



УДК 577.113.4

КОНЪЮГАТЫ ПОЛИАКРИЛАМИДА С ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ И ИХ МИМЕТИКАМИ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ

© 1999 г. В. А. Ефимов[#], О. Г. Чахмахчева*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 24.03.99 г. Принята к печати 19.04.99 г.

Рассматриваются подходы к получению конъюгатов олигонуклеотидов и некоторых ДНК-миметиков, родственных пептидо-нуклеиновым кислотам, с акриламидом и полиакриламидом. Обсуждаются их физико-химические свойства и перспективы использования для анализа НК.

Ключевые слова: акриламид; олигонуклеотиды; ДНК-миметики; пептидо-нуклеиновые кислоты; аналоги и гибриды; гибридизация; ДНК-диагностика.

Стремительный прогресс в молекулярной биологии и биотехнологии в значительной мере был обусловлен доступностью синтетических олигонуклеотидов, которые нашли широкое применение как гибридизационные зонды, линкеры и праймеры. В последнее время к потенциальным сферам применения этих соединений прибавилась диагностика различных заболеваний. В основе их использования лежит молекулярная гибридизация с олигонуклеотидом, имеющим специфическую последовательность оснований, что позволяет быстро и надежно определять наличие в исследуемой НК комплементарной последовательности и в большинстве случаев является простой и недорогой альтернативой традиционным методам секвенса. Этот подход, получивший название “микрочип”-технология, с успехом применяется для анализа генетического полиморфизма, диагностики генетических заболеваний и рака, детекции патогенных вирусов и микробов и картирования геномов [1, 2]. Среди наиболее популярных методологических приемов следует отметить “сэндвич”-системы для детекции НК, а также метод секвенса НК гибридизацией с олигонуклеотидной матрицей, представляющей собой набор олигонуклеотидов, иммобилизованных на твердом носителе [3–5].

Дальнейшее развитие “микрочип”-технологии предполагает решение ряда проблем, связанных со скоростью и степенью гибридизации, чувствительностью метода и стабильностью проб. На скорость и степень гибридизации на твердом носителе значительное влияние оказывают природа самого носителя и способ присоединения к нему олигонуклеотида. Для этих целей был предложен ряд материалов, в том числе полистирольные матрицы, нитроцеллюлозные и нейлоновые мембраны, активированный декстран, диазотированные цел-

люлозные носители, стекло [6]. Однако большинство из них имеет недостатки, связанные с возможностью потери закрепленной пробы, ее низким содержанием и недостаточной эффективностью самого процесса гибридизации.

В последнее время для иммобилизации биологических макромолекул (пептидов, углеводов, НК) широкое применение нашли полиакриламидные носители. К их привлекательным свойствам следует отнести легкость введения реакционноспособных функциональных групп, относительно высокую термическую и химическую стабильность, большую емкость и легкость регулирования плотности посадки олигонуклеотидных проб. Кроме того, их отличает гидрофильность и низкая степень неспецифической адсорбции биомолекул [7].

Известно несколько подходов к получению полиакриламидных носителей с присоединенными к ним в виде боковых цепей олигонуклеотидами. Разработка методов иммобилизации, основанных на конденсации полиакриламида с предварительно синтезированным олигонуклеотидом, проводилась в ряде научно-исследовательских групп. Один из удачных подходов был предложен Мирзабековым и сотр. [8]. Он основан на присоединении олигонуклеотида к покрытой полиакриламидным гелем поверхности за счет взаимодействия между 3'-концевой альдегидной группой олигонуклеотида и аминогруппой на геле, или, наоборот, концевой аминогруппы олигонуклеотида с альдегидной группой на твердой фазе. Гош с сотр. использовал для ковалентного присоединения олигонуклеотидов к полиакриламидному носителю тиоэфирные группировки [7].

Недавно введен в практику альтернативный подход, основанный на сополимеризации акриламида с олигонуклеотидом, содержащим в составе спейсера акриламидную группировку. Озаки и

[#] Автор для переписки (e-mail: eva@ibch.siobc.ras.ru).

