

კვადრუპლექს პრაიმერული ამპლიფიკაცია  
მოლეკულური დიაგნოსტიკისათვის

ლევან ლომიძე

*სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის  
საბუნებისმეტყველო მეცნიერებებისა და საინჟინრო ფაკულტეტზე ფიზიკის დოქტორის  
აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნის შესაბამისად*

ფიზიკისა და ასტრონომიის სადოქტორო პროგრამა

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ბესიკ კანკია, ასოცირებული პროფესორი, დოქტორი.

თანახელმძღვანელი: ნუნუ მეტრეველი, ასოცირებული პროფესორი, დოქტორი.

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი

თბილისი, 2017

## განაცხადი

*როგორც წარდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის ავტორი, ვაცხადებ, რომ ნაშრომი წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ, ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული, ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად.*

ლევან ლომიძე

29.06.2017

## აბსტრაქტი

კვადრუპლექს პრაიმერული ამპლიფიკაცია (Quadruplex priming amplification (QPA)) წარმოადგენს მეთოდს, რომელიც დნმ-ის სიგნალის იზოთერული ამპლიფიკაციის და ამ პროცესის რეალურ დროში დაკვირვების საშუალებას იძლევა. QPA რეაქციის საფუძველს წარმოადგენს დნმ-ის თანმიმდევრობა, GGGTGGGTGGGTGGG (G3T), რომელიც წარმოქმნის მაღალი თერმული სტაბილურობის სტრუქტურას, კვადრუპლექსს. რეაქციაში პრაიმერად გამოიყენება G3T თანმიმდევრობა, რომელსაც 3'-პრაიმ ბოლოში ჩამოცილებული აქვს გუანინი. გუანინის ნაკლებობა კრიტიკულია კვადრუპლექსის ფორმირებისთვის და თანმიმდევრობა ვეღარ წარმოქმნის კვადრუპლექსს. თავდაპირველად, წაკვეთილი თანმიმდევრობა ებმის პრაიმერის ბმის უბანს. როდესაც პოლიმერაზა პრაიმერს დაამატებს გუანინს, G3T თანმიმდევრობა თავისთავად ფორმირდება კვადრუპლექსად. რის შედეგადაც პრაიმერი იზოთერმულად სცილდება სამიზნე დნმ-ს და პრაიმერის ბმის უბანს თავისუფალია შემდეგი პრაიმერისთვის. ასევე, პრაიმერში ჩაკერებულია ფლურესცირებადი ნუკლეოტიდი (მაგ. 3-methylisoxanthopterin), რომელიც ხასიათდება ფლურესცენციული სიგნალის ძლიერი ზრდით კვადრუპლექსის ფორმირების შემდეგ, რაც სიგნალის თვლის მარტივ და ეფექტურ საშუალებას წარმოადგენს დამატებითი მთვლელი მოლეკულების გარეშე. კვლევების შედეგად ჩვენ შევქმენით ორპრაიმერიანი, ექსპონენციური QPA რეაქცია. რომელიც დნმ-ის ეფექტურ, სწრაფ და იზოთერმულ ამპლიფიკაციის საშუალებას გვაძლევს. აღნიშნული მეთოდით შესაძლებელია დნმ-ს სიგნალის  $10^{10}$ -ჯერ გაძლიერება, დაახლოებით 40 წუთში. QPA რეაქცია შესაძლებელია ფართოდ იქნას გამოყენებული ბიოსამედიცინო, მოლეკულური ბიოლოგიის, გენეტიკისა და სასამართლო ექსპერტიზის, გენეტიკური დაავადებებისა და პათოგენური მიკროორგანიზმების აღმოსაჩენად. ასევე, სამეცნიერო კვლევების პრაქტიკაში.

**ძირითადი საძიებო სიტყვები:** კვადრუპლექსი, QPA, დნმ, იზოთერმული ამპლიფიკაცია.

## Abstract

Quadruplex priming amplification (QPA) is a straightforward assay that allows isothermal amplification of DNA and possesses an intrinsic real-time detection mechanism. The key point of QPA is that a monomolecular DNA oligomer, GGGTGGGTGGGTGGG (G3T), is capable of forming a quadruplex structure with unusually high thermal stability. In contrast, the starting primer, which is a truncated version of G3T, is missing guanine residues critical for quadruplex formation. As a result the truncated sequence primes to primer binding site (PBS) without complication. When the polymerase adds the missing guanines, the extended primer spontaneously folds into a DNA quadruplex and the PBS is ready for the next priming event. In addition, primers containing fluorescent nucleotides, such as 3-methylisoxanthopterin, demonstrate a strong increase in fluorescence upon quadruplex formation, which permits simple and effective quantification without extra probe molecules. The intrinsic detection mechanism of QPA allows for further simplification of the assay by complete separation of the recognition step from the signal amplification. In contrast, all current detection mechanisms require the presence of probe molecules in the amplification reaction, since fluorescence signal is created upon hybridization of probes to amplicons. Here we demonstrate exponential version of isothermal QPA, which allows an unprecedented  $10^{10}$ -fold amplification of DNA signal in less than 40 min.

**Key Words:** Quadruplex, QPA, DNA, Isothermal amplification.

## მადლობა

მადლობას ვუხდით ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის ბიოფიზიკის ინსტიტუტისა და ოჰაიოს სახელმწიფო უნივერსიტეტის (აშშ) ქიმიისა და ბიოქიმიის დეპარტამენტის თანამშრომლებს თანადგომისათვის; მადლობა, ჩემს სამეცნიერო ხელმძღვანელებს პროფ. ბესიკ კანკიას და პროფ. ნუნუ მეტრეველს გაწეული დახმარებისთვის; მადლობა, შოთა რუსთაველის ეროვნულ სამეცნიერო ფონდს (გრანტები: DI/23/7-230/12 და YS/38/11-811/15) და „Bill & Melinda Gates Foundation“-ს (გრანტი: „The Grand Challenges in Global Health“), რომელთა დაფინანსებით სადოქტორო ნაშრომის ნაწილი შესრულდა ოჰაიოს სახელმწიფო უნივერსიტეტის ქიმიისა და ბიოქიმიის დეპარტამენტში (აშშ).

# სარჩევი

## 1. საწყისი გვერდები

### 1.1. თავფურცელი

### 1.2. განაცხადი ..... i

### 1.3. აბსტრაქტი ..... ii

### 1.4. მადლობა..... iv

### 1.5. სარჩევი..... v

#### 1.6. ცხრილების, გრაფიკებისა და სხვა ილუსტრაციების ჩამონათვალი ..... vii

##### 1.6.1. ცხრილების ჩამონათვალი..... vii

##### 1.6.2. გრაფიკების ჩამონათვალი..... viii

##### 1.6.3. ილუსტრაციების ჩამონათვალი ..... ix

### 1.7. აბრევიატურების ჩამონათვალი..... xi

## 2. ძირითადი ნაწილი..... 1

### 2.1. შესავალი..... 1

#### 2.2. სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა..... 5

##### 2.2.1. ნუკლეინის მჟავების ამპლიფიკაციის მეთოდები ..... 5

##### 2.2.2. ყულფოვანი იზოთერმული ამპლიფიკაცია (Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)) ..... 8

##### 2.2.3. ნუკლეინის მჟავის თანმიმდევრობაზე დაფუძნებული ამპლიფიკაცია (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA))..... 10

##### 2.2.4. ჯაჭვის ჩანაცვლებითი ამპლიფიკაცია (Strand Displacement Amplification (SDA)) ..... 12

##### 2.2.5. მოძრავ წრიული ამპლიფიკაცია (Rolling Circle Amplification (RCA))..... 13

2.2.6. მრავალჯერადი ჯაჭვის ჩანაცვლების ამპლიფიკაცია (Multiple Displacement Amplification (MDA)).....	15
2.2.7. ჰელიკაზა დამოკიდებული ამპლიფიკაცია (Helicase dependant amplification (HDA)).....	16
2.2.8. განშტოებადი ამპლიფიკაციის მეთოდი (Ramification amplification method (RAM)) .....	18
2.2.9. კვადრუპლექს პრაიმერული ამპლიფიკაცია (Quadruplex priming amplification (QPA)).....	20
<b>2.3. მეთოდოლოგია.....</b>	<b>25</b>
2.3.1. ულტრაიისფერი-ხილული სპექტროსკოპია.....	25
2.3.2. ულტრაიისფერ-ხილული სპექტრომეტრი .....	28
2.3.3. სპექტროფლურიმეტრია .....	28
2.3.4. ფლურიმეტრი.....	29
2.3.5. კვლევის პროცედურა .....	31
<b>2.4. შედეგები.....</b>	<b>33</b>
2.4.1. პრაიმერებისა და სამიზნე დნმ-ის შერჩევა ექსპონენციური QPA რეაქციისთვის .....	34
2.4.2. ფლურესცირებადი ნუკლეოტიდების შერჩევა .....	35
2.4.3. QPA პრაიმერი.....	36
2.4.4. კვადრუპლექსის გაშლა და რეპლიკაცია .....	37
2.4.5. ექსპონენციური QPA რეაქცია.....	41
<b>2.5. შედეგების ინტერპრეტაცია/დისკუსია.....</b>	<b>51</b>
<b>2.6. დასკვნა და რეკომენდაციები .....</b>	<b>53</b>
<b>3. გამოყენებული ლიტერატურის ჩამონათვალი/ბიბლიოგრაფია.....</b>	<b>54</b>

## 1.6. ცხრილების, გრაფიკებისა და სხვა ილუსტრაციების ჩამონათვალი

### 1.6.1. ცხრილების ჩამონათვალი

ცხრილი 1. ტიპიური ქრომოფორები და მათი მახასიათებლები .....	26
ცხრილი 2. ექსპონენციურ QPA რეაქციაში მონაწილე დნმ დუპლექსების ლღვობის ტემპერატურები (T <sub>m</sub> ).....	47



## 1.6.2. გრაფიკების ჩამონათვალი

გრაფიკი 1. QPA რეაქციის სიჩქარის დამოკიდებულება ტემპერატურაზე .....	36
გრაფიკი 2. ....	38
(A) კვადრუპლექსის პოლიმერაზული გაშლის სქემატური გამოსახულება;	
(B) კვადრუპლექსის გაშლის მრუდები სხვადასხვა ტემპერატურაზე;	
გრაფიკი 3. კვადრუპლექსის ფლურესცენციული ლღვობის მრუდები $K^+$ იონების სხვადასხვა კონცენტრაციაზე .....	39
გრაფიკი 4. ექსპონენციური QPA რეაქცია სხვადასხვა დნმ პოლიმერაზით .....	41
გრაფიკი 5. ნეგატიური კონტროლები სხვადასხვა პრაიმერებით .....	43
გრაფიკი 6. ექსპონენციური QPA სამიზნე დნმ-ის სხვადასხვა კონცენტრაციაზე .....	44
გრაფიკი 7. ექსპონენციური QPA რეაქცია მოკლე მეორე პრაიმერით, სამიზნე დნმ-ის სხვადასხვა კონცენტრაციებისთვის .....	45
გრაფიკი 8. ექსპონენციური QPA რეაქცია სტაბილიზირებული სამიზნე დნმ-ის სხვადასხვა კონცენტრაციებისთვის .....	46
გრაფიკი 9. პათოგენური რნმ-ის დეტექცია ექსპონენციური QPA რეაქციის გამოყენებით .....	49

### 1.6.3. ილუსტრაციების ჩამონათვალი

სურათი 1. პოლიმერაზულ ჯაჭვური რეაქციის სქემატური გამოსახულება .....	6
სურათი 2. ყულფოვანი იზოთერმული ამპლიფიკაციის (Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)) სქემატური გამოსახულება .....	8
სურათი 3. ნუკლეინის მჟავის თანმიმდევრობაზე დაფუძნებული ამპლიფიკაციის (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)) სქემატური გამოსახულება .....	10
სურათი 4. ჯაჭვის ჩანაცვლებითი ამპლიფიკაციის (Strand Displacement Amplification (SDA)) სქემატური გამოსახულება.....	12
სურათი 5. მოძრავ წრიული ამპლიფიკაციის (Rolling Circle Amplification (RCA)) სქემატური გამოსახულება .....	13
სურათი 6. მრავალჯერადი ჯაჭვის ჩანაცვლების ამპლიფიკაციის (Multiple Displacement Amplification (MDA)) სქემატური გამოსახულება.....	15
სურათი 7. ჰელიკაზა დამოკიდებული ამპლიფიკაციის (Helicase dependant amplification (HDA)) პროცესი.....	17
სურათი 8. განშტოებადი ამპლიფიკაციის მეთოდის (Ramification amplification method (RAM)) სქემატური გამოსახულება .....	18
სურათი 9. სხვადასხვა შემადგენლობისა და სტრუქტურის მქონე კვადრუპლექსები .....	20
სურათი 10. ფლურესცენციული მოლეკულები: 2AP, 6MI და 3MI. ....	21
სურათი 11.....	22
(A) პარალელური G3T კვადრუპლექსის სქემატური გამოსახულება;	
(B) 3MI-ის ქიმიური სტრუქტურა;	
(C) წრფივი QPA რეაქციის სქემატური გამოსახულება;	
სურათი 12. ელექტრონული გადასვლის ვარიანტები.....	27

სურათი 13. იაბლონსკის დიაგრამა.....	29
სურათი 14. ექსპონენციური QPA-ს ზოგადი სქემა.....	33
სურათი 15. მრავალ სინჯარიანი (Multi Tube) მოდელის სქემატური გამოსახულება .....	48

## 1.7. აბრევიატურების ჩამონათვალი

**G3T** - d(GGGTGGGTGGGTGGG)

**QPA** - კვადრუპლექს პრაიმერული ამპლიფიკაცია (Quadruplex Priming Amplification)

**PCR** - პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (Polymerase Chain Reaction)

**NASBA** – ნუკლეინის მჟავის თანმიმდევრობაზე დაფუძნებული ამპლიფიკაცია (Nucleic acid sequence-based amplification)

**LAMP** – ყულფოვანი ამპლიფიკაცია (Loop Mediated Isothermal Amplification)

**HDA** – ჰელიკაზა დამოკიდებული ამპლიფიკაცია (Helicase-dependent amplification)

**RCA** – მოძრავ წრიული ამპლიფიკაცია (Rolling circle amplification)

**RPA** – რეკომბინაზა პოლიმერაზული ამპლიფიკაცია (Recombinase polymerase amplification)

**MDA** – მრავალჯერადი ჯაჭვის ჩანაცვლების ამპლიფიკაცია (Multiple displacement amplification)

**SDA** – ჯაჭვის ჩანაცვლების ამპლიფიკაცია (Strand displacement amplification)

**RAM** – განშტოებადი ამპლიფიკაციის მეთოდი (Ramification amplification method)

**PBS** - პრაიმერის ბმის უბანი (Primer binding site)

**2AP** - 2-aminopurine

**6MI** - 6-methyl isoxanthopterin

**3MI** - 3-methyl isoxanthopterin

**dNTPs** - დეზოქსირიბონუკლეოტიდის ტრიფოსფატი

**MB** - მოლეკულური ბეკონი (Molecular beacons)

**ATP** - ადენოზინ ტრი ფოსფატი (Adenosine tri phosphate)

**დნმ** - დეზოქსირიბონუკლეინის მჟავა

**რნმ** - რიბონუკლეინის მჟავა

**UV-Vis** - ულტრაიისფერი-ხილული

**nt** - ნუკლეოტიდი (Nucleotides)

## 2. ძირითადი ნაწილი

### 2.1. შესავალი

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (Polymerase Chain Reaction (PCR)), არის მოლეკულურ-გენეტიკური მეთოდი, რომელიც დნმ-ის ფრაგმენტის ამპლიფიკაციის საშუალებას იძლევა. PCR აწარმოებს დნმ-ის სამიზნე ფრაგმენტის ასლების სინთეზს. აღნიშნული მეთოდი იყენებს დნმ-ის ორმაგი ჯაჭვების დენატურაციის და მათი ენზიმური რეპლიკაციის პროცედურებს, განმეორებადი თერმული ციკლების რეჟიმში. PCR-ის ძირითადი კომპონენტებია პრაიმერები, თერმოსტაბილური ფერმენტი დნმ-პოლიმერაზა და დეზოქსირიბონუკლეოტიდები. PCR მიმდინარეობს განსაზღვრული თერმული რეჟიმის პირობებში, რომელიც მოიცავს ციკლირების სამ თანმიმდევრულ ეტაპს: (i) დენატურაცია, ანუ დნმ-ის ორმაგი სპირალის გაღვობა დნმ-ის ერთმაგ ჯაჭვებად (პროცესი მიმდინარეობს  $\sim 95^{\circ}\text{C}$ ), (ii) ანილირება ანუ პრაიმერების სამიზნე დნმ-ის ჯაჭვთან ბმა (პროცესი მიმდინარეობს  $\sim 55^{\circ}\text{C}$ ) და (iii) ელონგაცია/ექსტენცია (Elongation/Extension), ანუ ორჯაჭვიანი დნმ-ს ფრაგმენტის აწყობა (პროცესი მიმდინარეობს  $\sim 72^{\circ}\text{C}$ ). PCR-ისთვის თერმული დამუშავების სამი ეტაპი (დენატურაცია-ანილირება-ელონგაცია) წარმოებს საშუალოდ 30-40 ციკლად. ტრადიციული PCR-ის გაუმჯობესებულ ვარიანტს წარმოადგენს ე.წ. რეალური დროის PCR (Real-Time PCR). რეალური დროის PCR-ის უპირატესობა იმაში მდგომარეობს, რომ ის ერთდროულად ახდენს საკვლევი დნმ-ის მოლეკულის ამპლიფიკაციას და მის რაოდენობრივ განსაზღვრას. რეალური დროის PCR-ის პროცედურები დაფუძნებულია ტრადიციული PCR-ის ზოგად პრინციპებზე და ახდენს ამპლიფიცირებული დნმ-ის რაოდენობის განსაზღვრას თითოეული ციკლის შემდეგ. PCR-ის მეთოდმა ფართო გამოყენება ჰპოვა, როგორც ბიოსამედიცინო, ისე მრავალი სხვა დარგის - მოლეკულური ბიოლოგიის, გენეტიკის და სასამართლო მეცნიერების, ინფექციური დაავადებების და სამეცნიერო კვლევების პრაქტიკაში. მიუხედავად PCR-ის ფართო გამოყენებისა, მეთოდს გააჩნია

თავისი ნაკლოვანი მხარეებიც, რაც გამოიხატება იმაში, რომ პროცესს სჭირდება მუდმივი ტემპერატურული ცვლილება, მიღებული პროდუქტი არის მცირე რაოდენობის (დაბალი ნაწილობრივი კონცენტრაცია) და პრაიმერები არის ძვირი.

უკანასკნელ წლების განმავლობაში ნუკლეინის მჟავების ამპლიფიკაციის მრავალი ალტერნატიული მეთოდების იქნა წარმოდგენილი. მათ შორის: ნუკლეინის მჟავის თანმიმდევრობაზე დაფუძნებული ამპლიფიკაცია (Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)), ყულფოვანი ამპლიფიკაცია (Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)), ჰელიკაზა დამოკიდებული ამპლიფიკაცია (Helicase-dependent amplification (HDA)), მოძრავ წრიული ამპლიფიკაცია (Rolling circle amplification (RCA)), რეკომბინაზა პოლიმერაზული ამპლიფიკაცია (Recombinase polymerase amplification (RPA)), მრავალჯერადი ჯაჭვის ჩანაცვლების ამპლიფიკაცია (Multiple displacement amplification (MDA)), ჯაჭვის ჩანაცვლების ამპლიფიკაცია (Strand displacement amplification (SDA)) და განშტოებადი ამპლიფიკაციის მეთოდი (Ramification amplification method (RAM)) (3, 8, 29, 34, 39, 49, 63, 66).

მიუხედავად იმისა, რომ ალტერნატიული მეთოდების მექანიზმები უფრო კომპლექსურია, ვიდრე PCR-ის. მათ მანიც აქვთ გაუმჯობესებული მგრძობელობა, PCR-ის შეზღუდვებთან მიმართებაში. ალტერნატიული მეთოდების უმეტესობა იზოთერმულია და PCR-ისგან განსხვავებით არ საჭიროებენ ტემპერატურულ ციკლებს, ან სწრაფი გათბობისა და გაციების მექანიზმებს. მიუხედავად ამისა, ახალი მეთოდები კვლავ მეცნიერულ კვლევებად რჩება. ამ მეთოდებს აქვთ PCR-ის ჩანაცვლების პოტენციალი. თუმცა, ჯერ არ მომხდარა მათთვის კომერციული სახის მიცემა.

რამდენიმე წლის წინ შეიქმნა დნმ-ის კვადრუპლექსებზე დაფუძნებული, ახალი, იზოთერმული მეთოდი დნმ-ის სიგნალის გაძლიერებისთვის (37). დნმ-ის მოკლე, გუანინით მდიდარ თანმიმდევრობებს აქვთ უნარი წარმოქმნან G-კვარტეტები, კვადრუპლექსები (37). კვადრუპლექსის ფორმირება საჭიროებს ლითონის კათიონებს. კვადრუპლექსი თერმოდინამიკურად უფრო სტაბილურია, ვიდრე იგივე თანმიმდევრობის დუპლექსი. ეს თვისება შესაძლებელს ხდის მათ გამოყენებას დნმ-ის იზოთერმული ამპლიფიკაციის რეაქციაში (quadruplex priming amplification (QPA)) (37).

QPA არის PCR-ის ალტერნატიული, იზოთერმული მეთოდი. QPA რეაქციაში პრაიმერი არის d(GGGTGGGTGGGTGGG) - G3T თანმიმდევრობა, რომელსაც 3' - პრაიმ ბოლოში ჩამოცილებული აქვს გუანინი, ასეთი თანმიმდევრობა ვერ წარმოქმნის კვადრუპლექსს. ეს თვისება წარმოადგენს QPA რეაქციის მუშაობის მთავარ მექანიზმს. საწყის ეტაპზე, პრაიმერი უკავშირდება პრაიმერის ბმის უბანს (primer binding site (PBS)), ელონგაციის შემდეგ, როდესაც პოლიმერაზა პრაიმერს მიაბამს გუანინს, ის თავისთავად ფორმირდება კვადრუპლექსად. კვადრუპლექსად ფორმირების შედეგად პრაიმერი თავისთავად, იზოთერმულად, სცილდება სამიზნე დნმ-ს და ათავისუფლებს PBS-ს შემდეგი პრაიმერისთვის. ეს შესაძლებელს ხდის პრაიმერების სრულ გამოყენებას, რადგან სამიზნე დნმ ყოველთვის თავისუფალია პრაიმერთან დასაკავშირებლად. QPA რეაქცია ასევე იყენებს კვადრუპლექსის კიდევ ერთ თვისებას, თუ G3T თანმიმდევრობაში, ყულფის პოზიციაში ჩავაკერებთ ფლურესცირებად ნუკლეოტიდს (მაგ.: 2-aminopurine (2AP); 6-methylisoxanthopterin (6MI); ან 3-methylisoxanthopterin (3MI)), ფორმირებული კვადრუპლექსი გვაძლევს გაზრდილ ფლურესცენციულ სიგნალს (37). როდესაც ფლურესცირებადი ნუკლეოტიდი ჩაბმულია დნმ-ის ერთმაგ ჯაჭვში, ან დუპლექსში მისი მეზობელი ნუკლეოტიდები ახშობენ ფლურესცირებად სიგნალს. ხოლო, კვადრუპლექსის ფორმირების შემდეგ, გამონთავისუფლდება რა ნუკლეოტიდებისგან, მისი ფლურესცირება იზრდება, რაც კვადრუპლექსის დაფიქსირების მარტივ საშუალებას წარმოადგენს. მათი გამოყენებით შესაძლებელი ხდება, QPA რეაქციის რეალურ დროში დაკვირვება. QPA რეაქციაში G3T თანმიმდევრობა ერთდროულად პრაიმერიცაა და მთვლელი მოლეკულაც, რაც ამ მეთოდის კიდევ ერთი უპირატესობაა.

ჩვენი კვლევის მიზანი იყო, ექსპონენციური QPA რეაქციის მეშვეობით შეგვექმნა დნმ-ს დეტექციისა და ამპლიფიკაციის სწრაფი, ეფექტური მეთოდი. ჩვენ შევიმუშავეთ დნმ-ის სწრაფი გამრავლების იზოთერმული მეთოდი, ექსპონენციური QPA რეაქცია (58). ეს რეაქცია საჭიროებს ორ პრაიმერს: (i) QPA-პრაიმერი (G3T-ის წაკვეთილი თანმიმდევრობა, ფლურესცირებადი ნუკლეოტიდით ყულფის პოზიციაში), რომელსაც აქვს უნარი, კვადრუპლექსად ფორმირების შემდეგ, თავისთავად დისოცირდეს სამიზნე

დნმ-ს და (ii) ე.წ. მეორე პრაიმერი, რომელიც QPA-პრაიმერის ბმის უბნის გამრავლების საშუალებას იძლევა. თავდაპირველად ხდება QPA-პრაიმერის სამიზნე დნმ-თან ბმა და მისი რეპლიკაცია. კვადრუპლექსის ფორმირების შემდეგ, პრაიმერის ბმის უბანს უკავშირდება შემდეგი QPA-პრაიმერი და პოლიმერაზას მეშვეობით მიმდინარეობს ჯაჭვის ჩანაცვლების რეაქცია. ჩანაცვლებული ამპლიკონი შეიცავს მეორე პრაიმერის ბმის უბანს. მეორე პრაიმერის ბმის და ელონგაციის შედეგად ვიღებთ ჩვენს საწყის სამიზნე დნმ-ს, რომელსაც აქვს პრაიმერის ბმის უბანი QPA-პრაიმერისთვის. შედეგად ვიღებთ რეაქციას ორი პრაიმერით და მათი შესაბამისი ბმის უბნებით. ამის შემდეგ რეაქცია მიმდინარეობს ექსპონენციურად. ჩვენ ვაჩვენეთ, რომ აღნიშნული იზოთერმული მეთოდით შესაძლებელია ატომოლარული კონცენტრაციის სამიზნე დნმ-ის დეტექცია და ამპლიფიკაცია დაახლოებით 40 წუთში.

