



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.113.4 : 543.4

© 1994 В. А. Коршун, Ю. А. Берлин

ВВЕДЕНИЕ НЕРАДИОАКТИВНЫХ РЕПОРТЕРНЫХ ГРУПП В СИНТЕТИЧЕСКИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И ИХ ДЕТЕКЦИЯ

*Институт биоорганической химии
им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

Ключевые слова: модифицированные олигонуклеотиды, нерадиоизотопные метки.

Рассмотрены методы функционализации олигонуклеотидов, введения в эти соединения нерадиоактивных меток различных типов и их анализа, а также некоторые аспекты использования меченых олигонуклеотидов.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение

1. Синтез олигонуклеотидов с реакционноспособными функциональными группами
 - 1.1. Алифатическая аминогруппа
 - 1.2. Тиольная группа
 - 1.3. Другие функциональные группы
 - 1.4. Реагенты для введения нескольких функциональных групп
2. Введение в олигонуклеотиды нерадиоактивных меток и их детекция
 - 2.1. Аффинные метки
 - 2.1.1. Биотин
 - 2.1.2. Другие аффинные метки
 - 2.2. Ферментные метки
 - 2.3. Флуоресцентные метки
 - 2.3.1. Пирен

Используемые сокращения и обозначения: AMPPD — 3-адамантил-4-метокси-4-(3-фосфо)фенил-1,2-диоксетан, AP — щелочная фосфатаза, BCP — 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат, Bio — биотинил, CPG — стекло с контролируемой пористостью, DAB — 3,3'-диаминобензидин, DBU — 1,8-диазобисцикло[5,4,0]ундецен-7, DMAP — 4-диметиламинопиридин, DMT — 4,4'-диметокситритил, Dns — дансил (5-диметиламинонафталин-1-сульфонил), DTT — дитиотреит, FITC — 5(4)-флуоресцеинизотиоцианат, Fmoc — (9-флуоренил)метоксикарбонил, HRP — пероксидаза хрена, MMT — 4-монометокситритил, MUBP — 4-метилумбеллиферонфосфат, NBD — 7-нитробензофуразан, NBT — нитротетразолиевый голубой, NPP — *n*-нитрофенилфосфат, PhITN — фталимидо, Prg — пиренил-1, P_x — пиксил, THF — тетрагидрофуран, THP — 2-тетрагидропиранил, TMRITC — тетраметилродамин-5(4)-изотиоцианат, оФВЭЖХ — обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография, НФБ — натрий-фосфатный буфер, ПААГ — полиакриламидный гель, ПЦР — полимеразная цепная реакция.

Адрес для переписки: 117871, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ИБХ РАН, Ю. А. Берлину.

- 2.3.2. Флуоресцеин и другие трифенилметановые красители
- 2.3.3. Металлокомплексы
- 2.3.4. Другие флуоресцентные метки
- 2.4. Фосфоресцентные метки (металлопорфирины)
- 2.5. Хемилюминесцентные метки
- 2.6. Спиновые метки
- 2.7. Инфракрасные метки
- 2.8. Сравнительная чувствительность нерадиоактивных меток
3. Детекция гибридизации ДНК в растворе

Введение

Впечатляющий прогресс в области синтеза дезоксирибо- и рибоолигонуклеотидов в 80-е годы [1] явился одним из важнейших факторов, обеспечивших выдающиеся достижения молекулярной биологии и медицинской диагностики последнего десятилетия. Используемый в настоящее время твердофазный химический олигонуклеотидный синтез представляет собой стандартный автоматизированный процесс. Однако во многих случаях, например при использовании олигонуклеотидов для секвенирования ДНК [2], изучения субстратной специфичности ферментов, в качестве ДНК-зондов [3—5], праймеров для ПЦР, антисмысловых ингибиторов экспрессии генов [6, 7], требуются их различным образом модифицированные производные. Модификации могут носить самый различный характер [8], но обычно необходимо, чтобы они не препятствовали гибридизации. Наибольшее распространение получило нерадиоактивное мечение, т. е. присоединение к олигонуклеотиду одной или нескольких так называемых репортерных групп, детектируемых затем тем или иным способом (используются флуоресцентные, хемилюминесцентные, ферментные, спиновые, аффинные метки). Быстро растущее число публикаций по синтезу и применению нерадиоактивно меченных олигонуклеотидов отражает усилия многих исследовательских групп в области увеличения чувствительности и снижения стоимости систем детекции, так как использование традиционных изотопных меток сопряжено с рядом проблем — от ограниченного срока хранения метки и необходимости радиационной защиты персонала до экологических и чисто психологических. И хотя по совокупности свойств (в первую очередь, по сочетанию высокой чувствительности и умеренной стоимости) превзойти радиоактивные метки пока не удается [3, 9], динамика развития неизотопных методов позволяет предположить, что нерадиоактивные метки займут в недалеком будущем доминирующее положение.

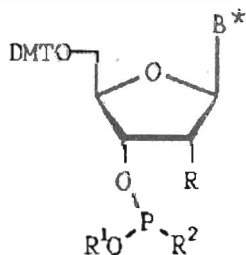
Одним из самых перспективных методов мечения является прямое введение метки в олигонуклеотид в процессе автоматического синтеза. В этом случае затраты на синтез реагента-модификатора окупаются простотой синтеза и выделения модифицированных олигомеров.

Химические методы искусственного синтеза фрагментов ДНК начали развиваться еще в 60-е годы. Ключевой стадией всех этих методов является межнуклеотидная конденсация, приводящая в конечном счете к образованию 3',5'-фосфодиэфирной (межнуклеотидной) связи с участием фосфатной группы одного из компонентов и гидроксильной группы другого. Для синтеза ДНК-олигомеров было предложено несколько подходов, различающихся характером используемых нуклеотидных блоков и фосфорсодержащей группы, образующейся непосредственно в результате конденсации. Вначале появились фосфодиэфирный и сменивший его в 70-е годы фосфотриэфирный методы, в которых конденсация защищенных фосфатного и гидроксильного компонентов, протекающая в присутствии различных реагентов, приводит соответственно к динуклеозидным фосфоди- и фосфотриэфирам. Применение этих методов наряду с совершенствованием разделения и очистки фрагментов ДНК и использованием ферментов для соединения фрагментов друг с другом позволило в конце 60-х и в 70-е годы синтезировать довольно длинные фрагменты ДНК (длиной до нескольких десятков

нуклеотидов), в том числе отвечающие небольшим генам. Позднее были предложены более эффективные фосфитный триэфирный и Н-фосфонатный методы, называемые так потому, что непосредственно в результате конденсации образуются соответственно динуклеозидные фосфиты и Н-фосфонаты. В этих методах для защиты экзоциклических аминогрупп нуклеиновых оснований и 5'-гидроксила используются в основном те же группы, что и в фосфоди- и фосфотриэфирном методах. Применение твердофазного носителя для растущей нуклеотидной цепи позволило резко упростить отделение продукта реакции от избытка реагентов и автоматизировать процесс, что привело к появлению в 80-е годы коммерческих автоматических ДНК-синтезаторов. Прогресс в области олигонуклеотидного синтеза поразителен: работа, требовавшая в начале 70-х годов нескольких человеко-лет усилий сотрудников ведущих лабораторий, в настоящее время может быть выполнена в одиночку (причем не обязательно химиком) в течение нескольких дней.

Фосфитный триэфирный (фосфамидитный) твердофазный (на СРG-подложке) метод олигонуклеотидного синтеза, разработанный в первой половине 80-х годов [10, 11], по общим выходам, скорости и качеству получаемой ДНК превосходит модифицированный фосфотриэфирный (см. [12] и цитированные там работы) и предложенный позже Н-фосфонатный [13, 14] методы [1]. Ключевой стадией в фосфитном методе является реакция фосфамидитов (1) или (2) в присутствии катализатора (тетразол или другие близкие ему по протондонорным свойствам соединения) с 5'-гидроксильной группой растущей нуклеотидной цепи, которая прикреплена к твердофазному носителю сложноэфирной связью через 3'-гидроксила 3'-концевого нуклеотидного звена.

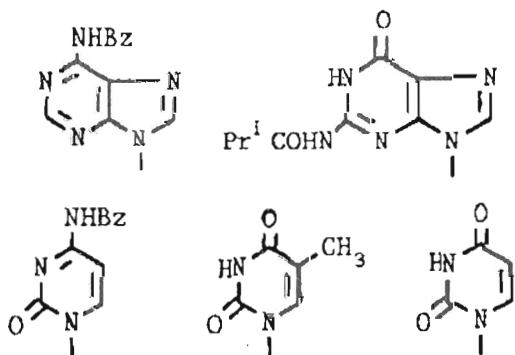
Рисунок



$R^1 = \text{Me}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$
 $R^2 = \text{N}(\text{Alk})_2$
 (обычно $\text{Alk} = \text{Pr}^1$)

- 1: $R = \text{H}$
 2: $R = \text{OSiBu}^t\text{Me}_2$

$B^* =$



(для 1) (для 2)

или защищенные другими методами гетероциклические основания, см., например, [15-17]

С применением фосфитного метода связаны значительные успехи и в синтезе олигорибонуклеотидов [18—21]. Для защиты 2'-гидроксила лучшие результаты дало применение различных триалкилсилильных групп (в первую очередь *трет*-бутилдиметилсилильной) в мономерных нуклеотидных блоках (2). Эти группы способны отщепляться в присутствии фторид-ионов.

Методы получения нерадиоактивно меченных олигонуклеотидов развивались вслед за методами олигонуклеотидного синтеза. Первыми появились так называемые не прямые, или ступенчатые, методы получения конъюгатов олигонуклеотид—метка. Обычно они включают в себя: а) олигонуклеотидный синтез, б) функционализацию олигонуклеотида, в) полное деблокирование, г) присоединение метки (стадии «в» и «г» в ряде подходов меняются местами), д) очистку и анализ. Под функционализацией, как правило, понимается введение в олигонуклеотид amino- или сульфгидрильных групп, высокая нуклеофильность которых позволяет селективно присоединять по ним метку, снабженную электрофильной функцией.

