

Антонова Елена Ивановна

д-р биол. наук, профессор, директор

Ачилов Атабег Батырович

магистрант, младший научный сотрудник

Фирсова Наталья Викторовна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник

Викторов Денис Александрович

канд. биол. наук, старший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

DOI 10.31483/r-112104

МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ xMAP

Аннотация: в статье рассматриваются методы технологии xMAP, сфера применения в области клинических и фундаментальных исследований.

Ключевые слова: технология xMAP, диагностика мутаций, методы технологии xMAP, генотипирование.

В эпоху постгеномного секвенирования возникает необходимость анализировать огромное количество генетической информации, в связи с этим возникает необходимость в технологиях, которые позволяют быстро, экономически эффективно и с высокой производительностью выявлять последовательности нуклеиновых кислот, которые определяют развитие заболеваний, позволяют идентифицировать патогены. Технологические достижения в диагностике рака с точным определением местоположения, размера, стадии и молекулярных характеристик крайне необходимы для своевременного лечения в связи с высоким уровнем роста смертности. Ранняя диагностика рака быстро развивается

благодаря постоянному развитию и совершенствованию технологий, которые повышают возможности надежных диагностических подходов [9; 18; 23; 27; 30]. Несмотря на широкое использование ставшими уже рутинными методами анализа ДНК и РНК – ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR) и количественная ПЦР с обратной транскрипцией (RT-qPCR) или на основе антител иммуноферментный анализ (ELISA), возможности этих методов одновременно обнаруживать несколько аналитов в одной реакции ограничена [2]. Технология xMAP (x – аналит, MAP – мультианалитное профилирование), разработана в конце 1990-х годов [24] на основе микросфер, обеспечивает одновременное обнаружение различных аналитов в одном образце. Мультиплексные анализы xMAP в настоящее время доступны для анализа нуклеиновых кислот и иммуноанализов, что позволяет типировать вирусы, бактерии, грибы, антигены или антитела, в связи с чем широко используется в фармацевтических, клинических и исследовательских лабораториях [24].

Технология xMAP основана на использовании полистироловых микросфер размером 5,6 мкм, окрашенные двумя спектрально различными флуорохромами. Поскольку наборы микросфер различаются по спектральным адресам, их можно комбинировать, что позволяет одновременно измерять до 500 различных параметров в одном анализе.

Для обнаружения нуклеиновых кислот в системе xMAP используются разные химические методы анализа.

1. *Прямая гибридизация меченой целевой ДНК*, амплифицированной ПЦР, с наборами микросфер, несущими олигонуклеотидные зонды захвата, специфичные для определенной последовательности. Прямая гибридизация самый простой метод для распознавания отдельных нуклеотидов [21]. Разработка специфичных для последовательности зондов захвата и праймеров для ПЦР для анализа прямой гибридизации на суспензионной матрице xMAP может быть облегчена за счет использования буфера, содержащего тетраметиламмонийхлорид (ТМАС). ТМАС буферы стабилизирует А-Т пары оснований. Для олиго-

нуклеотидов длиной до 200 пар оснований эффективность гибридизации в ТМАС является функцией длины идеального совпадения и в меньшей степени зависит от состава оснований. Буферы для гибридизации ТМАС, выравнивают точки плавления различных зондов и увеличивают выход дуплекса. Обычно для распознавания отдельных нуклеотидов зонды захвата конструируются так, чтобы их длина соответствовала примерно 20 нуклеотидам. Последовательность зондов комплементарна меченой цепи продукта ПЦР, а SNP или мутация расположены в центре зонда. Зонды модифицируются для обеспечения связывания концевого амина и спейсера с карбоксилированными микросферами [9; 11]. На температуру плавления зонда влияют длина, последовательность, тип и положение несовпадающего основания [1], эффективность гибридизации также зависит от последовательности и общей вторичной структуры мишени [8].

Прямая гибридизация с использованием технологии xMAP используется для обнаружения мутаций генов, связанных с гематопоэтическими и миелоидными злокачественными новообразованиями [20]. Набор MEBGEN RASKET-B (RASKET-B, MBL, Япония) широко используется для обнаружения 48 различных мутаций гена RAS, BRAFV600E у пациентов с колоректальным раком [28; 33].