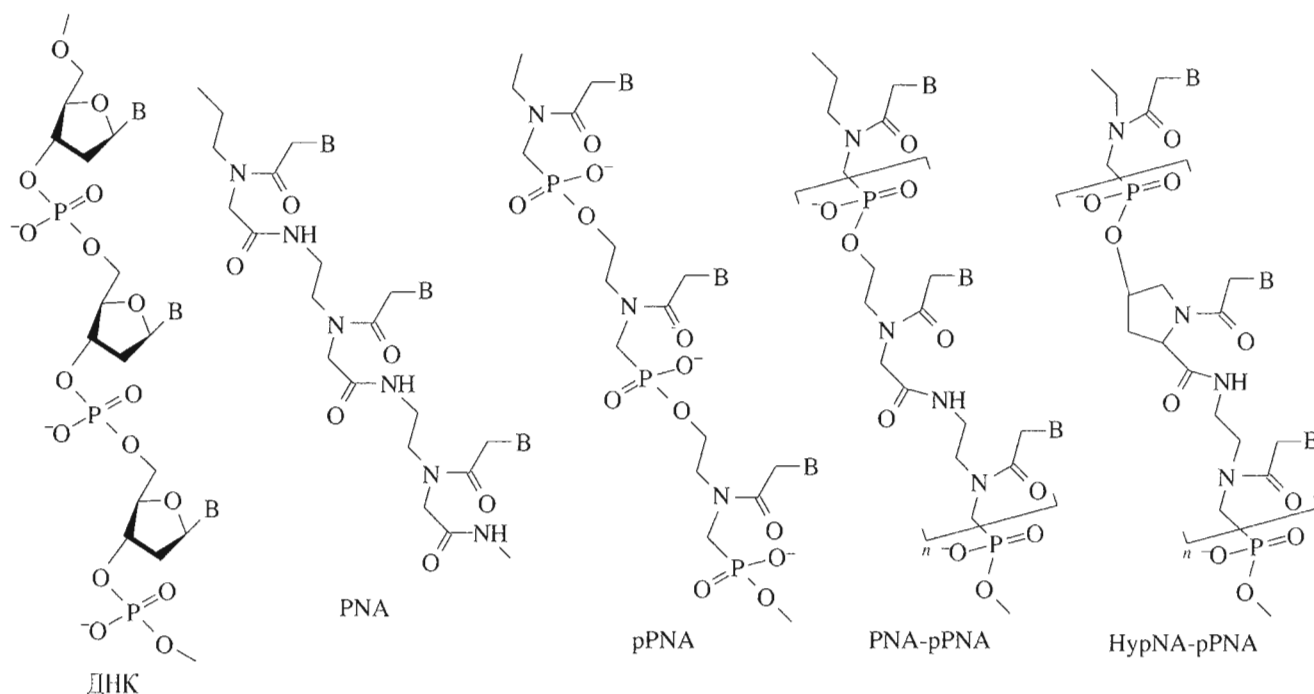


Рис. 1. Структуры ДНК-миметиков.

сопр. [9] и Мускат и сопр. [10] использовали этот подход для усовершенствования техники анализа НК аффинным капиллярным электрофорезом. Модифицированные акриламидом олигонуклеотиды вводились также в пластины полиакриламидного геля для проведения высокоспецифичного препаративного разделения НК электрофорезом в сочетании с гибридизацией, а также для твердофазного ПЦР- и гибридизационного анализа НК на матрицах [11, 12].

Несмотря на успехи, использование олигонуклеотидов для диагностики и терапии ограничивается из-за ряда проблем, которые связаны с нестабильностью молекул олигонуклеотидов в биологических системах и жидкостях за счет быстрой деградации нуклеазами. Для решения этой проблемы было предложено большое число аналогов НК и миметиков, обладающих повышенной устойчивостью к ферментам. Среди них особое место занимают пептидо-нуклеиновые кислоты (PNA) – незаряженные ациклические аналоги ДНК, классический вариант которых представляют производные *N*-(2-аминоэтил)глицина, несущие в виде боковых цепей гетероциклические основания НК [13] (рис. 1). Эти соединения, обладающие высоким сродством к ДНК и РНК, полностью устойчивы к действию как нуклеаз, так и протеиназ (пептидаз), а также практически не разрушаются при инкубации в течение 2 ч в человеческой сыворотке, экстрактах бактериальных клеток и других биологических жидкостях [14]. Было показано, что PNA могут успешно использоваться как генотипические пробы для амплификации

ДНК и способны дискриминировать точечные мутации в НК лучше, чем природные олигонуклеотиды [15, 16]. В последнее время их стали активно вводить в различные диагностические системы, вместо олигонуклеотидов [17–19]. Использование PNA-проб позволяет одновременно повысить специфичность и чувствительность гибридизационного анализа. Тем не менее, основное препятствие к широкому использованию PNA в биологических системах и диагностикумах – их плохая растворимость в воде и тенденция к самоагрегации [20, 21].