Прямые методы включают в себя мечение в процессе олигонуклеотидного синтеза с последующим деблокированием, очисткой и анализом. В данном обзоре рассматривается прямое мечение олигонуклеотидов, методы синтеза олигонуклеотидов с функциональными группами и присоединения по ним метки, а также свойства используемых меток и способы их детекции. Не рассмотрены методы статистического мечения несинтетических ДНК (например, плазмид) — как ступенчатые (например, переаминирование алифатическими α , ω -диаминами по остаткам dCyd с последующим присоединением метки), так и прямые (например, переаминирование биотинсодержащим моноацилгидразином или фотоактивационное присоединение арилизидных производных биотина). Не включены в обзор также ферментативные методы введения меток — например, с использованием различным образом функционализированных нуклеозид-5'-трифосфатов. Описание подобных реагентов для мечения нуклеиновых кислот и ссылки на их применение можно найти в каталогах различных фирм, например Clontech ([22], с. 123—130), Amersham, Pharmacia.

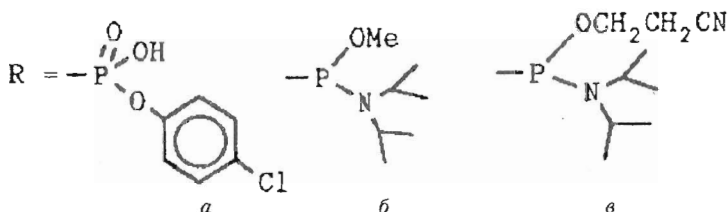
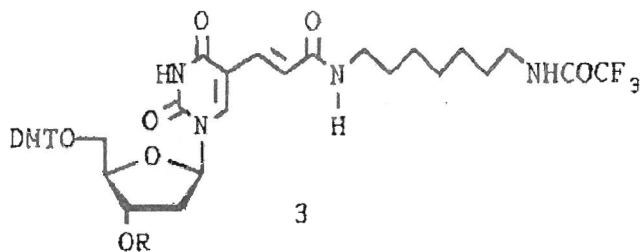
1. Синтез олигонуклеотидов с реакционноспособными функциональными группами

1.1. Алифатическая аминогруппа

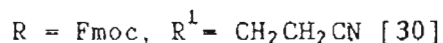
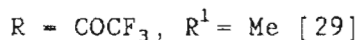
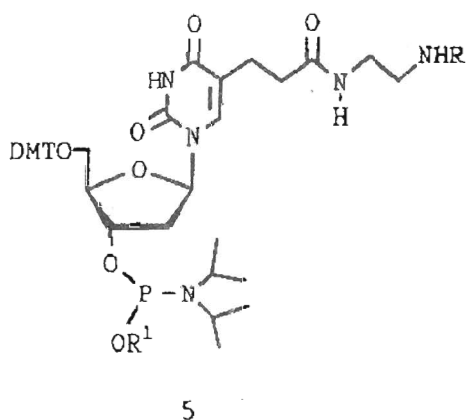
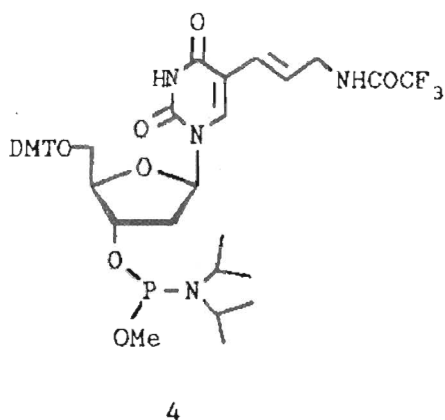
Высокая нуклеофильность алифатической аминогруппы позволяет далее присоединять по ней реакционноспособные производные меток, не затрагивая экзоциклических аминогрупп нуклеиновых оснований. Для этого обычно используются активированные эфиры (*n*-нитрофениловые, N-оксисукцинимидные и др.) или изотиоцианатные производные меток.

Существует множество методов введения аминоалкильного остатка — $(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ в заданные места олигонуклеотида. Можно получать олигонуклеотиды, модифицированные по основаниям, углеводному остатку или фосфатной группе.

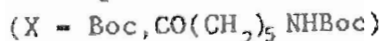
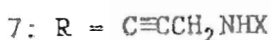
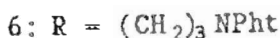
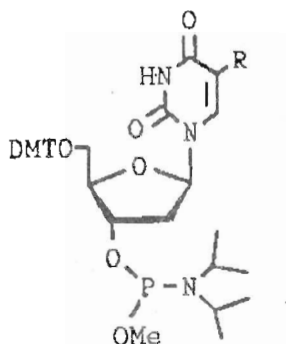
Метод введения алкильных заместителей по C5-положению уридина или дезоксиуридина путем взаимодействия 5-хлормеркуропроизводных 2'-дезоксиридина с алкенами в присутствии Li_2PdCl_4 [23] был применен в синтезе мономерных блоков (3) [24, 25] для фосфотриэфирного и фосфамидитного олигонуклеотидного синтеза. После обычного деблокирования синтетического олигонуклеотида (аммонолиз 25—29% водным NH_3 , 55° С, 6 ч) были получены олигонуклеотиды с одной или несколькими аминогруппами. Позднее синтез фосфамидита (3в), получение и модификация олигонуклеотидов с аминогруппами были описаны более детально [26, 27].



Конденсация 5-хлормеркуро-2'-дезоксинуридина с N-трифторацетилаллиламином использовалась для синтеза реагента (4) [28]. Двойная связь после реакции с алкеном может быть восстановлена каталитическим гидрированием для получения, например, блоков (5), также служащих для введения аминогрупп [29, 30].

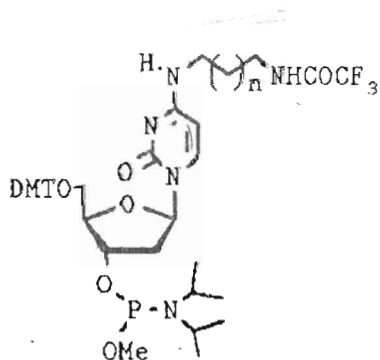


Функционализация уридина по C5 может быть также проведена взаимодействием соответствующих 5-йодпроизводных с алкинами. Так, реакцией 5-йод-2'-дезоксинуридина с N-пропаргилфталимидом в присутствии бис(трифенилфосфин)палладийдихлорида с последующим восстановлением тройной связи, 5'-диметокситриптированием и 3'-фосфитилированием был получен фосфамидит (6) [31]. Реакция в таких же условиях 3',5'-ди-O-ацилзащищенного 5-йод-2'-дезоксинуридина с N-Фос-пропаргиламином служила первой стадией в синтезе реагентов (7) [32]. Недостатком метода введения аминогруппы с помощью таких реагентов являются довольно жесткие условия снятия Фос-группы (обработка на носителе смесью $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}-\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, 9:1), хотя авторы работы [32] утверждают, что олигонуклеотид при этом не деградирует.

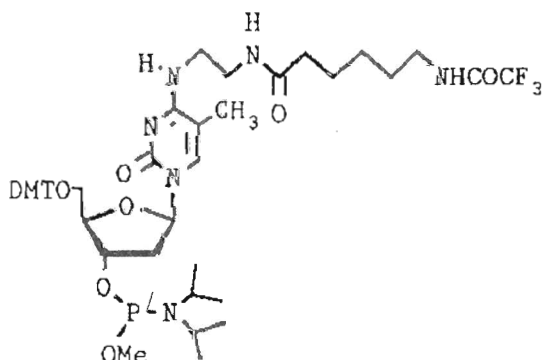


В случае 2'-дезокситидина алифатическая аминогруппа может быть введена путем замещения по 4-NH₂-группе. Например, переаминированием dCyd 1,3-диаминопропаном в присутствии HSO₃⁻ получают исходное вещество для синтеза модифицирующего реагента (8, n = 1) [29]. Гладко протекающее переаминирование 3',5'-дизамещенного N⁴-тозил-2'-дезокситидина [33] 1,6-диаминогексаном было использовано для синтеза реагента с более длинной ножкой (8, n = 4) [34].

Из 5'-O-DMT-защищенного тимидина через соответствующий 4-триазолилпиримидин-2-он получают производное 5-метил-2'-дезокситидина (9). Этот фосфамидит используется для введения большого числа аминогрупп в олигонуклеотиды; полученные зонды метят различными метками и используют в гибридизационном анализе [35, 37]. Для аминомодификации олигонуклеотидов по 3'-концу применяли носители, содержащие 5'-диметокситриптированные нуклеозиды с защищенной аминоалкильной группой, присоединенной к экзоциклической аминогруппе. Например, для этой цели использовали носители с 5'-диметокситриптил-N⁴-(2-Фмос-аминоэтил)дезокситидином [38] или аналогичным производным N⁶-(2-Фмос-аминоэтил)дезоксаденозина [39].

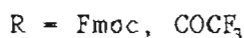
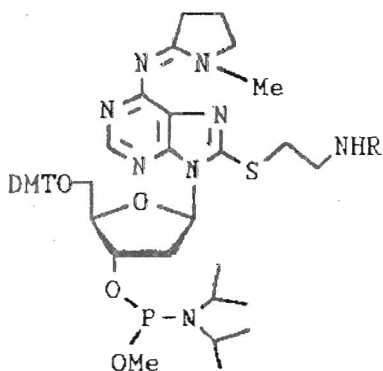


8

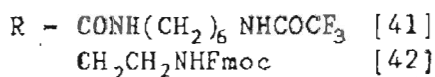
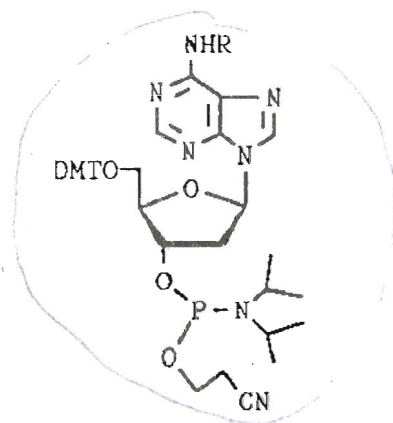


9

Бромирование дезоксиаденозина по С8 с последующим взаимодействием с N-защищенным цистеамином $\text{RNHCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ ведет к производным, которые после блокирования аминогруппы гетероциклического основания, 5'-диметокситриптилирования и 3'-фосфитилирования дают фосфамиды (10), пригодные для введения аминогрупп в олигонуклеотиды [40]. Описаны также N⁶-производные дезоксиаденозина (11), содержащие в заместителе защищенную аминогруппу [41, 42].

