



УДК 577.113(4+7)

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ КОРОТКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ II\*. ТАНДЕМ КОРОТКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ – ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ОДНОБУКВЕННОЙ ЗАМЕНЫ В ДНК-МИШЕНИ

© 1997 г. Д. В. Пышный, М. А. Подыминогин, И. А. Пышная,  
С. Г. Лохов, Е. М. Иванова<sup>#</sup>, В. Ф. Зарытова

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,  
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 13.09.96 г. Принята к печати 19.01.97 г.

Предложена новая стратегия модификации ДНК-мишени с использованием тандемов производных коротких олигонуклеотидов, позволяющая осуществлять высокоселективную модификацию нуклеиновых кислот только в составе правильных дуплексов. Показано, что додекануклеотидный алкилирующий реагент при физиологических температурах с одинаковой эффективностью модифицирует мишень как в правильном комплексе, так и в комплексе, содержащем мисматч, а реагент на основе тетрануклеотида в присутствии пары фланкирующих эффекторов алкилирует ДНК-мишень высокоселективно только при образовании правильного комплекса.

*Ключевые слова:* производные олигонуклеотидов, эффекторы, модификация ДНК, термостабильность дуплексов, селективность модификации, мисматчи.

Способность олигонуклеотидов образовывать комплементарные комплексы с нуклеиновыми кислотами лежит в основе многих подходов, направленных на изучение ключевых биологических процессов, протекающих с участием нуклеиновых кислот, на выявление генетического материала патогенов, секвенирование ДНК, создание терапевтических препаратов нового поколения и др. Решающую роль в этих подходах играет селективность образования только правильных комплементарных комплексов олигонуклеотидов с нуклеиновыми кислотами. Для обеспечения эффективности и сайт-специфичности взаимодействия олигонуклеотидов с нуклеиновыми кислотами обычно используют протяженные олигонуклеотиды (более 20 мономерных звеньев). Однако олигомеры такой длины в физиологических условиях способны образовывать с НК наряду с прочными правильными комплементарными комплексами также достаточно стабильные несовершенные комплексы, содержащие однобуквенные замены (мисматчи) или выпетливания. Поэтому с помощью реагентов на основе протяженных олигонуклеотидов практически невоз-

можно осуществить селективную модификацию нуклеиновых кислот *in vivo*.

Повышение селективности взаимодействия олигонуклеотидов с НК-мишенями, т.е. вероятности образования только правильных комплексов с последовательностью нуклеиновых кислот, является предметом пристального внимания исследователей [2–7].

Недавние работы, посвященные конструированию неприродных олигонуклеотидных структур, способных взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами, продемонстрировали, что повышение селективности может быть достигнуто только за счет значительной потери комплексообразующих свойств, как это наблюдается в случае модификации сахарофосфатного остова олигонуклеотидов или при введении в олигонуклеотиды метилированных цитозинов [8–10].

В последнее время наибольшее внимание исследователей привлекает возможность повышения селективности связывания олигонуклеотидов, основанная на использовании циклических олигонуклеотидных структур [11–13]. Было установлено, что циклические олигонуклеотиды или их аналоги способны образовывать только правильные триплексные структуры с одноцепочечными олигонуклеотидами. В этих случаях повышение селективности достигается путем структурного

\* Сообщение I см. [1]. Сокращения: префикс “d” в аббревиатуре олигодезоксирибонуклеотидов опущен; НК – нуклеиновые кислоты, Phn – N-(2-гидроксиэтил)феназиний, RCl – 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилметиламин.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

усложнения протяженных олигонуклеотидов, которое может привести в системах *in vivo* к непредсказуемым результатам, поскольку пространственная организация молекул играет большую роль в биологических процессах.

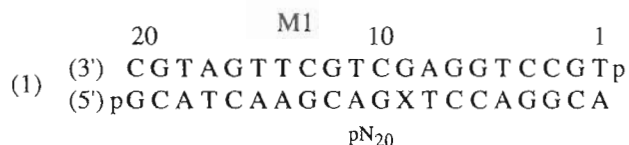
В данной работе предлагается принципиально новая стратегия решения проблемы селективной модификации НК за счет упрощения структуры олигонуклеотидных реагентов путем "разделения на части", т.е. использования тандемов производных коротких олигонуклеотидов (эффектор + реагент + эффектор), которые, как было показано ранее, способны эффективно осуществлять модификацию нуклеиновых кислот [1, 14, 15].

Естественно было ожидать, что при использовании тандема коротких олигонуклеотидов отсутствие полной комплементарности ДНК-мишени с каким-либо олигонуклеотидом будет губительно для формирования стабильной дуплексной структуры. Таким образом, в условиях, близких к физиологическим, можно будет осуществлять модификацию нуклеиновых кислот только в правильных комплементарных комплексах. Это предположение было полностью подтверждено в данной работе при исследовании и сравнении селективности взаимодействия олигонуклеотидов различной длины, тандемов олигонуклеотидов и их алкилирующих производных с ДНК-мишенью.