С целью улучшения свойств PNA были предложены новые типы ДНК-миметиков, представляющих собой фосфонатные аналоги PNA (рPNA) и их гибриды [22–24] (рис. 1). Введение отрицательных зарядов в молекулу миметиков привело к резкому повышению их гидрофильности с сохранением устойчивости к действию нуклеаз. При этом, если стабильность комплексов рPNA с комплементарными фрагментами ДНК (или РНК) ниже стабильности соответствующих комплексов, образованных PNA, то PNA-rPNA-гибриды сочетают в себе положительные свойства соединений обоих этих типов, обладая более высокими гибридизационными характеристиками, чем немодифицированные олигонуклеотиды [25, 26]. Другой тип гетероолигомеров состоит из чередующихся остатков рPNA и PNA-подобного мономера на основе *транс*-4-гидрокси-*L*-пролина (НурNA), который представляет собой конформационно ограниченный, хиральный аналог PNA [27]. Гибриды НурNA-rPNA также демонстрируют сильное связывание с комплементарными цепями НК, прак-



Рис. 2. Общая схема использования конъюгатов синтетических олигомеров с полиакриламидом для детекции и анализа НК "сэндвич"-гибридизацией.

тически эквивалентное связыванию PNA. Подобные свойства делают PNA-pPNA- и HupNA-pPNA-олигомеры весьма перспективными в качестве потенциальных антисмысловых или антигенных терапевтических средств.

Другой потенциальной сферой применения таких соединений является диагностика, где они могут использоваться вместо олигонуклеотидов в качестве улавливающих НК гибридных проб на твердых поверхностях или детекционных и амплификационных проб в растворе, как это показано в общем виде на рис. 2.

Проверка возможности применения ДНК-миметиков в диагностике проводилась нами на полиакриламидных носителях. Были разработаны подходы к синтезу конъюгатов олигонуклеотидов, PNA, PNA-pPNA- и HupNA-pPNA-гибридов с акриламидом и полиакриламидом [28]. Получение производных олигомеров-миметиков, содержащих остатки акриламида проводится исходя из мономеров (PNA, pPNA, HupNA) и димеров (PNA-pPNA и HupNA-pPNA) автоматическим твердофазным синтезом в специально разработанных режимах [24, 25–27]. Остаток акриламида присоединяется к концевой аминогруппе закрепленного на носителе олигомера действием активированного производного акриловой кислоты на последней стадии наращивания цепи (рис. 3). После удаления защитных групп и отщепления от носителя олигомеры очищают анионообменной хроматографией. Конъюгаты акриламида с олигодезоксирибонуклеотидами можно также получать стандартным фосфитамидным методом как описано в работе [11]. Чистота и структура соединений подтверждаются обращенно-фазовой хроматографией и гель-электрофорезом. Хорошие результаты при подтверждении структуры подобных соединений могут быть получены с использованием современных методов масс-спектрометрии [29].

Акриламидные производные олигомеров далее вводятся в реакцию сополимеризации с акриламидом и (или) каким-либо активированным производным акриловой кислоты (рис. 4). Прибавление в реакционную смесь бисакриламида позволяет получать полиакриламидные гели, содержащие иммобилизованные гибридные пробы. Подобные гели могут использоваться для проведения аффинной хроматографии и гель-электрофореза. При проведении реакции сополимеризации в микрообъеме на твердой поверхности, покрытой ковалентно присоединенными остатками акриламида, получают полимерные матрицы для "микрочип"-анализа. Эффективность иммобилизации олигомера при этом обычно составляет 80–85% от теоретически возможной.

Активированные карбоксильные группы на полиакриламидном сополимере, содержащем в виде множественных боковых цепей олигомеры, могут служить для присоединения к различным носителям, имеющим на поверхности аминогруппы. Кроме того, с их помощью в сополимер вводятся дополнительные боковые цепи ненуклеотидного характера, которые могут применяться для присоединения к различным поверхностям, а также для введения различных меток. Блокировка непрореагировавших активированных карбоксильных групп на сополимере аминоспиртом приводит к увеличению гидрофильности результирующего сополимера.

