), любезно предоставлена д-ром Л. Франзен (Ун-т г. Упсала, Швеция). Плазмидную ДНК выделяли из клеток *E. coli* щелочным методом [9]. РНК деградировали РНКазой А, затем препарат дважды экстрагировали фенолом и один раз — хлороформом. Плазмиду осаждали этанолом, осадок растворяли в буфере ТЕ. Далее ДНК дважды модифицировали: на первой стадии вводили аминогруппы, затем присоединяли биотин.

Алифатические аминогруппы вводили в двуцепочечный полинуклеотид переаминированием остатков цитозина 4-аминооксибутиламином по [7] с модификациями. Реакционную смесь, содержащую 0,4 мкг/мкл ДНК, 1,0 М дигидрохлорид 4-аминооксибутиламина (pH 4,5 при 37 °С), 0,4 М метабисульфит натрия (pH 4,5 при 37 °С), 5 мМ ЭДТА, инкубировали 3 сут при 37 °С. Модифицированную ДНК очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-25 при элюции бикарбонатом натрия. Раствор ДНК концентрировали экстракцией воды бутанолом-1. Бутанол-1 экстрагировали серным эфиром, эфир удаляли под вакуумом. Модифицированную ДНК хранили при —20 °С.

Биотинилирование переаминированной ДНК проводили в 50 мМ $NaHCO_3$, 10 мМ Bio-X-NOS в течение 1 ч при 37 °С. Модифицированный полинуклеотид очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-25 при элюции 50 мМ $NaHCO_3$ и хранили при —20 °С.

Гибридизация на фильтрах. ДНК-мишень денатурировали нагреванием в ТЕ в течение 5 мин при 98 °С, добавляли NaCl до 1 М и наносили на нитроцеллюлозные мембраны. На капроновые мембраны ДНК наносили в ТЕ. ДНК иммобилизовали освещением ультрафиолетом на обоих типах мембран [8]. Биотинилированный ДНК-зонд денатурировали нагреванием в ТЕ в течение 5 мин при 98 °С и вносили в раствор, содержащий 0,6 М NaCl, 50 %-й формамид, 0,02 %-й поли-

винилпирролидон, 0,02 %-й фиколл 400, 0,02 %-й BSA, 0,2 %-й твин-20, 0,2 %-й тритон X-305, 40 мМ фосфат натрия, pH 7. Гибридизацию фильтра с иммобилизованной ДНК осуществляли в течение 16 ч при 37 °С. Фильтр отмывали 3 раза по 10 мин при 37 °С в 0,5 М NaCl, 50 %-м формамиде, 0,4 %-м SDS, 33 мМ фосфате натрия, pH 7. Затем фильтр инкубировали при перемешивании в 1 %-м казеине, 50 мМ трис-HCl, pH 7, 0,15 М NaCl, 5 мМ $MgCl_2$, 0,5 %-м твине-20. Конъюгат стрептавидин — щелочная фосфатаза разводили в 2000 раз в 50 мМ трис-HCl, pH 7, 0,15 М NaCl, 5 мМ $MgCl_2$. Фильтр инкубировали в этом растворе 20 мин при 22 °С и отмывали от несвязавшегося конъюгата, перемешивая по 10 мин при 22 °С, в четырех сменах 0,15 М NaCl, 50 мМ трис-HCl, pH 7, 5 мМ $MgCl_2$, 0,5 %-м твине-20. Фильтр споласкивали 0,15 М NaCl, 50 мМ трис-HCl, pH 9,4, 5 мМ $MgCl_2$ и затем проявляли в течение 16 ч в растворе такого же состава, но с добавлением 0,33 мг/мл NBT, 0,165 мг/мл BCIP. Далее его ополаскивали водой и высушивали на воздухе.