სადისერტაციო ნაშრომი ეძღვნება იზოთერმული, ორპრაიმერიანი ექსპონენციური კვადრუპლექს პრაიმერული ამპლიფიკაციის მეთოდის შემუშავებას, რომელსაც აქვს რამდენიმე საფეხური. თითოეულ საფეხურს აქვს თავისი შეზღუდვა, რომლის გადალახვაც მოგვიწია აღნიშნული მეთოდის შემუშავების პერიოდში.



## 2.2 სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა

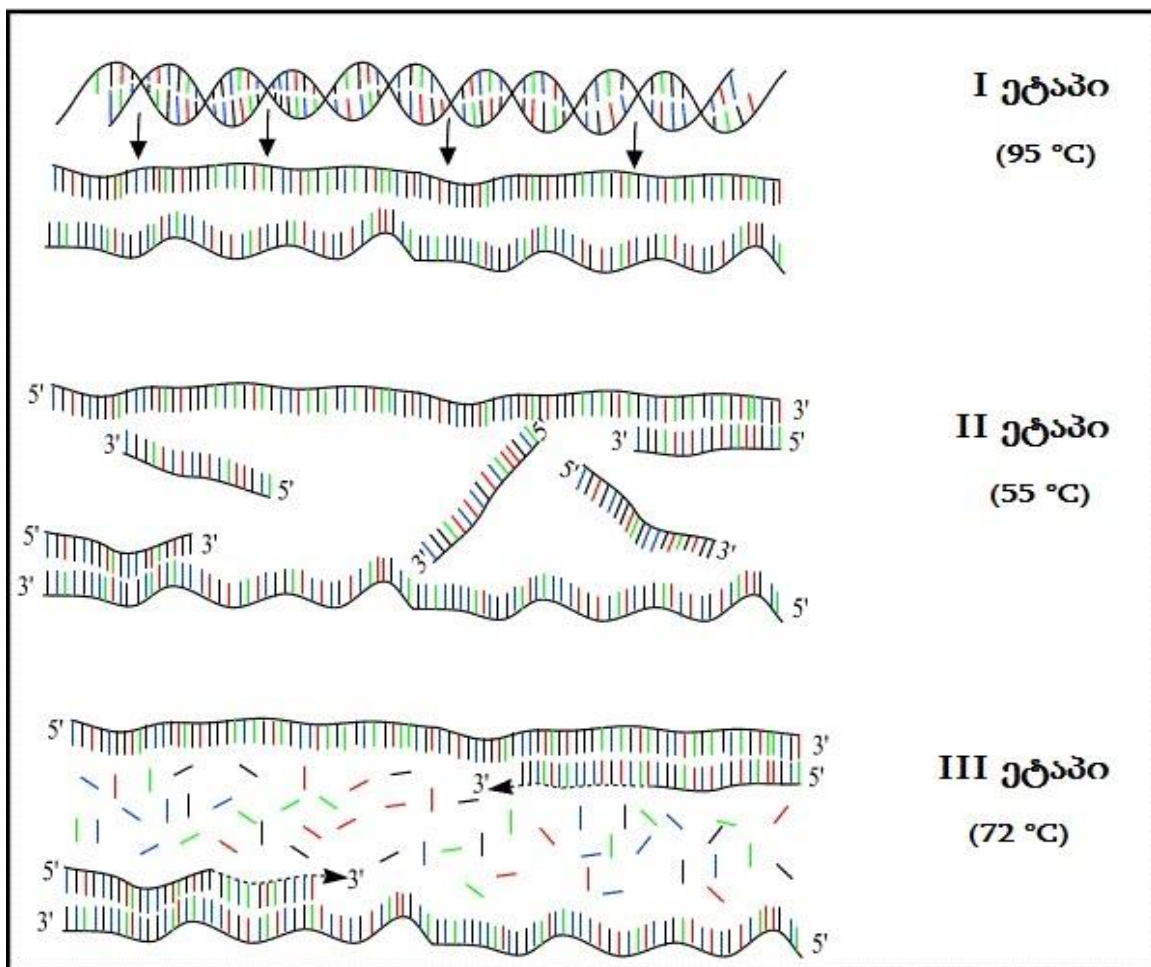
### 2.2.1. ნუკლეინის მჟავების ამპლიფიკაციის მეთოდები

ნუკლეინის მჟავების ამპლიფიკაცია მნიშვნელოვანი მეთოდია არა მხოლოდ ფუნდამენტურ კვლევებში, არამედ ფართოდ გამოიყენება სხვადასხვა სფეროებშიც: კლინიკური მედიცინის განვითარება, ინფექციური დაავადებების დიაგნოზირება, გენური კლონირება და სამრეწველო ხარისხის კონტროლი, სასამართლო მეცნიერებები.

პოლიმერაზულ ჯაჭვური რეაქცია (Polymerase chain reaction (PCR)) არის პირველი მეთოდი, რომელიც შეიქმნა ნუკლეინის მჟავების აპლიფიკაციისათვის, მულისის (Mullis) მიერ (46) და დღესაც რჩება ამპლიფიკაციის მთავარ მეთოდად. PCR არის სასურველი მეთოდი ისეთ სფეროებში, რომელიც დაკავშირებულია ნუკლეინის მჟავების ამპლიფიკაციასთან. მისი სიმარტივის, ადვილი მეთოდოლოგიის, რეაგენტებისა და ხელსაწყოების ხელმისაწვდომობის გამო.

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია არის მოლეკულურ-გენეტიკური მეთოდი, რომელიც დნმ-ის ფრაგმენტის ამპლიფიკაციის საშუალებას იძლევა. PCR აწარმოებს დნმ-ის სამიზნე ფრაგმენტის ასლების სინთეზს. აღნიშნული მეთოდი იყენებს დნმ-ის ორმაგი ჯაჭვების დენატურაციის და მათი ენზიმური რეპლიკაციის პროცედურებს განმეორებადი თერმული ციკლის რეჟიმში. PCR-ის ძირითადი კომპონენტებია პრაიმერები, თერმოსტაბილური ფერმენტი დნმ-პოლიმერაზა და დეზოქსირიბონუკლეოტიდები. PCR მიმდინარეობს განსაზღვრული თერმული რეჟიმის პირობებში, რომელიც მოიცავს ციკლირების სამ თანმიმდევრულ ეტაპს (სურ. 1): დენატურაცია, ანუ დნმ-ის ორმაგი ჯაჭვის გაღვობა დნმ-ის ერთმაგ ჯაჭვებად (პროცესი მიმდინარეობს  $\sim 95^{\circ}\text{C}$ ), ანილირება, ანუ პრაიმერების სამიზნე დნმ-ის ჯაჭვთან ბმა (პროცესი მიმდინარეობს  $\sim 55^{\circ}\text{C}$ ) და ელონგაცია/ექსტენსია (Elongation/Extension), ანუ ორჯაჭვიანი დნმ-ს ფრაგმენტის აწყობა (პროცესი მიმდინარეობს  $\sim 72^{\circ}\text{C}$ ). PCR-ისთვის თერმული დამუშავების სამი ეტაპი (დენატურაცია-ანილირება-ელონგაცია) წარმოებს

საშუალოდ 30-40 ციკლად. ტრადიციული PCR-ის ალტერნატივას წარმოადგენს ე.წ. რეალური დროის PCR (Real-Time PCR). რეალური დროის PCR-ის უპირატესობა იმაში მდგომარეობს, რომ ის ერთდროულად ახდენს საკვლევი დნმ-ის მოლეკულის ამპლიფიკაციას და მის რაოდენობრივ განსაზღვრას. რეალური დროის PCR-ის პროცედურები დაფუძნებულია ტრადიციული PCR-ის ზოგად პრინციპებზე და ახდენს ამპლიფიცირებული დნმ-ის რაოდენობის განსაზღვრას თითოეული ციკლის შემდეგ. PCR-ის მეთოდმა ფართო გამოყენება ჰპოვა როგორც ბიოსამედიცინო, ისე მრავალი სხვა დარგის - მოლეკულური ბიოლოგიის, გენეტიკის და სასამართლო მეცნიერების, ინფექციური დაავადებების და სამეცნიერო კვლევების პრაქტიკაში, მაგრამ PCR-ს გააჩნია თავისი ნაკლოვანი მხარეებიც, რაც გამოიხატება იმაში, რომ პროცესს სჭირდება მუდმივი ტემპერატურული ცვლილება, მიღებული პროდუქტი არის ძალიან ცოტა და



სურათი 1. პოლიმერაზულ ჯაჭვური რეაქციის სქემატური გამოსახულება.

პრაიმერები არის ძვირი.

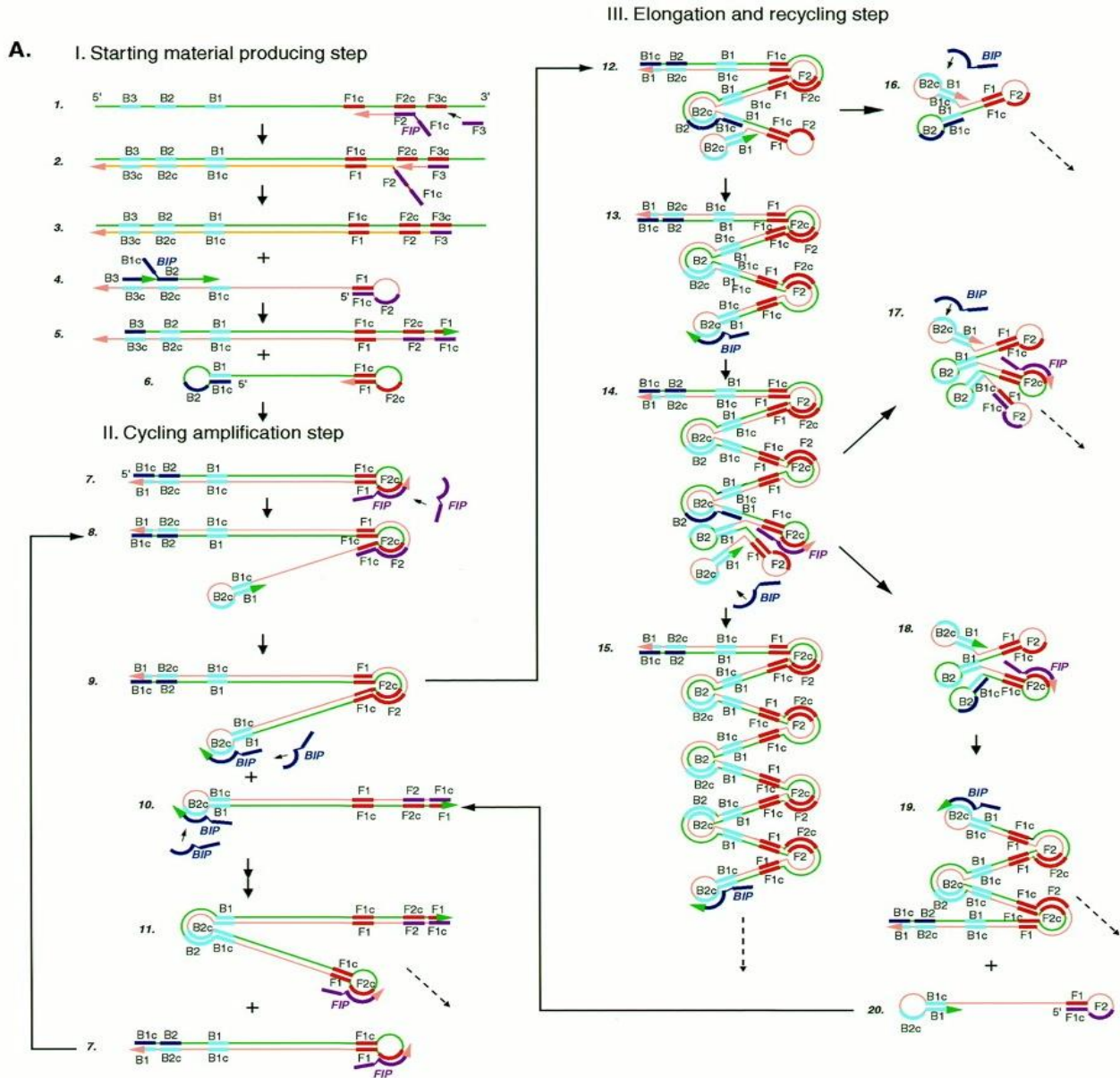
მიუხედავად PCR-ის ფართოდ გამოყენებისა, მას გააჩნია გარკვეული შეზღუდვებიც, საჭიროებს ძვირად ღირებულ ხელსაწყოებს, აქვს მრავალ კონპონენტური დეტექციის მეთოდი და საჭიროებს თერმულ ციკლებს (34). სწორედ ამიტომ, დღესდღეობით აქტიურად მიმდინარეობს კვლევები დნმ-ის ამპლიფიკაციისთვის ახალი მეთოდოლოგიების შემუშავებაში.

უკანასკნელ წლებში ნუკლეინის მჟავების ამპლიფიკაციის მრავალი ალტერნატიული მეთოდი იქნა წარმოდგენილი. მათ შორის: ნუკლეინის მჟავის თანმიმდევრობაზე დაფუძნებული ამპლიფიკაცია (Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)), ყულფოვანი ამპლიფიკაცია (Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)), ჰელიკაზა დამოკიდებული ამპლიფიკაცია (Helicase-dependent amplification (HDA)), მოძრავ წრიული ამპლიფიკაცია (Rolling circle amplification (RCA)), რეკომბინაზა პოლიმერაზული ამპლიფიკაცია (Recombinase polymerase amplification (RPA)), მრავალჯერადი ჯაჭვის ჩანაცვლების ამპლიფიკაცია (Multiple displacement amplification (MDA)), ჯაჭვის ჩანაცვლების ამპლიფიკაცია (Strand displacement amplification (SDA)) და განშტოებადი ამპლიფიკაციის მეთოდი (Ramification amplification method (RAM)) (3, 8, 29, 34, 39, 49, 63, 66).

მიუხედავად იმისა, რომ ალტერნატიული მეთოდების მექანიზმები უფრო კომპლექსურია, ვიდრე PCR-ის. მათ მანიც აქვთ გაუმჯობესებული მგრძობელობა, PCR-ის შეზღუდვებთან მიმართებაში. ალტერნატიული მეთოდების უმეტესობა იზოთერმულია და PCR-ისგან განსხვავებით არ საჭიროებენ ტემპერატურულ ციკლებს, ან სწრაფი გათბობისა და გაციების მექანიზმებს. თუმცა, ახალი მეთოდები, კვლავ მეცნიერულ კვლევებად რჩება. ამ მეთოდებს აქვთ PCR-ის ჩანაცვლების პოტენციალი, მაგრამ ჯერ არ მომხდარა მათთვის კომერციული სახის მიცემა.

2.2.2. ყულფოვანი იზოთერმული ამპლიფიკაცია (Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP))

LAMP არის ნუკლეინის მჟავების ამპლიფიკაციის სპეციფიკური, მარტივი, სწრაფი და ეფექტური იზოთერმული მეთოდი. LAMP-ს აქვს ამპლიკონების თვლის გაუმჯობესებული, მარტივი სისტემა. LAMP-ის დნმ-ის სინთეზის პროცესი ეყრდნობა



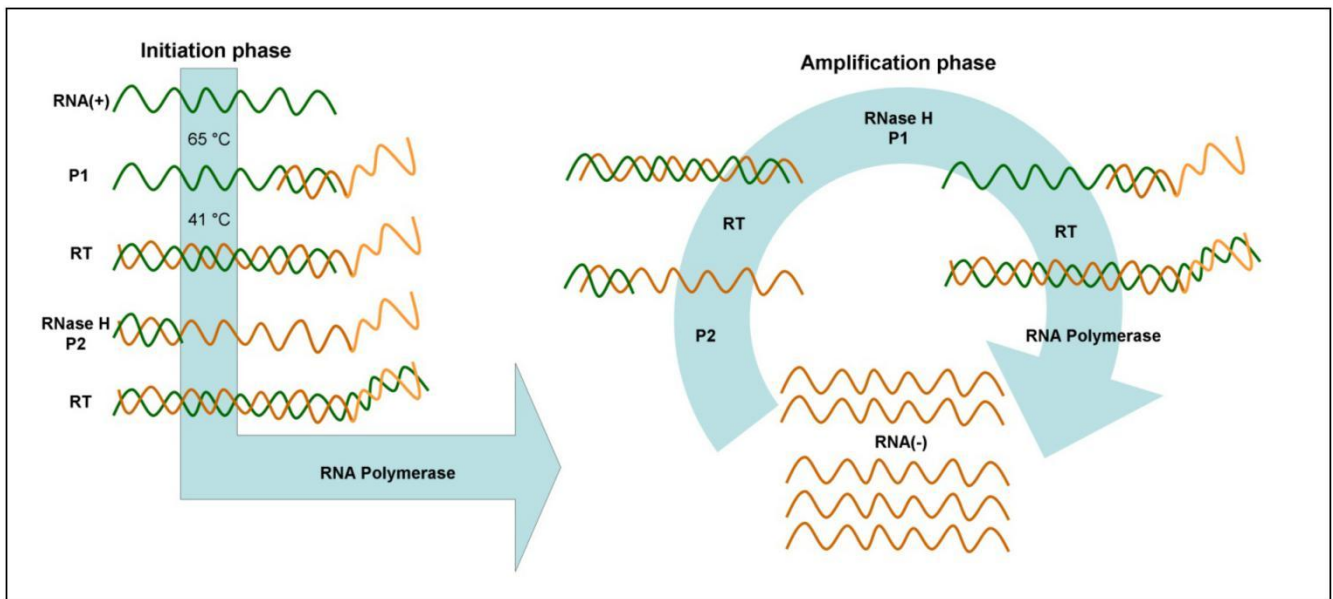
სურათი 2. ყულფოვანი იზოთერმული ამპლიფიკაციის (Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)) სქემატური გამოსახულება.

ავტომატურად ციკლირებად ჯაჭვის ჩანაცვლების რეაქციას, რომელიც ხორციელდება 60-65°C-ზე დაახლოებით 45-60 წთ-ის განმავლობაში. LAMP მეთოდი იყენებს დნმ პოლიმერაზას ჯაჭვის ჩანაცვლების მაღალი უნარით (*Bacillus stearothermophilus* (Bst)),

დეზოქსირიბონუკლეოტიდის ტრიფოსფატს (dNTPs), სპეციალურ პრაიმერებსა და სამიზნე დნმ-ს. სფეციფიკური ოთხი პრაიმერი (ორი შიდა და ორი გარე პრაიმერი) ამოიცნობს და უკავშირდება სამიზნე დნმ-ის ექვს განსხვავებულ უბანს. LAMP ამპლიფიკაციის რეაქცია ხორციელდება სამ ნაბიჯად: (i) საწყისი მასალის შექმნა (Production of starting material), (ii) ციკლირებადი ამპლიფიკაცია (cycling amplification) და (iii) ელონგაცია და რეაქციის გამეორება (elongation and recycling) (სურ. 2) (49). მაღალი სიზუსტის მიღწევა შესაძლებელია დამატებითი ძვირადღირებული ტექნიკის გარეშე. ნიმუშის მომზადება ხდება შედარებით მარტივად ვიდრე PCR-სა და რეალური დროის PCR-ში. LAMP კლინიკური ნიმუშების დაბინძურების მიმართ მაღალი გამძლეობით ხასიათდება და რეაქციისთვის არ საჭიროებს დნმ-ის დამატებით გასუფთავებას, PCR-სგან განსხვავებით (48). უკუ ტრანსკრიპტაზას კომბინირებით, LAMP-ს მაღალი ეფექტურობით შეუძლია რნმ-ის თანმიმდევრობის ამპლიფიკაცია. მეთოდი გამოირჩევა მაღალი მგრძობელობით და სარეაქციო არეში მცირე რაოდენობის სამიზნე დნმ-ის დეტექტირების უნარით (49). LAMP-ს გააჩნია პოტენციალი, მედიცინასა და ფარმაციის ფუნდამენტურ კვლევებში, ასევე ინფექციური დაავადებების კვლევებში და დიაგნოსტიკის ეფექტური მეთოდების შემუშავებაში (17). LAMP-ის გამოყენება შესაძლებელია, როგორც დნმ-ის, ასევე რნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის განსაზღვრისათვის (15, 16).

**2.2.3. ნუკლეინის მჟავის თანმიმდევრობაზე დაფუძნებული ამპლიფიკაცია (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA))**

NASBA არის იზოთერმული, ტრანსკრიფციაზე-დაფუძნებული ამპლიფიკაციის მეთოდი სპეციალურად შემუშავებული რნმ-ის და დნმ-ის ცალ-ჯაჭვიანი თანმიმდევრობებისთვის, ამპლიფიკაციისთვის. ეს მეთოდი პირველად წარმოდგინა კომპტონმა (Compton) 1991 წელს (8). რეაქცია მიმდინარეობს წინასწარ განსაზღვრულ



**სურათი 3. ნუკლეინის მჟავის თანმიმდევრობაზე დაფუძნებული ამპლიფიკაციის (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)) სქემატური გამოსახულება.**

მუდმივ ტემპერატურაზე, 41 °C-ზე. ამპლიფიკაციის რეაქციაში უკუტრანსკრიპციის (reverse transcription) აქტივობის ინტეგრირებით, შემუშავდა მეთოდი სხვადასხვა რნმ-სთვის: რიბოსომული, სატრანსპორტო, ინფორმაციული და გენომური რნმ (12).

NASBA იყენებს ორ, სამიზნეზე უბანზე მორგებულ, რნმ პრაიმერს და სამ ენზიმს (ფერმენტს) (Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase (AMV RT), T7 DNA-dependent RNA polymerase (DdRp) და RNase H.)

სტანდარტული NASBA-ს რნმ-ის ამპლიფიკაცია მიმდინარეობს შემდეგნაირად (სურ. 3): პირველ ეტაპზე ხდება რნმ-ის ინკუბაცია 65 °C-ზე, სამიზნე მოლეკულის

დენატურირებისთვის ენზიმის დამატების წინ. ამის შემდეგ რეაქცია მიმდინარეობს მუდმივ 41 °C ტემპერატურაზე. ინიციაციის ფაზაში, სპეციფიკური პრაიმერი (P1), რომლის 5' პრაიმ ბოლო არის T7 DdRp-ს პრომოტორული უბანი, უკავშირდება სამიზნე რნმ-ს და ხდება მისი დაგრძელება უკუტრანსკრიპტაზას მიერ. შედეგად მიღებული რნმ:დნმ ჰეტეროდუპლექსს RNase H შლის, ხოლო სპეციფიკური უკუ-პრაიმერი (reverse primer) (P2) ებმის მის კომპლემენტარულ უბანს და უკუტრანსკრიპტაზა ახდენს მისი ელონგაციას. შედეგად ვიღებთ ორჯაჭვიან დნმ-ს რომელსაც აქვს სამიზნე თანმიმდევრობა და T7 პრომოტორული უბანი. ამპლიფიკაციის ფაზა, T7 DdRp ქმნის საწყისი სამიზნე მოლეკულის კომპლემენტარულ რნმ-მოლეკულებს. ამ ეტაპზე ხდება ყოველი ახლად სინთეზირებული რნმ-ის ასლების გამრავლება, ექსპონენციური ამპლიფიკაციის შედეგად ვიღებთ საწყისი სამიზნე ნიმუშის კომპლემენტარულ რნმ მოლეკულებს. მიღებული პროდუქტის დეტექტირება ხდება ჰიბრიდიზაციაზე დაფუძნებული მეთოდებით (ECL, LFA, ECD) (9, 50, 55, 60).

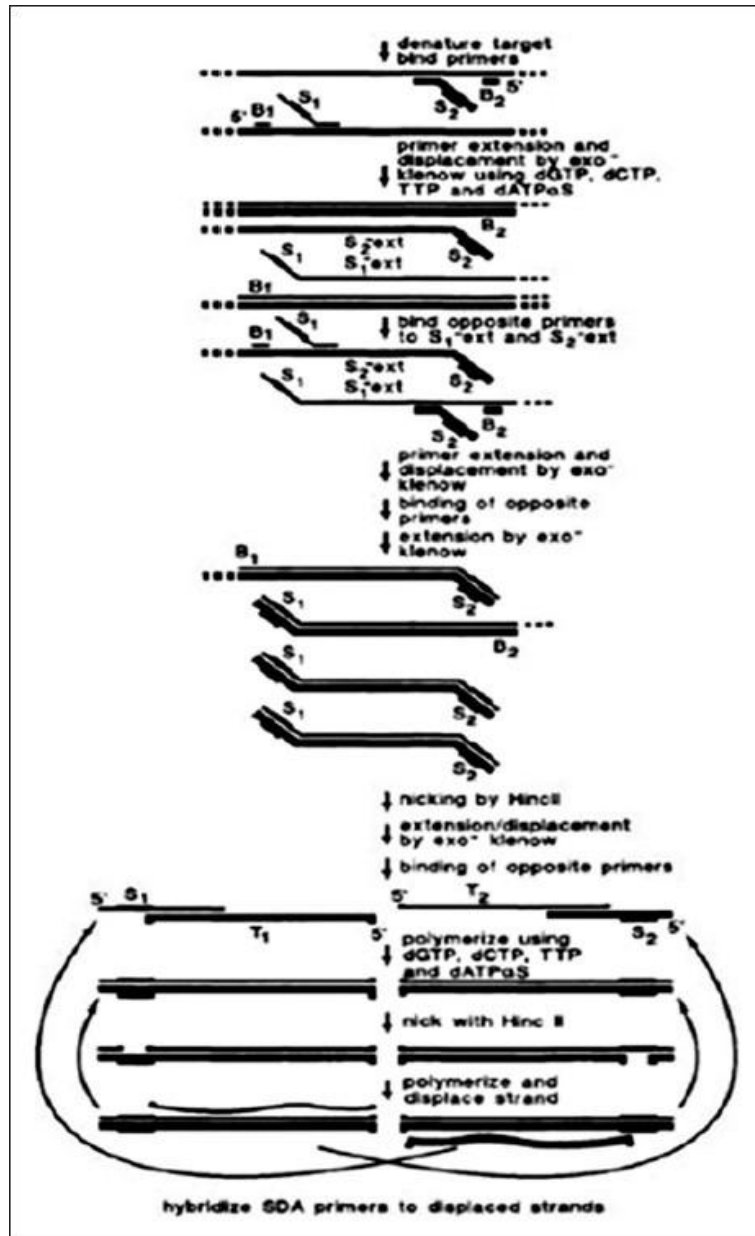
ასევე, შეიძლება გამოყენებულ იქნას დეტექციის მეთოდი მოლეკულური ბეკონით (molecular beacons) (MB) (68). MB არის ნუკლეინის მჟავის ერთ ჯაჭვიანი ყულფი, ბოლოებზე მიმაგრებული ფლუოროფორი (fluorophore) და მისი შესაბამისი ჩამხშობი (quencher) მოლეკულებით (65). ყულფის მდგომარეობაში ფლუოროფორი და ჩამქრობი ერთმანეთთან იმდენად ახლოს არიან, რომ ფლურესცენცია ჩახშობილია (64). MB-ს დაკავშირებით ამპლიფიცირებულ პროდუქტთან, ფლუოროფორი და ჩამხშობი ერთმანეთს დაშორდება და ვიღებთ ფლურესცენციულ სიგნალს. MB-ის გამოყენებით შესაძლებელია NASBA-ის რეალურ დროში დაკვირვება. ასევე, ფლურესცენციული სიგნალი მიღებული რნმ პროდუქტის რაოდენობის პროპორციულია (24, 47).