Альтернативный подход к получению полимерных конъюгатов включает иммобилизацию олигомера на предварительно приготовленных полиакриламидных цепях, содержащих реакционноспособные группы. Для прямого химического замещения олигонуклеотидами или миметиками, несущими на конце цепи аминофункцию, могут использоваться как альдегидная группа [8], так и, по аналогии с гликоконъюгатами [30], – ак-

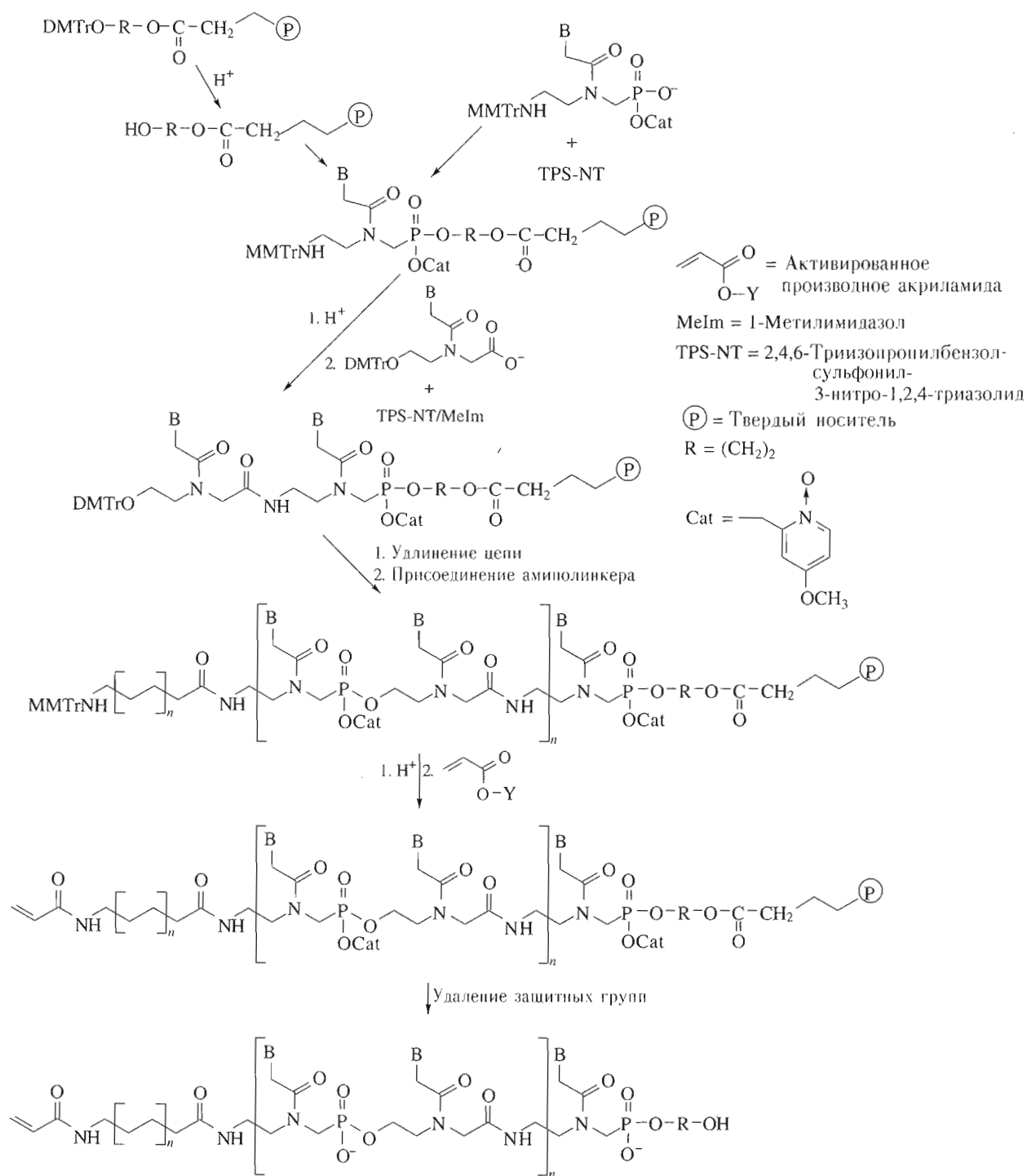


Рис. 3. Схема твердофазного синтеза акриламидного производного олигомера-гибрида PNA-pPNA.