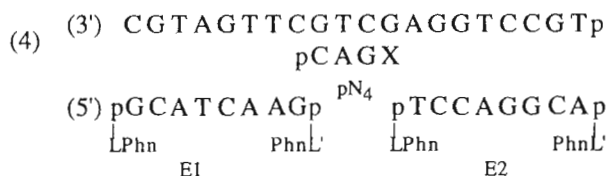
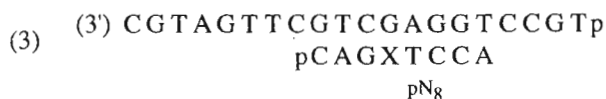
Исследования проводили, сравнивая термическую стабильность как правильных комплексов олигонуклеотидов, так и комплексов, содержащих один мисматч, и эффективность комплементарно-адресованной модификации в правильных и в несовершенных комплексах.

На первом этапе работы было проведено сравнение дестабилизирующего влияния мисматча в комплексе в зависимости от длины олигонуклеотида.

Влияние мисматча на стабильность комплексов определяли, сравнивая температуры плавления комплексов, образованных 20-звенным олигонуклеотидом-мишенью M1 с эйкозануклеотидами pN<sub>20</sub> (комплексы (1a) и (1б)), додекануклеотидами pN<sub>12</sub> (комплексы (2a) и (2б)) и октануклеотидами pN<sub>8</sub> (комплексы (3a) и (3б)), содержащими на 5'-конце общую тетра-нуклеотидную последовательность pCAGX (X = C или A), и тетра-нуклеотидом pCAGX (X = C или A) (pN<sub>4</sub>) в присутствии дифеназиниевых эффекторов E1 и E2 (комплексы (4a) и (4б)):

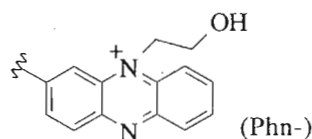


X = C (a), A (б)



PhnL' = -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-Phn

LPhn = Phn-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-



Комплексы с мисматчем получали, заменяя во всех исследуемых олигонуклеотидах нуклеотидный остаток C, образующий комплементарную пару с G<sup>9</sup>-основанием мишени M1, на нуклеотидный остаток A (табл. 1).

Как и следовало ожидать, самый прочный комплекс с мишенью M1 образует эйкозануклеотид pN<sub>20</sub> (X = C) (T<sub>пл</sub> комплекса (1a) 69°C). Однонуклеотидная замена приводит к понижению температуры плавления приблизительно на 6°C для комплекса (1б). В случае комплексов (2), образованных додекануклеотидами pN<sub>12</sub> (X = C) и pN<sub>12</sub> (X = A), ΔT<sub>пл</sub> составляет 9°C (табл. 1). Это свидетельствует о том, что концентрация неправильных комплексов (1б) и (2б) в интервале физиологических температур достаточно велика, что и обуславливает способность протяженных олигонуклеотидов взаимодействовать в клетке наряду с выбранным участком НК также и с участками, различающимися по нуклеотидной последовательности на одно звено.

Иная ситуация возникает при использовании коротких олигонуклеотидов. Так, в случае октануклеотидов значения температуры плавления правильного (3a) и неправильного (3б) комплексов составляют 35 и 10°C. Октануклеотид pN<sub>8</sub> не способен образовать с мишенью стабильный несовершенный комплекс, и это обеспечивает его селективное взаимодействие с ДНК-фрагментом при физиологической температуре, т.е. высокую вероятность образования с его участием только правильных комплексов. Однако использование олигонуклеотидов такой длины не позволяет надеяться на их сайт-специфическое воздействие, поскольку вероятность встречаемости определенных октануклеотидных последовательностей

**Таблица 1.** Температуры плавления комплексов, образованных ДНК-мишенью М1 с олигонуклеотидами, как полностью комплементарными мишени, так и содержащими мононуклеотидную замену\*.

Комплекс	Олигонуклеотид	$T_{пл}, ^\circ\text{C}$	$\Delta T, ^\circ\text{C}$
(1a)	pGCATCAAGCAGCTCCAGGCA	69	6
(1б)	pGCATCAAGCAGATCCAGGCA	63	
(2a)	pCAGCTCCAGGCA	55	9
(2б)	pCAGATCCAGGCA	46	
(3a)	pCAGCTCCA	35	25
(3б)	pCAGATCCA	10	
(4a)**	pCAGC	38	18
(4б)**	pCAGA	20	

\* Жирным шрифтом выделены звенья, замена которых в комплексах (а) приводит к мисматчам в комплексах (б).