## 2.2.4. ჯაჭვის ჩანაცვლებითი ამპლიფიკაცია (Strand Displacement Amplification (SDA))

პირველად SDA მეთოდი აღწერილ იქნა 1992 წელს (63). მეთოდი იყენებს ოთხ განსხვავებულ პრაიმერს და ორ დნმ პოლიმერაზას. SDA-ს თითოეული ციკლი შედგება:

1. პრაიმერის ბმა სამიზნე დნმ-თან, პრაიმერი რესტრიქციული უბნით (უბანი რომლის



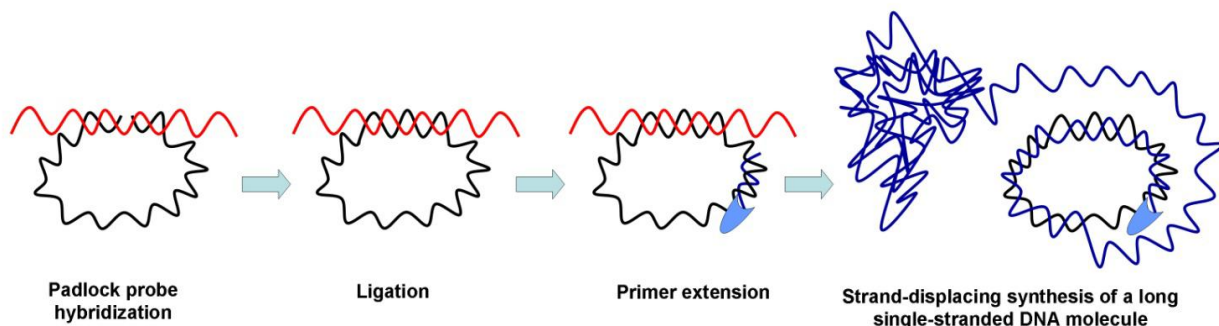
სურათი 4. ჯაჭვის ჩანაცვლების ამპლიფიკაციის (Strand Displacement Amplification (SDA)) სქემატური გამოსახულება.



მიმართაც აქტიურია HincII ეგზონუკლეაზა) უკავშირდება სამიზნე დნმ-ს, 2. პრაიმერი/სამიზნე დნმ-ის კოპლექსის ელონგაცია დნმ პოლიმერაზა exo-Klenow-ს მიერ, 3. HincII ეგზონუკლეაზას მიერ დნმ-ის ჯაჭვის გაჭრა, 4. HincII ეგზონუკლეაზას დისოციაცია ჭრის უბნიდან და 5. მოჭრილი უბნის ელონგაცია და ჯაჭვის ჩანაცვლება (სურ. 4) (62). ეს რეაქცია მიმდინარეობს მაღალ ტემპერატურაზე. რეაქციის შედეგად დაახლოებით ერთ საათში შეგვიძლია მივიღოთ სამიზნე დნმ-ის  $10^9$  ასლი. SDA ეფექტურად ვერ ახდენს გრძელი სამიზნე დნმ-ის აპლიფკაციას, რაც ამ მეთოდის მთავარი შეზღუდვას წარმოადგენს (63). SDA-ს ბაზაზე შექმნილია სხვადასხვა დეტექციის ტესტირების კომერციული მეთოდები (მაგ.: BDProbeTec (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)). ასევე არის კვლევები, ამ მეთოდის გამოყენებაზე *Mycobacterium tuberculosis* აღმოსაჩენად, პირდაპირ კლინიკური ნიმუშებიდან (42). ამ მეთოდის ეფექტურობა კვლავ რჩება კვლევის საგნად, მის ფართო სამედიცინო კვლევებში გამოყენებისთვის.

### 2.2.5. მოძრავ წრიული ამპლიფიკაცია (Rolling Circle Amplification (RCA))

RCA არის ნუკლეინის მუკვების ამპლიფიკაციის კიდევ ერთი მეთოდი (39, 53, 54, 67). ამ მეთოდით შესაძლებელია სამიზნე დნმ-ის თანმიმდევრობის  $10^9$ -ჯერადი



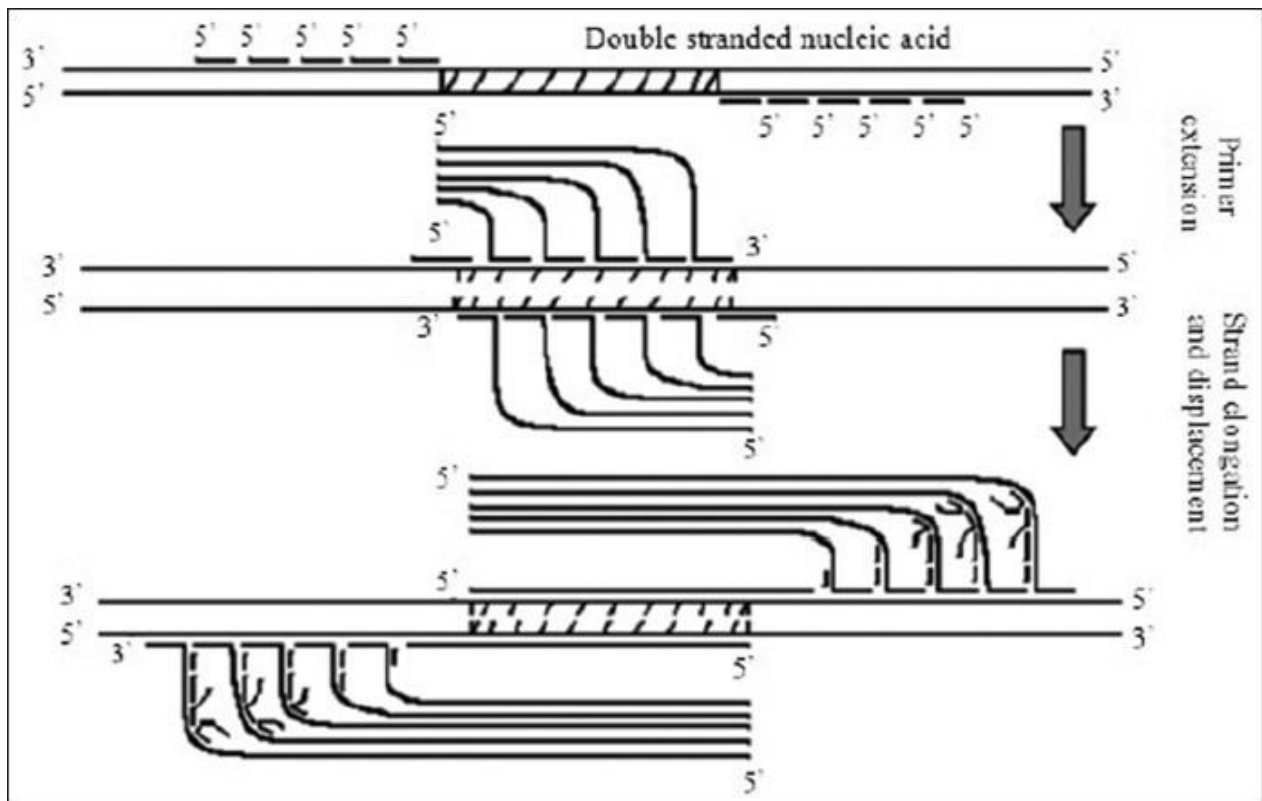
სურათი 5. მოძრავ წრიული ამპლიფიკაციის (Rolling Circle Amplification (RCA)) სქემატური გამოსახულება.

ამპლიფიკაცია როგორც თხევად, ასევე ზედაპირზე დაფიქსირებულ მეთოდებით, მუდმივ ტემპერატურაზე. მას აქვს უნარი დააფიქსიროს რამდენიმე სპეციფიკური, წრიული სამიზნე დნმ, სატესტო ნიმუშში. RCA რეაქციაში ჩართულია იზოთერმული ენზიმატიკური სინთეზის მრავალი ფაზა.  $\phi 29$  დნმ-პოლიმერაზა მუდმივად ახდენს წრიულად-ჰიბრიდიზებული პრაიმერის დაგრძელებას წრიული სამიზნე დნმ-ის გარშემო, შედეგად ვიღებთ განმეორებად, სამიზნე დნმ-ის კომპლემენტარულ, ოლიგონუკლეოტიდურ თანმიმდევრობას (სურ. 5) (7, 13). RCA მეთოდი ნაკლებად მგრძნობიარეა დაბინძურების მიმართ, რაც მისი მთავარი უპირატესობა PCR-თან შედარებით. ხოლო, სხვა იზოთერმული ამპლიფიკაციის მეთოდებისგან განსხვავებით, იგი ან სრულებით არ საჭიროებს, ან საჭიროებს მცირე ოპტიმიზაციას. RCA მეთოდს გააჩნია საგრძნობი უპირატესობები ზედაპირზე დაფიქსირებული ამპლიფიკაციის მეთოდებთან შედარებით, *in situ* ან მიკროარეის (microarray) მეთოდებთან შედარებით. წრფივ RCA რეაქციაში ამპლიფიკაციის შედეგად მიღებული პროდუქტი რჩება მიზნული სამიზნე დნმ-თან. RCA ასევე თავსებადია უჯრედებსა და ქსოვილებზე დაფუძნებულ მეთოდებთან, მეთოდის იზოთერმულ ხასიათიდან გამომდინარე და ერთდროულად სხვადასხვა მარკერის ლოკალიზაციის უნარით. RCA ასევე გამოყენებადია იმ შემთხვევებში, როდესაც მნიშვნელოვანია მორფოლოგიური ინფორმაციის შენარჩუნება. RCA იძლევა სიგნალების ლოკალიზაციას შესაძლებლობას. ამგვარად ახასიათებს ცალკეულ მოლეკულებს კონკრეტული გენეტიკური მახასიათებლებით (7, 71), ან ბიოქიმიური მახასიათებლებით (54, 67). RCA რეაქციები აჩვენებს შესანიშნავ სპეციფიურობას დნმ-ის თანმიმდევრობის მიმართ, რაც ხელსაყრელია გენოტიპირებისათვის ან მუტაციის გამოვლენისთვის და საშუალებას იძლევა ცალსახად მოახდინოს დნმ-ის მარკერების იდენტიფიკაცია (45). PCR-თან შედარებით, RCA დნმ-ის დიაგნოსტიკა არის უფრო მრავალფეროვანი და ამპლიფიკაციის დროს დაშვებული შეცდომები შემცირებულია, ასე რომ სამიზნე მოლეკულების დაბინძურების მიმართ მეტად რეზისტენტული რეაქცია ადვილად გამოსაყენებელია ტესტირების სხვადასხვა მეთოდებში. RCA ტექნოლოგიის სიმარტივე და ეფექტურობა, რაოდენობრივ

განსაზღვრის სიზუსტესთან ერთად, შესაძლებელს ხდის მის გამოყენებას მაღალი ხარისხის მქონე მინიატურულ და ავტომატიზირებულ ანალიზებში (25).

### 2.2.6. მრავალჯერადი ჯაჭვის ჩანაცვლების ამპლიფიკაცია (Multiple Displacement Amplification (MDA))

MDA არის მთლიანი გენომის ამპლიფიცირების იზოთერმული მეთოდი, რომელსაც აქვს მცირე რაოდენობის დნმ-ის მოლეკულების ამპლიფიკაციის უნარი (11). MDA იყენებს როგორც შემთხვევით შერჩეულ მოდიფიცირებულ პრაიმერებს, ასევე φ29 დნმ-პოლიმერაზას ჯაჭვის ჩანაცვლების უნარს. ამ მეთოდით შესაძლებელია 70 kb სიგრძის დნმ-ის თანმიმდევრობის ამპლიფიკაცია (5), თერმული ციკლების გარეშე.



სურათი 6. მრავალჯერადი ჯაჭვის ჩანაცვლების ამპლიფიკაციის (Multiple Displacement Amplification (MDA)) სქემატური გამოსახულება.

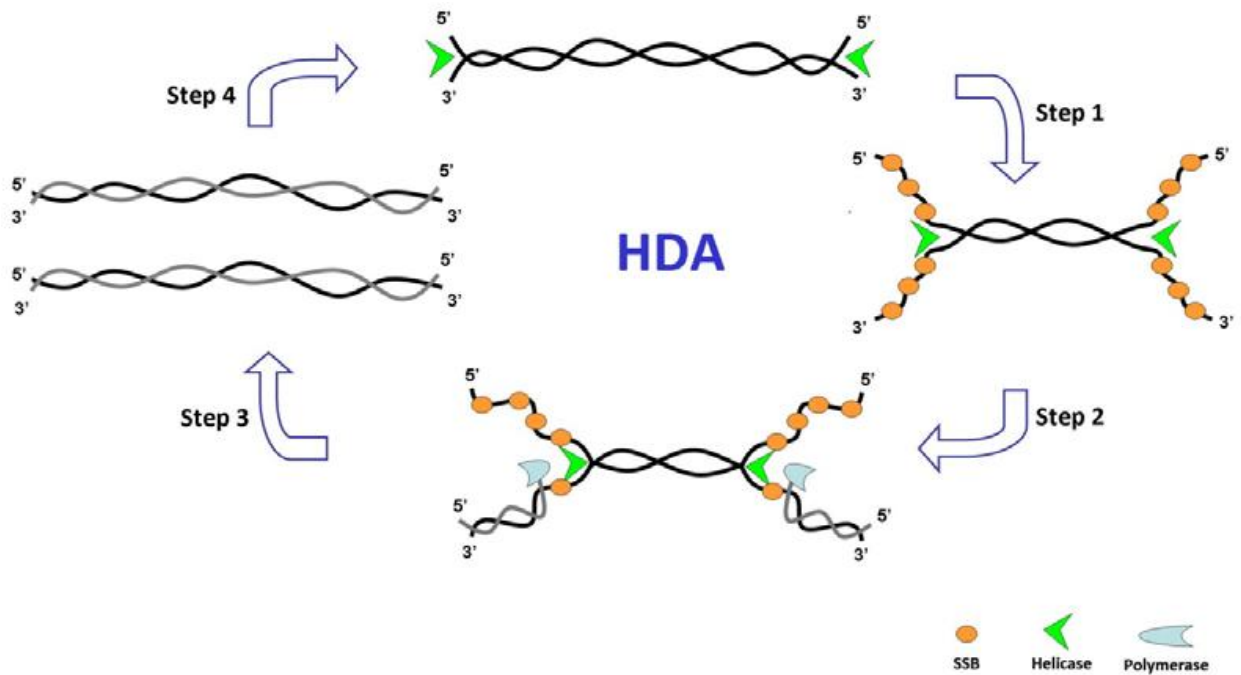
შემთხვევით შერჩეული პრაიმერი და  $\phi 29$  დნმ-პოლიმერაზა გამოიყენება წრიული დნმ-ის ამპლიფიკაციისთვის RCA რეაქციაში (31, 35). RCA რეაქციის ზემოთ აღწერილი კომპონენტს MDA გამოიყენებს გენომური წრფივი დნმ-ის ამპლიფიკაციისთვის. რეაქციისთვის საჭიროა პრაიმერების, სამიზნე დნმ-ის, dNTPs და  $\phi 29$  დნმ-პოლიმერაზის ინკუბაცია  $30^{\circ}\text{C}$ -ზე დაახლოებით 16-18 საათის განმავლობაში (სურ. 6) (44).

MDA რეაქციას არ სჭირდება გენომური დნმ-ის ტემპერატურული დენატურაციას, პრაიმერის ანლირებისთვის. დნმ-ის ორმაგ ჯაჭვთან პრაიმერის შემთხვევითი დაკავშირება საკმარისია პრაიმერის სამიზნე დნმ-თან დაკავშირების ეტაპის დასაწყებად. რასაც მოჰყვება ჯაჭვის ჩანაცვლების პროცესი. ნაჩვენები იქნა, რომ დენატურაციის ეტაპის გამოტოვებით ხდება სამიზნე მოლეკულების დეგრადაციის შემცირება და ამპლიფიკაციის სპეციფიკურობის გაზრდა (11). MDA მეთოდი გამოირჩევა მაღალი სარგებლით, დაახლოებით  $20\text{-}30\ \mu\text{g}$  დნმ-ის მიღებაა შესაძლებელი, ადამიანის გენომის დნმ-ის ძალიან მცირე ასლიდან ( $\sim 10$  ასლი) (11). აღსანიშნავია, რომ MDA

რეაქციის ამპლიფიკაციის სარგებელი საწყისი დნმ-ის კონცენტრაციაზე დამოკიდებული არ არის და რეაქციას აქვს ე.წ. პლატო.

### **2.2.7. ჰელიკაზა დამოკიდებული ამპლიფიკაცია (*Helicase dependant amplification (HDA)*)**

HDA არის ნუკლეინის მჟავების ამპლიფიკაციის იზოთერმული მეთოდი. HAD-ის ძირითად პრინციპს წარმოადგენს დნმ ჰელიკაზების უწყვეტი მოქმედება ადენოზინ ტრი ფოსფატის (adenosine tri phosphate (ATP)) თანაობისას (61). ჰელიკაზა ანცალკეებს დნმ-ის დუპლექსს ცალ ჯაჭვიან სამიზნე დნმ-ებად *in vitro* ამპლიფიკაციისთვის (2). განცალკევებულ ჯაჭვებს 3' ბოლოში უკავშირდება წინასწარ შერჩეული თანმიმდევრობის პრაიმერები, ორივე ჯაჭვს თითო. დნმ პოლიმერაზა ახდენს პრაიმერების ელონგაციას და ორი ცალ ჯაჭვიანი სამიზნე დნმ-დან ვიღებთ დნმ-ის ორ დუპლექსს. პროცესი მეორდება და ვიღებთ ექსპონენციურ რეაქციას ტემპერატურის ცვლილების გარეშე, როგორც ნაჩვენებია სურათ 7-ზე. მეთოდი საშუალებას გვაძლევს

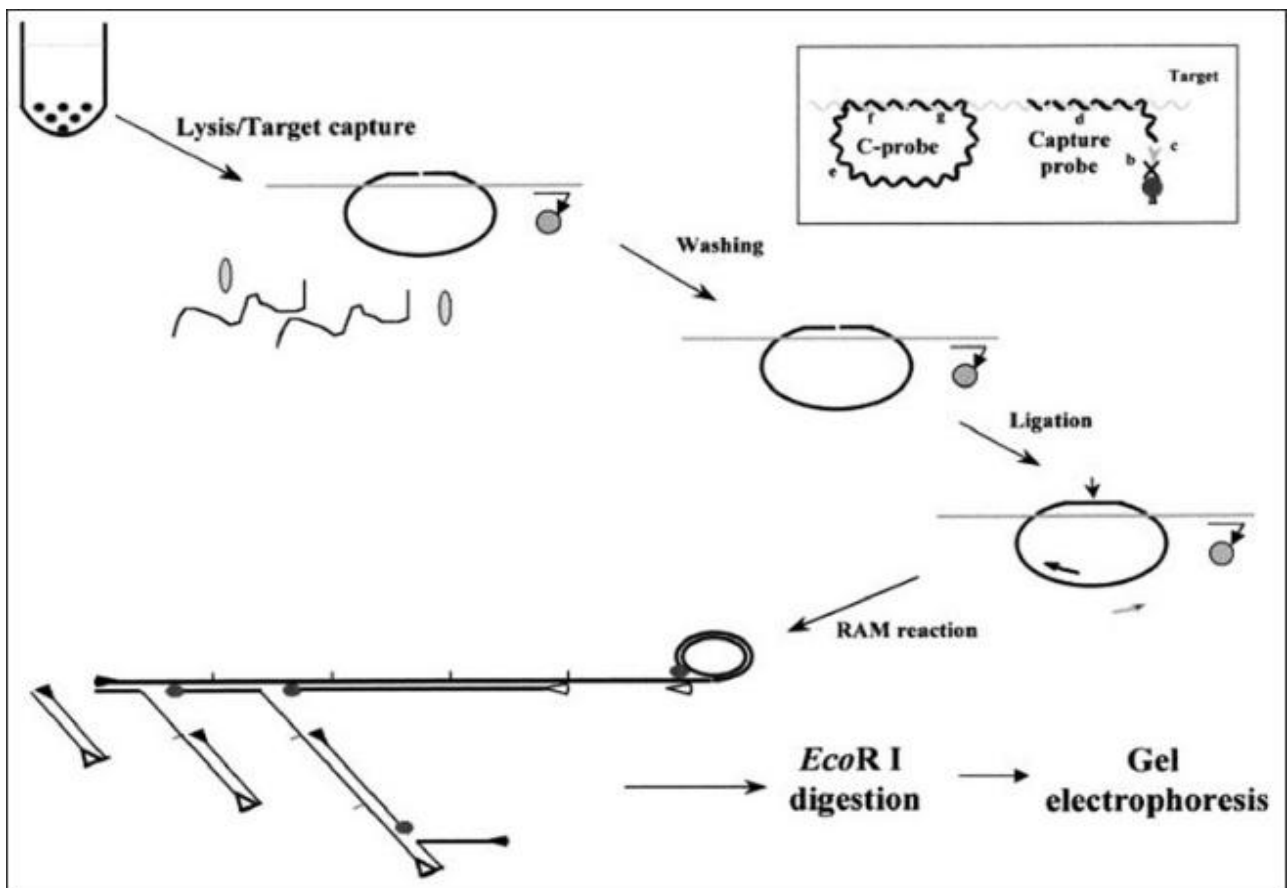


სურათი 7. ჰელიკაზა დამოკიდებული ამპლიფიკაციის (Helicase dependant amplification (HDA)) პროცესი. ნაბიჯი 1: ჰელიკაზა ანცალკევებს დნმ-ის დუბლექსს; ნაბიჯი 2: პრაიმერი უკავშირდება ცალ ჯაჭვიან დნმ-ს; ნაბიჯი 3: დნმ პოლიმერაზას მიერ პრაიმერის ელონგაცია; ერთი დუბლექსისგან მივიღეთ ორი იდენტური დუბლექსი; ნაბიჯი 4: ციკლის ხელახალი განმეორება, თითოეული მიღებული დუბლექსისთვის.

რეპლიკაციის ციკლის განხორციელებას მრავალჯერადი განმეორებით, მუდმივ ტემპერატურაზე, თერმული ციკლების დამატებითი ხელსაწყოების გარეშე (14). HDA რეაქციის შედეგად მღებული ამპლიკონების დეტექცია შესაძლებელია გელის ელექტროფორეზის, რეალურ დროში დაკვირვების და ELISA მეთოდებით (20). რეაქციის მაღალი სიჩქარე HAD-ის მთავარი უპირატესობაა (32). HDA მეთოდს აქვს უპირატესობები სხვა მსგავს მეთოდებთან შედარებით. რეაქციის სქემა არის ძლიან მარტივი და რეაქციის დასაწყისიდანვე პროცესი ხორციელდება მუდმივ ტემპერატურაზე. რაც შესაძლებელს ხდის მის გამოყენებას მარტივი დიაგნოსტიკური სისტემებში (21).

### 2.2.8. განშტოებადი ამპლიფიკაციის მეთოდი (Ramification amplification method (RAM))

RAM არის კიდევ ერთი იზოთერმული მეთოდი ნუკლეინის მჟავების ამპლიფიკაციისთვის. ამპლიფიკაციის დროს, პრაიმერის დაგრძელებისა და ჯაჭვის ჩანაცვლების რეაქციის შედეგად ვლებულობთ მრავალჯერად განშტოებებს (Ramification), მეთოდის სახელი RAM აქედან მომდინარეობს (70). მეთოდი იყენებს სპეციფიკურ წრიულ სამიზნეს (C-probe), რომელშიც 3' და 5' ბოლოები ერთმანეთთანაა შეკავშირებული სამიზნესთან ჰიბრიდიზაციის გზით. ორი პრაიმ ბოლოს ერთმანეთთან დასაკავშირებლად გამოიყენება T4 დნმ ლიგაზა, შედეგად ვიღებთ წრიულად შეკრულ დნმ-ს. პრაიმერების დაკავშირების (წინა (forward) და უკუ (reverse) პრაიმერები) შემდეგ, φ29 დნმ-პოლიმერაზა დააგრძელებს წინა პრაიმერს C-probe-ის გასწვრივს. ჯაჭვის



სურათი 8. განშტოებადი ამპლიფიკაციის მეთოდის (Ramification amplification method (RAM)) სქემატური გამოსახულება.

