



УДК 577.113.7

АФФИННЫЙ ЗАХВАТ ЗАДАНЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК С ПОМОЩЬЮ КОРОТКИХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

© 2013 г. В. С. Михайлов*, В. К. Потапов*, Р. Н. Амирханов**, ***,
Н. В. Амирханов**, ***, С. С. Буланенкова*, С. Б. Акопов*, В. Ф. Зарытова**, ***,
Л. Г. Николаев**, Е. Д. Свердлов*

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

***Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск

Поступила в редакцию 26.06.2012 г. Принята к печати 06.07.2012 г.

Сравнивали способность коротких олигомеров пептидо-нуклеиновой кислоты и олигонуклеотидов, содержащих модифицированные остатки 5-метилцитидина, 2-аминоаденозина и 5-пропинил-2'-дезоксигуанидина (SBO), обладающих повышенным сродством к комплементарной нуклеотидной последовательности, производить аффинный захват целевого двуникового фрагмента ДНК с такой последовательностью одной из цепей из смеси фрагментов по механизму концевой инвазии. Оба типа зондов в подобранных условиях показали высокую эффективность отбора. Зонды на основе SBO могут представлять собой более доступную и простую в приготовлении альтернативу ПНК для этих целей.

Ключевые слова: ДНК, аффинный захват, пептидо-нуклеиновая кислота, strong binding oligonucleotide (SBO).

DOI: 10.7868/S0132342313010077

ВВЕДЕНИЕ

Прямой отбор фрагментов ДНК с заданной последовательностью из их гетерогенной смеси нашел широкое применение в молекулярной биологии, геномике и ДНК-диагностике. В отличие от методов, основанных на ПЦР, прямой отбор обладает важными преимуществами, в частности, он позволяет отбирать фрагменты ДНК большой длины и с сохранением содержащихся в них эпигенетических маркеров, таких как метилированные основания ДНК [1]. При помощи различных вариантов этого подхода можно клонировать геномные последовательности [2], определять присутствие возбудителей инфекции в клинических образцах [3], наличие определенных видов организмов в окружающей среде [4] и т.д. (см. [1]).

Сокращения: ПНК – пептидо-нуклеиновая кислота (*peptide nucleic acid*); АЕЕА – аминоэтоксисетил; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; SBO – олигонуклеотид с повышенным сродством к комплементарной последовательности (*strong binding oligonucleotide*); TFA – трифторуксусная кислота; DMF – диметилформамид.

Автор для связи (тел.: +7(495)330-70-29; факс: +7(495)330-65-38; эл. почта: lev@ibch.ru).

Прямой отбор основан на комплементарном взаимодействии искомого фрагмента НК с относительно коротким зондом, в качестве которого может выступать клонированный одностранный фрагмент НК или синтетический олигонуклеотид. Для эффективного отбора двуникового фрагмента ДНК, когда вытеснение комплементарной цепи зондами на основе обычной ДНК энергетически невыгодно, используются зонды с повышенным сродством к комплементарной последовательности, такие как синтетические пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК) [5, 6], замкнутые нуклеиновые кислоты (*locked nucleic acids*, LNA) [7, 8], а также модифицированные различным образом олигонуклеотиды (*strong binding oligonucleotides*, SBO) [9, 10].

Возможны три типа взаимодействий зонда с целевым фрагментом двуникового ДНК:

1. *Концевая инвазия* – зонд за счет более высокого сродства к комплементарной последовательности одной из цепей ДНК-фрагмента расплетает его концевую область [11].

2. *Формирование зондом тройной спирали* с последовательностью целевого ДНК-фрагмента [12]. Недостаток этого типа взаимодействия состо-

ит в том, что для образования такой структуры целевой фрагмент ДНК должен содержать гомопуриновую последовательность существенной длины. Кроме того, стабильность тройной спирали обычно невысока [13].

3. Взаимодействие зонда с однонитевым участком ДНК, образующимся за счет связывания комплементарного участка целевого фрагмента вспомогательным олигонуклеотидом или ПНК (метод *oligonucleotide/PNA affinity capture*, ОРАС), см. [1]).