\*\* В присутствии дифеназиниевых эффекторов E1 и E2.

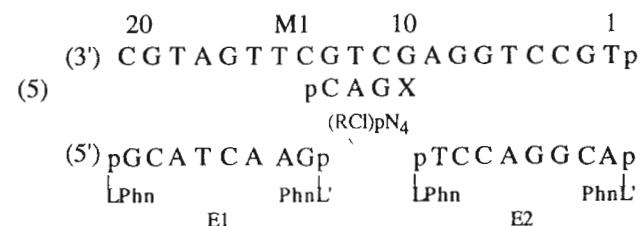
в протяженных нуклеиновых кислотах достаточно велика.

Проблема множественности сайтов узнавания коротких олигонуклеотидов на НК-мишени и их слабой комплексообразующей способности – два главных недостатка, практически исключающих их использование для сайт-специфической модификации НК, – была преодолена в предлагаемой нами стратегии применения тандема производных коротких олигонуклеотидов.

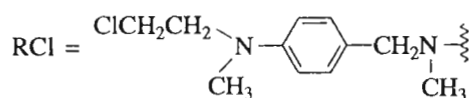
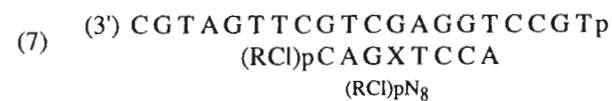
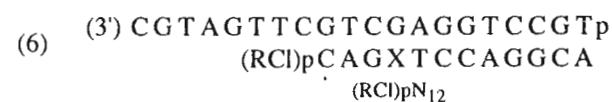
Как было показано ранее [1], зарегистрировать образование комплекса тетрануклеотида с мишенью при температуре выше  $5^\circ\text{C}$  не удается, однако в присутствии дифеназиниевых эффекторов E1 и E2 температура плавления комплекса М1 · рN<sub>4</sub> (X = C) (в составе правильного комплекса (4а)) достигает  $38^\circ\text{C}$ . Замена 3'-концевого нуклеотидного остатка С в тетрануклеотиде на А приводит к уменьшению температуры плавления комплекса (4б) до  $20^\circ\text{C}$  (табл. 1). Вероятно, эта замена вызывает нарушение стэкинг-взаимодействий между концевыми основаниями тетрануклеотида и эффектора E2, которые реализуются в правильном комплексе и способствуют стабилизации дуплекса мишень-тетрануклеотид. Полученные результаты свидетельствуют, что тетрануклеотид при фланкировании эффекторами способен формировать устойчивый правильный комплекс при физиологической температуре. Появление однобуквенной ошибки в дуплексе резко снижает его устойчивость; следовательно, концентрация таких дуплексов при  $37^\circ\text{C}$  будет крайне мала.

Влияние мисматча на термостабильность комплексов олигонуклеотидов с мишенью должно сказываться и на степени модификации мишени реагентами на основе этих олигонуклеотидов. Поэтому на следующем этапе работы было проведено сравнительное изучение модификации мишени М1 алкилирующими производными тетра- (в присутствии эффекторов), окта- и додеканук-

леотидов при 20 и  $37^\circ\text{C}$  как в составе правильных комплексов (5а)–(7а) (X = C), так и в комплексах с мисматчем (комплексы (5б)–(7б), X = A).



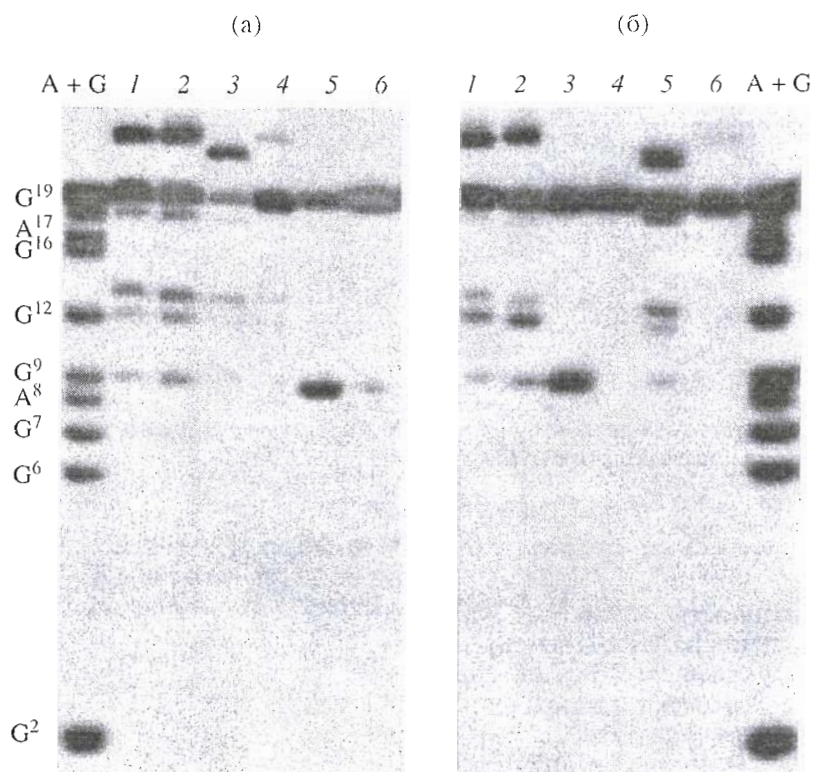
X = C (а), A (б)