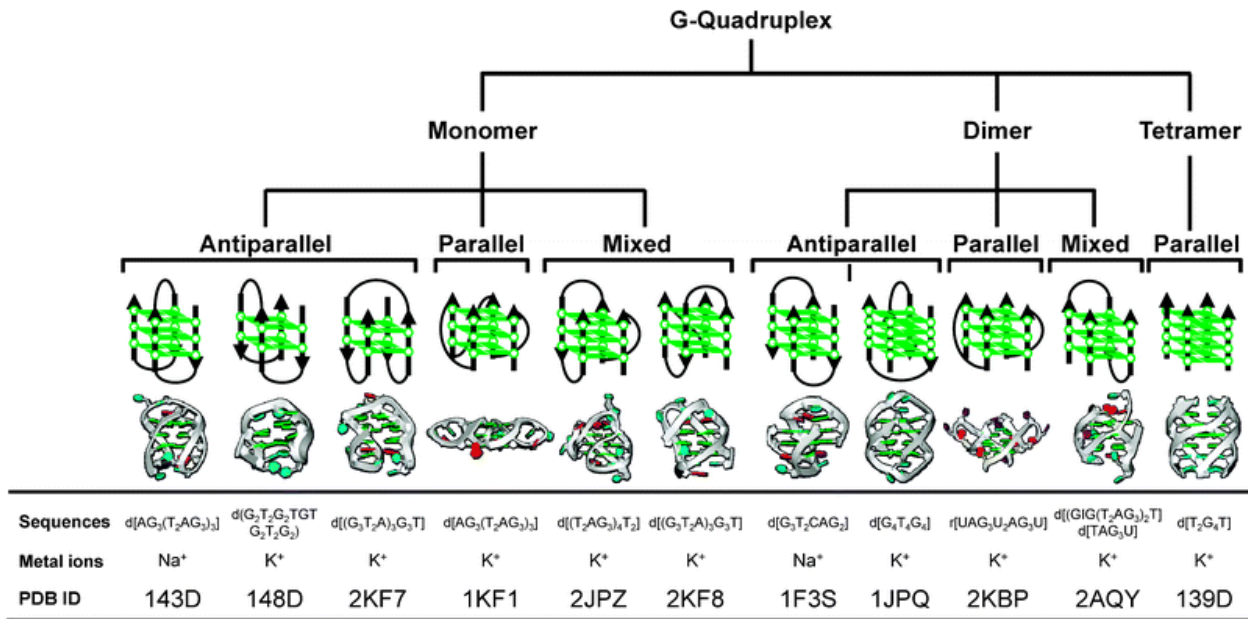
ჩანაცვლების შედეგად მიიღება წრიულ დნმ-ზე მიმაგრებული წინა პრაიმერი და დნმ პოლიმერაზა განუწყვეტლივ ახდენს მის რეპლიკაციას. დნმ-ის ახლად შექმნილ ცალი ჯაჭვი წარმოადგენს სამიზნეს უკუ პრაიმერებისთვის, რომლებიც უკავშირდებიან მას. დნმ პოლიმერაზა მიერ პრაიმერის დაგრძელებისა და ჯაჭვის ჩანაცვლების პროცესის შედეგად ვლუბულობთ მრავალჯერად განშტოებებისგან შემდგარ დნმ-ის კომპლექსს. პროცესი გრძელდება სანამ ყველა ცალჯაჭვიანი დნმ-ი არ გახდება დნმ-დუბლექსი. RAM არის ექსპონენციური რეაქცია (სურ. 8). 49 დნმ-პოლიმერაზა გამოირჩევა მაღალი შედეგიანობით და ამპლიფიკაციის შედეგი მიიღწევა დაახლოებით 1 საათში, 35 °C ტემპურატურაზე (4). RAM მეთოდი არის იზოთერმული და ამპლიფიკაციის შედეგად მიღებული პროდუქტი მულტიმერულია, ამპლიფიკაციის განმავლობაში უჯრედის მორფოლოგიური მახასიათებლები არ იცვლება, რაც შესაძლებელს ხდის ამ მეთოდის გამოყენებას *in situ* ამპლიფიკაციაში (30). RAM-ს აქვს მნიშვნელოვანი უპირატესობები ამპლიფიკაციის სხვა მეთოდებთან შედარებით: (i) პრაიმერები ადვილად ებმებიან დნმ პოლიმერაზას მიერ ჩანაცვლებულ დნმ-ის ცალ ჯაჭვს, შედეგად პროცესი მიმდინარეობს იზოთერმულად და თავიდან ვიცილებთ თერმულ ციკლებს; (ii) პრაიმერები სამიზნე დნმ-ის ამპლიფიცირებას თანაბარი ეფექტურობით ახდენს, რის შედეგადაც უკეთესი მრავლმხრივი შესაძლებლობები აქვს PCR-თან შედარებით (70); (iii) სამიზნის მიუხედავად (დნმ ან რნმ) შესაძლებელია წრიული დნმ-ის წარმოქმნა, ამ მეთოდის

გამოყენება შესაძლებელია, როგორც დნმ-ის, ასევე რნმ-ის დეტექციისთვის (30). მისი მარტივი და იზოთერმული ამპლიფიკაციის მექანიზმიდან გამომდინარე, მისი გამოყენება შესაძლებელია კლინიკურ ლაბორატორიებში სხვადასხვა ინფექციური აგენტების აღმოსაჩენად (69).

**2.2.9. კვადრუპლექს პრაიმერული ამპლიფიკაცია (Quadruplex priming amplification (QPA))**

რამდენიმე წლის წინ შეიქმნა დნმ-ის კვადრუპლექსებზე დაფუძნებული, ახალი, იზოთერმული მეთოდი დნმ-ის სიგნალის გაძლიერებისათვის (37). დნმ-კვადრუპლექსები უკვე 50 წელზე მეტია, რაც ღმოაჩინეს (19) და კვლავ ფართოდ მიდის კვლევები მათი როლის შესწავლაზე დნმ-ის აპტამერებში (6, 33, 51, 57) და გენის ექსპრესიაში (40, 41, 52, 56). ასევე მათი პოტენციურ გამოყენებაზე ბიოტექნოლოგიებში.

დნმ-ის მოკლე, გუანინით მდიდარ თანმიმდევრობებს აქვთ უნარი წარმოქმნან G-კვარტეტები, კვადრუპლექსები (33, 37). ოთხ გუანინი უკავშირდება ერთმანეთს ჰუგსტინის წყალბადური ბმებით და შექმნან ერთ სიბრტყეში მდებარე ოთხკუთხოვანი სტრუქტურას - G-ტეტრადს, თითოეულ ტეტრადზე მოდის 8 წყალბადური ბმა. მეზობელ G-ტეტრადებს შორის ადგილი აქვს ძლიერი სტეკინგ ურთიერთქმედებას. კვადრუპლექსის ფორმირება საჭიროებს ლითონის კათიონებს, რომლებიც მოთავსებულია ტეტრადებს შორის. კვადრუპლექსი შეიძლება იყოს, როგორც ინტერმოლეკულური, ასევე ინტრამოლეკულურიც. გვხვდება კვადრუპლექსები, როგორც პარალელური, ასევე ანტიპარალელური ჯაჭვებით (იგულისხმება ჯაჭვის 5'-3'

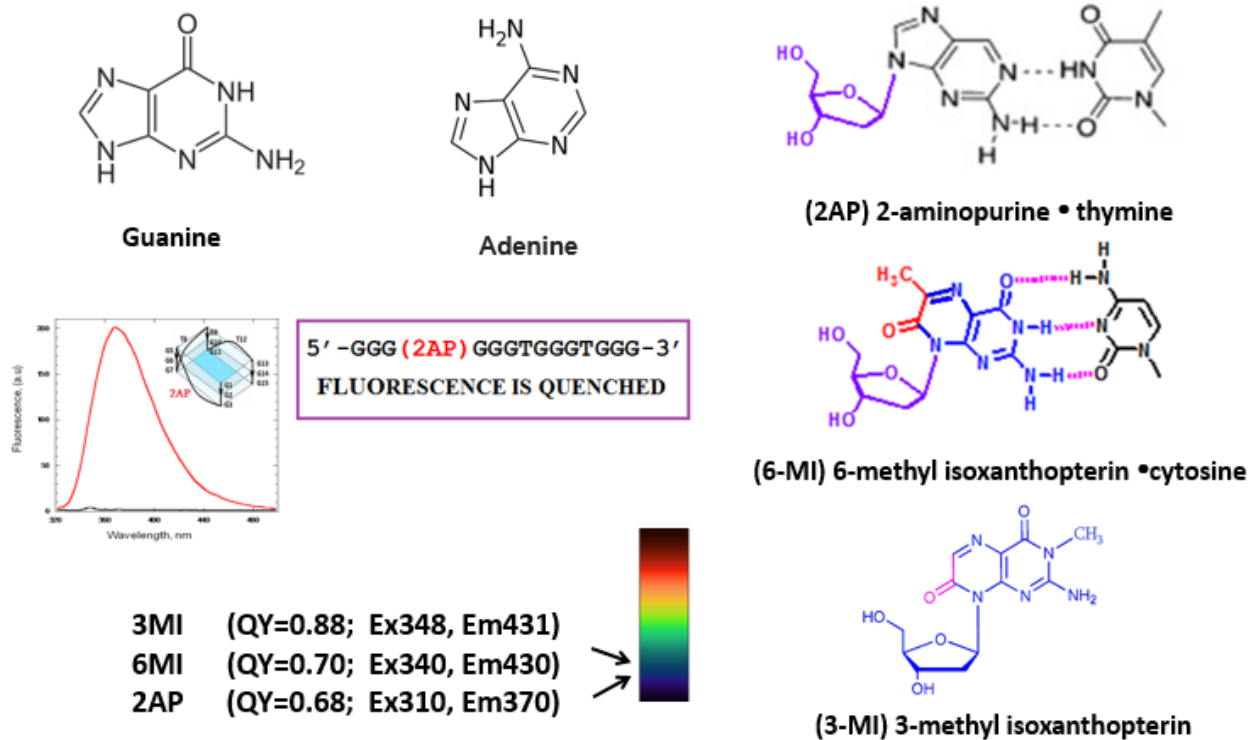


სურათი 9. სხვადასხვა შემადგენლობისა და სტრუქტურის მქონე კვადრუპლექსები.



მიმართულება) (სურ. 9).

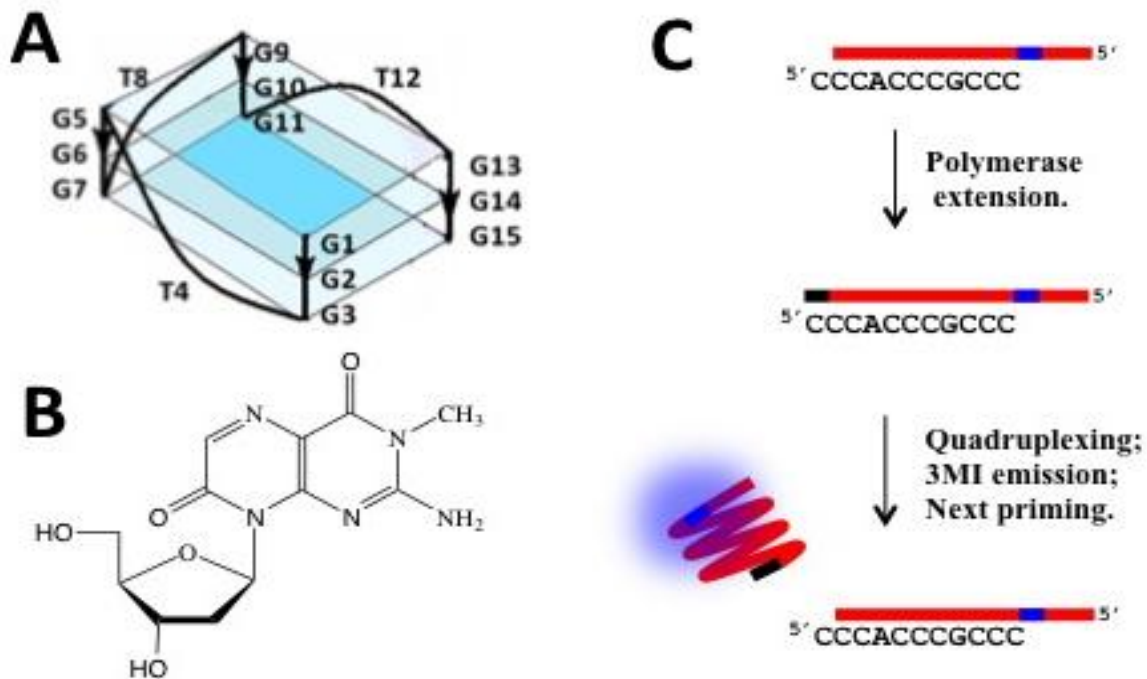
ბოლო პერიოდში სწრაფად იზრდება ინტერესი კვადრუპლექსების მიმართ, რადგან გროვდება მრავალი მტკიცებულება მათ უმნიშვნელოვანეს როლზე სხვადასხვა ბიოლოგიურ პროცესებში. ადამიანის გენომში იდენტიფიცირებულია ასობით ათასი კვადრუპლექსის თანმიმდევრობა (გუანინებით მდიდარი სეგმენტი, რომელსაც აქვს უნარი შექმნას კვადრუპლექსი). კვადრუპლექსები მრავლადაა დნმ-ის ტელომერულ უბნებში, მაგალითად, ადამიანის დნმ-ის ტელომერული თანმიმდევრობა არის d(TTAGGG) სეგმენტის დაახლოებით 2500 განმეორება. ტელომერული კვადრუპლექსები გავლენას ახდენენ ენზიმ ტელომერაზას აქტივობაზე, რომელიც თავის მხრივ პასუხისმგებელია ტელომერის ზომის კონტროლზე. 85% კანცეროგენული დაავადება სწორედ აღნიშნულ პროცესთანაა დაკავშირებული. ასევე დიდია ინტერესი



სურათი 10. ფლურესცენციული მოლეკულები: 2AP, 6MI და 3MI. 2AP წარმოქმნის ვოტსონ-კრიკის ფუბეთა წყვილს თიმიდინთან. 6MI ფუბეთა წყვილს წარმოქმნის ციტოზინთან. 3MI ფუბეთა წყვილს ვერ წარმოქმნის.

არატელომერული კვადრუპლექსების მიმართ. კვადრუპლექსები ნაპოვნი იქნა დნმ-ის აპტამერებში. აგრეთვე, ბოლო დროს სულ უფრო და უფრო ნათელი ხდება, რომ კვადრუპლექსი მნიშვნელოვან როლს ასრულებს გენის ექსპრესიის რეგულირებაში. აღმოჩენილია, რომ მრავალ გენს პრომოტორულ უბანში აქვს კვადრუპლექსის თანმიმდევრობა, რომელსაც შეუძლია გავლენა იქონიოს გენის აქტივაციაზე (შეიძლება მოახდინოს, როგორც მისი აქტივაცია, ასევე დეაქტივაცია). მაგალითად, თუ პრომოტორულ რეგიონში მოხდა კვადრუპლექსის ფორმირება, დაიბლოკება ტრანსკრიპციის პროცესი და მაშასადამე, მოხდება გენის დათრგუნვა. მაგრამ, თუ კვადრუპლექსი შეიქმნა დნმ-ის არამაკოდირებელ ჯაჭვში, ეს ხელს შეუწყობს მაკოდირებელი ჯაჭვი იყოს ღია მდგომარეობაში, რაც თავის მხრივ გააადვილებს შესაბამისი გენის ექსპრესიას.

არსებობს ფლურესცირებადი ნუკლეოტიდები (მაგ.: 2-aminopurine (2AP), 6-



სურათი 11. (A) პარალელური G3T კვადრუპლექსის სქემატური გამოსახულება. (B) 3MI-ის ქიმიური სტრუქტურა. (C) წრფივი QPA რეაქციის სქემატური გამოსახულება.

methylisoxanthopterin (6MI) და 3-methylisoxanthopterin (3MI)) (სურ. 10). 2AP არის ადენინის ანალოგი, ალგუნებისა და გამოსხივების ტალღის სიგრძეებით 310 nm და 370 nm (3, 43). 6MI და 3MI წარმოადგენენ გუანინის ანალოგებს, შესაბამისი ალგუნებისა და გამოსხივების ტალღის სიგრძეებით (6MI - 340 nm და 430 nm; 3MI - 348 nm და 431 nm.) (5). თუ ფლურესცენციული ნუკლეოტიდები წარმოადგენილია დნმ-ის ქაოსურ ჯაჭვში ისინი კარგავენ ფლურესცენციის უნარს, რადგან ხდება მათი სიგნალის ჩახშობა მეზობელი ნუკლეოტიდების მიერ. სიგნალი ჩახშობა კიდევ უფრო ძლიერად ხდება, თუ გვაქვს დნმ-ის ორმაგი სპირალი. მათი გამოყენება კვადრუპლექსს უნიკალურ თვისებას სძენს. თუკი ფლურესცირებად ნუკლეოტიდს ჩავაკერებთ კვადრუპლექსში ყულფის პოზიციაში, იგი დიდ გავლენას არ იქონიებს კვადრუპლექსის ფორმირების უნარზე. ხოლო, ფორმირებული კვადრუპლექსი გვაძლევს გაზრდილ ფლურესცენციულ სიგნალს (37). რაც კვადრუპლექსის დაფიქსირების მარტივ საშუალებას წარმოადგენს.

კვადრუპლექსის თავისუფალი ენერგია შეიძლება გამოყენებულ იქნას, როგორც მამოძრავებელი ძალა სხვადასხვა სასურველი ენდეროგონული პროცესების წარსამართად. რის საფუძველზეც შემუშავდა წრფივი კვადრუპლექს პრაიმერული ამპლიფიკაციის (Quadruplex priming amplification (QPA)) რეაქცია (37). QPA რეაქციის მთავარი მამოძრავებელი ძალას წარმოადგენს GGGTGGGTGGGTGGG (G3T) თანმიმდევრობის უნარი წარმოქმნას მონომოლეკულური კვადრუპლექსი (სურ. 11 A), უფრო მაღალი თერმული სტაბილურობით, ვიდრე შესაბამისი ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის დუპლექსი. QPA პრაიმერი, რომელიც წარმოადგენს G3T თანმიმდევრობას ბოლოში ჩამოცილებული გუანინით, ვერ იკეცება კვადრუპლექსად. გუანინის ჩამოცილება კრიტიკულია კვადრუპლექსის ფორმირებისთვის. საწყის ეტაპზე, პრაიმერი უკავშირდება სამიზნე დნმ-ის პრაიმერის ბმის უბანს (primer binding site (PBS)), ელონგაციის შემდეგ, როდესაც პოლიმერაზა პრაიმერს მიაბამს გუანინს, ის თავისთავად ფორმირდება კვადრუპლექსად. კვადრუპლექსად ფორმირების შედეგად პრაიმერი თავისთავად, იზოთერმულად, ცილდება სამიზნე დნმ-ს და ანთავისუფლებს PBS-ს შემდეგი პრაიმერისთვის (სურ. 11 C). ამავდროულად, QPA პრაიმერის ყულფის პოზიციაში ჩაკერებული ფლურესცირებადი ნუკლეოტიდი კვადრუპლექსის

ფორმირებისას გვაძლევს ფლურესცირებად სიგნალს. რაც ამპლიკონების თვლის მარტივი და ეფექტური საშუალებაა, დამატებითი მოლეკულების გარეშე (37, 23, 59). კვადრუპლექსის ორი უნიკალურ თვისებით, (i) უჩვეულოდ მაღალი სტაბილურობა და (ii) უნიკალური შინაგანი ფლურესცენცია, G3T თანმიმდევრობა ერთდროულად პრაიმერიცაა და მთვლელი მოლეკულაც. რაც ამ მეთოდის უპირატესობაა. დღესდღეობით არსებული ამპლიფიკაციის მეთოდები დეტექციისთვის იყენებენ დამატებით მოლეკულებს, რომლებიც უნდა დაუკავშირდნენ ამპლიკონებს, რაც ართულებ რეაქციას. წრფივი QPA რეაქცია უკვე შემუშავებულია ფართო ტემპერატურულ შუალედში (23, 59) და უკვე ინტეგრირებულია დიაგნოსტიკური საშუალებაში, შეზღუდული რესურსის პარამეტრების გამოყენებით (1). კერძოდ, წრფივი QPA გამოყენებულ იქნა, mRNA-ის რაოდენობის გასასაზღვრავად, მაგნიტურ მძივებზე დაფუძნებული მეთოდში (1). ეს შედეგები ცხადყოფს, რომ ამ ინტეგრირებულ მიდგომას აქვს პოტენციალი, როგორც მარტივი და ეფექტური mRNA ბიომარკერების შემუშავებაში. წრფივ QPA რეაქციის მეთოდით შესაძლებელია დაახლოებით 20 pM სამიზნე დნმ-ის დეტექცია (1, 22).

თითოეულ ამ მეთოდს აქვს, როგორც თავისი უნიკალური განმასხვავებელი თვისებები, ასევე საერთო თვისებაც (15). ზემოთ აღწერილ იზოთერმულ მეთოდებს აქვთ საკუთარი შეზღუდვები და მათი მექანიზმები შედარებით კომპლექსურია, თუმცა ისინი ადვილად შესრულებადია და აქვთ კარგი მგრძობიანობა. რეალური დროის დაკვირვების მექანიზმები, მათი ფართო გამოყენების საშუალებას იძლევა. სამომავლოდ, ამ მეთოდებიდან ზოგიერთმა შესაძლებელია ჰპოვოს ისეთივე ფართო გამოყენება, როგორც აქვს PCR-ს.

## 2.3. მეთოდოლოგია

### 2.3.1. ულტრაიისფერი-ხილული სპექტროსკოპია

სინათლე წარმოადგენს ელექტრომაგნიტურ ტალღას, რომელიც წარმოდგენილია ურთიერთპერპენდიკულარულ სიბრტყეებში მერხევ ელექტრული და მაგნიტურ ველებით, რომლებიც თავის გავრცელების გზაზე იცვლიან თავიანთ მნიშვნელობას სინუსის/კოსინუსის კანონით. სინათლეს ახასიათებს კორპუსკულარულ-ტალღური დუალიზმი. ის განიხილება, როგორც ფოტონური ბუნების ნაწილაკების ნაკადი, რომელსაც გააჩნია, როგორც ენერგია, ასევე მოძრაობის მასაც. ელექტრომაგნიტური ტალღის, ან ფოტონის ენერგიის დასათვლელად გამოიყენება ფორმულა:

$$E=hf \quad (1)$$

სადაც  $h$  - პლანკის მუდმივაა ( $h=6.625 \cdot 10^{-34}$  ჯ·წმ),  $f$  – ტალღის სიხშირე.

მოლეკულას შეუძლია შთანთქოს მასზე დაცემული გარკვეული ტალღის სიხშირის სინათლე. ულტრაიისფერი-ხილული გამოსხივება წარმოადგენს მთელი ელექტრომაგნიტური სპექტრის მცირე ნაწილს (~10 - 800 nm). მოლეკულას რომელსაც გააჩნია უნარი ხილული ან ულტრაიისფერი სინათლე შთანთქოს და გადავიდეს ენერგეტიკულად მაღალ, აღზნებულ მდგომარეობაში ქრომოფორი ეწოდება. თითოეულ ქრომოფორულ ჯგუფს აქვს მისთვის დამახასიათებელი შანთქმის სპექტრი. ცხრილ 1-ში მოყვანილია ტიპური ქრომოფორები და მათი მახასიათებლები. სინათლის შთანქმისას მოლეკულის ენერგია იზრდება ძირითად ენერგეტიკულ დონესთან შედარებით. ეს მდგომარეობა მოლეკულისთვის არასტაბილურია და იგი უბრუნდება საწყის ძირითად ენერგეტიკულ მდგომარეობას.

მოლეკულაში ელექტრონის მდგომარეობის მიხედვით არჩევენ 3 ძირითადი ტიპის ორბიტალებს:  $\sigma$ ,  $\pi$  და  $n$  ორბიტალები. ძირითად მდგომარეობაში  $\sigma$ ,  $\pi$  და  $n$  ორბიტალები არიან შევსებული, მაშინ როდესაც  $\sigma^*$  და  $\pi^*$  ორბიტალები თავისუფალია.

Chromophore	Example	Solvent	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$	Type of transition
Alkene	$C_6H_{13}HC=CH_2$	<i>n</i> -Heptane	177	13,000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Alkyne	$C_5H_{11}C \equiv C-CH_3$	<i>n</i> -Heptane	178	10,000	$\pi \rightarrow \pi^*$
			196	2,000	–
			225	160	–
Carbonyl	$\begin{array}{c} O \\    \\ CH_3CCH_3 \end{array}$	<i>n</i> -Hexane	186	1,000	$n \rightarrow \sigma^*$
			280	16	$n \rightarrow \pi^*$
	$\begin{array}{c} O \\    \\ CH_3CH \end{array}$	<i>n</i> -Hexane	180	Large	$n \rightarrow \sigma^*$
			293		12
Carboxyl	$\begin{array}{c} O \\    \\ CH_3COH \end{array}$	Ethanol	204	41	$n \rightarrow \pi^*$
Amido	$\begin{array}{c} O \\    \\ CH_3CNH_2 \end{array}$	Water	214	60	$n \rightarrow \pi^*$
Azo	$H_3CN=NCH_3$	Ethanol	339	5	$n \rightarrow \pi^*$
Nitro	$CH_3NO_2$	Isooctane	280	22	$n \rightarrow \pi^*$
Nitroso	$C_4H_9NO$	Ethyl ether	300	100	–
			665	20	$n \rightarrow \pi^*$
Nitrate	$C_2H_5ONO_2$	Dioxane	270	12	$n \rightarrow \pi^*$

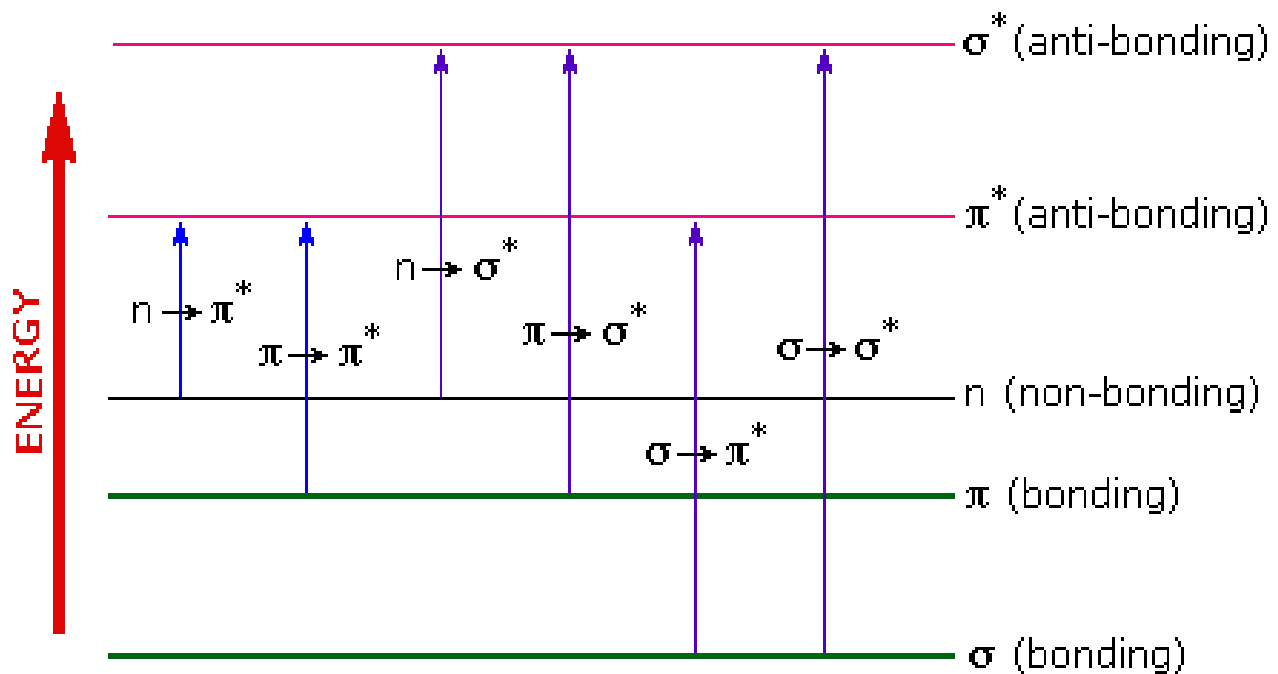
ცხრილი 1. ტიპური ქრომოფორები და მათი მახასიათებლები.