В настоящей работе мы сравнили эффективность аффинного захвата фрагмента ДНК при концевой инвазии с помощью ПНК и модифицированных олигонуклеотидов с повышенным сродством к комплементарной цепи (SBO).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что относительно короткие фрагменты ПНК (20 и менее звеньев), содержащие природную последовательность оснований, способны к концевой инвазии в двунитевую линейную ДНК, обладающую комплементарной ПНК концевой последовательностью одной из цепей, причем образующиеся комплексы достаточно прочны и специфичны для того, чтобы происходил аффинный захват целевого фрагмента из смеси [11]. Мы предположили, что подобным свойством могут обладать и олигонуклеотиды, содержащие модифицированные остатки 5-пропинилдезоксигуанидина, 5-метилцитидина и 2-аминоаденозина, отличающиеся повышенным сродством к комплементарным последовательностям [14, 15]. Подобные модифицированные SBO-олигонуклеотиды, как было показано нами ранее, способны служить эффективными праймерами для ПЦР и секвенирования [16].

Для определения эффективности аффинного захвата фрагмента ДНК при помощи зондов двух разных типов мы приготовили эквимольную модельную смесь двух фрагментов генома человека — целевого фрагмента промотора гена *ZBTB32* длиной 61 п.о. и контрольного фрагмента ДНК из межгенной области хромосомы 10 длиной 84 п.о. Температуры плавления фрагментов в условиях связывания с зондами были определены экспериментально при помощи амплификатора Mx3000P (Stratagene) и составили 78.7 и 88.7°C соответственно для целевого и контрольного фрагментов.

Для отбора целевого фрагмента из смеси были приготовлены биотинилированные по *N*-концу ПНК-зонды длиной 16 звеньев (ПНК1 и ПНК2) и биотинилированные по 5'-концу модифицированные олигонуклеотидные зонды длиной 20 нт (SBO1 и SBO2) (структуру см. в экспер. части). Для придания большей растворимости в воде синтезированные ПНК содержали на *N*- и *C*-кон-

цах цепи по две аминоэтоксиэтоксиацетильные (АЕЕА) линкерные группы.

Полученные ПНК-зонды образуют достаточно прочные гибридные ПНК/ДНК-дууплексы с соответствующими синтезированными нами 20-звеньевыми комплементарными дезоксиолигонуклеотидами с $T_{пл}$ 70 и 74°C соответственно для ПНК1 и ПНК2, что подтверждает последовательность и структуру синтезированных ПНК-олигомеров.

Каждый из зондов обеих пар был комплементарен одному из концов целевого фрагмента ДНК. Отбор (см. схему эксперимента на рис. 1) проводили при концентрации каждого из фрагментов $\sim 10^{-5}$ мкМ и ~ 10000 -кратном избытке зонда в низкосолевого буфере для ПНК или в 500 мМ NaCl для SBO. Отжиг фрагмента с зондом осуществляли при температуре 50°C, т.е. существенно ниже температуры плавления фрагментов ДНК при тех же условиях. Отметим, что добавление при отжиге ~ 40 нг/мкл фрагментированной ДНК из молока лосося практически не влияло на эффективность отбора фрагментов (данные не показаны), хотя в этом случае примененный нами метод анализа не позволяет исключить присутствие в конечном образце и некоторого количества ДНК лосося.

Далее связавшиеся с зондом фрагменты отбирали при помощи магнитных частиц, несущих стрептавидин (Dynabeads), и отделяли от частиц при температуре, превышающей температуру плавления олигонуклеотида или ПНК.

Соотношение количеств целевого и контрольного фрагментов в конечной смеси определяли при помощи количественной ПЦР в реальном времени. Результаты отбора представлены на рис. 2.