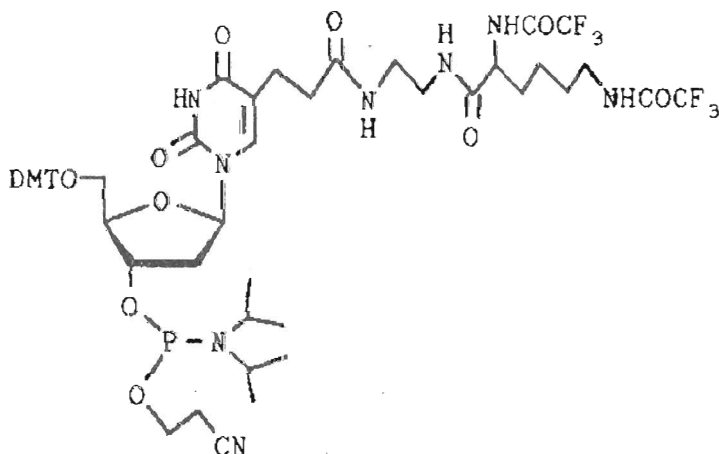


10



11

По гетероциклическому основанию в олигонуклеотид могут быть введены довольно сложные структурные единицы. Например, блок (12) служит для синтеза олигонуклеотид-пептидных конъюгатов [43].

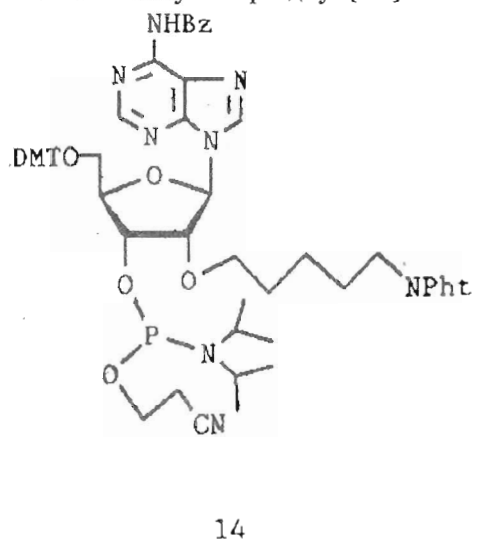
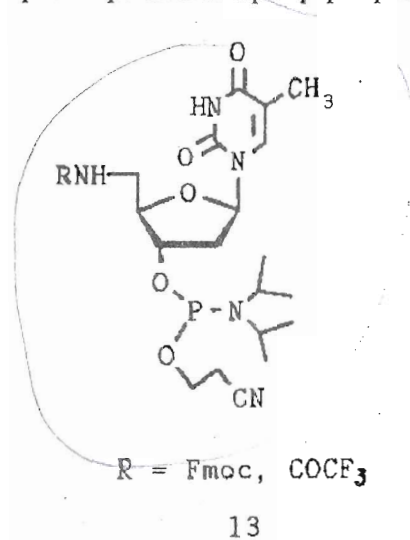


12

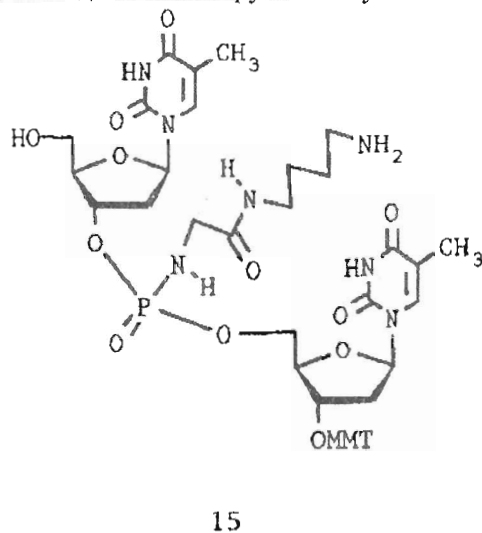
Введение аминогруппы по сахарному остатку было использовано для синтеза 5'-аминомодифицированных олигонуклеотидов с помощью соответствующих тимидиновых блоков (13), применяемых на последней стадии автоматического синтеза [44, 45]. Впоследствии на основе 2',5'-дидезокси-5'-аминонуклеозидов

были синтезированы все четыре фосфамидитных блока типа (13) [46]. Проблемы в ходе дальнейшей дериватизации, по-видимому, связаны с пространственной близостью 5'-аминогруппы и нуклеинового основания.

Аминоалкилирование аденозина по 2'-ОН-группе использовалось в синтезе реагента (14) для сайт-специфического введения аминогруппы и затем метки, ориентированной при формировании дуплекса в малую бороздку [47].

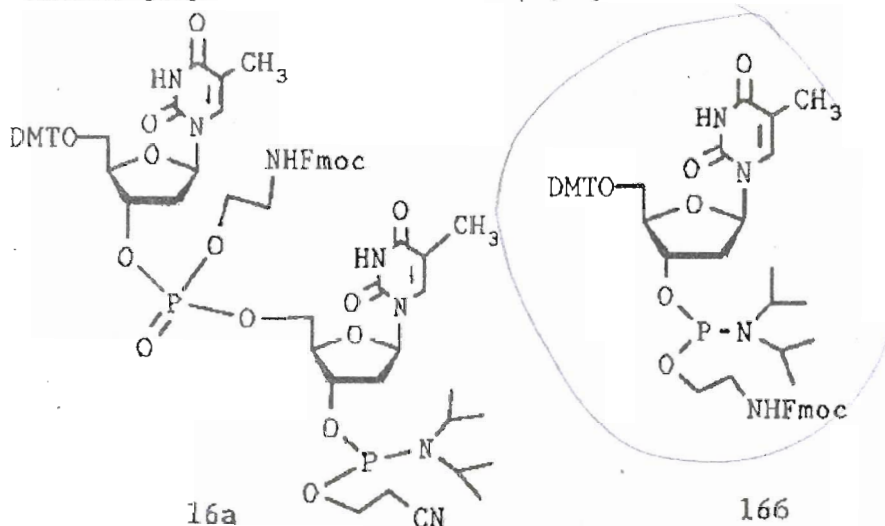


Существует ряд приемов модификации олигонуклеотидов аминоалкильным остатком также по межнуклеотидному и концевому фосфатам. Последний в составе 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов может быть активирован имидазолом в присутствии водорастворимого карбодиимида [48], хлорангидридом мезитиленкарбоновой кислоты в водном пиридине [49] или же 2,2'-дипиридилдисульфидом в присутствии Ph_3P и DMAP [50] с последующей обработкой алифатическими α, ω -диаминами. Введение аминогруппы по межнуклеотидному фосфату впервые было осуществлено реакцией динуклеозидфосфита с этиловым эфиром азидоуксусной кислоты и последующим аминолизом при действии 1,4-диаминобутана [51]; свободная аминогруппа полученного вещества (15) исполь-



зовалась для присоединения интеркалятора (производного фенантридина). Впоследствии для региоспецифического введения аминоалкильных остатков использовали Н-фосфонатную конденсацию с дальнейшей обработкой $H_2N(CH_2)_6NHCOF_3$ [52, 53] или $H_2N(CH_2)_9NH_2$ [54] в присутствии CCl_4 в условиях реакции Атертона — Тодда. Во втором случае свободную NH_2 -группу сразу же после реакции блокировали действием $Fmoc-Cl$.

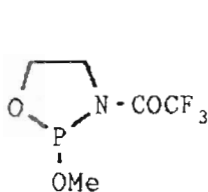
Для селективной функционализации олигонуклеотида по одному из межнуклеотидных фосфатов использовали фосфотриэфирный динуклеотидный блок (16а), снабженный 3'-концевой стандартной фосфитилирующей группировкой, а также аналог обычного фосфамидитного синтона (16б) [55].



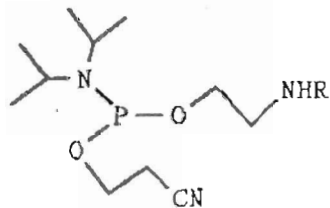
Специальный метод, включающий в себя комбинацию пептидного и олигонуклеотидного синтеза, позволяет получать олигонуклеотиды с большим числом аминогрупп по 3'-концу [56—61]. Вначале к гидроксильной группе носителя присоединяют через сложноэфирную связь остаток аланина. Затем проводят пептидный синтез с использованием в качестве синтетических блоков производных диаминокислоты ($C_6F_5OCOCH(NHFmoc)(CH_2)_4NH Boc$), а также моноаминокислот ($C_6F_5OCOCH(CH_3)NHFmoc$ и $C_6F_5OCO(CH_2)_5NHCO(CH_2)_5NHFmoc$). Первый из этих блоков позволяет ввести ω -аминоалкильные боковые цепи, а остальные два используются для разнесения этих цепей на нужное расстояние. После синтеза полиамидной цепи желаемой структуры в концевое положение вводится DMT-защищенная гидроксильная группа (например, с помощью *n*-нитрофенил-4-(4,4'-диметокситритилокси)бутирата), и далее проводится обычный олигонуклеотидный синтез. Деблокирование включает ранее предложенную авторами обработку смесью $CF_3CO_2H - HSCH_2CH_2SH$, 9 : 1 [32] для удаления Boc-групп, устойчивых в условиях Fmoc-пептидного и олигонуклеотидного синтеза. Однако в целом вся стратегия громоздка и не является оптимальной ни для модификации олигонуклеотидов алифатическими аминогруппами, ни для синтеза олигонуклеотид-пептидных конъюгатов.