Результаты и обсуждение. Экспресс-метод выявления малярийного плазмодия в периферической крови пациентов или при скринировании банков крови должен сочетать в себе быстрый способ подготовки большого количества образцов для гибридизационного анализа, простую процедуру иммобилизации ДНК на подложке и гибридизацию, не использующую радионуклидов.

Обычно выделение ДНК из крови сопровождается обработкой образца протеиназой К в присутствии SDS, затем обработкой РНКазой и на последней стадии — удалением белков фенольной экстракцией. Попытки, предпринимаемые исследователями в области упрощения методов выделения ДНК, сводятся либо к опусканию некоторых стадий, либо к применению совершенно других способов лизиса клеток и освобождения от белков [10—12]. Интересны в этом плане лизис и очистки непосредственно на подложке [4]. Однако примеси гемоглобина и продуктов его разложения, неизбежно остающиеся в препарате ДНК при использовании экспресс-методов выделения, могут затруднить интерпретацию результатов при колориметрической детекции. Поэтому в наших экспериментах мы применяли процедуру выделения, использующую SDS, протеиназу К и фенол.

Выбор способа иммобилизации ДНК на микропористой мембране обычно диктуется материалом подложки. Так, при разработке различных методов быстрого выделения ДНК из крови для последующей гибридизации исследователи обычно используют нитроцеллюлозные мембраны [2, 4], обладающие минимальной неспецифической сорбцией. ДНК иммобилизуют запеканием фильтров в вакууме при повышенной температуре. Мы использовали для иммобилизации ДНК как на нитроцеллюлозных, так и на капроновых мембранах освещение ультрафиолетом [8]. Процедура иммобилизации ультрафиолетом более проста, занимает меньше времени, позволяет повысить гибридизационный сигнал по сравнению с традиционными методами иммобилизации и не вызывает повреждений нитроцеллюлозного фильтра, что происходит при запекании его в вакууме.

Выбор способа приготовления нерадиоактивного зонда при ориентации на массовые анализы определяется потребностью в больших (порядка миллиграмма) количествах ДНК-зонда, воспроизводимостью процедуры мечения, ее технологичностью. Химические методы мечения зонда имеют в этом плане определенные преимущества перед ферментативными, например ник-трансляцией [9]. Именно поэтому мы химическим путем вводили в состав полинуклеотида алифатические аминогруппы, к которым затем присоединяли биотин. Метод легко масштабируется и позволяет метить более миллиграмма зонда.

На рис. 1, *б*, приведен результат гибридизации биотинилированного зонда *Rep2* с очищенной ДНК *P. falciparum*. Выявляется 100 пг ДНК малярийного плазмодия, при этом отсутствует сигнал от ДНК человека (316 нг), нанесенной рядом для контроля специфичности (см.

рис. 1, *а*). Таким образом, метод позволяет обнаруживать около 250 паразитов в 10 мкл периферической крови человека.

Результаты гибридизации биотинилированного зонда *Rep2* с образцами ДНК из крови пациентов, находящихся на разных стадиях лечения болезни, приведены на рис. 1, *в* — *ж*. Количество нанесенной на капроновую мембрану ДНК для всех образцов составляет 200 нг и со-