Из рисунка видно, что при использовании зондов обоих типов происходит значительное (два-три порядка величины) обогащение конечной смеси целевым фрагментом ДНК, при этом SBO-зонды по степени обогащения мало уступают зондам на основе ПНК. В то же время, в условиях связывания с зондами на основе SBO наблюдается значительный фон (связывание фрагмента с носителем в отсутствие зонда), что понижает эффективность отбора. Этот эффект скорее всего обусловлен различной степенью неспецифического связывания с магнитными частицами целевого и контрольного фрагментов ДНК при высокой концентрации соли, используемой при отборе с SBO. В пользу этого предположения говорит тот факт, что при отборе с ПНК, где применяется низкая концентрация соли, аналогичный фон значительно ниже (рис. 2).

Таким образом, из полученных данных можно сделать следующие выводы:

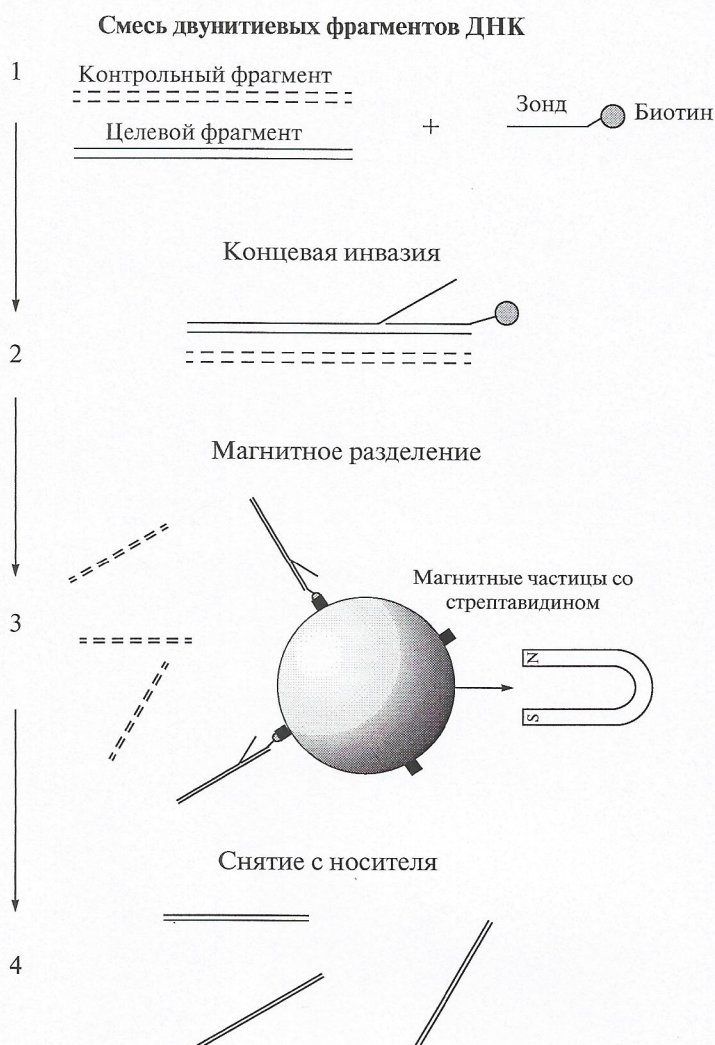


Рис. 1. Схема отбора целевого фрагмента из смеси фрагментов при помощи зондов, действующих за счет концевой инвазии.

1. Короткие зонды на основе ПНК и SBO способны с достаточно высокой эффективностью аффинно захватывать целевой фрагмент из смеси фрагментов ДНК. При этом эффективность отбора с ПНК-зондами остается несколько выше, чем с SBO-зондами.

2. Тем не менее, зонды на основе SBO, как более доступные и простые в приготовлении, могут представлять собой альтернативу ПНК для отбора целевых фрагментов ДНК из смесей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве ДНК использовали: целевой фрагмент промотора гена *ZBTB32*, 61 п.о. (ДНК1) и контрольный фрагмент хромосомы 10 человека, 84 п.о. (ДНК2).