Модификацию 5'-<sup>32</sup>P-меченого 20-звенного олигонуклеотида М1 алкилирующими производными проводили в буфере, содержащем 0.1 М NaCl, 0.01 М трис-НСl (рН 7.2), 1 мМ EDTA. Продукты модификации мишени регистрировали электрофорезом в денатурирующем ПААГ после их обработки пиперидином.

Как видно из табл. 2 и рис. 1а, 1б (1, 2), степени модификации мишени М1 реагентами на основе додекануклеотидов (RCI)pN<sub>12</sub> (С<sup>4</sup> или А<sup>4</sup>) как в правильном комплексе (6а) (X = C), так и в комплексе (6б) с мисматчем (X = A) одинаковы. Очевидно, это обусловлено тем, что даже при  $37^\circ\text{C}$  комплекс с мисматчем, образованный мишенью и додекануклеотидом рN<sub>12</sub> (X = A), образуется с выходом, превышающим 50%. Полученные резуль-





**Рис. 1.** Радиоавтограф электрофореза в денатурирующем 20% ПААГ продуктов модификации  $^{32}\text{P}$ -меченой ДНК-мишени М1 алкилирующими реагентами в составе правильных и несовершенных комплексов (0.1 М NaCl, 0.01 М трис-HCl (pH 7.2), 1 мМ EDTA). (а) – при 20°C в течение 48 ч алкилирующие реагенты: (RCl)pN<sub>12</sub> с C<sup>4</sup> (1), с A<sup>4</sup> (2); (RCl)pN<sub>8</sub> с C<sup>4</sup> (3), с A<sup>4</sup> (4); (RCl)pN<sub>4</sub> с C<sup>4</sup> (5), с A<sup>4</sup> (6); (б) – при 37°C в течение 8 ч алкилирующие реагенты: (RCl)pN<sub>12</sub> с C<sup>4</sup> (1), с A<sup>4</sup> (2); (RCl)pN<sub>4</sub> с C<sup>4</sup> (3), с A<sup>4</sup> (4); (RCl)pN<sub>8</sub> с C<sup>4</sup> (5), с A<sup>4</sup> (6). Комплексы с (RCl)pN<sub>4</sub> образованы в присутствии эффекторов E1 и E2. [M1] =  $5 \times 10^{-7}$  М, [реагент] = [эффектор] =  $1 \times 10^{-5}$  М. А + G – расщепление мишени по пуриновым нуклеотидам.

таты свидетельствуют о том, что в использованных условиях додекануклеотидный реагент не может обеспечить селективность модификации ДНК-мишени.

**Таблица 2.** Степени модификации мишени М1 алкилирующими реагентами на основе комплементарных ей олигонуклеотидов различной длины в составе правильных комплексов и комплексов с мисматчем

Комплекс	Олигонуклеотидный реагент*	Степень модификации (%) при	
		20°C	37°C
(5a)**	(RCl)pCAGC	70	41
(5b)**	(RCl)pCAGA	15	0
(6a)	(RCl)pCAGCTCCAGGCA	60	60
(6b)	(RCl)pCAGATCCAGGCA	60	60
(7a)	(RCl)pCAGCTCCA	70	55
(7b)	(RCl)pCAGATCCA	10	5

\*, \*\* См. примечания к табл. 1.

В случае более коротких октануклеотидных реагентов наблюдается резкое падение эффективности модификации мишени М1 в неправильных комплексах (табл. 2). Октануклеотидный реагент (RCl)pN<sub>8</sub> (X = A) практически не способен модифицировать мишень при 37°C (рис. 1б, 6), при более низкой температуре степень модификации мишени этим реагентом в неправильном комплексе (7б) составляет 10% (рис. 1а, 4). Степень алкилирования мишени М1 в правильном комплексе (7а) (X = C) достигает 55 и 70% соответственно (рис. 1б, 5, рис. 1а, 3). Таким образом, селективность модификации мишени может быть достигнута при использовании коротких олигонуклеотидных реагентов. Однако, как указывалось выше, непреодолимой проблемой в данном случае является множественность сайтов полного комплементарного связывания коротких олигонуклеотидов на протяженной НК-мишени.