Обработка заблокированного олигонуклеотида на носителе после завершения синтеза (5'-концевая DMT-группа удалена) карбонилдиимидазолом и последующая реакция с 1,6-гександиамином дает возможность получать защищенные олигонуклеотиды с 5'-концевой алифатической аминогруппой, присоединенной к C5'-атому нуклеозида через карбаматную группу. Последняя устойчива к концентрированному водному NH_3 в течение 5 ч при 55° С. Это дает возможность после обычного деблокирования получать 5'-аминоалкилолипомеры или проводить функционализацию олигомеров на носителе с последующим деблокированием [62].

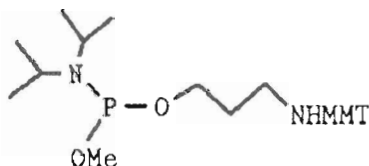
Наиболее просто введение аминогрупп в олигонуклеотиды достигается при помощи ненуклеотидных фосфамидитных (или Н-фосфонатных) реагентов типа (17) («Aminolink 1» фирмы Applied Biosystems) [63], (18a) [64], (18б) [65], (19) [66], (20) [67, 68], (20a) (R = COCF₃, R¹ = Me — «Aminolink 2» (Applied Biosystems)) [69]. Применение защит тритильного типа в блоках (19) и (20) позволяет после деблокирования выделять модифицированные олигомеры при помощи офВЭЖХ, а затем действием кислоты регенерировать аминофункцию. Общий недостаток реагентов (17—20) состоит в невозможности введения в олигонуклеотид более одной аминогруппы.



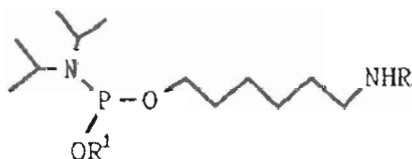
17

18a: R = COCF₃

18б: R = Fmoc



19



20a



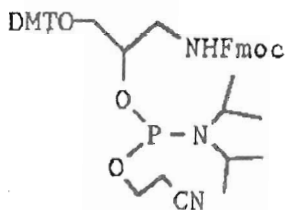
20б

R = DMT, MMT, Px, COCF₃

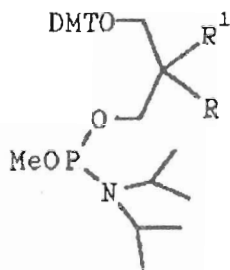
R¹ = Me, CH₂CH₂CN

Естественным развитием методов модификации явились разработка и синтез ненуклеотидных реагентов (21) [70], (22)—(26) [71], которые содержат группы, аналогичные нуклеозидным 3'- и 5'-гидроксилам, функционализированным как в нуклеотидных блоках. Реагент (21) был позже применен в синтезе олигонуклеотид-пептидных конъюгатов [72]. Фосфамидиты (21)—(26), а также аналогичный продукт фирмы Clontech (27) ([22], с. 117; [73]) могут использоваться для последовательного введения в олигонуклеотид нескольких аминогрупп. За один шаг конденсации вводится одна или, в лучшем случае, две аминогруппы (для реагента (22б)).

Для получения олигонуклеотидов, содержащих аминоалкильную группу по 3'-концевому фосфату, был предложен функционализированный носитель (28), в котором, как и в реагенте (21), в качестве основы используется

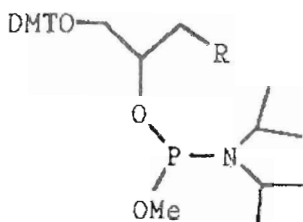


21



22a: R = H, R¹ = (CH₂)₃NHFmoc

226: R = R¹ = (CH₂)₃NHFmoc

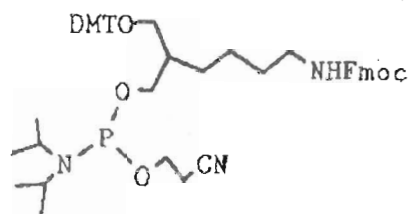


23: R = NHCOCF₃

24: R = (CH₂)₃NHFmoc

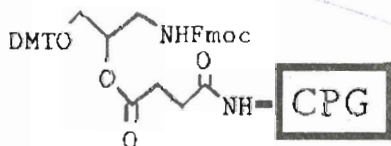
25: R = NHCO(CH₂)_nNHFmoc (n = 1, 3, 5)

26: R = NHCO(CH₂)₅NHCO(CH₂)₅NHFmoc

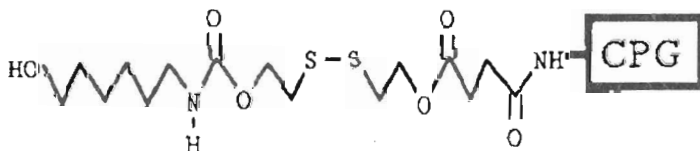


27

3-амино-1,2-пропандиол. На подложке (28) проводят олигонуклеотидный синтез и после аммонолиза сразу выделяют 3'-аминомодифицированный олигонуклеотид [74].

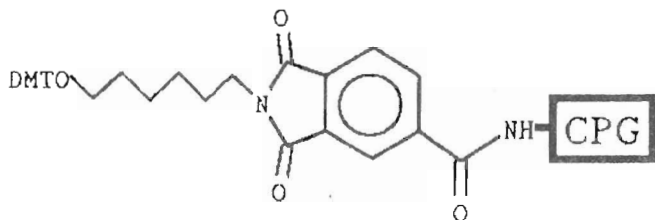


28

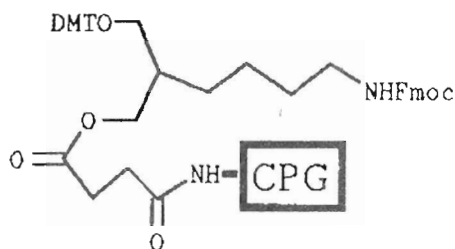


29

Позже были описаны носители (29) [75] и (30) [76], используемые для той же цели. Для гидролиза карбаматной группы в подложке (29) при деблокировании применяют 0,1 М раствор дитиотреита в концентрированном водном NH₃. Условия



30



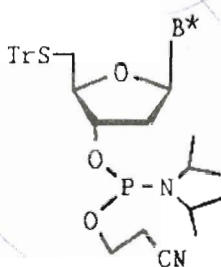
31

деблокирования олигонуклеотидов, синтезированных на носителе (30), не отличаются от обычных; фталоильная защита при этом полностью удаляется. CPG-носитель (28) и его аналог (31) ([22], с. 117; [73]) в настоящее время имеются в продаже (фирма Clontech).

1.2. Тиольная группа

Алифатические сульфгидрильные группы удобны для модификации нуклеотидов, поскольку они способны с высокой селективностью взаимодействовать с α -галогенацетильными (α -галогенацетамидными) производными различных репортерных групп, а также ковалентно связываться с тиолсодержащими носителями, активированными 2,2'-дипиридилдисульфидом.

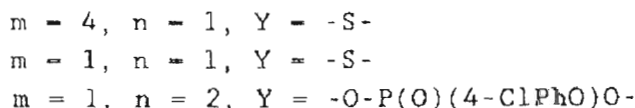
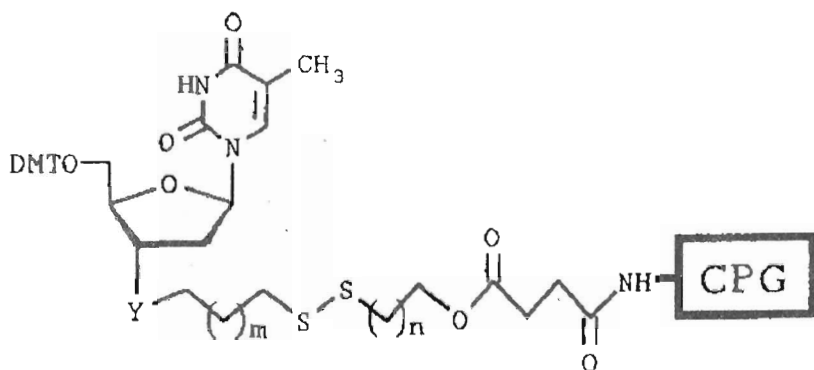
Для защиты SH-функции применяется в основном тритильная группа, удаляемая обработкой AgNO_3/DTT . Синтезирован набор из четырех нуклеотидных блоков (32) для получения 5'-тиолмодифицированных олигонуклеотидов [77]. Носители (33) были использованы для синтеза олигонуклеотидов с 3'-концевой SH-группой [78].



32

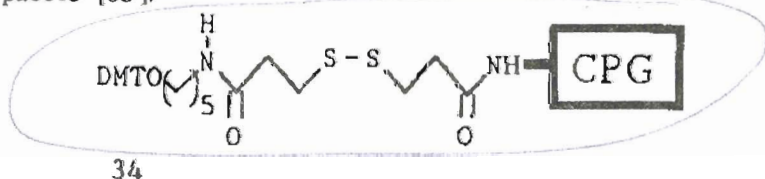
B^* - защищенные гетероциклические основания как и в (1), лишь для аденина вместо бензоильной применена N^6 -пивалоильная защита

Позднее были разработаны носители (34) [79] и (35) [80, 81]. После аммонолиза получают олигонуклеотиды с дисульфидной группой по 3'-концу, которая затем может быть восстановлена дитиотреитом. Если дитиотреит добавлять прямо в деблокирующий раствор NH_3 , можно сразу выделять 3'-тиолированные оли-

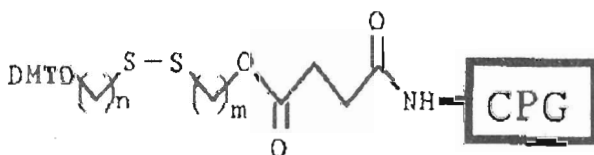


33

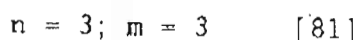
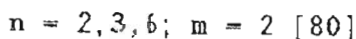
гонуклеотиды. Однако носитель (35, $n = 2$) в таких условиях деблокирования дает лишь 3'-фосфат. Это вызвано, по-видимому, тем, что стерические факторы благоприятствуют внутримолекулярной реакции нуклеофильного замещения алкилфосфатной группы высоконуклеофильной алкилтиолятной группой с образованием тирана и моноалкилфосфата [82]. Носитель, аналогичный (35) и содержащий вместо каждой из групп $(CH_2)_n$ и $(CH_2)_m$ линкер $(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2$, описан в работе [83].



