

**Колориметрическая детекция на основе пероксидазы хрена
для диагностических ДНК-чипов¹**

***Уляшова Мария Морисовна, Рубцова Майя Юрьевна, Егоров Алексей
Михайлович***

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
E-mail: mmulyashova@gmail.com*

Новые методы ДНК-диагностики на микрочипах имеют значительные преимущества перед традиционными молекулярно-биологическими методами, т.к. позволяют миниатюризировать исследуемый образец и одновременно определить различные его параметры. Технологии ДНК-чипов основаны на гибридизации неизвестной нуклеотидной последовательности, содержащей метку, с расположенными на поверхности носителя олигонуклеотидами или фрагментами ДНК. Результат гибридизации определяется по активности метки. Большая часть разработанных к настоящему времени ДНК-чипов основана на использовании флуоресцентной метки. Это обеспечивает необходимую чувствительность анализа, однако значительно увеличивает его стоимость.

В данной работе был разработан высокочувствительный метод колориметрической детекции пероксидазы хрена (ПХ) на поверхности стекла. Нами было проведено сравнительное изучение целого ряда субстратов ПХ, и были установлены значительные преимущества реакций совместного ферментативного окисления некоторых замещенных бензидинов и 4-хлор-1-нафтола. Было показано, что при использовании данных субстратных систем чувствительность определения ПХ на поверхности стекла на порядок превышает чувствительность, наблюдаемую при использовании других субстратов пероксидазы.

Возможность использования разработанных колориметрических систем была показана на примере определения генов СТХ-М β -лактамаз методом ДНК-чипов. Нами были оптимизированы условия проведения ПЦР и гибридизации меченной биотином ДНК с иммобилизованными на поверхности чипа олигонуклеотидами. В результате был разработан метод гибридизационного анализа с колориметрической детекцией для определения точечных мутаций в генах β -лактамаз СТХ-М типа. Сравнение результатов тестирования реальных образцов, содержащих β -лактамазы СТХ-М типа, на ДНК-чипах с колориметрической и флуоресцентной детекцией показало, что чувствительность анализа при использовании колориметрической детекции сравнима с чувствительностью, наблюдаемой при использовании флуоресцентной детекции.

¹ Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2002-2006 годы» (контракт № 02.434.11.7030).