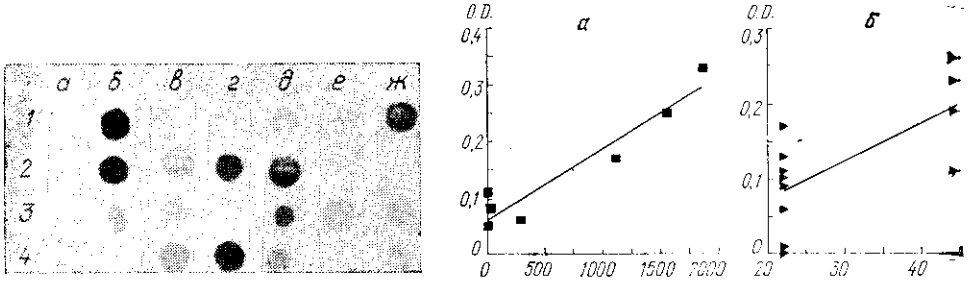

Рис. 1. Гибридизация биотинилированной ДНК *Rep2*: *а* — с ДНК здорового человека (*1*—316; *2*—100; *3*—31,6; *4*—10 нг); *б* — с ДНК *P. falciparum* (*1*—3160; *2*—1000; *3*—316; *4*—100 нг); *в*—*ж* — с ДНК из образцов крови пациентов (*в* — №№ 1—4; *г* — №№ 5—8; *д* — №№ 9—12; *е* — №№ 13—16; *ж* — №№ 17—20). Характеристики образцов см. в таблице

Рис. 2. Зависимость величины гибридизационного сигнала от плотности заражения малярийным плазмодием по данным микроскопического исследования (количество кольцевых форм на 1000 лейкоцитов): *а* — для образцов №№ 1—8; *б* — для образцов №№ 9—20. По горизонтали — плотность заражения

ответствует ~6 мкл периферической крови. Идентичную картину гибридизации получали и на нитроцеллюлозных мембранах (данные не приведены) при несколько меньшем уровне фона на фильтре.

Образцы крови охарактеризованы на заражение малярийным плазмодием независимо двумя методами: микроскопическим анализом и гибридизацией (таблица). На основе этих данных построена зависимость величины гибридизационного сигнала от плотности заражения. Графики приводятся отдельно для образцов №№ 1—8 (рис. 2, *а*) и №№ 9—20 (рис. 2, *б*), так как в первом случае количество паразитов при микроскопическом исследовании посчитано относительно лейкоцитов; во втором — заражение нормировали на количество эритроцитов. Из-за возможности гемолиза при малярийном заражении более точной оценкой паразитэмии является нормировка на количество лейкоцитов. Для удобства сравнения двух графиков плотность заражения для всех образцов выражена в количестве кольцевых форм паразитов на количество лейкоцитов, пересчет данных микроскопии для образцов №№ 9—20 осуществляли в предположении нормальной формулы крови.

Характеристика образцов крови по данным микроскопического исследования и гибридизации

№	Плотность заражения *P. falciparum**	Денситометрия фильтра, ед. опт. плотности	№	Плотность заражения *P. falciparum**	Денситометрия фильтра, ед. опт. плотности
1	10	0,05	11	++	0,19
2	0	0,11	12	+	0,17
3	22	0,08	13	+	0,09
4	1111	0,17	14	+	0,06
5	0	0,05	15	+**	0,11
6	1550	0,25	16	+	0,01
7	282	0,06	17	++	0,26
8	1866	0,33	18	+	0
9	+	0,13	19	+	0,10
10	++	0,23	20	++	0,11

Примечание. «+» — один паразит в пяти полях зрения; «++» — то же в одном поле зрения (объектив X90; окуляр X10). * Количество кольцевых форм паразита на 1000 лейкоцитов для №№ 1—8 либо на количество эритроцитов для №№ 9—20; ** в образце обнаружен также *P. berhgei*.

Как видно из приведенных графиков, корреляция между данными микроскопического анализа и данными гибридизации достаточно хорошая, особенно при плотностях заражения более 25 паразитов на 1000 лейкоцитов. Коэффициент корреляции равен 0,96 в варианте *а* и 0,70 — в варианте *б* (см. рис. 2). Образцы № 2 и №5, отрицательные в микроскопическом анализе, дали сигнал при гибридизации. Неспецифическая гибридизация исключается, так как нет сигнала от ДНК здорового человека (см. рис. 1, *а*). Расхождение результатов для этих образцов, по-видимому, объясняется низкой точностью микроскопии при малых плотностях заражения, повышение же точности може быть достигнуто лишь значительным увеличением времени просмотра препаратов, что невозможно при массовых анализах. Нельзя исключить также варьирования плотности паразитов в отбираемых пробах крови от одного и того же больного [1]. Полученные результаты согласуются с испытаниями ДНК-зондов, проведенными в Таиланде и Кении, где наибольшее количество ложноотрицательных результатов (до 75 %) наблюдается при плотности заражения менее 100 паразитов на 1000 лейкоцитов [1].