тивированные производные акриловой кислоты, например *n*-нитрофениловый эфир (эффективность около 50%) (рис. 4). Характеризация сополимеров акриламида проводится по молекулярной массе и содержанию олигомера-миметика с помощью флуоресцентной или УФ-спектроскопии, а также электрофореза и гель-фильтрации [11, 31].

Гибридизационные свойства конъюгатов акриламида с олигонуклеотидами и ДНК-мимети-

ками изучались различными методами, в частности гель-фильтрацией, гель-электрофорезом и УФ-спектроскопией. Поскольку электрическое поле 200–400 В/см не оказывает влияния на эффективность гибридизации комплементарных олигонуклеотидов [9], акриламидные конъюгаты олигомеров могут быть заподимеризованы в определенные районы неденатурирующего полиакриламидного геля. После удаления неиммоби-

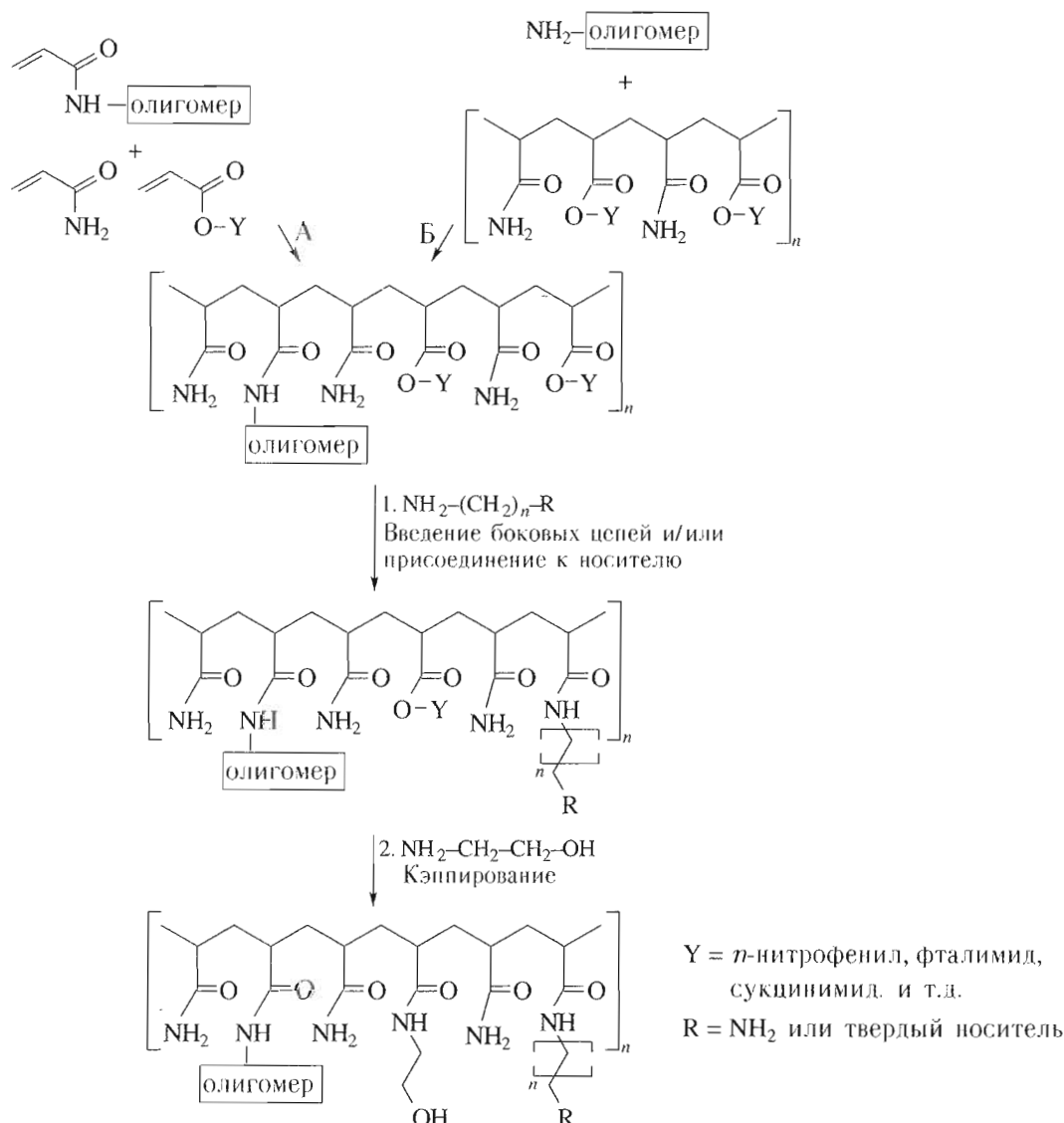


Рис. 4. Получение функционализованного полиакриламида путем сополимеризации акриламидных производных олигомеров с акриламидом (А) и иммобилизации олигомеров на предварительно приготовленный полиакриламид (Б).