34



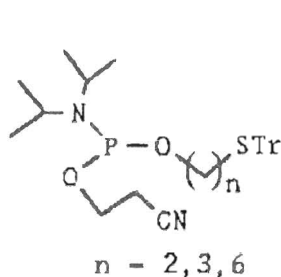
35



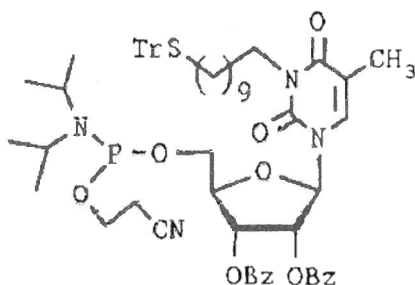
Для синтеза олигонуклеотидов с 5'-тиоалкильной группой разработаны ненуклеотидные реагенты (36) [68, 84, 85]; в настоящее время они коммерчески доступны (Millipore, Clontech и др.).

Следует отметить интересное применение фосфамидитного реагента (37) [86] для синтеза и очистки 5'-фосфорилированных олигодезокси-нуклеотидов. После заключительной конденсации с реагентом (37), аммонолиза и обработки $AgNO_3$ получают олигонуклеотид, содержащий SH-группу. Затем реакционную смесь, полученную в результате деблокирования, пропускают через колонку с тиолсодержащим носителем, предварительно активированным дипиридилдисульфидом,

при этом с носителем связывается только тиолсодержащий олигонуклеотид. Обработка периодатом ведет к расщеплению гликольной группировки рибозного остатка и β -элиминированию 5'-фосфорилированного олигонуклеотида.



36



37

Алифатическую тиольную группу можно также вводить в защищенный олигонуклеотид на твердой фазе сразу после завершения синтеза и удаления 5'-DMT-группы. В одном методе для этого используется S-третилцистеин, которым обрабатывают 5'-активированный карбонилдиимидазолом олигонуклеотид с образованием соответствующего карбамата. После аммонолиза и электрофоретической очистки третильную группу удаляют обработкой AgNO_3/DTT , получая тиолированный олигонуклеотид [87].

В другом методе после реакции олигонуклеотида с карбонилдиимидазолом и алифатическим α, ω -диамином для введения аминогруппы [62] проводят дополнительную обработку оксисукцинимидным эфиром S-ацетилтиогликолевой кислоты. Затем действием гидроксилamina удаляют S-защиту и получают олигонуклеотид, модифицированный алифатической сульфгидрильной группой [88]. Следует отметить, что последний метод не требует дитиотреита для генерации сульфгидрильной функции, поэтому сразу можно проводить обработку тиолспецифичным модифицирующим реагентом.

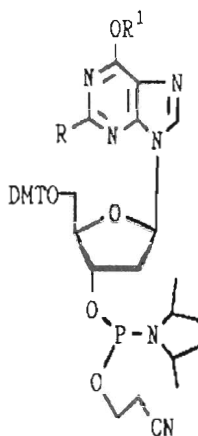
В более раннем методе [89] используют обработку выделенного 5'-аминомодифицированного олигонуклеотида N-ацетилгомоцистеинтиолактоном при pH 8,0, который ацилирует NH_2 -группу олигонуклеотида с освобождением алифатической SH-функции. Реакцию проводят без доступа воздуха, чтобы избежать окисления сульфгидрильных групп.

Олигонуклеотиды с SH-группой на 3'-конце могут быть получены из олигонуклеотидов с 3'- NH_2 -группой последовательной обработкой оксисукцинимидным эфиром дитио-бис-пропионовой кислоты и дитиотреитом [38].

При помощи фосфамидита (38a) в олигонуклеотиды встраивают остаток O⁶-фенилдезоксигуанидина, который в составе олигонуклеотида легко подвергается аминолизу алифатическими аминами с образованием N⁶-алкилпроизводного дезоксиаденозина. Для аминолиза используются амины типа $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{SS}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ ($n = 2, 3$), что позволяет получать олигонуклеотиды как с амино-, так и (после обработки дитиотреитом) с сульфгидрильной группой [90]. Необходимо упомянуть и реагент (38б) для введения в состав олигонуклеотидов O⁶-пентафторфенилдезоксигуанидина, который при аминолизе дает производные N⁶-алкил-2,6-диамино-9-(2-дезоксис- β -D-эритро-пентофуранозил)пурина [91].

Следует отметить, что алифатическая тиольная функция удобна не только для присоединения меток, но и для мягкой конъюгации олигонуклеотидов с белками [92].

В литературе отсутствуют сведения о введении нескольких алифатических



38a: R - H, R¹ - Ph [90]

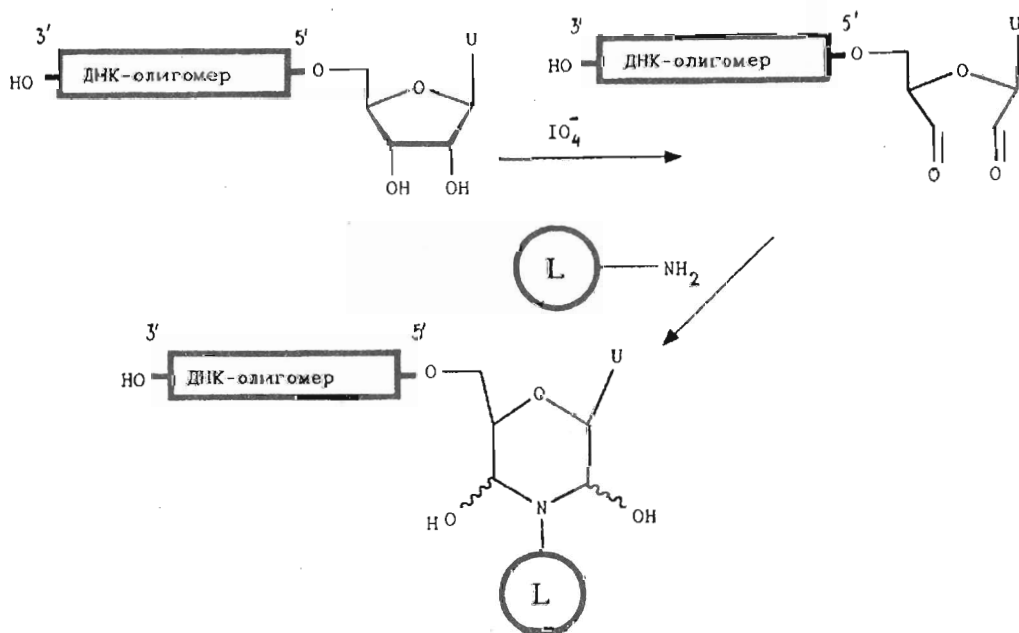
38b: R - NHCOCF₃, R¹ - C₆F₅ [91]

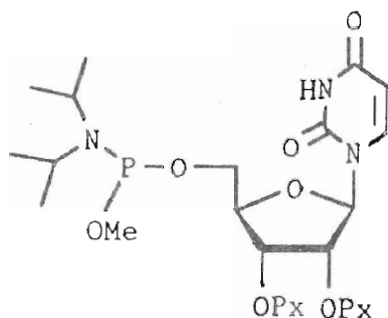
тиольных групп в олигонуклеотид. Однако в последние годы быстро развиваются методы синтеза фосфотиоатных и фосфодитиоатных аналогов ДНК [1, 93, 94], в том числе стереоспецифические методы для монотиоатов [95, 96]. Высокая нуклеофильность фосфотиоатов и фосфодитиоатов позволяет модифицировать их производными различных меток подобно тиольным группам [53, 96—99].

1.3. Другие функциональные группы

Выше рассмотрены способы получения олигонуклеотидов с нуклеофильными функциональными группами. Электрофильные группы для присоединения меток используются редко. В качестве примера можно упомянуть уридиновый мономер

Схема 1

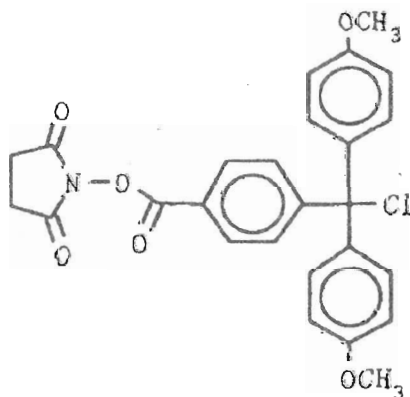




39

(39), применяемый для введения по 5'-концу ДНК-олигомера рибонуклеотидного блока. После деблокирования остаток рибозы может быть окислен периодатом до диальдегида, который при обработке меткой, содержащей аминогруппу, образует производное 1,4-оксазина (схема 1) [65].

В защищенный олигонуклеотид можно ввести активированную карбоксильную группу. Так, сотрудниками фирмы Millipore получен аналог DMT-хлорида (40), содержащий активированный карбоксил; после завершения олигонуклеотидного синтеза этот реагент применялся для 5'-трителирования олигонуклеотида на носителе с последующей обработкой продукта реакции α,ω -алкандиаминном и деблокированием [100]. Ясно, что модифицированный таким образом олигонуклеотид можно обрабатывать не только диаминном, но и производными меток, содержащими алифатические аминогруппы. В этом случае необходимо, чтобы метка выдерживала обычные условия аммонолиза в ходе заключительного деблокирования.