Получение зондов SBO

Фосфорамидиты 5-метилцитидина и 2-аминоаденозина получали согласно [15]. Фосфорамидиты 5-пропинил-2'-дезоксигуанидина – коммерческие продукты фирмы Glen Research (USA). Для последующего присоединения биотина на 5'-конец олигонуклеотидов вводили амиолинкер, представляющий собой 6-аминогексанол, содержащий фосфорамидит по спиртовой группе и Fmoc-защиту по аминогруппе (Glen Research), удаляемую при деблокировании. Синтез модифицированных олигонуклеотидов проводили на синтезаторе ASM-800 (Biosset, Новосибирск). По завершении синтеза олигонуклеотиды отщепляли от носителя и деблокировали по стандартной методике обработкой смесью аммиак–метиламин при 50°C в течение 60 мин с последующим высаживанием в 2% растворе перхлората натрия в ацетоне. Продукт очищали методом оФВЭЖХ. Были синте-

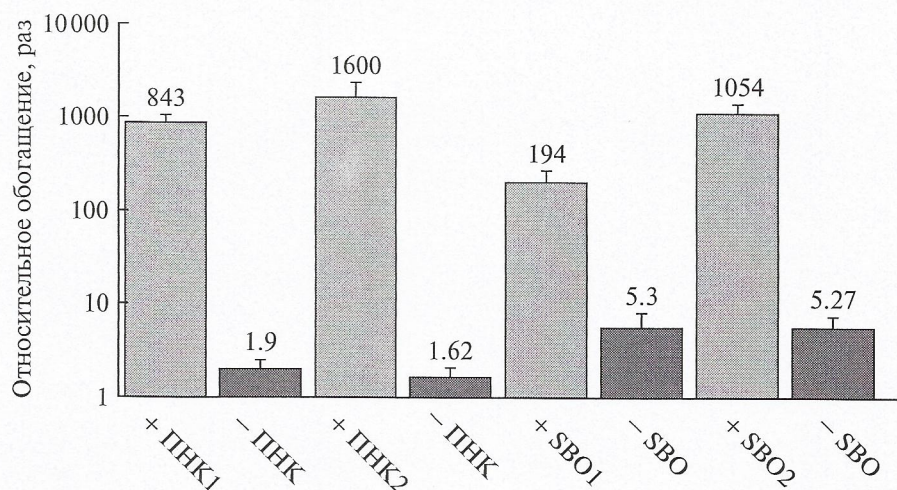


Рис. 2. Степень обогащения целевым фрагментом при аффинном захвате двунитевого фрагмента ДНК из смеси двух фрагментов при помощи коротких олигомеров пептидо-нуклеиновой кислоты (ПНК) и модифицированных олигонуклеотидов с повышенным сродством к комплементарной цепи (SBO). +ПНК, +SBO – реакция с добавлением ПНК или SBO, соответственно; –ПНК, –SBO – контрольные реакции без добавления зонда. Степень обогащения рассчитывали так, как указано в разделе “Экспериментальная часть”. Приведены усредненные данные трех независимых отборов, в двух параллелях каждый, и стандартная ошибка среднего.

зированы SBO1 (CTGCAGAAGTAAAAAGGATT) и SBO2 (CTTCTGGCTCCTCCACCCCT), где A, C и T полностью замещенные аналоги. Значения $T_{пл}$ для SBO1/ДНК1- и SBO2/ДНК2-дуплексов, рассчитанные с помощью модели ближайших соседей [17, 18], составили 66 и 69°C, соответственно.