$\sigma$  და  $\pi$  ტიპის ორბიტალები შეიძლება იყოს, როგორც დამაკავშირებელი  $\sigma$  და  $\pi$ , ასევე არადამაკავშირებელი  $\sigma^*$  და  $\pi^*$ . სინათლის შთანთქმისას ადგილი აქვს  $\sigma$  და  $\pi$  ორბიტალებიდან ელექტრონების გადასვლას  $\sigma^*$  და  $\pi^*$  ორბიტალებზე. სურათ 12-ზე ნაჩვენებია ელექტრონების გადასვლის ვარიანტები.

მოლეკულის მიერ სინათლის შთანთქმის რაოდენობრივად აღწერს ლამბერტ-ბერის კანონი:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon dc} \quad (2)$$

სადაც,  $I$  არის კიუვეტიდან გამოსული სინათლის ინტენსივობა;  $I_0$  დაცემული სინათლის ინტენსივობა;  $\epsilon$  – შთანთქმის კოეფიციენტი, რომელსაც სხვანაირად შთანთქმის ექსტინციის კოეფიციენტს ეძახიან;  $d$  კიუვეტის სიგანეა;  $c$  საკვლევი ხსნარის კონცენტრაცია.



სურათი 12. ელექტრონული გადასვლის ვარიანტები.

ულტრაიისფერ და ხილულ არეებში სპექტროფოტომეტრის გამოყენება დამყარებულია ნივთიერების მიერ ელექტრომაგნიტურ გამოსხივების შთანთქმასთან.

ოპტიკური შთანთქმის სპექტროსკოპია წარმოადგენს ბიომოლეკულების ანალიზის მეთოდს. საკვლევ ნივთიერებაზე დაცემული და ნივთიერებიდან გამოსული სინათლის ინტენსივობების შედარებით, შეგვიძლია ვიმსჯელოთ შესასწავლი ნივთიერების თვისებებზე. თუ მოლეკულა შთანთქავს სინათლის ტალღას, მაშინ შთანთქმული ენერჯის სიდიდის და ხასიათის მიხედვით შესაძლებელია ვიმსჯელოთ ამ მოლეკულის თვისებების შესახებ. ოპტიკური შთანთქმის სპექტროსკოპიის მეთოდით შესაძლებელია დავადგინოთ ბიომოლეკულებს შორის კომპლექსების არსებობა და ასევე განვსაზღვროთ მათი კონცენტრაცია.

### **2.3.2. ულტრაიისფერ-ხილული სპექტრომეტრი**

ტემპერატურა-დამოკიდებული ულტრაიისფერ-ხილული სპექტრომეტრი არის მოსახერხებელი ხელსაწყო დნმ-ის მეორეული სტრუქტურის შესასწავლად. ულტრაიისფერი-ხილული სპექტროსკოპიის მეთოდით შესაძლებელია განისაზღვროს ოლიგონუკლეოტიდური თანმიმდევრობების კონცენტრაცია. ასევე ამ მეთოდის გამოყენება შესაძლებელია კვადრუპლექსების ლღვობის შესასწავლად. დნმ-ის დუპლექსის გაშლას თან ახლავს შთანთქმის გაზრდა 260 nm-ზე. კვადრუპლექსები ხასიათდებიან დნმ-ისგან განსხვავებული ოპტიკური თვისებებით (შთანთქავენ სინათლეს 300 nm ტალღის სიგრძეზე), რაც მათი დაფიქსირების საშუალებას იძლევა აბსორბციული სპექტროსკოპიის მეთოდით.

კვლევები ჩატარდა ხელსაწყოებზე: UV-Vis Spectrophotometer (Cary 100 UV-Vis) (ბიოფიზიკის ინსტიტუტი, ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი); Varian Spectrophotometer (Cary Eclipse) (ქიმიისა და ბიოქიმიის დეპარტამენტი, ოჰაიოს სახელმწიფო უნივერსიტეტი, აშშ).

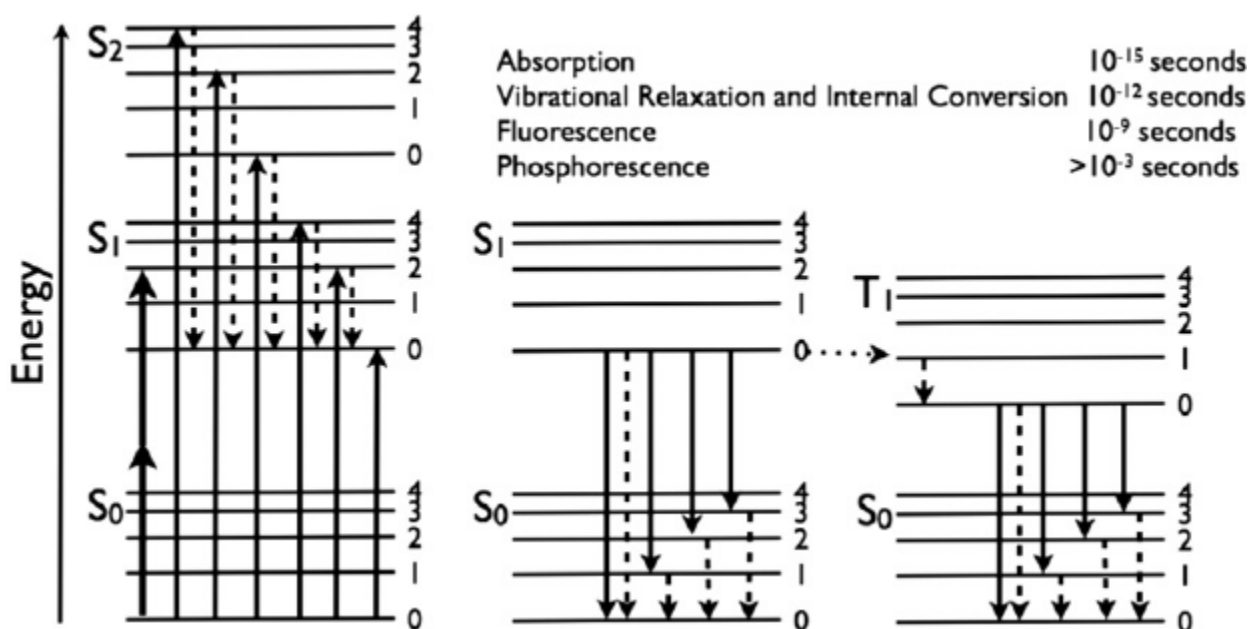
### **2.3.3. სპექტროფლუორიმეტრია**

ფლურესცენციული მეთოდები გამოირჩევა მაღალი მგრძობიარობით, რაც მათი ფართო გამოყენების საშუალებას იძლევა. ცილების ნუკლეინის მჟავების და სხვა ბიოპოლიმერების ფლურესცენციის შესწავლა გვამლევს მნიშვნელოვან მონაცემებს მათ კონფორმაციულ გარდაქმნასა და გარდაქმნის დინამიკაზე.

ფლურესცირების პროცესი სქემატურად მარტივად შეიძლება გამოვსახოთ იაბლონსკის დიაგრამის მეშვეობით (სურ. 13).

$S_0$ ,  $S_1$  და  $S_2$  დონეებს (სურ. 13) სინგლეტური დონეები ეწოდება. მათ შორის გადასვლის დროს ელექტრონის სპინი არ იცვლება.





სურათი 13. იაბლონსკის დიაგრამა.

ფლურესცენცია წარმოდგენს გამოსხივებას, რომელიც თან სდევს S<sub>1</sub> აგზნებული დონიდან ელექტრონის გადასვლას S<sub>0</sub> ძირითად დონეზე. ფლურესცენციულ გამოსხივება ხდება სინათლის შთანთქმიდან 10<sup>-9</sup>-10<sup>-8</sup> წმ-ის შემდეგ. ის ფართოდ გამოიყენება ბიოლოგიურად უმნიშვნელოვანესი მოლეკულების შესასწავლად.

ფლურესცენცია ხასიათდება შთანთქმისა და გამოსხივების ტალღის სიგრძეებით. გამოსხივებული სინათლის ტალღის სიგრძე ყოველთვის ნაკლებია შთანთქმულ სინათლესთან შედარებით. რაც გამოწვეულია ფლუროფორის სწრაფი რელაქსაციით S<sub>1</sub> სინგლეტური დონის ქვედა რხევით დონეზე, რომელსაც არ ახლავს გამოსხივება (internal conversion).

### 2.3.4. ფლურიმეტრი.

ფლურესცირებადი სპექტროსკოპიის მეთოდით შესაძლებელია ფლურესცირებადი ნუკლეოტიდების დაფიქსირება (2-aminopurine (2AP) Ex310, Em370; 6-methylisoxanthopterin (6MI) Ex340, Em430; და 3-methylisoxanthopterin (3MI) Ex348,

Em431), რაც საშუალებას გვაძლევს რეალურ დროში დავაკვირდეთ QPA რეაქციას. ასევე აღნიშნული მეთოდი საშუალებას გვაძლევს შევისწავლოთ კვადრუპლექსის ლღვობისა და მისი პოლიმერაზული გაშლის რეაქციები.

კვლევები ჩატარდა ხელსაწყოებზე: ESEQuant Tube Scanner (Qiagen) (ბიოფიზიკის ინსტიტუტი, ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი); Microplate reader FluoDia T70 (Photon Technology International) და ESEQuant Tube Scanner (Qiagen) (ქიმიისა და ბიოქიმიის დეპარტამენტი, ოჰაიოს სახელმწიფო უნივერსიტეტი, აშშ).

### 2.3.5. კვლევის პროცედურა

**დნმ პოლიმერაზები და დნმ სუბსტრატები.** ყველა დნმ პოლიმერაზა და დეზოქსირიბონუკლეოტიდის ტრიფოსფატი (dNTPs) შევიძინეთ New England BioLabs (NEB)-დან. ოლიგონუკლეოტიდური თანმიმდევრობები და 2AP-ჩაკერებული თანმიმდევრობები შევიძინეთ Integrated DNA Technologies (IDT)-დან. 3MI-ჩაკერებული პრაიმერები შევიძინეთ Fidelity Systems-დან. ოლიგონუკლეოტიდური თანმიმდევრობების კონცენტრაციების განსაზღვრისთვის, გავზომეთ UV შთანთქმა 260 nm ტალღის სიგრძეზე. ყველა ექსპერიმენტში გამოვიყენეთ შემდეგი ბუფერი: 50 mM მონოვალენტური კათიონი ( $K^+$  და  $Cs^+$ ), 2 mM  $MgCl_2$ , 10 mM Tris-HCl, pH 8.7. თითოეულ ექსპერიმენტში იონების კონცენტრაციები ნაჩვენებია შესაბამის გრაფიკებზე.

**ფლურესცენციული გაზომვები.** ფლურესცენციული ნუკლეოტიდების (2AP (შთა. 310 nm, გამ. 370 nm), 6MI (შთა. 340 nm, გამ. 430 nm) და 3MI (შთა. 348 nm, გამ. 431 nm)) გაზომვებისთვის გამოვიყენეთ სხვადასხვა სახის ფლუროფოტომეტრები Varian spectrophotometer (Cary Eclipse), Microplate reader FluoDia T70 (Photon Technology International) და ESEQuant Tube Scanner (Qiagen). წრფივი QPA, კვადრუპლექსის ლლობა და კვადრუპლექსის გახსნის/შენგრევის ექსპერიმენტები ჩავატერეთ კვარცის კიუვეტებში, სპექტროფოტომეტრით. ექსპონენციალური QPA-რეაქციისთვის გამოვიყენეთ მიკროფირფიტები (microplates) და 0,2 mL-იანი PCR-ის სინჯარები, გაზომვებისთვის გამოვიყენეთ Plate Reader და Tube Scanner.

**წრფივი QPA რეაქციის ჩატარების პირობები (პროტოკოლი).** წრფივი QPA რეაქცია ჩავატერეთ შემდეგი პირობებით: 1  $\mu$ M QPA პრაიმერი, 1 nM სამიზნე დნმ, 800  $\mu$ M dNTP და 0.05 U/ $\mu$ l Taq, ბუფერი: 2 mM  $MgCl_2$ , 25 mM CsCl, 25 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.7. რეაქცია ჩატარდა კვარცის კიუვეტებში. კიუვეტა სარეაქციო ნარევით, მოვურიეთ ვორტექსზე 2-3 წამის განმავლობაში და მოვათავსეთ ფლურომეტრში, რეაქციის ტემპერატურაზე და რეალურ დროში ჩავიწერეთ 2AP-ის ფლურესცენცია. QPA რეაქციის

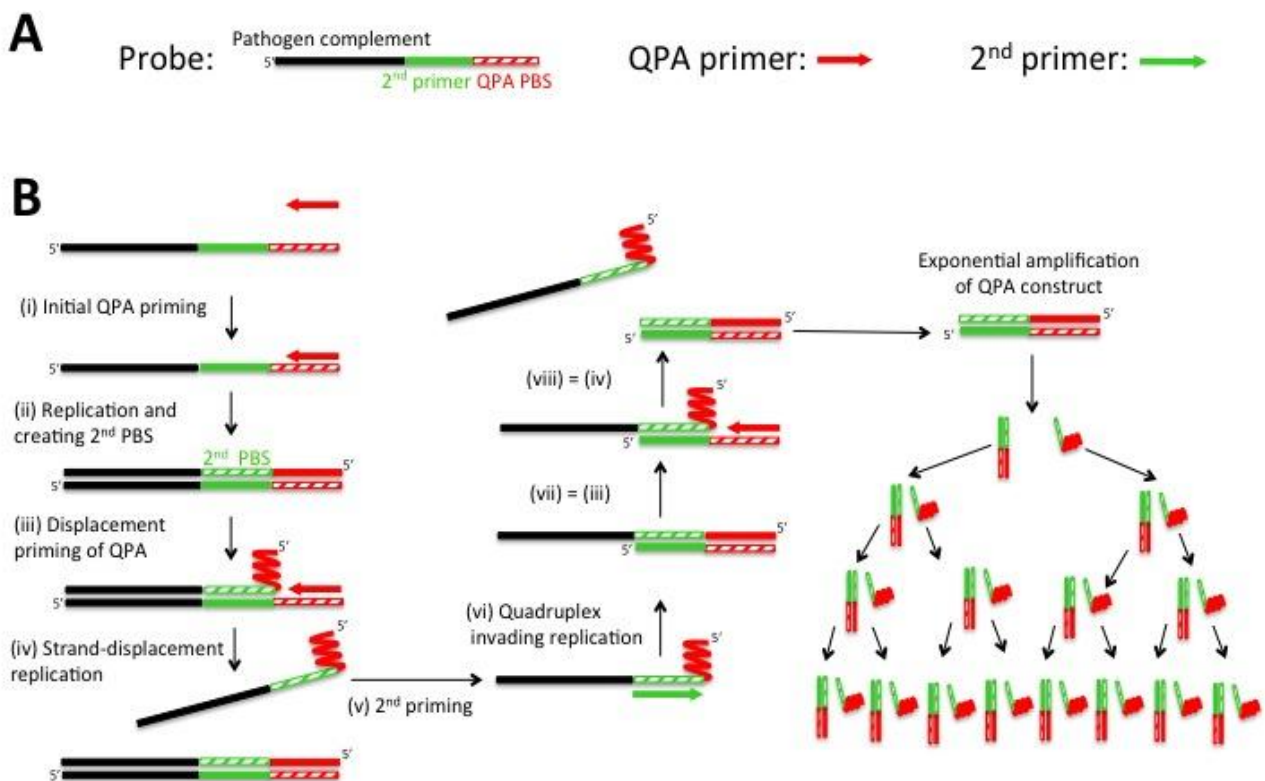
სიჩრარეები განისაზღვრა სხვადასხვა ტემპერატურაზე ჩწერილი კინეტიკური მრუდების დახრებიდან.

**კვადრუპლექსის გახსნის ექსპერიმენტები.** კვადრუპლექსის გახსნის ექსპერიმენტებისთვის 1  $\mu\text{M}$  კვადრუპლექსიანი სამიზნე დნმ, 1.1  $\mu\text{M}$  პრაიმერი და 800  $\mu\text{M}$  dNTP იკუბირებული იყო კიუვეტებში, 100  $\mu\text{l}$  მოცულობის სარეაქციო ნარევი, 2-5 წუთის განმავლობაში, ფლურომეტრში, წინასწარ შერჩეულ ტემპერატურაზე. ინკუბაციის შემდეგ ვამატებდით 5 U/ $\mu\text{l}$  კონცენტრაციის 1  $\mu\text{l}$  დნმ პოლიმერაზას და დაუყოვნებლივ ვზომავდით ფლურესცენციას. საკონტროლო ექსპერიმენტებში სარეაქციო ნარევს ვამატებდით 1  $\mu\text{l}$  ბუფერის, დნმ პოლიმერაზას ნაცვლად.

**ექსპონენციური QPA რეაქციის ჩატარების პირობები (პროტოკოლი).** ექსპონენციური QPA რეაქციას ვატარებდით 100  $\mu\text{l}$  მოცულობის სარეაქციო ნარევში, რომელიც შედგებოდა ბუფერის, სამიზნე დნმ-ის, QPA პრაიმერის, *მეორე* პრაიმერის და dNTP-სგან. კონკრეტულ ექსპერიმენტებში, თითოეული კომპონენტის კონცენტრაცია ნაჩვენებია შესაბამის გრაფიკებზე. თავდაპირველად ვახდენთ სარეაქციო ნარევის ინკუბაციას რეაქციის ტემპერატურაზე 1 წუთის განმავლობაში. ინკუბაციის შემდეგ ვამატებთ დნმ პოლიმერაზას და დაუყოვნებლივ ვზომავთ 3MI-ს ფლურესცენციულ სიგნალს. Plate Reader-ით გაზომვებისას სარეაქციო ნარევის მორევა ხდებოდა პიპეტით პირდაპირ მიკროფირფიტაზე. ხოლო, Tube Scanner-ით გაზომვებისას PCR-ის 0,2 mL-იან სინჯარას ვურევდით ვორტექსზე, 2-3 წამის განმავლობაში.

## 2.4. შედეგები

ჩვენ შევიმუშავეთ, დნმ-ის სწრაფი გამრავლების იზოთერმული და ეფექტური მეთოდი, ექსპონენციური QPA რეაქცია. ეს რეაქცია საჭიროებს ორ პრაიმერს: (i) QPA-პრაიმერი (G3T-ის წაკვეთილი თანმიმდევრობა, ფლურესცირებადი ნუკლეოტიდით ყულფის პოზიციაში; წითელი ისარი, სურ. 14 A), რომელსაც აქვს უნარი, კვადრუპლექსად ფორმირების შემდეგ, თავისთავად დისოცირდეს სამიზნე დნმ-ს და (ii) მეორე პრაიმერი (მწვანე ისარი, სურ. 14 A), ამ პრაიმერს თავისთავად დისოცირების უნარი არ აქვს, თუმცა ჯაჭვის ჩანაცვლების რეაქციის შედეგად, QPA-პრაიმერის ბმის



სურათი 14. ექსპონენციური QPA-ს ზოგადი სქემა. (A) სამიზნე დნმ, რომელიც შედგება სამი უზნისგან: პათოგენის კომპლიმენტარული უზანი, მეორე პრაიმერის თანმიმდევრობა და QPAპრაიმერის ბმის უზანი. (B) ექსპონენციალური QPA-ს სქემატური გამოსახულება.

უბნის გამრავლების საშუალებას იძლევა.

თავდაპირველად ხდება QPA-პრაიმერის სამიზნე დნმ-თან ბმა და მისი რეპლიკაცია (steps i, ii). კვადრუპლექსის ფორმირების შემდეგ, პრაიმერის ბმის უბანს უკავშირდება შემდეგი QPA-პრაიმერი (step iii) და პოლიმერაზას მეშვეობით მიმდინარეობს ჯაჭვის ჩანაცვლების რეაქცია (step iv). ჩანაცვლებული ამპლიკონი შეიცავს მეორე პრაიმერის ბმის უბანს. მეორე პრაიმერის ბმის (step v) და ელონგაციის შედეგად (step vi) ვიღებთ სამიზნე დნმ-ს, რომელს შეიცავს პრაიმერის ბმის უბნის QPA-პრაიმერისთვის. გვაქვს ორი პრაიმერი და ორი პრაიმერის ბმის უბანი, ამის შემდეგ რეაქცია მიმდინარეობს ექსპონენციურად (სურ. 14 B, მარჯვენა ნაწილი).

კვლევების შედეგად ჩვენ შევქმენით QPA რეაქცია, რომელიც დნმ-ის ეფექტურ, სწრაფ და იზოთერმულ ამპლიფიკაციის საშუალებას გვაძლევს. ჩვენ ვაჩვენეთ, რომ იზოთერმული ექსპონენციური QPA რეაქცია დნმ-ის სიგნალის  $10^{10}$ -ჯერ გამრავლების საშუალებას გვაძლევს, დაახლოებით 40 წუთში. აღნიშნული მეთოდის გამოყენება შესაძლებელია მრავალ სინჯარიანი (Multi Tube) დიაგნოსტიკისთვის. სადაც სამიზნე დნმ-ის გადატანა სამუშაო ბუფერში ხდება პათოგენური დნმ-ის მეშვეობით, რომელიც მიმაგრებულია მაგნიტურ მძივებზე.

#### ***2.4.1. პრაიმერებისა და სამიზნე დნმ-ის შერჩევა ექსპონენციური QPA რეაქციისთვის.***

ეფექტური QPA-ს შესაქმნელად საჭიროა ზემოთ აღწერილი რეაქციის (სურ. 14 B) თითოერთი საფეხურის ოპტიმიზაცია. მიუხედავად იმისა, რომ რეაქციის უმეტესი ნაწილი მოითხოვს მხოლოდ ექსპერიმენტული პირობების შერჩევას (მაგ.: ტემპერატურის ან ბუფერის კონკრეტული დნმ პოლიმერაზასთვის), ორი საფეხური (iii და vi; სურ. 14 B) საჭიროებს უფრო ზუსტ და ფრთხილ შერჩევას. რეაქციის ეს ორი საფეხური განსაზღვრავს მის იზოთერმულად და პლატოსგან თავისუფალ (Plateau-free) მუშაობას. ვინაიდან ფლურესცირებადი ნუკლეოტიდები არის პრაიმერის ნაწილი, უნდა მოხდეს მათი რეპლიკაციაც, რომ ახლად წარმოქმნილ ამპლიკონზე გვექონდეს პრაიმერის

ბმის სრული უბანი. ფლურესცირებადი ნუკლეოტიდების მიმართ დნმ პოლიმერაზები განსხვავებულ აქტივობას ავლენენ (23, 59), რაც ასევე საყურადღებოა პრაიმერების შერჩევისას.