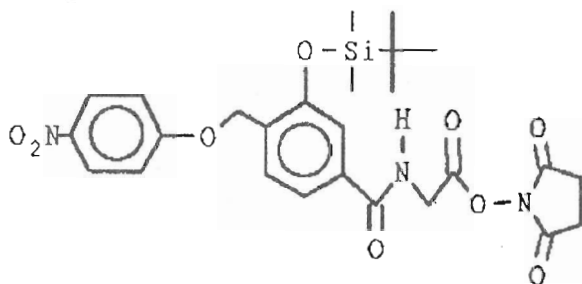


40

Олигонуклеотиды с электрофильными группами неустойчивы и используются лишь в специальных случаях. Как правило, электрофильные группы в таких соединениях могут быть получены из нуклеофильных. Так, олигонуклеотиды, несущие изотиоцианатную группу, были получены реакцией аминомодифицированного олигомера с бифункциональным изотиоцианатом (см. раздел 2.2 и схему 6), а реакция содержащего аминогруппу олигонуклеотида с бис-оксисукцинимидилсубератом привела к олигонуклеотиду с активированной карбоксильной группой (схема 7). Оба этих производных были получены лишь в качестве промежуточных продуктов и сразу же использованы в дальнейших реакциях.

Чаще всего электрофильные группы используются для сайт-специфического

алкилирования ДНК. Например, реакцией аминомодифицированного олигопиримидинового нуклеотида с оксисукцинимидным эфиром бромуксусной кислоты получают олигонуклеотид с бромацетамидной группой, связывающийся с полипуриновым участком дуплексной ДНК с образованием тройной спирали, причем бромацетамидная группа алкилирует ближайший дезоксигуанозиновый остаток полипуриновой цепи [30].



41

Среди публикаций по сайт-специфическому алкилированию, быть может, наиболее эффективна работа [101]. В этой работе для модификации олигонуклеотида с аминогруппой используется реагент (41), содержащий в латентной форме реакционноспособный монометид *o*-хинона, образующийся в результате десилилирования в присутствии неорганических солей. Олигонуклеотид с присоединенным модификатором (41) стабилен, и реакционноспособная группа может быть генерирована лишь после гибридизации с комплементарной последовательностью при добавлении раствора KF или $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_4\text{O}_7$. В результате протекает быстрая реакция сайт-специфического алкилирования ДНК-мишени.

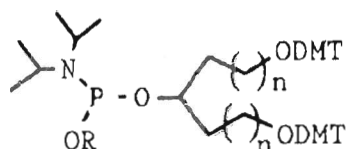
1.4. Реагенты для введения нескольких функциональных групп

Чувствительность детекции в ряде случаев может быть повышена путем увеличения числа вводимых репортерных групп. Выше были рассмотрены методы присоединения множественных меток к олигонуклеотиду по 3'-концу с помощью полиамидного реагента с большим числом аминогрупп [57—60] или по 5'-концу с использованием ненуклеотидных реагентов типа (21)—(26) [70, 71, 73]. В этих методах количество вводимой в олигонуклеотид метки прямо пропорционально числу раундов модификации. Однако в принципе возможны более эффективные подходы, приводящие к возрастанию числа функциональных групп в геометрической прогрессии в зависимости от числа циклов модификации. Например, возможность осуществить подобный процесс дает использование производного лизина (42). Защищенный олигонуклеотид на носителе функционализируют известным способом — последовательной обработкой карбонилдиимидазолом и алифатическим α,ω -диамином [62]. Конденсация с активированным эфиром (42) по NH_2 -группе в условиях пептидного синтеза и удаление Fmoc-защит (0,1 M DBU в MeCN) приводят к олигонуклеотиду с двумя аминогруппами; повторение цикла позволяет ввести уже четыре аминогруппы [102]. Недостаток метода связан с трудностью его автоматизации из-за необходимости перепрограммирования синтезатора (операции модификации в этой работе проводились вручную).

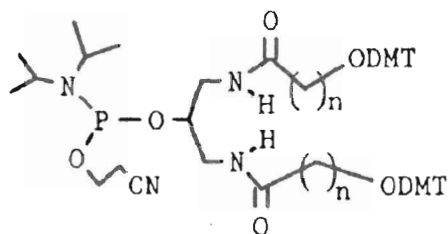
В настоящее время описаны реагенты для «размножения» реакционноспособных гидроксильных функций 5'-концевой области олигонуклеотида. Реагенты типа (43) [103—105], (44) [106, 107], (45) [108], (46) [104] могут использоваться в обычных автоматических синтезаторах и теоретически позволяют ввести в олигонуклеотид 2^n гидроксильных групп за *n* синтетических циклов. В дальнейшем



42

R = Me, CH₂CH₂CN, n = 0, 2, 5

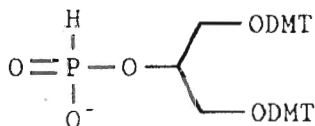
43



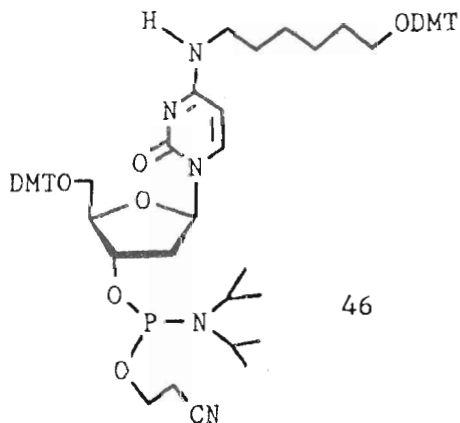
n = 3, 11

44

по гидроксилам тем или иным способом может быть введена метка. Недостаток реагента (46) состоит в том, что модифицированный остаток dCyd может влиять на гибридизационные свойства получаемых зондов. С этой точки зрения нуклеотидные реагенты (43—45) более предпочтительны. Использование реагента (43) ($n = 0$, R = CH₂CH₂CN) не приводит к ожидаемому возрастанию числа гидроксильных групп [103] — предположительно из-за образования циклического фосфата с отщеплением цианэтильной группы. Подобный реагент (R = Me) был успешно применен для синтеза олигонуклеотидов с разветвленной структурой [105]. Отмечается, что увеличение n в реагенте (43) ведет к повышению липофильности образующихся зондов и к возрастанию их неспецифической сорбции на поверхности полимера (например, полистирола) [103]. Реагенты (44), по-видимому, более перспективны, чем (43), благодаря простоте синтеза, легкой возможности регулирования длины спейсеров (n) и большей гидрофильности получаемых конъюгатов [106, 107].



45



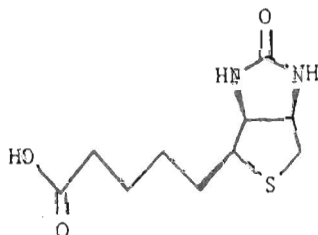
46

2. Введение в олигонуклеотиды нерадиоактивных меток и их детекция

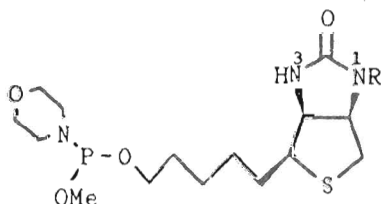
2.1. Аффинные метки

2.1.1. Биотин

Биотин, или витамин Н (47), природный кофактор группы ферментов (карбоксилаз), представляет собой наиболее часто используемую метку непрямой детекции. Он обладает уникально высоким сродством к белку авидину, содержащемуся в яичном белке (константа диссоциации комплекса 10^{-15} М). Связывание с авидином протекает по гетероциклической части молекулы биотина. Наличие карбоксильной группы, практически не участвующей во взаимодействии с авидином, позволяет легко присоединять биотин к различным молекулам, в частности к олигонуклеотидам. Авидин (как и его бактериальный аналог стрептавидин) состоит из четырех идентичных субъединиц и может присоединить четыре остатка биотина или его производных. Несколько меньшее сродство стрептавидина к биотину (константа диссоциации 10^{-14} М) компенсируется меньшим, чем у авидина, уровнем неспецифического связывания с олиго- и полинуклеотидами [5]. На основе использования (стрепт)авидин-биотиновых взаимодействий разработано множество методов биохимического анализа [109].

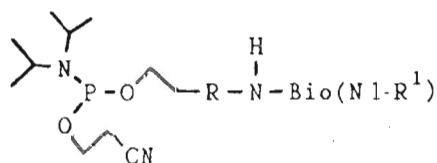


47: (Bio-OH)



R = DMT, THP, 6-(MeO)THP

48

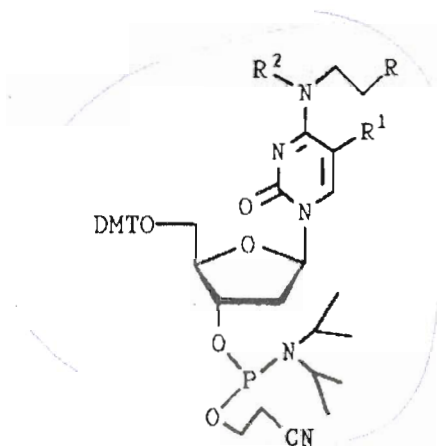


49: R = *p*-C₆H₄-, R¹ = H

50: R = (CH₂)₄, R¹ = DMT

Проще всего получать биотинмеченые олигонуклеотиды с помощью специальных фосфамидитных реагентов в автоматических синтезаторах. Для синтеза 5'-монобиотинилированных олигонуклеотидов предложены нуклеотидные реагенты (48) [110], (49) [111, 112], (50) [113], которые применяются на последней стадии конденсации. Использование DMT-защиты 1-NH-функции биотина позволяет определять выход реакции модификации и улучшает растворимость реагентов в ацетонитриле, стандартном растворителе для межнуклеотидных конденсаций (реагент (49) нерастворим в ацетонитриле).