Получение зондов ПНК

Пептидо-нуклеиновые олигомеры с последовательностью NH_2N -(AAEA)₂-CTGCAGAAGTAAAAAG-(AAEA)₂-C(O)NH₂^C (ПНК1) и NH_2N -(AAEA)₂-CTTCTGGCTCCTCCAC-(AAEA)₂-C(O)NH₂^C (ПНК2) синтезировали стандартным твердофазным методом с использованием Fmoc-стратегии [6] на приспособленном для синтеза ПНК пептидном синтезаторе PS3 (Protein Technologies) по ранее описанному способу [19, 20]. Для придания большей растворимости в воде синтезированные ПНК содержали на N- и C-концах цепи по две аминоксипропанкарбоксильные (AEEA) линкерные группы. По завершении синтеза ПНК-олигомеры отщепляли от носителя и деблокировали по стандартной методике обработкой полимерного носителя 20% раствором мета-крезола в трифторуксусной кислоте (TFA) при комнатной температуре в течение 2 ч с последующим высаживанием неочищенного продукта ПНК диэтиловым эфиром. Продукт при необходимости очищали методом офВЭЖХ в градиенте водного ацетонитрила, содержащего 0.1% TFA (с обогревом или без обогрева колонки), или непосредственно вводили в реакцию биотинилирования.

Термическую денатурацию дуплексов ПНК с соответствующими 20-звенными комплементарными дезоксиолигонуклеотидами TTGTGGAGGAGC-CAGAAGTT и TCTTTTTTACTTCTGCAGTT (подчеркнуты 16-звенные участки, комплементарные ПНК) (2 мкМ) проводили в стеме анализа температуры плавления нуклеиновых кислот TMSPC-8 (Shimadzu, Япония) в буфере, содержащем 0.14 М NaCl, 0.01 М KН₂PO₄, рН 7.5. Концентрацию ДНК- и ПНК-олигомеров и их производных определяли спектрофотометрически, используя суммарные величины молярных коэффициентов поглощения моно- и динуклеотидов при длине волны 260 нм [21].

Биотинилирование SBO-олигонуклеотидов и ПНК-олигомеров проводили, смешивая 50 мкл раствора 10 ОЕ₂₆₀ олигомера в 0.2 М карбонат-бикарбонатном буфере рН 8.5–9.0 с 50 мкл 100 мМ раствора N-оксисукцинимидного эфира ε-аминогексаноилбиотина в диметилформамиде (100-кратный избыток). Реакционную смесь оставляли на ночь, нейтрализовали уксусной кислотой и выделяли биотинированный олигомер офВЭЖХ. Целевую фракцию после упаривания ацетонитрила обессоливали на обращено-фазовой колонке. Количество и концентрацию биотинированного олигомера определяли методом УФ-спектроскопии. Степень биотинилирования зондов определяли двумя способами: по профилю аналитической обращено-фазовой ВЭЖХ или по степени связывания зондов с магнитным носителем Dynabeads (определяли отношение поглощения при 260 нм биотинированного зонда в супернатанте к поглощению исходного раствора зонда до

связывания его с носителем). Степень биотинилирования, определенная этими методами, в обоих случаях составляла не менее 95%.

Аффинный захват фрагментов ДНК. Фрагменты ДНК получали при помощи ПЦР-амплификации на матрице геномной ДНК клеток HeLa: ДНК1 – с праймерами СТТСТGGCTCCTCCACССТ (P1F) и СТGCAGAAGTAAAAAGGATTGAA (P1R) и ДНК2 – с праймерами и ААGTGCTGTCСGCCTGТААС (P2F) и ССТССТТАGССАТGСАСТСТ (P2R). Продукты амплификации очищали в 5% агарозном геле (Low-melt agarose <1000, Affymetrix) и выделяли из геля с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Очищенные фрагменты ДНК разводили буфером ТЕ (10 мМ Tris-HCl pH 8, 1 мМ EDTA) до концентрации примерно 2.5×10^{-5} мкМ и смешивали в эквимолярном соотношении. Количество фрагментов ДНК оценивали по интенсивности свечности в геле после окраски бромидом этидия в сравнении с параллельно нанесенными на гель растворами плазмидной ДНК известной концентрации.

Суспензию магнитных частиц Dynabeads M280 (Dyna, USA) с присоединенным стрептавидином трижды промывали 5 мМ Tris-HCl с 0.5 мМ EDTA, 1 М NaCl, pH 7.5 в течение 5 мин при комнатной температуре и перемешивании. Частицы отделяли от буфера при помощи магнитного сепаратора. Затем частицы помещали в 200 мкл блокирующего буфера (50 мМ HEPES-Na pH 7.9, 20 мМ EDTA, 0.5 М NaCl, 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0.25% NP-40 (Sigma), 0.3 мкг/мл фрагментированной ультразвуком ДНК из молок лосося) и инкубировали для блокирования неспецифического связывания в течение 1 ч на льду при периодическом перемешивании. Далее частицы трижды промывали тем же буфером, но без добавления ДНК, и ресуспендировали в деионизованной воде (10 мкл на 3 мкл исходной суспензии).