лизованных олигомеров из геля электрофорезом, на него наносятся образцы комплементарных или некомплементарных (частично или полностью) олигонуклеотидов. При дальнейшем проведении электрофореза иммобилизованная на геле проба улавливает комплементарный ей олигонуклеотид из жидкой фазы и концентрирует его в тонкую полосу на геле. При этом олигонуклеотиды, имеющие в последовательности пропуски или замены оснований, не связываются достаточно прочно с аффинной матрицей и элюируются с геля в ходе электрофореза с пропорциональной количеству замен скоростью [11, 12].

Эксперименты по плавлению комплексов, образованных растворимыми полиакриламидными конъюгатами олигомеров и комплементарными им олигонуклеотидами, показали, что вязкость 1–5%-ных полимеров практически не влияет на темпера-

туру плавления комплексов, специфичность их образования и скорость взаимодействия комплементарных молекул [10]. Контрольные эксперименты с олигомерами, имеющими некомплементарные последовательности и отдельные замены, подтверждают сиквенс-специфичность гибридизации сополимеров миметиков с комплементарными одноцепочечными ДНК и РНК (рис. 5).

Проводилась также иммобилизация полиакриламидных конъюгатов олигонуклеотидов и миметиков на пластиковых подложках для микротитрования [11]. Акриламидные сополимеры получали в лунках стандартных полиэтиленовых плашек, отмывали от неиммобилизованных олигомеров и обрабатывали растворами, содержащими флуоресцентно меченые олигонуклеотиды с комплементарными последовательностями оснований. Сканирование показало сильную флуо-

ресценцию в тех лунках, которые содержали комплементарные олигомеры, при отсутствии неспецифического связывания с материалом плашек и с некомплементарными олигонуклеотидами. Плотность распределения улавливающей пробы при этом оценивалась как 250–270 фмоль/мм² [11].

В диагностикумах в качестве материала подложки часто используется стекло. Смеси акриламида, бисакриламида и акриламидсодержащих олигонуклеотидов (или миметиков) полимеризуют в микрообъеме на предварительно покрытой акрильными группировками поверхности микроскопных стекол (обработка 3-(триэтоксисил)пропилакриламидом [8]). После промывки на твердой фазе остаются олигомеры, ковалентно связанные с матрицей и представляющие собой улавливающую пробу. Полученные “слайды” гибридизуют с мечеными образцами ДНК, промывают и автордиографируют. Специфической гибридизации на радиоавтографе соответствуют сильные сигналы, тогда как частично комплементарные последовательности дают слабые сигналы, а сигналы некомплементарных последовательностей практически не отличаются от фона (рис. 6).

Одной из задач при проведении гибридизационного анализа является амплификация сигнала. Традиционные способы основаны на использовании разветвленных детекционных проб-мультимеров, которые содержат первичную нуклеотидную последовательность, комплементарную определяемой НК, и одну или несколько вторичных последовательностей, содержащих метку и обеспечивающих усиление сигнала. Подобные разветвленные олигонуклеотидные пробы получают прямым химическим твердофазным синтезом, что достаточно трудоемко и сложно [31, 32]. Альтернативная стратегия – приготовление полимера ненуклеотидной природы, содержащего в виде боковых цепей ковалентно присоединенные олигонуклеотиды.