Реагенты на нуклеотидной основе (51) [114, 115] и (52) [116] позволяют последовательно вводить несколько биотиновых остатков, однако синтез этих реагентов довольно громоздок. Кроме того, замещение цитозиновой аминогруппы снижает способность оснований к комплементарным взаимодействиям.

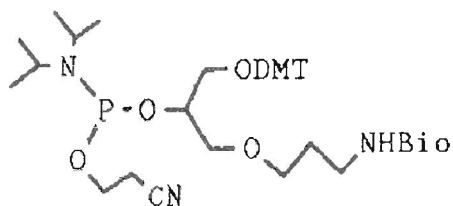


51: $R = (CH_2)_4NH-Bio$, $R^1 = H$ или Me , $R^2 = H$

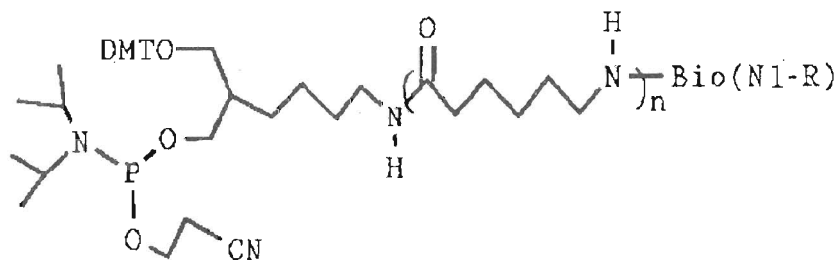
52: $R = OCH_2CH_2OCH_2CH_2N(CH_3)Bio(N1-COC_6H_4Bu^t-p)$,

$R^1 = H$, $R^2 = CH_3$

Довольно простые нуклеотидные реагенты (53) [117, 118] и (54) [73] разработаны специалистами фирм Amersham и Clontech и имеются в продаже. Реагенты (54) оптимальны при встраивании биотина внутрь олигонуклеотидной цепи, так как их трехуглеродный скелет моделирует взаимное расположение 5'-С- и 3'-С-атомов в нативных нуклеотидах, благодаря чему искажения дуплекса оказываются минимальными. Кроме того, следует упомянуть еще один биотинсодержащий фосфамидит (55), продукт фирм Peninsula Laboratories и Pharmacia, а также сходный по структуре и, по-видимому, наиболее экономичный реагент (56) [119].

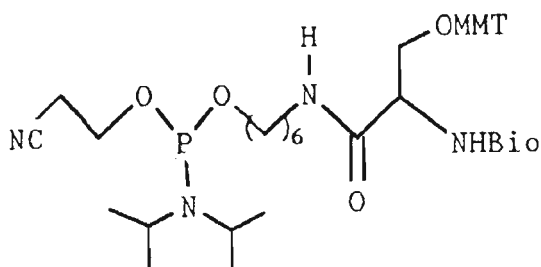


53

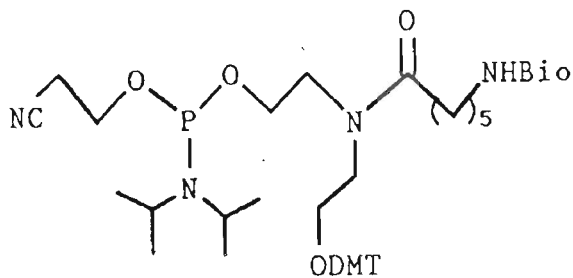


$n = 0, 1, R = \text{COC}_6\text{H}_4\text{Bu}^t - n$

54

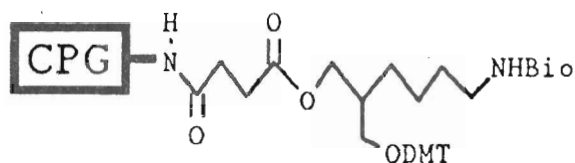


55

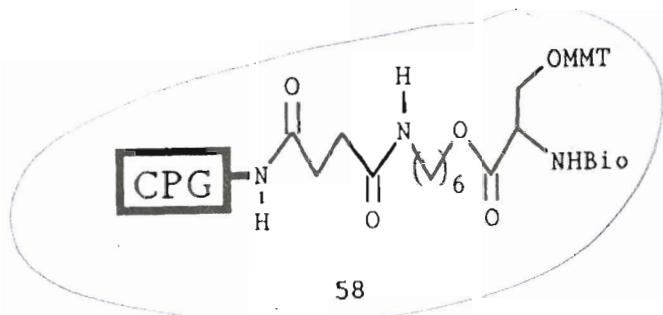


56

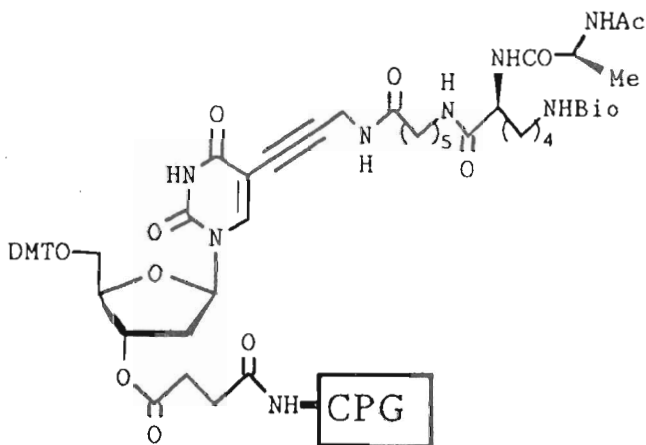
Для синтеза 3'-биотинилированных олигонуклеотидов сконструированы биотинсодержащие CPG-носители (57) (Clontech) и (58) (Peninsula Laboratories), имеющиеся в продаже, а также носитель (59) [61].



57



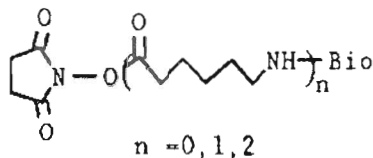
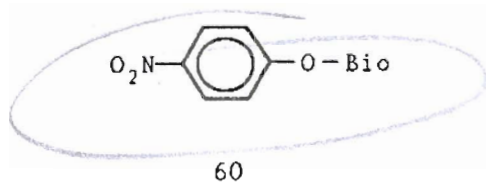
58



59

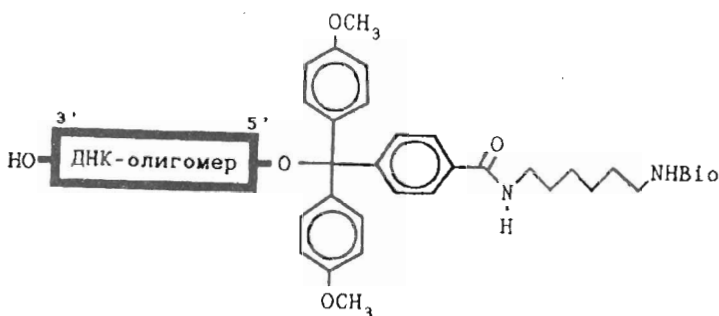
Однако на практике для синтеза биотинилированных олигонуклеотидов часто применяется разработанный ранее метод: синтез олигонуклеотида с аминогруппами и затем обработка активированным эфиром биотина — *n*-нитрофениловым (Bio-ONp) (60) или *N*-оксисукцинимидным эфиром (Bio-ONSu) (61, $n = 0$). Используются также производные биотина с удлиняющей ножкой (61, $n = 1, 2$). Методики модификации аминролигомеров активированными эфирами биотина можно найти в ряде работ [28, 29, 36, 39, 47, 48, 62, 64–66, 70, 74]; кроме того, они подробно изложены в разделах сборника, посвященного синтезу модифицированных олигонуклеотидов [27, 68].

Для обратимого присоединения биотина олигонуклеотид на носителе после завершения синтеза тритилировали аналогом DMT-хлорида (40) (см. раздел 1.3) с последующей обработкой α, ω -алкандиамином и деблокированием. Полученный таким образом олигомер с алифатической аминогруппой был выделен с помощью оФВЭЖХ [100]. Последующая реакция с оксисукцинимидным эфиром биотина приводит к конъюгату (62), который может использоваться, например, в качестве



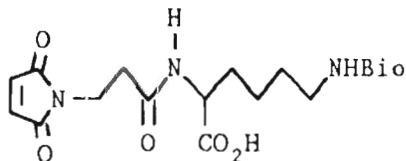
61

зонда [120]. Действием кислоты на конъюгат (62) или продукт его полимеразной достройки (например, после ПЦР) может быть регенерирована немодифицированная ДНК.

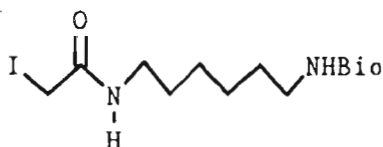


62

Тиолсодержащие олигонуклеотиды для модификации производными биотина практически не использовались. Сообщалось лишь о дериватизации некоторых тиололигомеров с помощью N^α -производного ϵ -биотиниллизина (биоцетина) (63) [67] и N^1 -иодацетил- N^6 -биотинил-1,6-диаминогексана (64) [77, 94], однако без экспериментальных подробностей.