2. *Конкурентная гибридизация ДНК.* Конкурентная гибридизация аналогична прямой гибридизации по дизайну зонда и мишени. Отличием является то, что немеченые двухцепочечные мишени, амплифицированные ПЦР, конкурируют с мечеными одноцепочечными олигонуклеотидными мишенями за отжиг с зондами захвата, специфичными для последовательности, на микросферах.

3. *Химические методы на основе растворов с захватом микросфер.* Метод заключается в использовании специфичной для последовательности нуклеиновых кислот ферментативной реакции с целью определения целевого генотипа с последующим захватом и детекцией на поверхность микросферы. Ферментативные методы определения последовательности основаны на различительной активности ДНК-полимераз ДНК-лигаз и включают удлинение аллель-

специфического праймера (ASPE), анализ лигирования олигонуклеотидов (OLA) и анализ одной базовой цепи (SBCE) [29].

Определены параметры тестов для анализов генотипирования на основе ферментативной реакции xMAP [29; 32]. Аллель-специфичные олигонуклеотиды разработаны таким образом, чтобы их температура плавления составляла 51–56°C. Уникальная последовательность захвата для каждой аллели встроена в 5'-конец олигонуклеотида. Для SBCE проводятся индивидуальные реакции для каждого из четырех возможных нуклеотидов, при этом используется термостабильная полимеразы для включения одного меченного биотином ddNTP (дидезокси-нуклеотиды). Удлинение происходит только в том случае, если в реакции присутствует нуклеотид, комплементарный последовательности, расположенной непосредственно за праймером. Микросферы внутри помечены флуоресцентными красителями и соединены с захватывающими олигонуклеотидами (анти-TAG), оптимизированными для изотермического анализа с минимальной перекрестной реактивностью. Микросферы FlexMAP позволяют мультиплексное генотипирование до 50 дуаллельных SNP и совместимы с большинством химических методов обнаружения SNP, таких как ASPE, OLA и SBCE.

4. *SNP-генотипирование.* SNP (Single Nucleotide Polymorphism) являются наиболее распространенной вариацией последовательностей в геноме человека. Широко используются для генотипирования SNP метод прямой гибридизации [17] захвата микросфер на основе раствора с использованием OLA, SBCE и ASPE [15]. SNP служат маркерами, для идентификации специфичных локусов для диагностики заболеваний, прогнозирования чувствительности к лекарственным препаратам. Так, в частности, разработаны 32-плексных SNP для одновременного определения генотипов восьми различных полиморфных генов; для генотипирования девяти SNP, расположенных рядом с локусом ApoE из семи образцов ДНК [14]. Используя систему захвата/адресации ZipCode/cZipCode определены генотипы 58 SNP в гене ApoE [5]. Разработан аналогичный анализ генотипирования варианта Glu96 локуса HLA DPB1 и

восьми SNP в локусе HLA DPA1 [3]. Описан анализ генотипирования SNP для генов цитохрома P450 (CYP) 2C9 и 2C19 [22]. Проводили сравнительный анализ прямой гибридизации с ASPE, OLA или SBCE с захватом на адресованные микросферы для генотипирования четырех SNP в 58 линиях сои [17].

Скрининг генетических заболеваний. Описано несколько исследований с использованием технологии xMAP для обнаружения мутаций гена бета-глобина [6], мутаций в гене трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR) [4; 10], генотипа 27 мутаций и 4 полиморфизмов в гене CFTR [16], генотипа полиморфизма 5T/7T/9T в интроне 8 гена CFTR [13], мутаций, связанных с предрасположенностью к тромбофилии [19]. Разработан анализ BARCODE-ALL который сочетает в себе мультиплексную ПЦР с мультиплексной прямой гибридизацией на основе xMAP для обнаружения семи транскриптов слияния, возникающих в результате хромосомных транслокаций, которые возникают при детском лимфобластном лейкозе [31].

HLA-типирование ДНК. Классифицированы аллели HLA с помощью суспензионной матрицы xMAP [12].

Обнаружение микробов. Описано несколько примеров использования технологии xMAP для обнаружения бактериальных, вирусных и грибковых патогенов в окружающей среде [25; 26], проведена идентификация 17 различных грамотрицательных или грамположительных бактерий с переменными последовательностями 16S рДНК [32], бактериальных патогенов вызывающих заболевания ЖКТ [11], изолятов *Mycobacterium Tuberculosis (Mtb)* [7] и *Trichosporon spp* [8].