Пример использования такого полимера, представляющего собой конъюгат олигонуклеотида и линейного сополимера *N*-винилпирролидона и *N*-акрилоилсукцинимиды, для детекции ДНК вируса гепатита В был недавно опубликован [33]. Очевидно, что подобные пробы для амплификации сигнала могут быть получены и на основе полиакриламида (рис. 2). Для оценки эффективности применения полиакриламидных конъюгатов для амплификации сигнала при детекции НК методом “сэндвич”-гибридизации использовались меченые детекционные пробы, представляющие собой олигонуклеотиды или их миметики, расположенные в виде многочисленных боковых цепей на полиакриламидном полимере. Следует отметить, что таким образом в один и тот же полимер могут одновременно вводиться олигомеры, имеющие различные последовательности оснований или метки, что создает дополнительные удобства

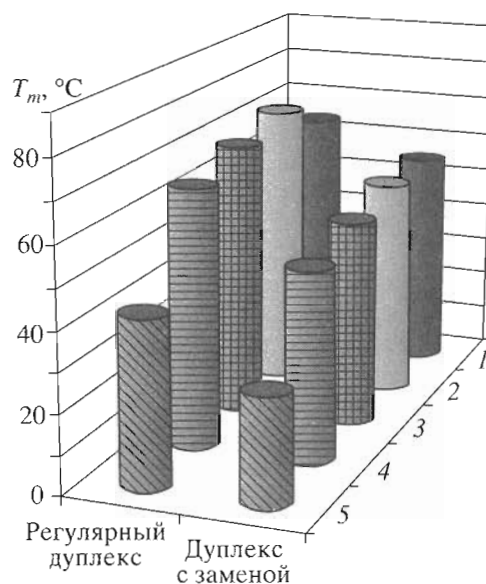


Рис. 5. Сравнение температур плавления комплексов, образованных полиакриламидными конъюгатами олигонуклеотида (1) и ДНК-миметиков: рPNA (5), PNA-pPNA (4), НурNA-pPNA (3) и PNA (2), полностью (CTGCAAAGGACACCCATGA) или частично (CTGCAAAGCACACCCATGA) комплементарных олигодезоксирибонуклеотидной матрице d(TCATGGTGTCCCTTTCAG).

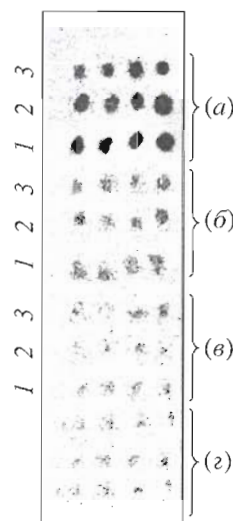


Рис. 6. Гибридизация между ³²P-меченым 18-звенным олигонуклеотидом (TCATGGTGTCCCTTTCAG) и присоединенным к стеклянной поверхности сополимером акриламида с олигонуклеотидом (1), PNA-pPNA-гибридом (2) или НурNA-pPNA-гибридом (3), имеющими строго комплементарную (CTGCAAAGGACACCCATGA) (а), частично комплементарную (CTGCAAAGCACACCCATGA) (б) или некомплементарную (T₁₅) (в) последовательности. В качестве контроля использовались полиакриламидные пятна, не содержащие олигомеров (2).

для работы. Степень амплификации сигнала зависит от мольного соотношения между олигомерами и полиакриламидом, а также между различными олигомерами. При этом чувствительность сигнала достигает 1–2 × 10⁶ молекул/мл и не на-

блюдается существенных отличий при использовании миметиков вместо олигонуклеотидов [28].