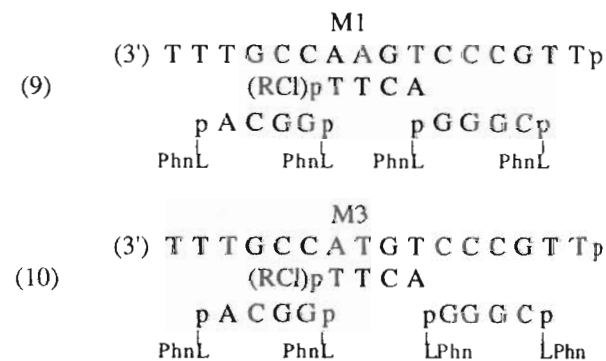
Как было показано ранее, высокая степень сайт-специфической модификации нуклеиновых кислот может быть достигнута при использовании реакционноспособных производных даже таких

коротких олигонуклеотидов, как тетрамеры, в присутствии пары фланкирующих эффекторов – дифеназиниевых производных олигонуклеотидов [15]. Было показано, что при наличии нескольких сайтов полного связывания тетра-нуклеотидного реагента на ДНК-мишени модификация протекает лишь по одному – где реагент фланкирован эффекторами. Специфичность модификации в этом случае достигается тем, что тетра-нуклеотидный реагент способен взаимодействовать с НК только в составе тандемного комплекса мишень · (эффектор + реагент + эффектор), что эквивалентно использованию 20-звенного олигонуклеотида. Важно было выяснить, только ли в составе правильных комплексов будет происходить модификация НК-мишени тандемом производных коротких олигонуклеотидов.

Из табл. 2 и рис. 1 видно катастрофическое падение степени модификации мишени М1 в несовершенном комплексе (5б) при использовании тандема E1 + (RCl)pN<sub>4</sub> (X = A) + E2. Если в правильном комплексе (5а) степень модификации достигает 70 и 41% (при 20 и 37°C) (рис. 1а, 5, рис. 1б, 3), то в случае комплекса (5б) с мисматчем (X = A) модификацию мишени М1 при 37°C зарегистрировать не удастся (рис. 1а, б, рис. 1б, 4).

Таким образом, можно заключить, что предлагаемый подход, основанный на использовании тандема эффектор + реагент + эффектор, позволяет осуществлять модификацию ДНК-мишени высокоселективно, т.е. только в случае образования правильного комплекса.

Полученные результаты были подтверждены в экспериментах по модификации ДНК-мишени в комплексе (9), в котором образование мисматча моделировалось заменой нуклеотидного остатка мишени А на Т в сайте связывания реагента. В качестве эффекторов использовали дифеназиниевые производные тетра-нуклеотидов, модификацию мишеней М2 и М3 проводили при 25°C.



L- = -HN(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH-

Степень алкилирования “правильной” мишени М2 в комплексе (9) достигает 62%, а для мишени М3 в комплексе (10), содержащем мононуклеотидную замену, снижается до 9% (рис. 2). Эти дан-

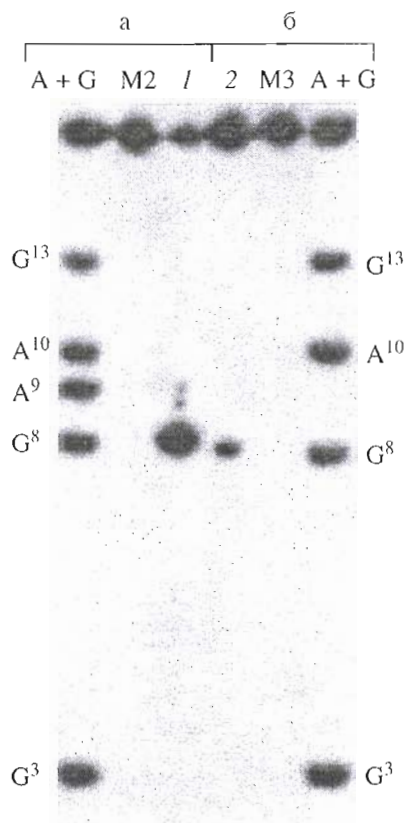
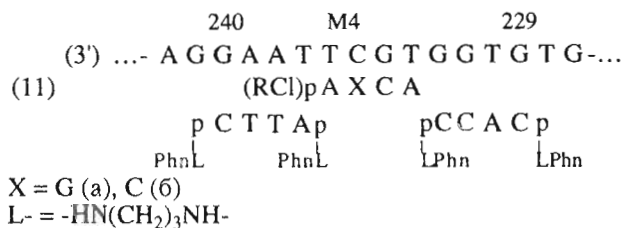