На сегодняшний день существуют коммерчески Luminex® xMAP™ доступные наборы для обнаружения нуклеиновых кислот разработанные с применением технологии xMAP: Ambion Diagnostics (диагностика Муковисцидоза), Marligen Biosciences (выявление полиморфизмов митохондриальной ДНК, SNP Y-хромосомы), One Lambda (HLA-типирование ДНК), Proactive Medical Technologies (обнаружение SARS-CoV, грипп А и В, парагрипп 1 и 3, RSV), Tepnel Lifecodes

(типирование HLA A, B, C, DRB, DQB), TM Bioscience (SNP-генотипирование цитохром Р450: CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6; скрининг генетических заболеваний). Ожидается, что в будущем гораздо больше приложений на основе xMAP для обнаружения нуклеиновых кислот станут коммерчески доступными, а технология xMAP будет более широко использоваться для количественного обнаружения нуклеиновых кислот и профилирования экспрессии генов.

Статья написана и доклад выполнен в рамках Дополнительного соглашения №073-03-2024-060/1 от 13.02.2024 к Соглашению о предоставлении субсидии из федерального бюджета на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (выполнения работ) №073-03-2024-060 от 18.01.2024, заключенным между ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова» и Министерством просвещения Российской Федерации.

Список литературы

1. Armstrong B., Stewart M., Mazumder A. Suspension arrays for high throughput, multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping // *Cytometry*, 2000; 40: 102–108.
2. Boonhama N., Kreuze J., Winter S., van der Vlugt R., Bergervoet J., Tomlinsona J., Mumforda R. Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing // *Virus Research* 186 (2014) 20–31.
3. Cai H., White P.S., Torney D. Flow cytometry-based minisequencing: a new platform for high-throughput single-nucleotide polymorphism scoring. *Genomics*. 2000; 66: 135–143.
4. Chao O.X., Bing Z., Xuan S.Z, Jun P.S., Fen W.S., Cong H.W. [et.al.] Evaluation of Microsphere-based xMAP Test for gyrA Mutation Identification in Mycobacterium Tuberculosis // *Biomedical and Environmental Sciences*, 2023, 36 (4): 384–387. doi: 10.3967/bes2023.046

5. Chen J., Iannone M.A., Li M.S. A microsphere-based assay for multiplexed single nucleotide polymorphism analysis using single base chain extension. *Genome Res.* 2000; 10: 549–557.
6. Colinas R.J., Bellisario R., Pass K.A. Multiplexed genotyping of beta-globin variants from PCR-amplified newborn blood spot DNA by hybridization with allele-specific oligodeoxynucleotides coupled to an array of fluorescent microspheres. *Clin Chem.* 2000; 46: 996–998.
7. Cowan L.S., Diem L., Brake M.C., Crawford J.T. Transfer of a *Mycobacterium tuberculosis* genotyping method, spoligotyping, from a reverse line-blot hybridization, membrane-based assay to the Luminex multianalyte profiling system // *Clin Microbiol.* 2004; 42: 474–477.
8. Diaz M.R., Fell J.W. High-throughput detection of pathogenic yeasts of the genus *Trichosporon* // *Clin Microbiol.* 2004; 42: 3696–3706.
9. Dunbar S.A. Applications of Luminex® xMAP™ technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection // *Clin Chim Acta.*, 2006, 363 (1): 71–82. DOI 10.1016/j.cccn.2005.06.023. EDN LNDLPB
10. Dunbar S.A., Jacobson J.W. Application of the Luminex LabMAP in rapid screening for mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: a pilot study. *Clin Chem.* 2000; 46: 1498–1500.
11. Dunbar S.A., Vander Zee C.A., Oliver K.G., Karem K.L., Jacobson J.W. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP™ system // *Microbiol Methods.* 2003; 53: 245–252.
12. Fulton R.J., McDade R.L., Smith P.L., Kienker L.J., Kettman J.R., Jr. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix™ system. *Clin Chem.* 1997; 43: 1749–1756.
13. Hadd A.G., Laosinchai-Wolf W., Novak C.R. Microsphere bead arrays and sequence validation of 5/7/9T genotypes for multiplex screening of cystic fibrosis polymorphisms. *J Mol Diagn.* 2004; 6: 348–355.

14. Iannone M.A., Taylor J.D., Chen J. Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry. *Cytometry*. 2000; 39: 131–140.