#### **2.4.2. ფლურესცირებადი ნუკლეოტიდების შერჩევა**

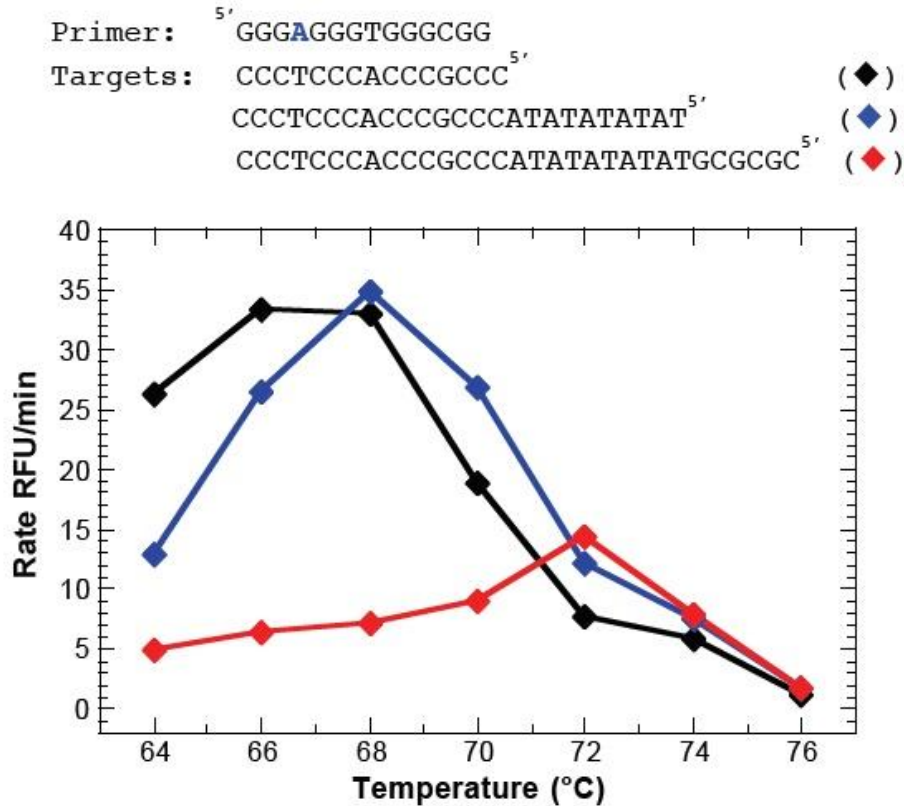
ფლურესცირებადი ნუკლეოტიდური ანალოგები ადვილი გამოსაყენებელია ამპლიკონების სათვლელ მექანიზმად. ექსპერიმენტებისთვის შევარჩიეთ შემდეგი ფლურესცირებადი ნუკლეოტიდები: 2-aminopurine (2AP) (შთა. 310 nm, გამ. 370 nm); 6-methylisoxanthopterin (6MI) (შთა. 340 nm, გამ. 430 nm); და 3-methylisoxanthopterin (3MI) (შთა. 348 nm, გამ. 431 nm). ფლურესცირებადი ნუკლეოტიდის G3T თანმიმდევრობის ყულფის პოზიციაში ჩაკერება მისი დეტექციის მარტივ საშუალებას წარმოადგენს, რადგან, როდესაც ფლურესცირებადი ნუკლეოტიდი ჩაბმულია დნმ-ს ერთმაგ ჯაჭვში, მეზობელი ნუკლეოტიდები აქრობენ მის სიგნალს. ხოლო, კვადრუპლექსის ფორმირებისას, გამონთავისუფლდება რა ნუკლეოტიდებისგან, მისი ფლურესცირება საგრძნობლად იზრდება (23, 36, 37).

2AP არის ადენინის ფლურესცირებადი ანალოგი, რომელიც ქმნის Watson-Crick-ს ფუძეთა წვილს თიმინთან (38, 43) და დნმ პოლიმერაზა ადვილად ახდენს მის რეპლიკაციას (18). 6MI და 3MI სტრუქტურულად წარმოადგენენ გუანინის ანალოგებს. 6MI წარმოქმნის ფუძეთა წყვილს ციტოზინთან, მაშინ როცა 3MI ვერ წარმოქმნის (27, 28). დნმ პოლიმერაზე ვერცერთის რეპლიკაციას ვერ ახდენს (10, 59).

ჩვენ რეაქციისთვის შევარჩიეთ 3MI (სურ. 11 B), რადგან (i) აქვს მაღალი კვანტური სარგებელი (0,88) და (ii) დნმ პოლიმერაზა ვერ ახდენს მის რეპლიკაციას. რაც 11-nt სიგრძის QPA პრაიმერის ბმის უბნის გამოყენების საშუალებას გვაძლევს (სურ. 11) და ზრდის QPA-ს ეფექტურობას (23).

### 2.4.3. QPA პრაიმერი

წრფივი QPA რეაქციის, სადაც პრაიმერზე დნმ პოლიმერაზის მიერ მხოლოდ ერთი გუანინის დამატება სრულდება (სურ. 11 C), ტემპერატურაზე დამოკიდებულება წინა კვლევებში შევისწავლეთ (23, 59). როგორც ცდება აჩვენა, QPA რეაქციის სიჩქარე მჭიდროდ უკავშირდება QPA პრაიმერისა და პრაიმერის ბმის უბნის კომპლექსის ლღობის ტემპერატურას. რეაქციის ოპტიმალური ტემპერატურა დაახლოებით 10-15 °C-ით მაღალია, ვიდრე პრაიმერ/პრაიმერის ბმის უბნის ლღობის ტემპერატურა (23). წრფივ QPA რეაქციაში (სურ. 11 C) კვადრუპლექსს არ არქვს რაიმე სახის მიმატებები, რაც ამარტივებს მის დისოციაციას სამიზნე დნმ-ისგან. ხოლო, ექსპონენციურ QPA



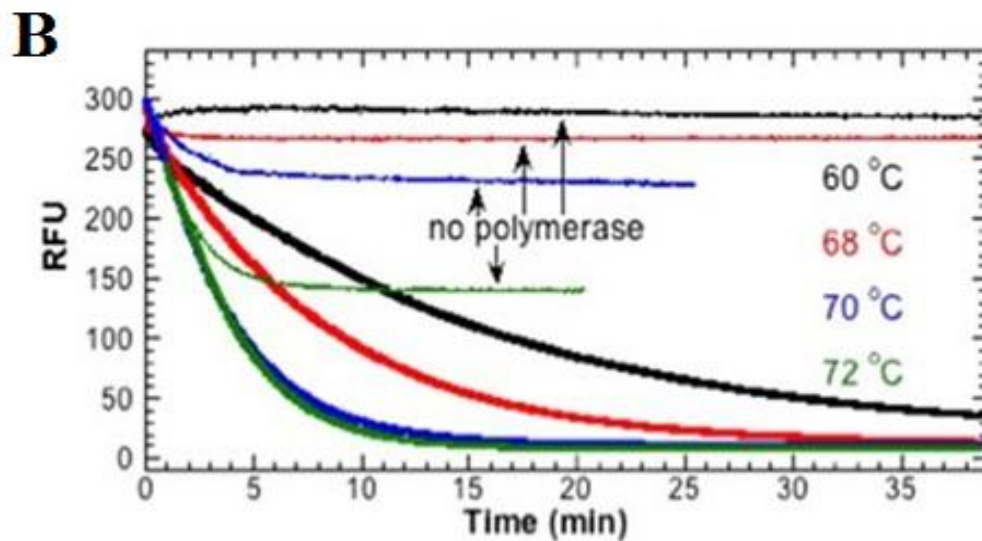
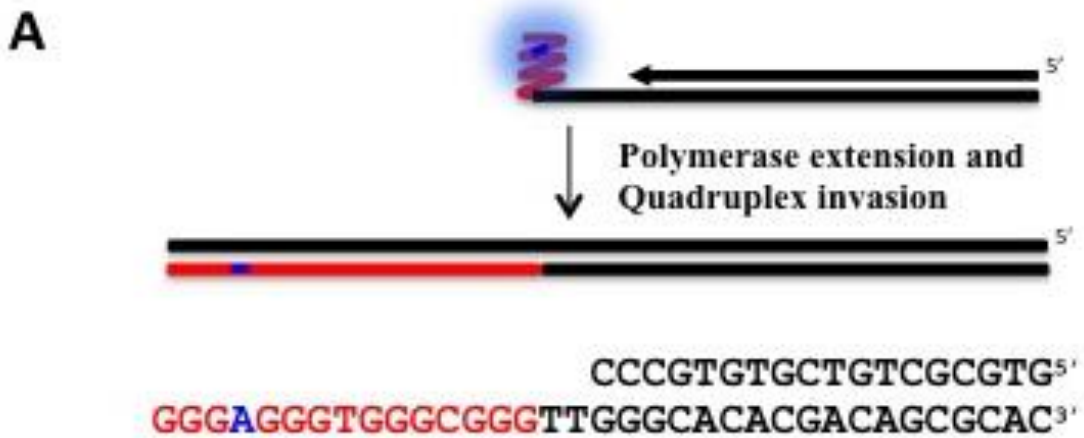
გრაფიკი 1. QPA რეაქციის სიჩქარის დამოკიდებულება ტემპერატურაზე. QPA-ის სიჩქარეები განსაზღვრულია კინეტიკური მრუდების დახრებიდან. პრაიმერში A აღნიშნავს 2AP-ს. რეაქციის პირობები: 1  $\mu$ M QPA პრაიმერი, 1 nM სამიზნე დნმ, 800  $\mu$ M dNTP, 0.05 U/ $\mu$ l *Taq*, ბუფერში 25 mM K<sup>+</sup>.



რეაქციაში, კვადრუპლექსმა უნდა შეძლოს ფორმირება, როდესაც ის არის გრძელი ამპლიკონის ნაწილი (step iii, სურ. 14 B). იმისათვის რომ შეგვესწავლა, თუ როგორ მიმდინარეობს ეს პროცესი, ჩვენ შევისწავლეთ QPA რეაქციის სიჩქარის დამოკიდებულება სხვადასხვა სიგრძის სამიზნე დნმ-ისთვის (გრაფ. 1). სისტემას მოკლე სამიზნე დნმ-ით აქვს ტიპიურ QPA რეაქციის ხასიათი. ოპტიმალური ტემპერატურით ~67 °C-ზე (59). შემდეგი სისტემა, სამიზნე დნმ დაგრძელებული 10-nt სიგრძის AT უბნით, დიდად არ განსხვავდება მოკლე სამიზნე დნმ-იანი სისტემისგან. მისი ოპტიმალური ტემპერატურა გადანაცვლებულია 68 °C-ზე (გრაფ. 1). AT უბნით გამოწვეულ ამ მცირე სტაბილურობამ, მნიშვნელოვანი როლი შეასრულა ორ-პრაიმერიან ექსპონენციური QPA რეაქციისათვის პრაიმერებისა და სამიზნე დნმ-ის შერჩევაში. სამიზნე დნმ-ის დამატებით 6 GC ფუძე წყვილით დაგრძელებამ, საგრძნობლად შეამცირა რეაქციის სიჩქარე. რეაქციის ოპტიმალური სიჩქარე მიიღწევა 72 °C-ზე. ამდენად, პრაიმერის ჩანაცვლების პროცესი მნიშვნელოვნად შეფერხდა ამპლიკონი/სამიზნე დნმ-ის თერმული სტაბილურობის გაზრდით (რაც განაპირობა სამიზნე დნმ-ის დაგრძელებამ GC უბნით) (გრაფ. 1). თუმცა, AT უბნის დამატებამ სამიზნე დნმ-ზე, რეაქციაზე მნიშვნელოვანი გავლენა არ მოახდინა. ასე რომ, გრძელი სამიზნე დნმ-ის პირობებში, სასურველია QPA რეაქცია ჩატარდეს 4-5 °C-ით უფრო მაღალ ტემპერატურაზე, ვიდრე QPA რეაქცია მოკლე სამიზნე დნმ-იანი სისტემისთვის.

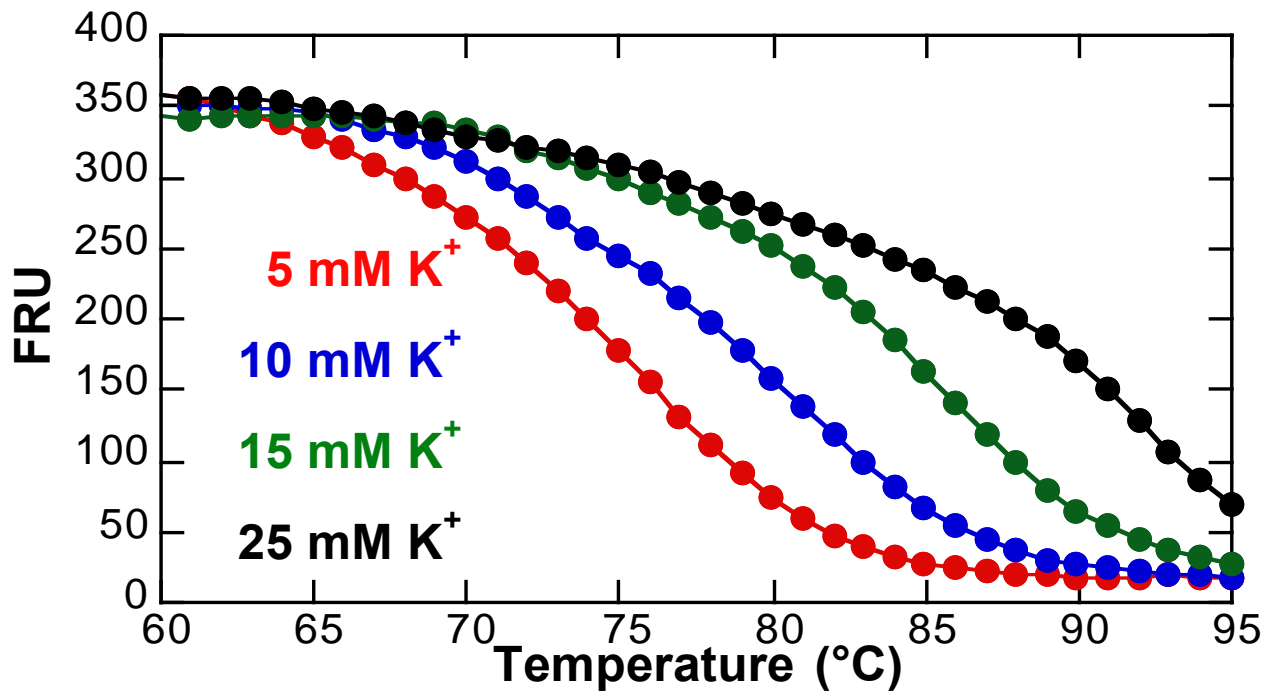
#### **2.4.4. კვადრუპლექსის გაშლა და რეპლიკაცია**

იზოთერმული, ექსპონენციური QPA რეაქციის ყველაზე დიდი გამოწვევა იყო, ორი ურთიერთსაპირისპირო პროცესისთვის, QPA პრაიმერის ელონგაციის შემდეგ კვადრუპლექსის ფორმირების და მეორე პრაიმერის ელონგაციის შედეგად მისი გაშლის, საერთო სარეაქციო პირობების მორგება. მაგ.: K<sup>+</sup> იონების კონცენტრაციის გაზრდით ხდება პირველი პროცესის ხელშეწყობა და ამავდროულად მეორე პროცესისთვის ხელის შეშლა.



გრაფიკი 2. (A) კვადრუპლექსის პოლიმერაზული გაშლის სქემატური გამოსახულება. (B) კვადრუპლექსის გაშლის მრუდები სხვადასხვა ტემპერატურაზე; 5 mM KCl, 45 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> ბუფერში, Taq პოლიმერაზას გამოყენებით. (წვრილი მრუდები შეესაბამება საკონტროლო ექსპერიმენტებს, პოლიმერაზას გარეშე).

წრფივ QPA რეაქციაში K<sup>+</sup> იონების როლი შევისწავლეთ წინა კვლევებში (59). რეაქცია მუშაობს K<sup>+</sup> იონების 5 mM-დან 50 mM-მდე კონცენტრაციულ შუალედში. დნმ პოლიმერაზას მიერ კვადრუპლექსის გაშლის პროცესის შესასწავლად ჩავატარეთ კვადრუპლექსზე დაფუძნებული ანალიზი (გრაფ. 2). ექსპერიმენტში გამოვიყენეთ კვადრუპლექსი 2AP-ით ყულფის პოზიციაში, რომელიც იყო დაგრძელებული 20-nt სიგრძის თანმიმდევრობით. ეს თანმიმდევრობა წარმოადგენს პრაიმერის ბმის უბანს 18-



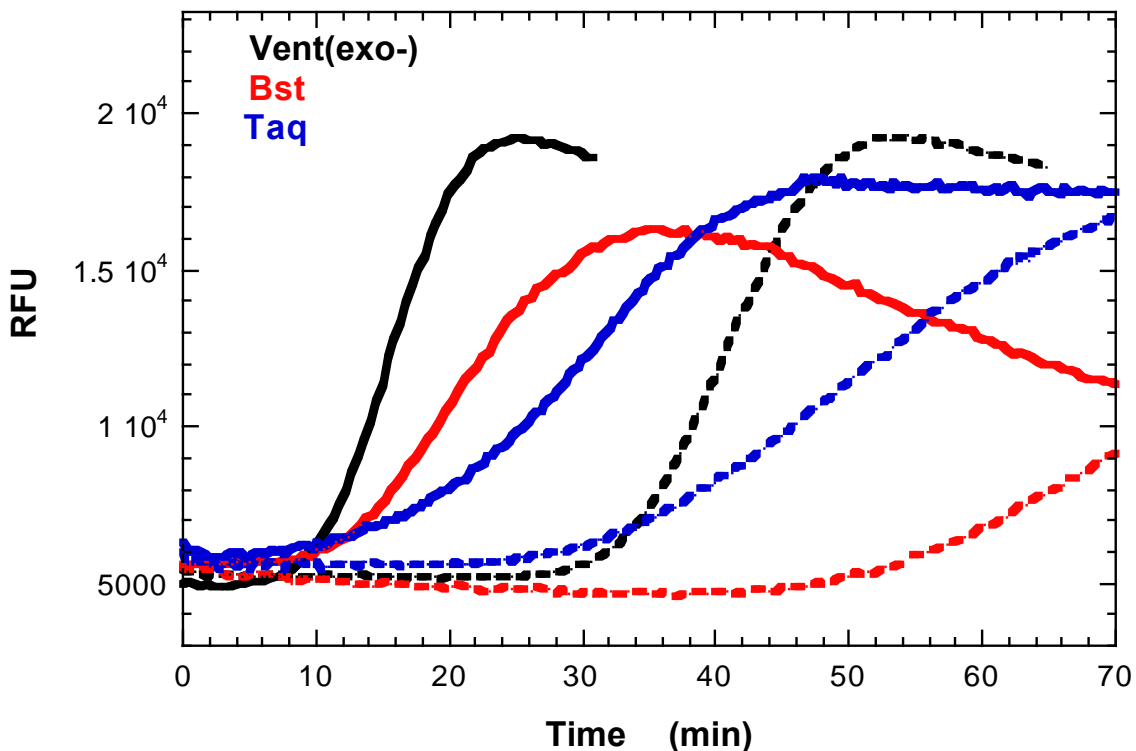
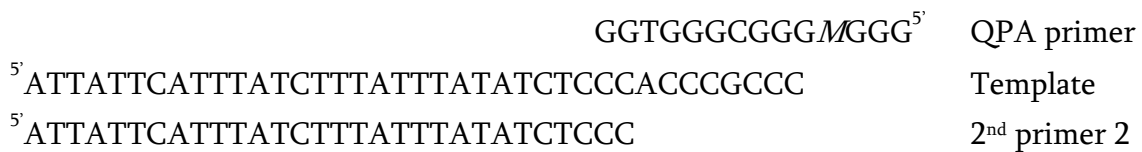
გრაფიკი 3. კვადრუპლექსის ფლურესცენციული ლღობის მრუდები K<sup>+</sup> იონების სხვადასხვა კონცენტრაციაზე. ექსპერიმენტის პირობები: 50 mM მონოვალენტური კათიონები (K<sup>+</sup> + Cs<sup>+</sup>), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 8.7.

nt სიგრძის პრაიმერისთვის (გრაფ. 2 A). პრაიმერის ელონგაციის შედეგად მოხდება კვადრუპლექსის გაშლა და 2AP-ის ფლურესცენციული სიგნალის ჩაქრობა. იმის შესამოწმებლად, რომ ფლურესცენციული სიგნალის ჩაქრობა ხდება ელონგაციის შედეგად, ასევე გავზომეთ კვადრუპლექსის თერმული ლღობის ექსპერიმენტები K<sup>+</sup> იონების სხვადასხვა კონცენტრაციისთვის (გრაფ. 3). როგორც მოსალოდნელი იყო კვადრუპლექსის სტაბილურობა ძლიერად არის დამოკიდებული K<sup>+</sup> იონების კონცენტრაციაზე. 65 °C-ის ქვემოთ, 5 mM K<sup>+</sup> იონების კონცენტრაციაზეც კი, კვადრუპლექსი ინარჩუნებს დაკეცილ სტრუქტურას (გრაფ. 3). კვადრუპლექსის გახსნის რეაქცია შევისწავლეთ Taq პოლიმერაზას გამოყენებით, 5 mM K<sup>+</sup> იონების თანაობისას, 60, 68, 70 და 74 °C-ზე (გრაფ. 2). საკონტროლო ექსპერიმენტებში (წვრილი მრუდები; გრაფ. 2 B) სადაც დნმ პოლიმერაზას დამატება არ ხდებოდა, დაიკვირვება ფლურესცირებადი სიგნალის კლება, რაც გამოწვეულია ტემპერატურით. 60 და 68 °C-ზე ფლურესცენციული სიგნალი უმნიშვნელოდ იკლებს (შავი და წითელი წვრილი

მრუდები; გრაფ. 2 B). ხოლო, 70 და 74 °C-ზე სიგნალი მცირდება დაახლოებით 20% და 50%-ით, რაც გამოწვეულია კვადრუპლექსის თერმული გაშლით (ლურჯი და მწვანე წვრილი მრუდები; გრაფ. 2 B). რაც სრულად შეესაბამება კვადრუპლექსის ლლობის მრუდებს (გრაფ. 3). ამგვარად 60 და 68 °C-ზე ფლურესცენციული სიგნალი ჩაქრობა, მხოლოდ დნმ პოლიმერაზას აქტივობის შედეგია (შავი და წითელი მსხვილი მრუდები; გრაფ. 2 B). სიგნალის ჩაქრობის სიჩქარე დაახლოებით 50 nM/min და 80 nM/min-შია, შესაბამისად 60 და 68 °C-ზე. მაღალ ტემპერატურებზე, 70 °C და 74 °C, დარჩენილი სიგნალის 80% და 50%-ის ჩაქრობა ხდება ასევე პოლიმერაზას აქტივობის შედეგად (ლურჯი და მწვანე მსხვილი მრუდები; გრაფ. 2 B). ჩაქრობის სიჩქარით დაახლოებით 200 nM/min, ორივე ტემპერატურისთვის. ჩვენ ასევე შევისწავლეთ კვადრუპლექსის გახსნის რეაქცია სხვადასხვა დნმ პოლიმერაზას მიერ. ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ ჩვენს მიერ შესწავლის ყველა დნმ პოლიმერაზას აქვს კვადრუპლექსის გაშლის უნარი. თუმცა კვადრუპლექსის გაშლა დამოკიდებულია ტემპერატურაზე და K<sup>+</sup> იონების კონცენტრაციაზე. საბოლოო ექსპერიმენტის პირობების შესარჩევად, ჩავატარეთ ექსპერიმენტები ჩვენი სანიზნე დნმ-ის (გრაფ. 4) გამოყენებით. რის შედეგადაც ექსპონენციური QPA რეაქციისთვის K<sup>+</sup>-ის იონების ოპტიმალურ კონცენტრაციად შევარჩიეთ 10 mM.

#### 2.4.5. ექსპონენციური QPA რეაქცია

სამიზნე დნმ (გრაფ. 4), რომელიც ზემოთ აღწერილი შედეგების გათვალისწინებით შევარჩიეთ, შედგება ორი სეგმენტისგან. 11-nt სიგრძის QPA



გრაფიკი 4. ექსპონენციური QPA რეაქცია სხვადასხვა დნმ პოლიმერაზით. QPA პრაიმერში *M*-ით აღნიშნულია 3MI. ერთიანი მრუდები შეესაბამება ექსპერიმენტებს 100 pM კონცენტრაციის სამიზნე დნმ-ით; წყვეტილი მრუდები შეესაბამება ნეგატიურ კონტროლებს, ექსპერიმენტებს სამიზნე დნმ-ის გარეშე; ექსპერიმენტის პირობები: 350 nM QPA პრაიმერი, 300 nM მეორე პრაიმერი, 400 μM dNTP, 0.06 U/μl *Vent* (exo-), (შავი) 0.08 U/μl *Bst* 2.0 (წითელი), 0.1 U/μl *Taq* (ლურჯი). ბუფერი: 10 mM KCl, 40 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>; ექსპერიმენტი ჩატარდა 66 °C ტემპურატურაზე.

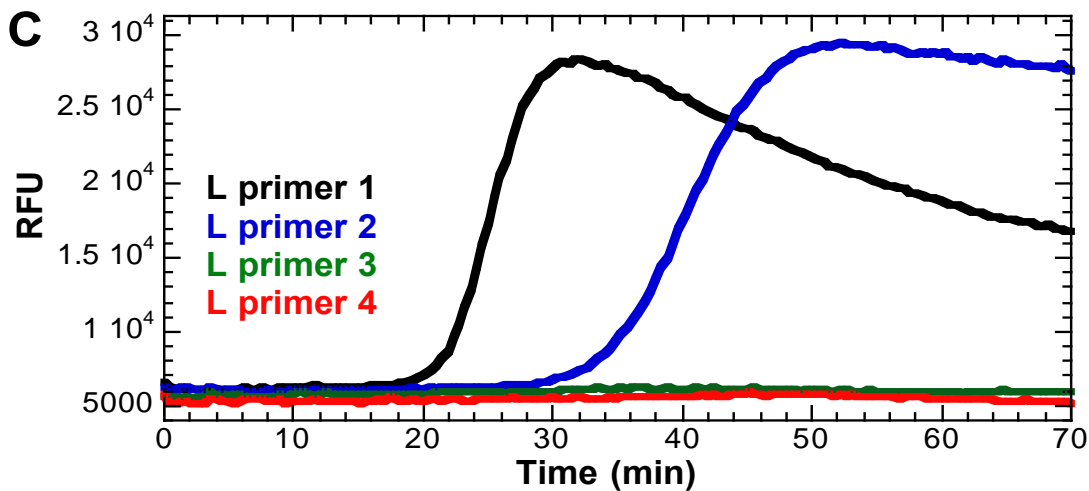
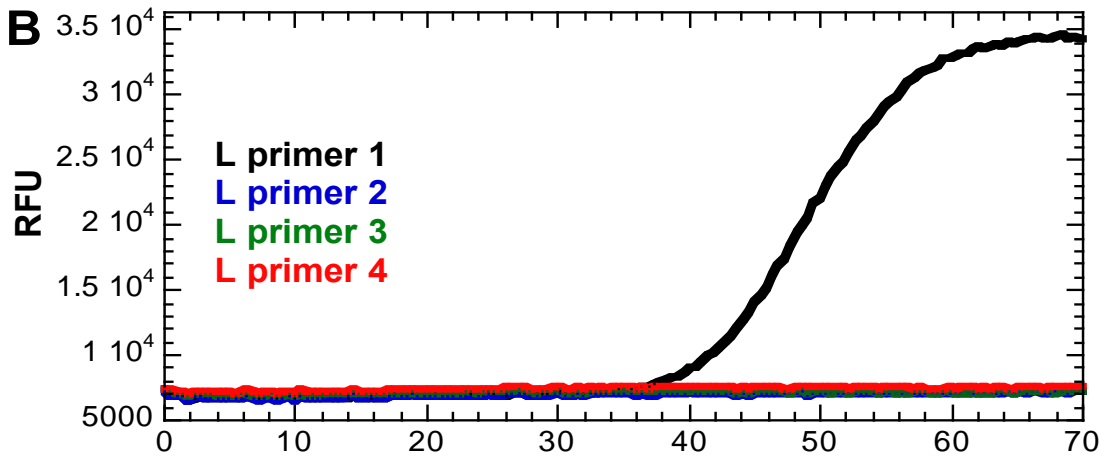
პრაიმერის ბმის უბნისგან და AT-თ მდიდარი *მეორე* პრაიმერის თანმიმდევრობისგან (58). *მეორე* პრაიმერის AT-თ მდიდარი უბანი ინარჩუნებს პროდუქტის დაბალ თერმულ სტაბილურობას (ცხრილი 2). იგივე მიზეზით QPA პრაიმერის ბმის უბანი არის 11-nt სიგრძის (58). პრაიმერებს აქვთ გადაფარვა (overlap) (i) რათა გაადვილდეს კვადრუპლექსის გაშლის პროცესი *მეორე* პრაიმერის მიერ; (ii) *მეორე* პრაიმერი/ამპლიკონის კომპლექსის სტაბილიზაცია, პროდუქტი დნმ-ის სტაბილიზაციის უცვლელად. ექსპერიმენტები ჩავატარეთ 66 °C-ზე, ამ ტემპერატურაზე ეფექტურად ხდება პრაიმერების ელონგაცია (58), ამავდროულად პროდუქტი ორჯაჭვიანი დნმ დესტაბილიზირებულია, რაც ხელს უწყობს კვადრუპლექსის სწრაფ ფორმირებას და ჯაჭვის ჩანაცვლების პროცესს (ცხრილი 1).