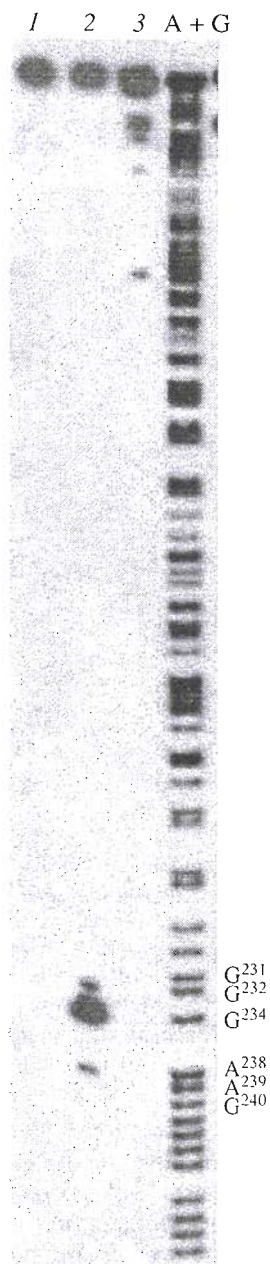
Рис. 2. Радиоавтограф электрофореза в денатурирующем 20% ПААГ продуктов модификации <sup>32</sup>P-меченой ДНК мишени М2 (а) и М3 (б) в составе комплексов (9) (1) и (10) (2). Условия модификации: 0.16 М NaCl, 0.02 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 7.4), 0.1 мМ EDTA, 25 ч при 25°C, [M<sub>2</sub>] = [M<sub>3</sub>] = 10<sup>-6</sup> М, [реагент] = [эффектор] = 5 × 10<sup>-5</sup> М. А + G – расщепление мишени по пуриновым нуклеотидам.

ные подтверждают возможность проведения селективной модификации ДНК-мишени при использовании тандемов эффектор + реагент + эффектор и правомерность использования модельных “неправильных” комплексов, в которых нуклеотидная замена осуществляется в адресной части реагента.

Для проверки возможности использования этого подхода для модификации протяженных нуклеиновых кислот была проведена модификация 302-звенного фрагмента ДНК (М4) тандемом олигонуклеотидов, комплементарных последовательности мишени 229–240.







**Рис. 3.** Радиоавтограф электрофореза в денатурирующем 8% ПААГ  $^{32}\text{P}$ -меченой мишени М4 (1) и продуктов ее модификации в составе комплексов (11а) (2) и (11б) (3).  $[\text{M4}] = 1 \times 10^{-8}$  М. Остальные условия см. подпись к рис. 2.

Для образования комплекса с мисматчем в тетра-нуклеотидном реагенте была произведена замена второго с 5'-конца нуклеотида G на C. Модификацию проводили при 25°C. Как видно из рис. 3, модификации тетра-нуклеотидным реагентом в присутствии тетра-нуклеотидных эффекторов подвергается одно основание мишени – G<sup>234</sup>. Степень модификации достигает 53%. В случае использования тетра-нуклеотидного реагента, ко-

торый может формировать неправильный комплекс (11б), модификация этого участка не наблюдается, а регистрируется незначительное алкилирование poly(G)-тракта на 5'-конце мишени.

Таким образом, для проведения сайт-специфичной и селективной модификации ДНК предпочтительно использовать тандемы производных коротких олигонуклеотидов – реагенты на основе тетра-нуклеотида в присутствии пары фланкирующих эффекторов. Реагенты на основе длинных олигонуклеотидов способны обеспечить только сайт-специфичное воздействие на ДНК, но не селективность, т.е. модификацию только из правильных комплексов. Если алкилирующее производное додекануклеотида при физиологических температурах одинаково эффективно модифицирует ДНК-фрагмент как в правильном, так и в неправильном комплексе, содержащем один мисматч, то реагент на основе более короткого октануклеотида в тех же условиях обладает селективностью воздействия на ДНК, так как дискриминирует правильные и неправильные комплексы. Однако октануклеотиды неспособны обеспечить сайт-специфичность воздействия на ДНК, поскольку определенная октануклеотидная последовательность может встречаться в протяженных фрагментах ДНК более одного раза. В то же время тандем производных коротких олигонуклеотидов, с одной стороны, обладает сайт-специфичностью, так как модифицирует ДНК только в случае образования полноразмерного комплекса тандема с мишенью, что эквивалентно использованию протяженных олигонуклеотидных производных. С другой стороны, модификация ДНК-мишени реагентом на основе тетра-нуклеотидов в присутствии эффекторов протекает исключительно селективно, т.е. только из правильного комплекса.