Таким образом, в настоящей работе применен универсальный способ иммобилизации ДНК на нитроцеллюлозных и капроновых микропористых мембранах, а также оригинальный метод введения нерадиоактивной метки в ДНК и предложен высокочувствительный, не использующий радионуклидов, тест на малярийное заражение, основанный на дот-гибридизации нуклеиновых кислот. Тест применим для серийного анализа *P. falciparum* в периферической крови человека и позволяет проводить эпидемиологические исследования зараженности комаров малярийным плазмодием.

Работа выполнена в рамках программы «Геном человека».

Summary. Nonradioactive molecular hybridization test on *Plasmodium falciparum* infection in human peripheral blood is described. The DNA immobilization both on nylon and nitrocellulose membranes is carry out by UV irradiation. Nonradioactive biotinilated probe is prepared according to original method based on chemical modification of doublestranded DNA. The correlation coefficient between microscopic examination data and hybridization data is 0.96 for infection density more then 25 parasites by 1000 leukocytes.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Применение* ДНК-зондов для диагностики малярии: выводы и рекомендации совещания ВОЗ // Бюл. всемир. организации здравоохранения.— 1986.— 64, № 5.— С. 11.
2. *Barker R. H., Suebsley L., Rooney W. et al.* Specific DNA probe for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria // Science.— 1986.— 231.— P. 1434—1436.
3. *Franzen L., Shabo R., Perlmann H. et al.* Analysis of speciments by hybridization with probe containing repetitive DNA from *Plasmodium falciparum* // Lancet.—1984.— 1, N 8376.— P. 525—528.
4. *Pollack Y., Metzger S., Shemer R. et al.* Detection of *Plasmodium falciparum* in blood using DNA hybridization // Amer. J. Trop. Med. Hyg.— 1985.— 34.— P. 663—667.
5. *Delves C. J., Goman M., Ridley R. G. et al.* Identification of *Plasmodium falciparum*-infected mosquitous using a probe containing repetitive DNA // Mol. and Biochem. Parasitol.— 1989.— 32.— P. 105—112.
6. *Aslund L., Franzen L., Westin G. et al.* Highly reiterated non-coding sequence in the genome of *Plasmodium falciparum* is composed of 21-base pair tandem repeats // J. Mol. Biol.— 1985.—185.— P. 509—516.
7. *Адаричев В. А., Дымшиц Г. М. Калачников С. М. и др.* Получение ДНК, несущей алифатические аминогруппы, и использование ее флюоресцентного производного в качестве зонда при молекулярной гибридизации // Биоорг. химия.— 1987.— 13, № 8.
8. *Калачиков С. М., Адаричев В. А., Дымшиц Г. М.* Иммобилизация ДНК на микропористых мембранах с помощью УФ-облучения // Там же.— 1992.— 18, № 1.
9. *Маниатис Т., Фрич Э. Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М. : Мир, 1984.— 490 с.
10. *Gillespie D., Bresser J.* mRNA immobilization in NaI: Quick-blots // BioTechniques.— 1983.— 1, N 1.— P. 185—192.
11. *Jeanpierre M.* A rapid method for the purification of DNA from blood // Nucl. Acids Res.— 1987.— 15, N 22.— P. 9611.
12. *McInture P., Stark G. R.* A quantitative method for analyzing specific DNA sequences directly from whole cells // Anal. Biochem.— 1988.— 174.— P. 209—214.

Ин-т цитологии и генетики Сиб. отд. РАН, Новосибирск
Ин-т троп. медицины им. Е. И. Марциновского МЗ РФ Москва

Получено 12.08.92