ექსპონენციურ QPA რეაქციაში (სურ. 14), პროდუქტის რაოდენობრივი განსაზღვრა ხორციელდება ფლურესცენციით, კვადრუპლექსის საშუალებით. ამპლიფიკაციის დროს კვადრუპლექსი განუწყვეტლივ იკეცება (გაქვს სიგნალი) და იშლება (სიგნალი ქვრება). როგორც უკვე განვიხილეთ, კვადრუპლექსის გაშლის პროცესი, რასაც თან ახლავს ფლურესცირებადი სიგნალის ჩაქრობა, აუცილებელია ექსპონენციალური ამპლიფიკაციისთვის. ასე, რომ მნიშვნელოვანია პრაიმერების იმ რაოდენობის განსაზღვრა, რომელიც ხელს არ შეუშლის QPA რეაქციის დაკვირვებას ფლურესცენციული სიგნალი დაფიქსირებით. ამის გათვალისწინებით ჩავატარეთ ექსპერიმენტები პრაიმერების სხვადასხვა კონცენტრაციებზე. QPA პრაიმერის ფიქსირებულ კონცენტრაციაზე ვცვლიდით *მეორე* პრაიმერის კონცენტრაციას. ცდების შედეგად გამოვლინდა, რომ საუკეთესო შედეგი მიიღება, როდესაც QPA პრაიმერი 15-20%-ით უფრო მეტია ვიდრე *მეორე* პრაიმერი.

ექსპონენციური QPA რეაქციისთვის საუკეთესო დნმ პოლიმერაზას შესარჩევად ჩავატარეთ ექსპერიმენტთა ციკლი. ამ ექსპერიმენტებში, შევისწავლეთ (i) ამპლიფიკაცია 100 pM კონცენტრაციის სამიზნე დნმ-ისთვის და (ii) რეაქციის ნეგატიური კონტროლი, ექსპერიმენტები, როდესაც სარეაქციო არეში გვაქვს ყველა კომპონენტი გარდა სამიზნე დნმ-ისა (გრაფ. 4).

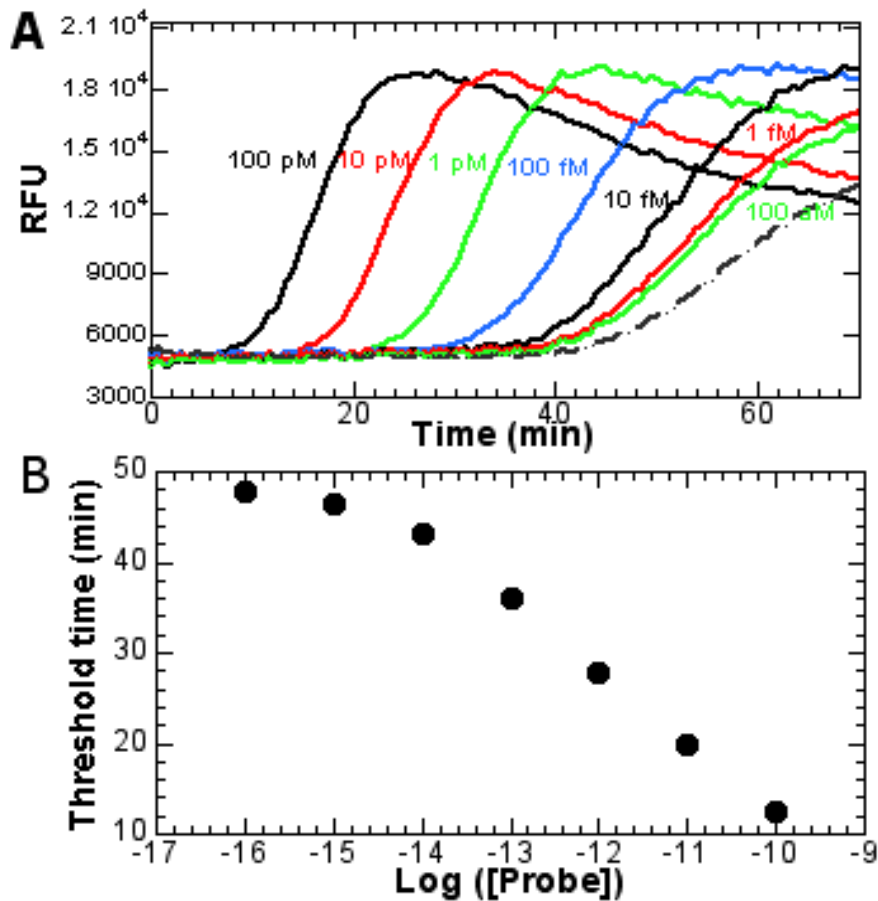
**A**

	GTGGGCGGGMGGG <sup>5'</sup>	13-nt QPA primer
	GGTGGGCGGGMGGG <sup>5'</sup>	14-nt QPA primer
5'	ATTATTCATTTATCTTTATTTATATCTCCCAC	2 <sup>nd</sup> primer 1
5'	ATTATTCATTTATCTTTATTTATATCTCCC	2 <sup>nd</sup> primer 2 (WT)
5'	ATTATTCATTTATCTTTATTTATATCTCC	2 <sup>nd</sup> primer 3
5'	ATTATTCATTTATCTTTATTTATATCTC	2 <sup>nd</sup> primer 4



გრაფიკი 5. ნეგატიური კონტროლები სხვადასხვა პრაიმერებით. (A) პრაიმერის თანმიმდევრობები; QPA პრაიმერში *M* აღნიშნავს 3MI-ს. (B) ექსპერიმენტები 13-nt QPA პრაიმერით და (C) ექსპერიმენტები 14-nt QPA პრაიმერით. რეაქციის პირობები: 300 nM QPA პრაიმერი, 300 nM მეორე პრაიმერები, 400  $\mu$ M dNTP, 0.06 U/ $\mu$ l *Vent* (exo-). ბუფერი: 10 mM KCl, 40 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>; ექსპერიმენტი ჩატარდა 66 °C.

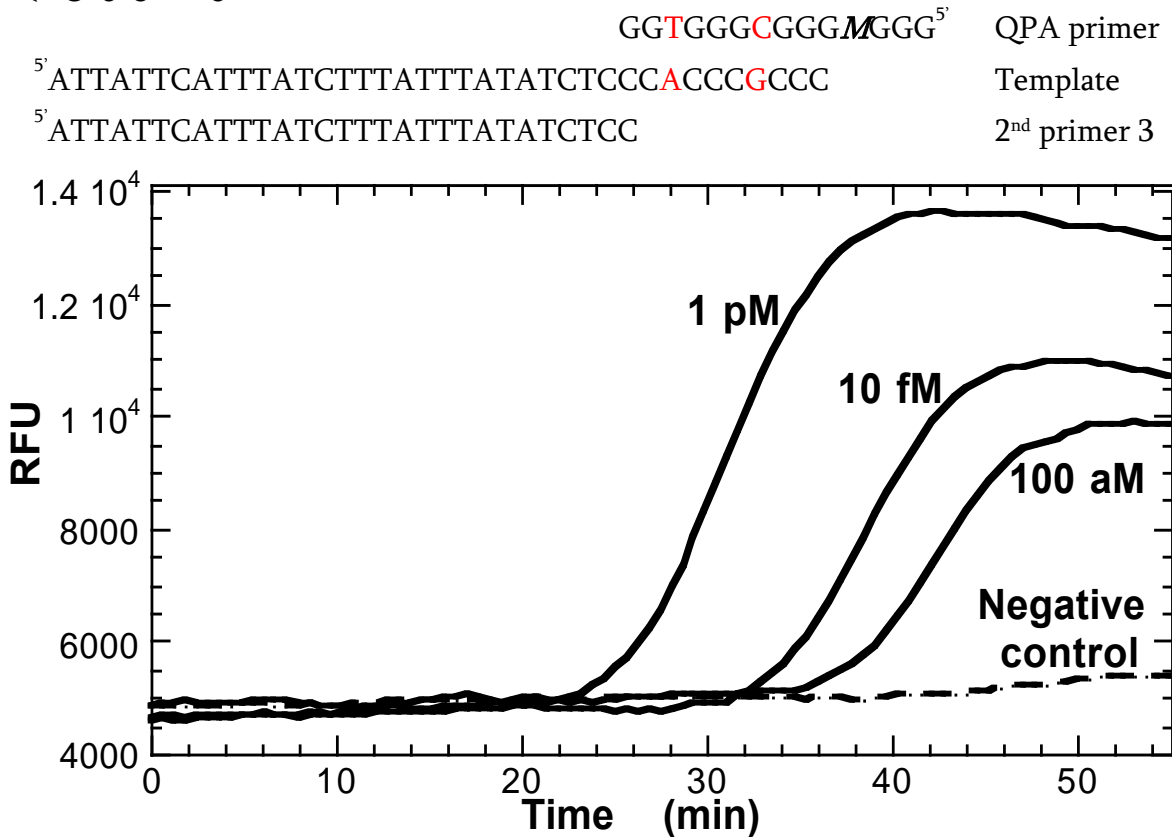
ყველაზე სწრაფი და ეფექტური ამპლიფიკაცია აჩვენა Vent (exo-) დნმ პოლიმერაზამ (შავი მრუდი; გრაფ. 4). ფლურესცირებადი სიგნალის ზრდა ფიქსირდება, რეაქციის დაწყებიდან ~8 წუთში და მაქსიმუმს აღწევს 15 წუთში. ასევე, ფიქსირდება ძლიერი ნეგატიური აქტივობა, რომელიც იმეორებს ამპლიფიკაციის მრუდს და ჩამორჩება მას ~25 წუთით (შავი წყვეტილი მრუდი; გრაფ. 4). ექსპერიმენტებში Bst 2.0



გრაფიკი 6. ექსპონენციური QPA სამიზნე დნმ-ის სხვადასხვა კონცენტრაციაზე. (A) ამპლიფიკაცია სამიზნე დნმ-ის კონცენტრაციის 10-ჯერადი შემცირებით 100 pM-დან 100 aM-მდე. (B) კორელაცია რეაქციის დაწყების დროსა და სამიზნე დნმ-ის კონცენტრაციას შორის. ექსპერიმენტული პირობები: 350 nM QPA პრაიმერი, 300 nM მეორე პრაიმერი, 400 μM dNTP, 0.06 U/μl Vent (exo-). ბუფერი: 10 mM KCl, 40 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> ექსპერიმენტი ჩატარდა 66 °C.

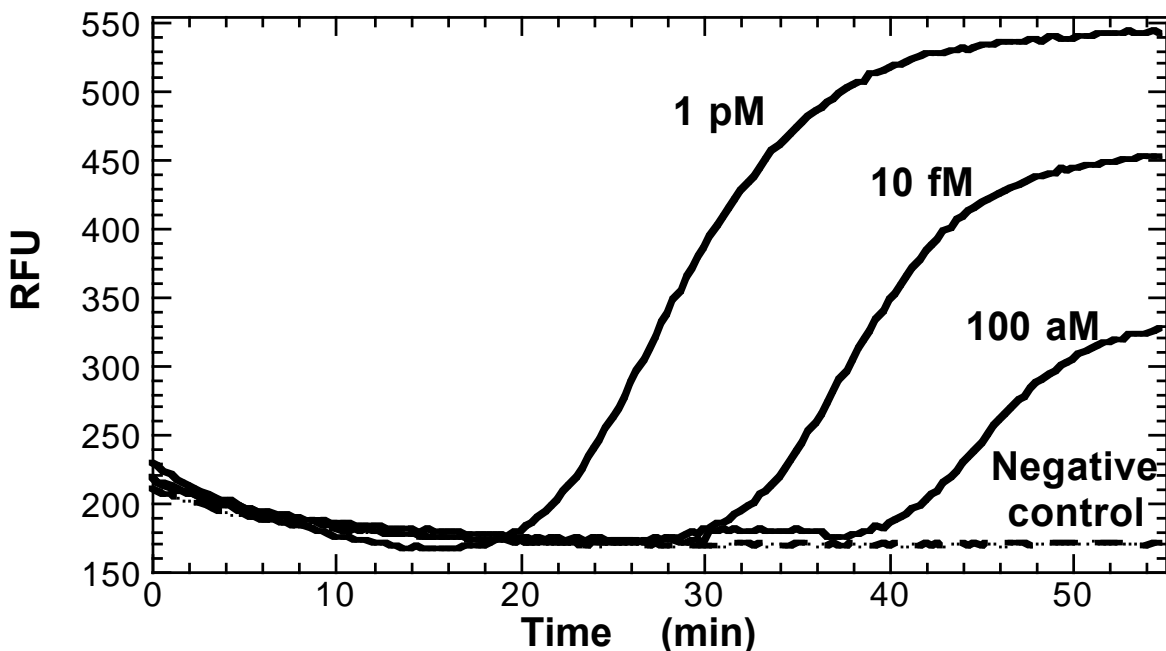


პოლიმერაზით, ფლურესცირებადი სიგნალის ზრდა დაიწყო 10 წუთის შემდეგ (წითელი მრუდი; გრაფ. 4). თუმცა, (i) სიგნალი მცირეა; (ii) ვერ აღწევს მის მაქსიმუმს; და (iii) იწყებს ჩაქრობას ~35 წუთში. Bst 2.0 პოლიმერაზის ნეგატიურმა საკონტროლო ექსპერიმენტებმა აჩვენა სუსტი აქტივობა 50 წუთის შემდეგ (წითელი წყვეტილი მრუდი; გრაფ. 4). Taq პოლიმერაზამ აჩვენა სიგნალის ყველაზე სუსტი ზრდა. იწყება 10 წუთის შემდეგ და იწყებს კლებას ~45 წუთის შემდეგ. ხოლო მისი ნეგატიური კონტროლი იმეორებს ამპლიფიკაციის მრუდს და ჩამორჩება მას ~20 წუთით. აღწერილმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ სამივე დნმ პოლიმერაზა შესაძლებელია გამოვიყენოთ ექსპონენციურ QPA რეაქციებში. მიღებული შედეგების გათვალისწინებით, შემდგომი ექსპერიმენტებისთვის ჩვენ ავირჩიეთ Vent (exo-) დნმ პოლიმერაზა. სწრაფი ამპლიფიკაციის გამო.



გრაფიკი 7. ექსპონენციური QPA რეაქცია მოკლე მეორე პრაიმერით, სამიზნე დნმ-ის სხვადასხვა კონცენტრაციებისთვის. QPA პრაიმერში *M* აღნიშნავს 3MI-ს. ექსპერიმენტული პირობები: 350 nM QPA პრაიმერი, 300 nM მეორე პრაიმერი, 400 μM dNTP, 0.08 U/μl Vent (exo-). ბუფერი: 5 mM KCl, 45 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> ექსპერიმენტი ჩატარდა 66 °C.

საბოლოო ექსპერიმენტების დაწყებამდე, QPA რეაქციის, როგორც სამიზნე დნმ ფუნქციის ჩაწერამდე, ჩავატერეთ ექსპერიმენტების კიდევ ერთი ციკლი, ნეგატიური აქტივობების შესასწავლად. ამ ექსპერიმენტებში გამოვიყენეთ იგივე ექსპერიმენტული პირობები, რაც აღწერილია გრაფიკ 4-ში. შევარჩიეთ განსხვავებული სიგრძის ოთხი *მეორე* პრაიმერი და ორი QPA პრაიმერი, მათ შორის სხვადასხვა სიგრძის გადაფარვით (გრაფ. 5 A). 13-nt სიგრძის QPA პრაიმერს აქვს გადაფარვა *მეორე* პრაიმერთან 0-, 1-, და 3-nt. შესაბამისი ექსპერიმენტები აჩვენებს, რომ ნეგატიური აქტივობა აქვს, მხოლოდ პრაიმერებს 3-nt გადაფარვით. (გრაფ. 5 B). ხოლო, 14-nt-იანი QPA პრაიმერი, 0-, 1-, 2- და 4-nt გადაფარვით, აჩვენებს ნეგატიურ აქტივობას 2- და 4-nt გადაფარვიან სისტემებისთვის (გრაფ. 5 C). სისტემა 4-nt გადაფარვიანი სისტემით, აჩვენებს სიგნალის ზრდას 20 წუთიდან და აღწევს მაქსიმუმს, დაახლოებით 10 წუთში. როგორც



გრაფიკი 8. ექსპონენციური QPA რეაქცია სტაბილიზირებული სამიზნე დნმ-ის სხვადასხვა კონცენტრაციებისთვის. QPA პრაიმერში *M* აღნიშნავს 3MI-ს. ექსპერიმენტული პირობები: 300 nM QPA პრაიმერი, 400 nM *მეორე* პრაიმერი, 400 μM dNTP, 0.06 U/μl *Vent* (exo-). ბუფერი: 15 mM KCl, 35 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> ექსპერიმენტი ჩატარდა 69 °C.

მოსალოდნელი იყო, 2-nt გადაფარვიანი სისტემა ჩამორჩება მას 30 წუთით (გრაფ. 5 C). ეს კვლევები მიანიშნებს, რომ ექსპონენციური QPA რეაქციის ნეგატიური აქტივობა გამოწვეულია გადაფარვით პრაიმერებს შორის. ამგვარად, ჩვენ შეგვიძლია გამოვიყენოთ პრაიმერები 2-nt გადაფარვით და შეგვიძლია მივიღოთ მარტივი ამპლიფიკაცია, დამატებითი კომპონენტების გარეშე. მნიშვნელოვანია იმის ცოდნა, რომ ნეგატიური აქტივობა შეიძლება გაიზარდოს პრაიმერების უფრო მაღალი კონცენტრაციების გამოყენების შემთხვევაში, ვიდრე ნაჩვენებია გრაფიკ 5-ზე.

საბოლოო ექსპერიმენტებში, ექსპონენციური QPA რეაქცია ჩავწერეთ, როგორც სამიზნე დნმ-ის კონცენტრაციის ფუნქცია. ჩვენ შევისწავლეთ სამი განსხვავებული სისტემა. პირველი სისტემა აღწერილია გრაფიკ 4-ზე, პრაიმერები 2-nt გადაფარვით. გრაფიკ 6A-ზე ნაჩვენებია ექსპონენციური QPA რეაქციის სამიზნე დნმ-ის კონცენტრაციის 10-ჯერადი შემცირებით 100 pM-დან 100 aM-მდე და გრაფიკ 6B-ზე წარმოდგენილია

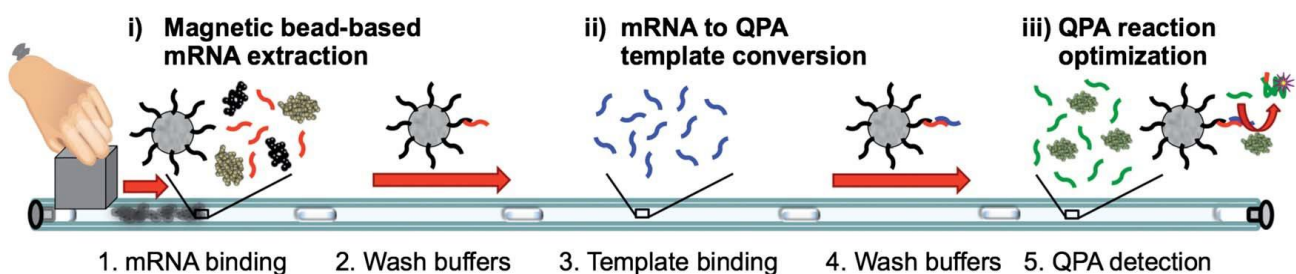
Complex	Cs <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
Template/QPA primer	60.4 (53.3)	60.5 (53.3)
Template/2 <sup>nd</sup> primer	62.0 (59.0)	58.5 (55.5)
Product	71.0 (68.8)	67.0 (64.8)

ცხრილი 2. ექსპონენციურ QPA რეაქციაში მონაწილე დნმ დუპლექსების ლღვობის ტემპერატურები ( $T_m$ ). დნმ-ის ოლიგონუკლეოტიდური თანმიმდევრობები ნაჩვენებია გრაფიკ 4-ზე. ოლიგონუკლეოტიდური თანმიმდევრობების კონცენტრაცია არის 6  $\mu$ M; ბუფერები: Cs<sup>+</sup> (50 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) და K<sup>+</sup> (10 mM KCl, 40 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>). ფრჩხილებში ჩაწერილი მონაცემები შეესაბამება 500 nM კონცენტრაციის თანმიმდევრობებს.

კორელაცია რეაქციის დაწყების დროსა და სამიზნე დნმ-ის კონცენტრაციას შორის. დამოკიდებულება არის წრფივი 100 pM-დან 10 fM-მდე. თუმცა, დაბალ კონცენტრაციებისთვის (1 fM და 100 aM) ხდება გადახრა წრფივი დამოკიდებულებიდან. როგორც მოსალოდნელი იყო, ამ სისტემას აქვს ნეგატიური აქტივობა. მეორე სისტემა პირველს მსგავსია, ერთი განსხვავებით, *მეორე* პრაიმერი დამოკლებულია, რის შედეგადაც პრაიმერებს შორის გვრჩება 1-nt გადაფარვა (გრაფ. 7). ამ სისტემას არ აქვს ნეგატიური აქტივობა და სამიზნე დნმ-ის 100 aM კონცენტრაციის დაფიქსირება ადვილად ხორციელდება. უკანასკნელ, მესამე სისტემაში (გრაფ. 8), პრაიმერები ურთიერთგადაიფარება 1-nt-თი, მაგრამ გაზრდილია პრაიმერები/პრაიმერების ბმის უბნის სტაბილიზაცია, QPA პრაიმერში თიმინი ჩანაცვლებულია ციტოზინით, ხოლო *მეორე* პრაიმერში ადენინი ჩანაცვლებულია ციტოზინით. რის შედეგადაც რეაქციის ოპტიმალური ტემპერატურა გაიზარდა და არის 69 °C. წინა სისტემის მსგავსად, ეს სისტემაც თავისუფალია ნეგატიური აქტივობისგან.

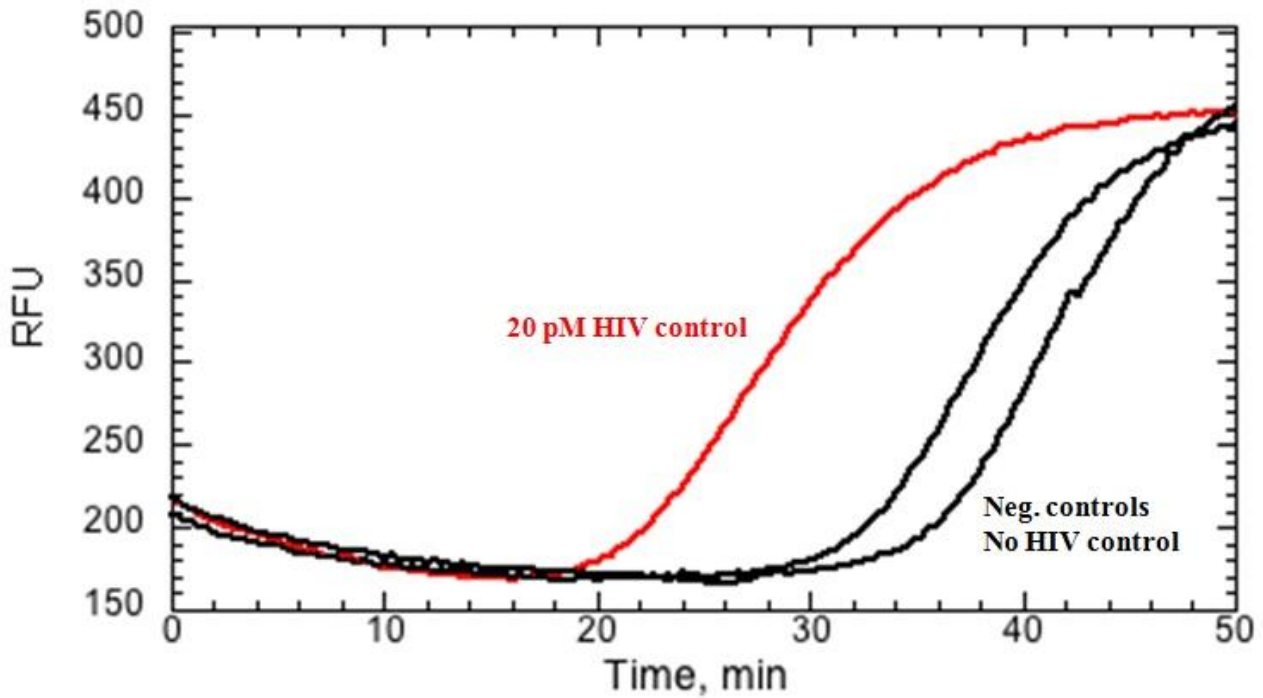
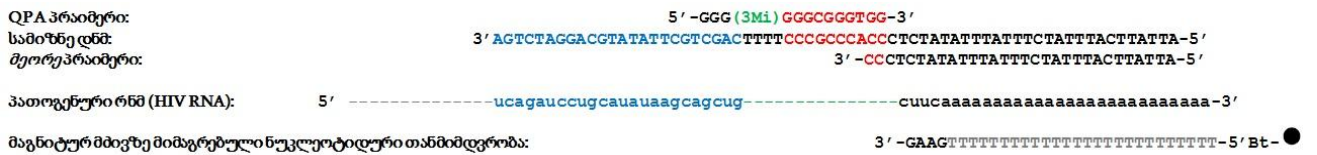
ჩვენ მიერ წარმოდგენილი ქსპონენციური QPA რეაქცია შექმნილია ე.წ. მრავალ სინჯარიანი (Multi Tube) დიაგნოსტიკური მოდელისთვის. სადაც პათოგენური დნმ-ის (ან რნმ-ის) გადატანა სხვადასხვა ბუფერში, კაპილარის გასწვრივ, ხდება მაგნიტის მეშვეობით (სურ. 15).