Таким образом, нами предложена новая стратегия модификации мишени, основанная на использовании тандемов коротких олигонуклеотидов, позволяющая осуществлять высокоселективную модификацию НК только из правильных комплексов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Хлорид N-(2-гидроксиэтил)феназиния любезно предоставлен В.Н. Сильниковым (НИБХ СО РАН). 4-(N-2-Хлорэтил, N-метиламино)бензил-метиламин (RC1) синтезирован Т.М. Ивановой (НИБХ СО РАН).

Олигонуклеотиды и их производные выделяли ионообменной (Полисил-СА, "Теоретическая практика", Россия) и обращенно-фазовой (Li-Chroprep RP-18, Merck) хроматографиями на хроматографе "Beckman-332".

**Олигонуклеотиды** рTGCCTGGAGCTGCTTGAT-GC, рGCATCAAG, рTCCAGGCA, рCAGA, рCAGC, рCAGCTCCA, рCAGATCCA, рCAGCTC-CAGGCA, рCAGATCCAGGCA синтезировали фосфотриэфирным методом в растворе [16].

**Дифеназиниевые производные олигонуклеотидов** (PhnL)рGCATCAAGр(L'Phn) (E1) и (PhnL)рTCCAGGCAр(L'Phn) (E2) получали по методу [17]. Анализ полученных производных олигонуклеотидов проводили методом обращенно-фазовой хроматографии (линейный градиент ацетонитрила в 0.05 M LiClO<sub>4</sub>; 0 → 20%, 30 мин, скорость элюции 2 мл/мин), сравнивая времена удерживания исходных олигонуклеотидов и более гидрофобных продуктов реакции ( $\Delta t_{уд}$  – время удерживания относительно исходного олигонуклеотида), а также спектрофотометрически по соотношению поглощения растворов целевых продуктов в воде на длинах волн 260 и 530 нм ( $\epsilon_{530}$  феназиниевого остатка с аминолинкером составляет  $14 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [17]). Для E1:  $\Delta t_{уд} = 11$  мин,  $A_{260}/A_{530} = 3.6$ ; для E2:  $\Delta t_{уд} = 10$  мин,  $A_{260}/A_{530} = 3.5$ .

**Алкилирующие производные олигонуклеотидов** (RCl)рN<sub>n</sub> получали по методу [18] и выделяли обращенно-фазовой хроматографией (линейный градиент ацетонитрила в 0.05 M LiClO<sub>4</sub>; 0 → 20%, 30 мин, скорость элюции 2 мл/мин), сравнивая времена удерживания исходных олигонуклеотидов и более гидрофобных продуктов реакции ( $\Delta t_{уд}$  – время удерживания относительно исходного олигонуклеотида): (RCl)рCAGC – 13 мин; (RCl)рCAGA – 12; (RCl)рCAGCTCCA – 7; (RCl)рCAGATCCA – 7; (RCl)рCAGCTCCAGGCA – 2; (RCl)рCAGATCCAGGCA – 2 мин.

Содержание активного хлора в олигонуклеотидных реагентах определяли по реакции алкилирования тиосульфата, выход которой во всех случаях превышал 90% по данным обращенно-фазовой хроматографии [19].

**Концентрацию олигонуклеотидов** и их производных определяли спектрофотометрически, используя суммарные величины  $\epsilon_{260}$  (M<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>) моно- и динуклеотидов [20], алкилирующей группировки ( $1.47 \times 10^4$  [21]) и N-(2-гидроксиэтил)феназиниевого остатка ( $1 \times 10^4$  [17]).

**Исследование термической денатурации** олигонуклеотидных дуплексов проводили в буфере 0.1 M NaCl, 0.01 M каодилат натрия (рН 7.4), 1 mM EDTA при концентрации каждого олигонуклеотидного компонента  $1.3 \times 10^{-5}$  M на установке с терморегулируемой оптической кюветой на базе УФ-детектора жидкостного хроматографа “Миляхром” (Россия) на длине волны 260 нм. Скорость нагрева образцов не превышала 0.7–1°C/мин. За температуру плавления дуплекса M · рN<sub>4</sub> в присутствии E1 и E2 принимали температуру, при которой кривая, полученная как разность дифференциальной кривой плавления ком-

плекса M · (E1 + рN<sub>4</sub> + E2) и дифференциальной кривой плавления комплекса мишени с эффекторами M · (E1 + E2), достигала максимального значения [1].

**Модификацию ДНК-мишеней** алкилирующими производными олигонуклеотидов проводили в течение 8 ч при 37°C, 25 ч при 25°C и 48 ч при 20°C (более пяти периодов полуионизации связи C–Cl [21]).

**5'-<sup>32</sup>P-Меченые олигонуклеотидные мишени** M1, M2 и M3 получали путем обмена 5'-фосфата на [<sup>32</sup>P]фосфат [22].