Таким образом, оценка гибридизационных характеристик сополимеров акриламида с олигонуклеотидами и ДНК-миметиками, в частности РНА-рРНА- и НурНА-рРНА-гибридами, показала, что они могут быть с успехом применены для анализа и обнаружения НК как в виде присоединенных к различным поверхностям (пластик, стекло) улавливающих проб, так и в виде усиливающих сигнал растворимых детекционных проб. При этом применение миметиков позволяет сохранить или даже несколько повысить уровень специфичности и чувствительности процесса детекции по сравнению с использованием олигонуклеотидов, наряду с увеличением стабильности проб в биологических системах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chetverin A.B., Kramer F.R. // *BioTechnology*. 1994. V. 12. P. 1093–1099.
2. Case-Green S.C., Mir K.U., Pritchard C.E., Southern E.M. // *Curr. Op. Chem. Biol.* 1998. V. 2. P. 404–410.
3. Southern E.M. // *Trends in Genetics*. 1996. V. 12. P. 110–115.
4. Parinov S., Barsky V., Yershov G., Kirillov E., Timofeev E., Belgovskiy A., Mirzabekov A. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 2998–3004.
5. Drmanac S., Kita D., Labat I., Hauser B., Schmidt C., Burczak J.D., Drmanac R. // *Nature Biotechnology*. 1998. V. 16. P. 54–58.
6. Ramsay G. // *Nature Biotechnology*. 1998. V. 16. P. 40–44.
7. Fahy E., Davis G.R., DiMichele L., Ghosh S.S. // *Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. P. 1819–1826.
8. Timofeev E., Kochetkova S.V., Mirzabekov A., Florentiev V.L. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 3142–3148.
9. Ozaki Y., Ihara T., Katayama Y., Maeda M. // *Nucl. Acids Symp. Ser.* 1997. V. 37. P. 235–236.
10. Muscate A., Natt F., Paulus A., Ehrat M. // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 1419–1424.
11. Rehman F.N., Audeh M., Abrams E.S., Hammond P.W., Kenney M., Boles T.C. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 649–655.
12. Kenney M., Ray S., Boles T.C. // *BioTechniques*. 1998. V. 25. P. 516–521.
13. Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H., Buchardt O. // *Science*. 1991. V. 254. P. 1497–1500.
14. Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C., Freier S.M., Driver D.A., Berg R.H., Kim S.K., Norden B., Nielsen P.E. // *Nature*. 1993. V. 365. P. 566–568.
15. Hyrup B., Nielsen P.E. // *Bioorganic & Medical Chemistry*. 1996. V. 4. P. 5–23.
16. Eriksson M., Nielsen P.E. // *Q. Res. Biophys.* 1996. V. 29. P. 369–394.
17. Geiger A., Lester A., Kleiber J., Orum H. // *Nucleosides & Nucleotides*. 1998. V. 17. P. 1717–1724.
18. Weiler J., Gausephohl H., Hauser N., Jensen O.N., Hoheisel J.D. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 2792–2799.
19. Marshall A., Hodgson J. // *Nature Biotechnology*. 1998. V. 16. P. 27–31.
20. Nielsen P.E., Egholm M., Buchardt O. // *Bioconjugate Chem.* 1994. V. 5. P. 3–7.
21. Bergman F., Bannwarth W., Tam S. // *Tetrahedron Lett.* 1995. V. 36. P. 6823–6826.
22. Efimov V.A., Choob M.V., Kalinkina A.L., Chakhmakhcheva O.G., Stromberg R., van der Laan A.C., Meeuwenoord N., Kuyl-Yeheskiely E., van Boom J.H. // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1996. V. 61. P. S262–S264.
23. Van der Laan A.C., Stromberg R., van Boom J.H., Kuyl-Yeheskiely E., Efimov V.A., Chakhmakhcheva O.G. // *Tetrahedron Lett.* 1996. V. 37. P. 7857–7860.
24. Peyman A., Uhlmann E., Wagner K., Augustin S., Breipohl G., Will D.W., Schafer A., Wallmeier H. // *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 1996. V. 35. P. 2636–2638.
25. Efimov V.A., Choob M.V., Buryakova A.A., Kalinkina A.L., Chakhmakhcheva O.G. // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 566–575.
26. Ефимов В.А., Бурякова А.А., Чуб М.В., Чахмахчева О.Г. // *Биоорганическая химия*. 1998. Т. 24. С. 696–709.
27. Ефимов В.А., Бурякова А.А., Чуб М.В., Чахмахчева О.Г. // *Биоорганическая химия*. 1999. Т. 25. С. 611–622.
28. Efimov V.A., Buryakova A.A., Chakhmakhcheva O.G. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. (in press).
29. Owens D.R., Bothner B., Phung Q., Harris K., Siuzdak G. // *Bioorganic & Medical Chemistry*. 1998. V. 6. P. 1547–1554.
30. Бовин Н.В. // *Биоорганическая химия*. 1996. Т. 22. С. 643–663.
31. Shchepinov M.S., Udalova I.A., Bridgman A.J., Southern E.M. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4447–4454.
32. Horn T., Chang C.-A., Urdea M.S. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4842–4849.
33. Erout M.-N., Troesch A., Pichot C., Cros F. // *Bioconjugate Chem.* 1996. V. 7. P. 568–575.

Polyacrylamide Conjugates with Oligonucleotides and Their Mimics for Diagnostics

V. A. Efimov[#] and O. G. Chakhmakhcheva

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

Approaches to preparing acrylamide and polyacrylamide conjugates with oligonucleotides and some peptide nucleic acid-related DNA mimics are considered. Their physicochemical properties and application to the nucleic acid analysis are discussed.

Key words: acrylamide, DNA diagnostics, DNA mimics, hybridization, oligonucleotides, peptide nucleic acids

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: eva@ibch.siobc.ras.ru.