Для отбора целевого фрагмента ДНК из смеси двух фрагментов при помощи ПНК-зондов [11] 6 мкл смеси фрагментов добавляли к 70 мкл 10 мМ Tris-HCl, pH 7.0, содержащего 40 нг/мкл фрагментированной ДНК из молок лосося. Реакционную смесь разделяли на 2 равные части, к одной из которых добавляли 2 мкл 0.08 мкМ раствора биотинилированного ПНК в воде. Оба препарата инкубировали при 50°C в течение 18 ч.

Для отбора при помощи SBO-зондов 6 мкл смеси фрагментов добавляли к 70 мкл 50 мМ HEPES-Na, содержащего 20 мМ EDTA, 500 мМ NaCl (pH 7.9) и 40 нг/мкл фрагментированной ДНК из молок лосося. Реакционную смесь разделяли на 2 равные части, к одной из которых добавляли 2 мкл 0.09 мкМ раствора биотинилиро-

ванного SBO в воде. Оба препарата инкубировали при 50°C в течение 2 ч.

К препаратам добавляли по 10 мкл суспензии магнитных частиц, приготовленных, как описано выше, перемешивали и инкубировали 30 мин при комнатной температуре при периодическом перемешивании. Частицы с сорбированными на них биотинилированными фрагментами ДНК промывали пятикратно по 500 мкл блокирующего буфера без ДНК, и затем двукратно по 100 мкл 10 мМ Tris-HCl, pH 7.0 для отбора с ПНК или 10 мМ Tris-HCl, pH 8.0 для отбора с SBO. Частицы суспендировали в 20 мкл деионизованной воды (для SBO) или 20 мкл ТЕ-буфера с 50 мМ NaCl (для ПНК).

Для элюции фрагментов, отобранных при помощи ПНК и SBO, с магнитных частиц суспензию последних инкубировали 30 мин при 74°C, осаждали частицы при помощи магнитного носителя и отбирали супернатант.

Количественная ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени выполняли на амплификаторе Mx3000P (Stratagene) с использованием набора реагентов qPCRmix-HS SYBR (Евроген). Амплификацию проводили по следующей программе: 95°C – 30 с, 65°C – 30 с, 72°C – 30 с в течение 40 циклов. Использовали те же праймеры, что и для амплификации фрагментов из геномной ДНК (см. выше). Полученные в результате фрагменты ДНК дополнительно анализировали на гомогенность электрофорезом в 5% агарозном геле (Low-melt agarose <1000, Affymetrix, USA). Эффективность амплификации определяли методом стандартных кривых и рассчитывали при помощи прилагаемой к прибору программы.

Степень относительного обогащения смеси целевым фрагментом рассчитывали по формуле:

$$Enr = F_c^C / F_t^T,$$

где F_c , F_t – эффективность одного цикла ПЦР при амплификации контрольного и целевого фрагментов, соответственно;