**Фрагмент [<sup>32</sup>P]ДНК (302-мер)** предоставлен С.В. Мамаевым (НИБХ СО РАН).

**Алкилирование мишени** регистрировали электрофорезом в денатурирующем ПААГ по появлению продуктов деструкции полинуклеотидной цепи по модифицированным основаниям после обработки препаратов мишени 10% водным пиперидином в течение 30–50 мин при 95°C [23].

За степень модификации ДНК-мишени принимали процентное отношение радиоактивности в пятне, соответствующем продукту расщепления мишени по заданному основанию, к суммарной радиоактивности в дорожке геля. Статистическое расщепление олигонуклеотида-мишени по остаткам пуринов (A + G) получали обработкой препарата ДНК 2% раствором дифениламина в 66% муравьиной кислоте (25°C, 35 мин) [24].

Работа финансировалась грантом Государственной программы “Новейшие методы биоинженерии” и грантом РФФИ (№ 96-04-50-191).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пышный Д.В., Пышная И.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорганич. химия. 1995. Т. 21. С. 709–716.
2. Aboul-ela F., Koh D., Tinoco I., Jr., Martin F.H. // Nucleic Acids Res. 1985. V. 13. P. 4811–4824.
3. Werntges H., Steger G., Riesner D., Fritz H.-J. // Nucleic Acids Res. 1986. V. 14. P. 3773–3790.
4. Freier S.M., Kierzek R., Jaeger J.A., Sugimoto N., Cruthers M.H., Neilson T., Turner D.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 9373–9377.
5. Roberts R.W., Crothers D.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 9397–9401.
6. Rougee M., Faucon B., Mergny J.L., Barcelo F., Giovannangeli C., Montenay-Garestier T., Helene C. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 9269–9278.
7. Best G.C., Dervan P.B. // J. Am. Chem. Soc. 1995. V. 117. P. 1187–1193.
8. Uhlmann E., Peyman A. // Chem. Rev. 1990. V. 90. P. 543–584.
9. Beaucage S.L., Iyer R.P. // Tetrahedron. 1993. V. 49. P. 6123–6194.

10. *Зенкова М.А., Карпова Г.Г.* // Успехи химии. 1993. Т. 62. С. 414–435.
11. *Prakash G., Kool E.T.* // J. Am. Chem. Soc. 1992. V. 114. P. 3523–3528.
12. *Wang S., Friedman A.E., Kool E.T.* // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 9774–9784.
13. *Wang S., Kool E.T.* // J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116. P. 8857–8858.
14. *Kutyavin I.V., Podyminogin M.A., Bazuna Yu.N., Fedorova O.S., Knorre D.G., Levina A.S., Matayev S.V., Zarytova V.F.* // FEBS Lett. 1988. V. 238. P. 35–38.
15. *Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Подыминогин М.А.* // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 895–900.
16. *Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Романенко В.П.* // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 516–521.
17. *Lokhov S.G., Podyminogin M.A., Sergeyev D.S., Silnikov V.N., Kutyavin I.V., Shishkin G.V., Zarytova V.F.* // Bioconj. Chem. 1992. V. 3. P. 414–419.
18. *Zarytova V.F., Godovikova T.S., Kutyavin I.V., Khalimskaya L.M.* // Biophosphates and their Analogues, Synthesis, Structure, Metabolism and Activity / Eds K.S. Bruzik, W.S. Stec. Amsterdam: Elsevier, 1987. P. 149–164.
19. *Гринева Н.И., Ломакина Т.С., Тугеева Н.Г., Чимитова А.Т.* // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. С. 210–214.
20. *Cantor C.R., Tinoco I.* // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. P. 65–72.
21. *Барам Г.И., Бунева В.Н., Добрикова Е.Ю., Петров В.Н.* // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 613–620.
22. *Berkner K.L., Folk W.R.* // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 3176–3184.
23. *Maxam A.M., Gilbert W.* // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.
24. *Коробко В.Г., Грачев С.А.* // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. С. 1420–1422.

## Interaction of Derivatives of Short Oligonucleotides with Nucleic Acids. II. A Tandem of Short Oligonucleotides as a Highly Sensitive System for Identification of Single-Base Substitutions in Target DNAs

**D. V. Pyshnyi, M. A. Podyminogin, I. A. Pyshnaya,  
S. G. Lokhov, E. M. Ivanova, and V. F. Zarytova**

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,  
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

**Abstract**—A new approach for modification of target DNAs with tandems of derivatives of short oligonucleotides was suggested that allows highly selective modification of perfect duplexes only. At physiological temperatures, the efficiency of DNA modification by a dodecanucleotide alkylating agent was demonstrated to be the same for both perfect and mismatch-containing duplexes, whereas the tetranucleotide reagent in the presence of two flanking effectors alkylated with high selectivity the target DNA in the perfect duplex only.

*Key words:* oligonucleotide derivatives, effectors, DNA modification, duplex thermostability, modification selectivity, mismatches