ეს მოდელი წარმოადგენს კაპილარში, ერთმანეთის შეურევლად, მოთავსებულ სხვადასხვა ბუფერს, რომელშიც გარედან მაგნიტის მეშვეობით, ხდება მაგნიტური მძივების გადატანა ბუფერიდან ბუფერში. თავდაპირველად ხდება სტრუქტავიდინით დაფარულ მაგნიტურ მძივებზე წინასწარ შერჩეული, პათოგენური რნმ-ის კომპლემენტარული, ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის მიმაგრება. ნუკლეოტიდურ



სურათი 15. მრავალ სინჯარიანი (Multi Tube) მოდელის სქემატური გამოსახულება.

თანმიმდევრობას 5' ბოლოში დაკვშირებული აქვს ბიოტინი, რომელიც წარმოქმნის ძლიერ ბმას სტრუქტავიდინთან. მაგნიტურ მძივებზე მიმაგრებული თანმიმდევრობა უკავშირდება პათოგენური რნმ-ის კომპლემენტარულ უბანს (1. mRNA binding, სურ. 15) და მაგნიტის გამოყენებით გადაგვაქვს *გასარეცხ* ბუფერში (2. wash buffer, სურ. 15), არასპეციფიკური ბმების თავიდან ასაცილებლად. შემდეგ მძივებზე მიმაგრებული პათოგენური რნმ გადაგვაქვს ბუფერში სადაც გვაქვს QPA რეაქციისთვის შერჩეული სამიზნე დნმ (3. template binding, სურ. 15). პათოგენურ რნმ-ს და სამიზნე დნმ-ს აქვთ ურთიერთკომპლემენტარული უბანი (გრაფ. 9). სამიზნე დნმ-ის დაკავშირების შემდეგ მძივები კვლავ გადაგვაქვს *გასარეცხ* ბუფერში (4. wash buffer, სურ. 15). რის შემდეგაც,



გრაფიკი 9. პათოგენური რნმ-ის დეტექცია ექსპონენციური QPA რეაქციის გამოყენებით; Biotin DNA / Beads – 100 nM / 0.2 mg/mL, 20 pM HIV RNA, 100 nM სამიზნე დნმ; QPA რეაქციის ექსპერიმენტული პირობები: 300 nM QPA პრაიმერი, 300 nM მეორე პრაიმერი, 400 μM dNTP, 0.06 U/μl *Vent* (exo-). ბუფერი: 10 mM KCl, 40 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> ექსპერიმენტი ჩატარდა 69 °C.

მძივები გადაგვაქვს QPA დეტექციის ბუფერში, სადაც გვაქვს QPA-ს სარეაქციო პირობები: QPA პრაიმერი, *მეორე* პრაიმერი, dNTPs, დნმ პოლიმერაზა და სამუშაო ბუფერი (5. QPA detection, სურ. 15). QPA რეაქციით ვახდენთ სამიზნე დნმ-ის ამპლიფიკაციას და მის რაოდენობრივ განსაზღვრას.

ლაბორატორიულ პირობებში ჩვენ ჩავატერეთ აღნიშნულთან მიახლოებული ექსპერიმენტი, დაავადებული პაციენტის რნმ-ზე. კაპილარის ნაცვლად რეაქციისთვის გამოვიყენეთ კიუვეტა. QPA რეაქციის პირობები და ოლიგონუკლეოტიდური თანმიმდევრობები ნაჩვენებია გრაფიკ 9-ზე. დნმ პოლიმერაზა და დეზოქსირიბონუკლეოტიდის ტრიფოსფატი (dNTPs) შევიძინეთ New England BioLabs (NEB)-დან; ოლიგონუკლეოტიდური თანმიმდევრობები შევიძინეთ Integrated DNA Technologies (IDT)-დან; 3MI-ჩაკერებული პრაიმერები შევიძინეთ Fidelity Systems-დან; მაგნიტური მძივები შევიძინეთ Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific-დან.

გრაფიკ 9-ზე წარმოდგენილია ექსპერიმენტის შედეგი. წითელი მრუდი შეესაბამება რეაქციას 20 pM პათოგენური რნმ-ით. ასევე გვაქვს ორი ნეგატიური კონტროლი (შავი მრუდები), რეაქციები: (i) პათოგენური რნმ-ის გარეშე და (ii) სამიზნე დნმ-ის გარეშე. 20 pM პათოგენური რნმ-ის ამპლიფიკაციის სიგნალს ნეგატიური კონტროლები ჩამორჩება 10-12 წუთით.

როგორც მეცხრე გრაფიკიდან ჩანს, ამ მეთოდით, ლაბორატორიულ პირობებში მოვახდინეთ 20 pM პათოგენური რნმ-ის დეტექცია.

## 2.5. შედეგების ინტერპრეტაცია/დისკუსია

წინამდებარე ნაშრომში ჩვენ შევქმენით ორპრაიმერიანი, ექსპონენციური QPA რეაქცია, წრფივი რეაქციისგან განსხვავებით თითქმის  $10^6$ -ჯერ გაზრდილი მგრძნობელობით. ექსპონენციური QPA არის მრავალ ეტაპიანი რეაქცია, რომელიც სხვა საფეხურებთან ერთად, აწარმოებს ორ ურთიერთ საწინააღმდეგო პროცესს: (i) ამპლიფიკაციის თითოეული ციკლი იწყება კვადრუპლექსის ფორმირებით (დაკეცვით), რომელის მეშვეობითაც პრაიმერი თავისთავად დისოცირდება სამიზნე დნმ-ს და ანთავისუფლებს პრაიმერის ბმის უბანს შემდეგი პრაიმერისთვის (Plateau-free), ყოველგვარი თერმული ციკლის გარეშე; და (ii) ციკლი მთავრდება კვადრუპლექსის გაშლით და რეპლიკაციით დნმ პოლიმერაზას მეშვეობით, რის შედეგადაც იქმნება ახალი სამიზნე დნმ, რაც წარმოადგენს ექსპონენციური რეაქციის საფუძველს. ექსპონენციური QPA რეაქციის კონსტრუირებაში მთვარი გამოწვევა იყო მოგვეძებნა სწორი ექსპერიმენტული პირობები და დნმ პოლიმერაზა, რომელიც თავსებადი იქნებოდა ამ ორი ურთიერთსაწინააღმდეგო პროცესის. კვადრუპლექსის გაშლისა და ფორმირების პროცესისთვის საერთო სარეაქციო პირობების მოსარგებად. ჩავატრეთ კვადრუპლექსის თერმული ლღვობის ექსპერიმენტები,  $K^+$ -ის იონების სხვადასხვა კონცენტრაციაზე. მიღებული შედეგების გათვალისწინებით შევარჩიეთ ბუფერები, სადაც  $K^+$ -ის იონების კონცენტრაცია არის 5, 10 ან 15 mM, პრაიმერების სხვადასხვა წყვილებისა და რეაქციის ტემპერატურის გათვალისწინებით.

რეაქციის თითოეული ეტაპი შევისწავლეთ ინდივიდუალურად, სხვადასხვა დნმ პოლიმერაზას გამოყენებით. დნმ პოლიმერაზას შესარჩევად ჩატარებული ექსპერიმენტების შედეგად შევარჩიეთ Vent (exo-) დნმ პოლიმერაზა, რომელმაც ყველაზე სწრაფი და ეფექტური ამპლიფიკაცია აჩვენა. ჩვენს მიერ შესწავლილ თითოეულ პოლიმერაზა ხასიათდებოდა ნეგატიური აქტივობით (ექსპერიმენტები სამიზნე დნმ-ის გარეშე). როგორც კვლევებით გამოჩნდა ნეგატიური აქტივობის მიზეზს წარმოადგენს პრაიმერებს (QPA პრაიმერი და *მეორე* პრაიმერი) შორის ნუკლეოტიდური გადაფარვები



(overlap). ვაჩვენეთ, რომ პრაიმერების სწორი შერჩევით შესაძლებელია ნეგატიური აქტივობის დათრგუნვა.

საბოლოოდ, მიღებული შედეგებზე დაყრდნობით შევქმენით იზოთერმული, ექსპონენციური QPA რეაქცია, რომელიც ატომოლარული კონცენტრაციის სამიზნე დნმ-ის ამპლიფიკაციის შესაძლებლობას გვაძლევს, დაახლოებით 40 წუთში.

ჩვენს მიერ წარმოდგენილი ექსპონენციური QPA რეაქცია შექმნილია ე.წ. მრავალ სინჯარიანი (Multi Tube) დიაგნოსტიკური მოდელისთვის. სადაც პათოგენური დნმ-ის (ან რნმ-ის) გადატანა სხვადასხვა ბუფერში, კაპილარის გასწვრივ, ხდება მაგნიტის მეშვეობით. ლაბორატორიულ პირობებში ჩავატერეთ, აღნიშნულთან მიახლოებული ექსპერიმენტი, დაავადებული პაციენტის რნმ-ზე. ექსპერიმენტის შედეგად ვაჩვენეთ, 20 pM კონცენტრაციის პათოგენური რნმ-ის დეტექცია.

QPA რეაქციაში დამატებითი პრაიმერის შემოტანით, შესაძლებელია მეთოდის გარდაქმნა ერთ-სინჯარიან დიაგნოსტიკური მოდელისთვის. რისი განხორციელებაც შემდგომ კვლევებს საჭიროებს.

მიღებულ შედეგების გათვალისწინებით, ვფიქრობთ, რომ რეალურად არის შესაძლებელი QPA რეაქციის გამოყენება სამედიცინო დიაგნოსტიკაში. ასევე, მოლეკულური ბიოლოგიის, გენეტიკის და სასამართლო მეცნიერების, გენეტიკური დაავადებებისა და პათოგენური მიკროორგანიზმების აღმოსაჩენად. და სამეცნიერო კვლევების პრაქტიკაში.



## 2.6. დასკვნა და რეკომენდაციები

1. QPA რეაქცია არის რეალურად იზოთერმული;
2. პრაიმერის მეშვეობით ხდება პროდუქტის დეტექცია და დათვლა;
3. რეაქციის პროდუქტის თვლის სისტემა მონომოლეკულურია;
4. რეაქციას არ აქვს ამპლიფიკაციის ლიმიტი (პლატოსგან თავისუფალია);
5. წრფივი რეაქციისგან განსხვავებით ექსპონენციურ QPA რეაქციას აქვს  $\sim 10^6$ -ჯერ გაზრდილი მგრძობელობა;
6. პრაიმერების შერჩევით შესაძლებელია რეაქციის სხვადასხვა ტემპერატურაზე წარმართვა;
7. QPA რეაქცია შესაძლებელია გამოვიყენოთ მრავალ სინჯარიანი (Multi Tube) დიაგნოსტიკური მეთოდში;
8. QPA რეაქციით შესაძლებელია დნმ-ს სიგნალის  $10^{10}$ -ჯერ გამრავლება  $\sim 40$  წუთში;

QPA რეაქციას აქვს სამედიცინო დიაგნოსტიკაში გამოყენების პოტენციალი. ასევე, მოლეკულური ბიოლოგიის, გენეტიკის და სასამართლო მეცნიერების, სამეცნიერო კვლევებში, გენეტიკური დაავადებებისა და პათოგენური მიკროორგანიზმების აღმოსაჩენად.

### 3.1. გამოყენებული ლიტერატურის ჩამონათვალი/ბიბლიოგრაფია

1. Adams, N. M., Wang, K. K., Caprioli, A. C., Thomas, L. C., Kankia, B., Haselton, F. R., and Wright, D. W. (2014) Quadruplex priming amplification for the detection of mRNA from surrogate patient samples, *The Analyst* 139, 1644-1652.
2. An L, Tang W, Ranalli TA, Kim HJ, Wytiaz J, Kong H. Characterization of a thermostable UvrD helicase and its participation in helicase-dependent amplification. *J Biol Chem.* 2005; 280:28952–8.
3. Asiello, P.J.; Baeumner, A.J. Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review. *Lab Chip* 2011, 11, 1420–1430.
4. Beals TP, Smith JH, Nietupski RM, Lane DJ. A mechanism for ramified rolling circle amplification. *BMC Mol Biol.* 2010; 11:94.
5. Blanco, L.; Bernad, A.; Lazaro, J.M.; Martin, G.; Garmendia, C.; Salas, M. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 8935–8940.
6. Bock, L. C., L. C. Griffin, J. J. Toole. 1992. Selection of singlestranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature.* 355:564–566.
7. Cho EJ, Yang L, Levy M, Ellington AD. Using a deoxyribozyme ligase and rolling circle amplification to detect a non-nucleic acid analyte, ATP. *J Am Chem Soc.* 2005; 127:2022–3.
8. Compton, J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 1991, 350, 91–92. 107
9. Connelly, J.T.; Nugen, S.R.; Borejsza-Wysocki, W.; Durst, R.A.; Montagna, R.A.; Baeumner, A.J. Human pathogenic *Cryptosporidium* species bioanalytical detection method with single oocyst detection capability. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391, 487–495.
10. Datta, K., Johnson, N. P., Villani, G., Marcus, A. H. & von Hippel, P. H. Characterization of the 6-methyl isoxanthopterin (6-MI) base analog dimer, a spectroscopic probe for

- monitoring guanine base conformations at specific sites in nucleic acids. *Nucleic acids research* 40, 1191-1202, doi:10.1093/nar/gkr858 (2012).
11. Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:5261–6.
  12. Deiman, B.; van Aarle, P.; Sillekens, P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Mol. Biotechnol.* 2002, 20, 163–179.
  13. Demidov VV. Rolling-circle amplification in DNA diagnostics: The power of simplicity. *Expert Rev Mol Diagn.* 2002; 2:542–8.
  14. Eisenstein M. DNA cloning and amplification; Breaking the cycle. *Nat Methods*. 2004; 1:1–2.
  15. Fakruddin M, Chowdhury A. Pyrosequencing: An alternative to traditional sanger sequencing. *Am J Bio Biotechnol.* 2012; 8:14–20.
  16. Fakruddin M, Mazumdar RM, Chowdhury A, Hossain MN, Mannan KS. Pyrosequencing-prospects and applications. *Int J Life Sci Pharma Res.* 2012; 2:65–76.
  17. Fakruddin M. Loop mediated isothermal amplification-An alternative to polymerase chain reaction (PCR) *Bang Res Pub J.* 2011; 5:425–39.
  18. Fidalgo da Silva, E., Mandal, S. S. & Reha-Krantz, L. J. Using 2-aminopurine fluorescence to measure incorporation of incorrect nucleotides by wild type and mutant bacteriophage T4 DNA polymerases. *The Journal of biological chemistry* 277, 40640-40649 (2002).
  19. Gellert, M., M. N. Lipsett, and D. R. Davies. 1962. Helix formation by guanylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 48:2013–2018.
  20. Gill P, Abdul-Tehrani H, Ghaemi A, Hashempour T, Amiri VP. Molecular detection of mycobacterium tuberculosis by tHDA-ELISA DIG detection system. *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 29:570–1.
  21. Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: A review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2008; 27:224–43.

22. Gogichaishvili S., Lomidze L., Kankia B. Quadruplex priming amplification combined with nicking enzyme for diagnostics. *Analytical Biochemistry*, Volume 466, Pages 44-48. 2014.
23. Gogichaishvili, S., Johnson, J., Gvarjaladze, D., Lomidze, L. & Kankia, B. Isothermal amplification of DNA using quadruplex primers with fluorescent pteridine base analogue 3-methyl isoxanthopterin. *Biopolymers*, doi:10.1002/bip.22421 (2013).
24. Gore, H.M.; Wakeman, C.A.; Hull, R.M.; McKillip, J.L. Real-time molecular beacon NASBA reveals *hblc* expression from *Bacillus* spp. in milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, *311*, 386–390.
25. Gusev Y, Sparkowski J, Raghunathan A, Ferguson H Jr, Montano J, Bogdan N, et al. Rolling circle amplification: A new approach to increase sensitivity for immunohistochemistry and flow cytometry. *Am J Pathol.* 2001; 159:63–9.
26. Hart E.J and Anbar M., *The Hydrated Electron*, At, Moscow, (1973).
27. Hawkins, M. E. Fluorescent pteridine probes for nucleic acid analysis. *Methods in enzymology* 450, 201-231, doi:10.1016/S0076-6879(08)03410-1 (2008).
28. Hawkins, M. E., Pfliederer, W., Mazumder, A., Pommier, Y. G. & Balis, F. M. Incorporation of a fluorescent guanosine analog into oligonucleotides and its application to a real time assay for the HIV-1 integrase 3'-processing reaction. *Nucleic acids research* 23, 2872-2880 (1995).
29. Hawkins, M.E. Synthesis, purification and sample experiment for fluorescent pteridine-containing DNA: tools for studying DNA interactive systems. *Nat Protoc.* 2007.
30. Hsuih TC, Park YN, Zaretsky C, Wu F, Tyagi S, Kramer FR, et al. Novel, ligation-dependent PCR assay for detection of hepatitis C in serum. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:501–7.
31. Hutchison, C.A., III; Smith, H.O.; Pfannkoch, C.; Venter, J.C. Cell-free cloning using phi29 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005, *102*, 17332–17336.
32. Jeong YJ, Park K, Kim DE. Isothermal DNA amplification *in vitro*: The helicase-dependent amplification system. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66:3325–36.

33. Jing, N., C. Marchand, Y. Pommier. 2000. Mechanism of inhibition of HIV-1 integrase by G-tetrad-forming oligonucleotides in Vitro. *J. Biol. Chem.* 275:21460–21467.
34. Jing, N., Rando, R.F., Pommier, Y. and Hogan, M.E. Ion selective folding of loop domains in a potent anti-HIV oligonucleotide. *Biochemistry.* 1997.
35. Johne, R.; Mueller, H.; Rector, A.; van Ranst, M.; Stevens, H. Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends Microbiol.* 2009, 17, 205–211.
36. Johnson, J., Okyere, R., Joseph, A., Musier-Forsyth, K. & Kankia, B. Quadruplex formation as a molecular switch to turn on intrinsically fluorescent nucleotide analogs. *Nucleic acids research* 41, 220-228, doi:10.1093/nar/gks975 (2013).
37. Kankia, B. I. (2011) Self-dissociative primers for nucleic acid amplification and detection based on DNA quadruplexes with intrinsic fluorescence, *Analytical biochemistry* 409, 59-65.
38. Law, S. M., Eritja, R., Goodman, M. F. & Breslauer, K. J. Spectroscopic and calorimetric characterizations of DNA duplexes containing 2-aminopurine. *Biochemistry* 35, 12329-12337 (1996).
39. Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas DC, Ward DC. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet.* 1998; 19:225–32.
40. Maizels, N. 2006. Dynamic roles for G4 DNA in the biology of eukaryotic cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:1055–1059.
41. Maizels, N. 2015. G4-associated human diseases. *EMBO Rep.* 16:910–922.
42. McHugh TD, Pope CF, Ling CL, Patel S, Billington OJ, Gosling RD, et al. Prospective evaluation of BDProbeTec strand displacement amplification (SDA) system for diagnosis of tuberculosis in non-respiratory and respiratory samples. *J Med Microbiol.* 2004; 53:1215–9.
43. McLaughlin, L. W., Leong, T., Benseler, F. & Piel, N. A new approach to the synthesis of a protected 2-aminopurine derivative and its incorporation into oligodeoxynucleotides

- containing the Eco RI and Bam HI recognition sites. *Nucleic acids research* 16, 5631-5644 (1988).
44. Morisset D, Stebih D, Cankar K, Zel J, Gruden K. Alternative DNA amplification methods to PCR and their application in GMO detection: Review. *Eur Food Res Technol.* 2008; 227:1287–97.
  45. Mothershed EA, Whitney AM. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and future considerations for the clinical laboratory. *Clin Chim Acta.* 2006; 363:206–20.
  46. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 1990; 262:56–61, 64.
  47. Nadal, A.; Coll, A.; Cook, N.; Pla, M. A molecular beacon-based real time NASBA assay for detection of *Listeria monocytogenes* in food products: Role of target mRNA secondary structure on NASBA design. *J. Microbiol. Methods* 2007, 68, 623–632.
  48. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes.* 2002; 16:223–9.
  49. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28:E63.
  50. Nugen, S.R.; Asiello, P.J.; Connelly, J.T.; Baeumner, A.J. PMMA biosensor for nucleic acids with integrated mixer and electrochemical detection. *Biosens. Bioelectron.* 2009, 24, 2428–2433.
  51. Rando, R. F., J. Ojwang, M. E. Hogan. 1995. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 activity in vitro by oligonucleotides which form intramolecular tetrads. *J. Biol. Chem.* 70:1754–1760.
  52. Rhodes, D., and H. J. Lipps. 2015. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res.* 43:8627–8637.
  53. Schweitzer B, Kingsmore S. Combining nucleic acid amplification and detection. *Curr Opin Biotechnol.* 2001; 12:21–7.

54. Schweitzer B, Wiltshire S, Lambert J, O'Malley S, Kukanskis K, Zhu Z, et al. Immunoassays with rolling circle DNA amplification: A versatile platform for ultrasensitive antigen detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97:10113–9.
55. Shan, S.; Ko, L.S.; Collins, R.A.; Wu, Z.; Chen, J.; Chan, K.Y.; Xing, J.; Lau, L.T.; Yu, A.C. Comparison of nucleic acid-based detection of avian influenza H5N1 with virus isolation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 302, 377–383.
56. Simone, R., P. Fratta, A. M. Isaacs. 2015. G-quadruplexes: emerging roles in neurodegenerative diseases and the non-coding transcriptome. *FEBS Lett.* 589:1653–1668.
57. So, H. M., K.Won, J. O. Lee. 2005. Single-walled carbon nanotube biosensors using aptamers as molecular recognition elements. *J. Am. Chem. Soc.* 127:11906–11907.
58. Tamar Partskhaladze, Adam Taylor, Levan Lomidze, David Gvarjaladze, Besik Kankia. Exponential quadruplex priming amplification for DNA-based isothermal Diagnostics. *Biopolymers*. 2015.
59. Taylor, A., Joseph, A., Okyere, R., Gogichaishvili, S., Musier-Forsyth, K., and Kankia, B. (2013) Isothermal quadruplex priming amplification for DNA-based diagnostics, *Biophysical chemistry* 171, 1-8.
60. van Gemen, B.; van Beuningen, R.; Nabbe, A.; van Strijp, D.; Jurriaans, S.; Lens, P.; Kievits, T. A one-tube quantitative HIV-1 RNA NASBA nucleic acid amplification assay using electrochemiluminiscent (ECL) labelled probes. *J. Virol. Methods* 1994, 49, 157–168.
61. Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep.* 2004; 5:795–800.
62. Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP. Strand displacement amplification - An isothermal, *in vitro* DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20:1691–6.

63. Walker GT. Empirical aspects of strand displacement amplification. *PCR Methods Appl.* 1993; 3:1–6.
64. Wang, K.; Tang, Z.; Yang, C.J.; Kim, Y.; Fang, X.; Li, W.; Wu, Y.; Medley, C.D.; Cao, Z.; Li, J.; Colon, P.; Lin, H.; Tan, W. Molecular engineering of DNA: Molecular beacons. *Angew. Chem. Int. Edit.* 2009, 48, 856–870.
65. Wang, Y.; Li, J.; Jin, J.; Wang, H.; Tang, H.; Yang, R.; Wang, K. Strategy for molecular beacon binding readout: Separating molecular recognition element and signal reporter. *Anal. Chem.* 2009, 81, 9703–9709.
66. Wiedmann M, Wilson WJ, Czajka J, Luo J, Barany F, Batt CA. Ligase chain reaction (LCR) - overview and applications. *PCR Methods Appl.* 1994; 3:S51–64.
67. Wiltshire S, O'Malley S, Lambert J, Kukanskis K, Edgar D, Kingsmore SF, et al. Detection of multiple allergen-specific IgEs on microarrays by immunoassay with rolling circle amplification. *Clin Chem.* 2000; 46:1990–3.
68. Yates, S.; Penning, M.; Goudsmit, J.; Frantzen, I.; van de Weijer, B.; van Strijp, D.; van Gemen, B. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA by real-time nucleic acid sequence-based amplification with molecular beacon detection. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 3656–3665.
69. Zhang DY, Brandwein M, Hsuih T, Li HB. Ramification amplification: A novel isothermal DNA amplification method. *Mol Diagn.* 2001; 6:141–50.
70. Zhang DY, Brandwein M, Hsuih TC, Li H. Amplification of target-specific, ligation-dependent circular probe. *Gene.* 1998; 211:277–85.
71. Zhong XB, Lizardi PM, Huang XH, Bray-Ward PL, Ward DC. Visualization of oligonucleotide probes and point mutations in interphase nuclei and DNA fibers using rolling circle DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:3940–5.