C , T – число циклов ПЦР, необходимое для амплификации соответственно контрольного и целевого фрагментов до порогового значения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддерживалась программой Президента РАН “Молекулярная и клеточная биология”, программой “Ведущие научные школы РФ” (НШ-5638.2010.4), а также Государственным контрактом № 16.512.11.2267.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Demidov V.V., Bukanov N.O., Frank-Kamenetskii D. // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2000. V. 2. P. 31–35.
2. Cheng D.W., Armstrong K.C. // *Genome.* 2002. V. 45. P. 977–983.
3. Parham N.J., Picard F.J., Peytavi R., Gagnon M., Seyrig G., Gagne P.A., Boissinot M., Bergeron M.G. // *Clin. Chem.* 2007. V. 53. P. 1570–1576.
4. Galluzzi L., Bertozzini E., del Campo A., Penna A., Bruce I.J., Magnani M. // *J. Appl. Microbiol.* 2006. V. 101. P. 36–43.
5. Nielsen P.E., Egholm M. // *Curr. Issues Mol. Biol.* 1999. V. 1. P. 89–104.
6. Nielsen P.E., Egholm M. // *An Introduction to PNA* / Ed. P.E. Nielsen. Wymondam, UK: Horizon Bioscience, 2004.
7. Vester B., Wengel J. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. P. 13233–13241.
8. Dejardin J., Kingston R.E. // *Cell.* 2009. V. 136. P. 175–186.
9. Petyuk V., Serikov R., Tolstikov V., Potapov V., Giege R., Zenkova M., Vlassov V. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2000. V. 19. P. 1145–1158.
10. Herdewijn P. // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000. V. 10. P. 297–310.
11. Smolina I.V., Demidov V.V., Soldatenkov V.A., Chasovskikh S.G., Frank-Kamenetskii M.D. // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. P. e146.
12. Ito T., Smith C.L., Cantor C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. P. 495–498.
13. Fox K.R., Brown T. // *Biochem. Soc. Trans.* 2011. V. 39. P. 629–634.
14. Potapov V.K., Azhikina T.L., Demin V.V., Limborskaja S.A., Sverdlov E.D. // *Pure Appl. Chem.* 1996. V. 68. P. 1315–1320.
15. Azhikina T., Veselovskaya S., Myasnikov V., Potapov V., Ermolayeva O., Sverdlov E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 11460–11462.
16. Ажикина Т.Л., Шевченко Ю.О., Лебедев Ю.Б., Веселовская С.В., Мясников В.А., Потанов В.К., Сverdlov E.Д. // *Доклады РАН.* 1993. V. 330. P. 642–645.
17. Owczarzy R., You Y., Moreira B.G., Manthey J.A., Huang L., Behlke M.A., Walder J.A. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. P. 3537–3554.
18. SantaLucia J., Jr., Hicks D. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2004. V. 33. P. 415–440.
19. Amir Khanov N.V., Dimitrov I., Opitz A.W., Zhang K., Lackey J.P., Cardi C.A., Lai S., Wagner N.J., Thakur M.L., Wickstrom E. // *Biopolymers.* 2008. V. 89. P. 1061–1076.
20. Amir Khanov N.V., Zhang K., Aruva M.R., Thakur M.L., Wickstrom E. // *Bioconjug. Chem.* 2010. V. 21. P. 731–740.
21. Richards E. *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Nucleic Acids.* Cleavland: CRC Press, 1975.

Affinity Capture of Specific DNA Fragments with the Use of Short Synthetic Sequences

V. S. Mikhailov*, V. K. Potapov*, R. N. Amir Khanov**, ***, N. V. Amir Khanov**, ***,
S. S. Bulanenkova*, S. B. Akopov*, V. F. Zarytova**, ***,
L. G. Nikolaev*, E. D. Sverdlov*

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117897 Russia
Fax: +7 (495) 330-65-38, e-mail: lev@ibch.ru

**Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of RAS,
ul. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia
Fax: +7 (383) 36-35-153, e-mail: nariman@niboch.nsc.ru

***Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia
Fax: +7 (383) 23 97 101, e-mail: zarytova@niboch.nsc.ru

The ability of short peptide nucleic acid (PNA) oligomers and oligonucleotides containing modified residues of 5-methylcytidine, 2-aminoadenosine and 5-propynyl-2'-deoxyuridine (strong binding oligonucleotides, SBO) to affinity capture the target double-stranded DNA fragment from mixture by means of the end invasion was compared. Both types of probes were highly effective at the conditions used. The SBO-based probes may represent a handy and easily prepared alternative to PNA for selection of target DNA fragments from mixtures.

Keywords: DNA affinity capture, peptide nucleic acid, strong binding oligonucleotide