15. Iannone M.A., Taylor J.D., Chen J., Li M.S., Ye F., Weiner M.P. Microsphere-based single nucleotide polymorphism genotyping. *Methods Mol Biol*. 2003; 226: 123–134.

16. Johnson S.C., Marshall D.J., Harms G. Multiplexed genetic analysis using an extended genetic alphabet. *Clin Chem*. 2004; 50: 2019–2027.

17. Lee S.-H., Walker D.R., Cregan P.B., Boerma H.R. Comparison of four flow cytometric SNP detection assays and their use in plant improvement. *Theor Appl Genet*. 2004 (Nov. 17).

18. Montagnana M., Lippi G. Cancer diagnostics: current concepts and future perspectives. *Ann Transl Med*. 2017; 5 (13): 268.

19. Musher D., Goldsmith E., Dunbar S. The association between hypercoagulable states or increased platelet adhesion/aggregation and bacterial colonization of intravenous catheters. *J Infect Dis*. 2002; 186: 769–773.

20. Paradis F.W., Simard R., Gaudet D. Quantitative assay for the detection of the V617F variant in the Janus kinase 2 (JAK2) gene using the Luminex xMAP technology // *BMC Medical Genetics*. 2010. V. 11, 54.

21. Peterson A.W., Wolf L.K., Georgiadis R.M. Hybridization of mismatched or partially matched DNA at surfaces // *Am Chem Soc*. 2002; 124:14601–14607.

22. Pickering J.W., McMillin G.A., Gedge F., Hill H.R., Lyon E. Flow cytometric assay for genotyping Cytochrome P450 2C9 and 2C19: Comparison with a micro-electronic DNA array. *Am J Pharmacogenomics*. 2004; 4: 199–207.

23. Pulumati A., Pulumati A., Dwarakanath B.S., Verma A., Papineni R.V.L. Technological advancements in cancer diagnostics: Improvements and limitations // *Cancer Reports*. 2023; 6: e1764. DOI 10.1002/cnr2.1764. EDN QXRNYI

-
24. Reslova N., Michna V., Kasny M., Mikel P., Kralik P. xMAP Technology: Applications in Detection of Pathogens // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00055>. EDN YXQOON
25. Spiro A., Lowe M. Quantitation of DNA sequences in environmental PCR products by a multiplexed, bead-based method. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68: 1010–1013.
26. Spiro A., Lowe M., Brown D. A bead-based method for multiplexed identification and quantitation of DNA sequences using flow cytometry. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 4258–4265.
27. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. [et al.] Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71 (3): 209–249.
28. Taniguchi H., Okamoto W., Muro K. [et al.] Clinical Validation of Newly Developed Multiplex Kit Using Luminex xMAP Technology for Detecting Simultaneous RAS and BRAF Mutations in Colorectal Cancer: Results of the RASKET-B Study // *Neoplasia.* 2018. V. 20. №12. P. 1219–1226.
29. Taylor J.D., Briley D., Nguyen Q. Flow cytometric platform for high-throughput single nucleotide polymorphism analysis. *BioTechniques.* 2001; 30: 661–669.
30. Tempany C.M.C., Jayender J., Kapur T. [et al.] Multimodal imaging for improved diagnosis and treatment of cancers. *Cancer.* 2015; 121 (6): 817–827.
31. Wallace J., Zhou Y., Usmani N. BARCODE-ALL: Accelerated and cost effective genetic risk-stratification in acute leukemia using spectrally addressable liquid bead microarrays. *Leukemia.* 2003; 17: 1404–1410.
32. Ye F., Li M.-S., Taylor J.D. Fluorescent microsphere-based readout technology for multiplexed human single nucleotide polymorphism analysis and bacterial identification. *Hum Mutat.* 2001; 17: 305–316.
33. Yoshino T., Muro K., Yamaguchi K., Nishina T., Denda T., Kudo T., Okamoto W., Taniguchi H., Akagi K., Kajiwara T., Hironaka S., Satoh T. Clinical Vali-

Validation of a Multiplex Kit for RAS Mutations in Colorectal Cancer: Results of the RASKET (RAS KEy Testing) Prospective, Multicenter Study // EBioMedicine. 2015. 2. 317–323. DOI 10.1016/j.ebiom.2015.02.007. EDN WRSSYP