63



64

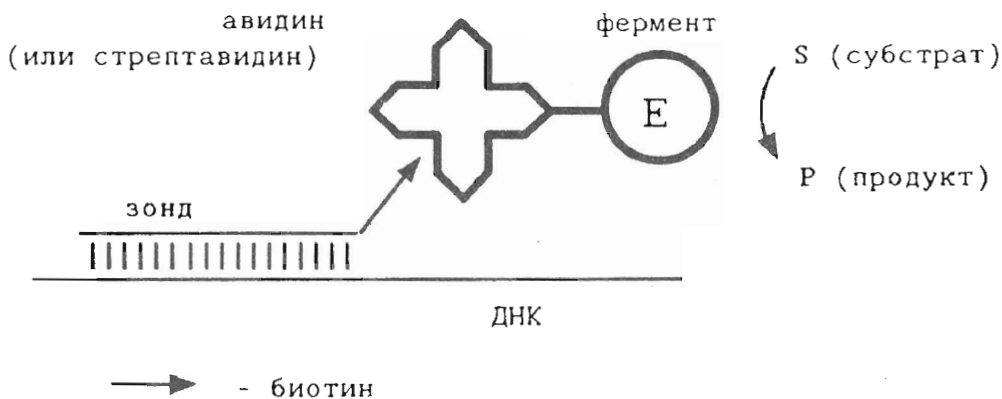


Рис. 1. Детекция гибридизации биотинмеченого зонда с помощью ковалентного конъюгата (стрепт)авидина с ферментом

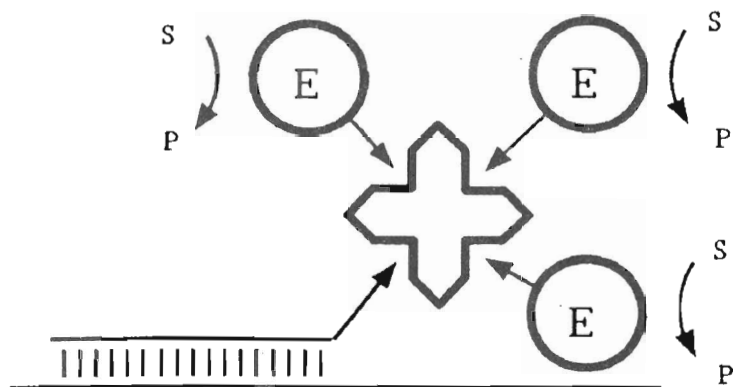


Рис. 2. Детекция гибридизации биотинмеченого зонда с помощью (стрепт)авидина и биотинмеченого фермента (обозначения такие же, как и на рис. 1)

Для присоединения биотина (в виде биотингидразида) использовали также упоминавшийся выше (схема 1) довольно громоздкий метод, в основе которого лежит периодатное окисление 3'-концевого рибозного звена и превращение образующегося диальдегида в циклический альдимин [65].

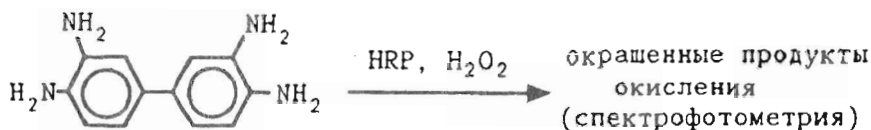
Детекция биотиновой метки осуществляется в несколько стадий. Обычно используются конъюгаты (стрепт)авидина с бактериальной щелочной фосфатазой или пероксидазой хрена. После обработки пробы конъюгатом и отмывки его избытка фермент детектируют с помощью хромогенного субстрата (рис. 1).

Возможен и другой способ детекции — с использованием биотинилированного фермента (рис. 2). В этом случае число стадий детекции возрастает на одну (обработка (стрепт)авидином и затем биотинилированным ферментом), однако не применяется дорогой (стрепт)авидин-ферментный конъюгат.

В качестве субстрата для пероксидазы хрена обычно используют *o*-фенилендиамин или диаминобензидин (DAB) (65) в присутствии перекиси водорода (схема 2) и продукты окисления определяют колориметрически. Что же касается щелочной фосфатазы, то в этом случае в зависимости от субстрата может использоваться колориметрическая, флуоресцентная и хемилюминесцентная детекция. Так, хромогенный субстрат 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (66) после ферментативного дефосфорилирования дает соответствующий индоксил (67), который, в свою очередь, в присутствии кислорода воздуха окисляется с образованием сильноокрашенного тетрагалогениндиго (68), определяемого спектрофотометри-

чески (схема 3). Реакцию проводят в присутствии красителя нитротетразолиевого голубого (производное бис-триарилтетразола), который претерпевает сопряженное с окислением индоксила восстановление в окрашенный продукт формазановой природы.

Схема 2



65

Схема 3

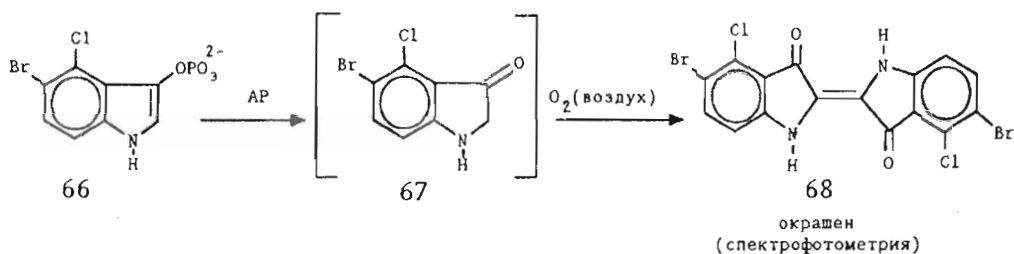
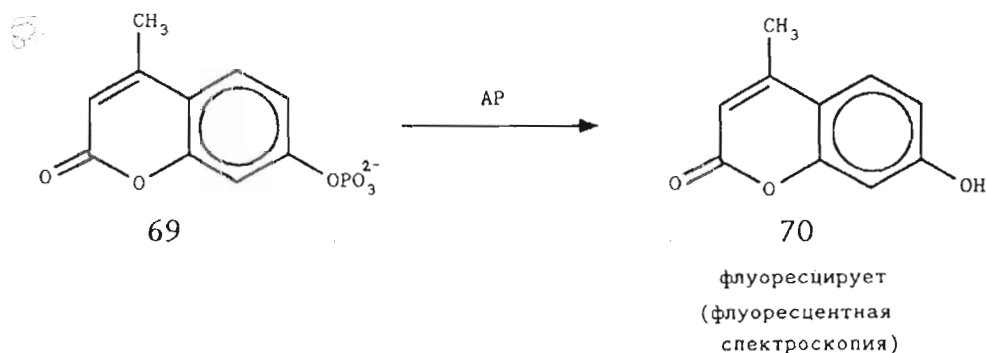


Схема 4

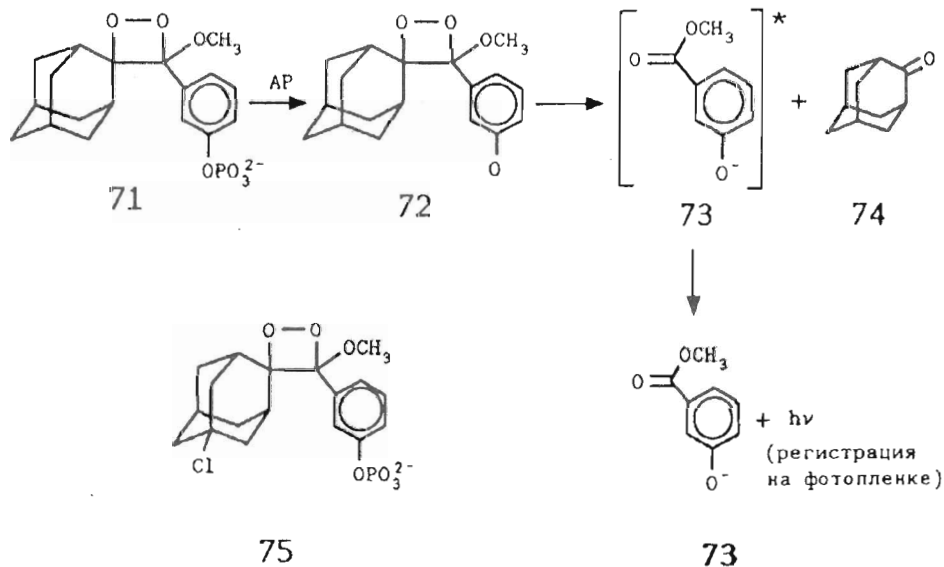


В качестве флуорогенного субстрата фосфатазы используется также 4-метилумбеллиферонфосфат (69), при гидролизе образующий 4-метилумбеллиферон (70) (схема 4).

Однако самым эффективным способом детекции щелочной фосфатазы является хемилюминесцентный (схема 5), в котором субстратом служит 3-адамантил-4-метокси-4-(3-фосфо)фенил-1,2-диоксетан (AMPPD) (71). 1,2-Диоксетаны термически неустойчивы и подвержены самопроизвольному распаду до карбонильных соединений [121, 122], причем избыток энергии выделяется в виде света, преимущественно в ближней УФ- и видимой области. В 1987 г. было впервые описано «включение» хемилюминесценции ферментом с использованием различия в устойчивости диоксетанов [123]. Впоследствии были синтезированы субстраты различных ферментов, в том числе субстрат щелочной фосфатазы (71). Этот

диоксетан, продукт фирм Tropic и Lumigen, вполне устойчив в нормальных условиях (время полужизни при 25° С составляет 19 лет [122]). Гидролиз фосфата в водных растворах протекает очень медленно и практически не наблюдается при хранении в карбонатном буфере (рН 12; 4° С). В присутствии же щелочной фосфатазы генерируется продукт гидролиза (72), который, будучи чрезвычайно нестабильным (время полужизни несколько секунд), распадается до адамантанона (74) и возбужденного 3-метоксикарбонилфенолята (73). Релаксация последнего сопровождается излучением света, регистрируемого, например, на фотопленке. Общее количество излучаемого света пропорционально концентрации диоксетанового субстрата, а интенсивность — количеству фермента [122].

Схема 5



Хемилюминесценция 1,2-диоксетанов эффективно используется для Сазерн-блоттинга и секвенирования ДНК методами Максама — Гилберта и Сенгера [124—127], в том числе для мультиплексного секвенирования (несколько образцов ДНК на одной дорожке) [120, 128]. Описан также улучшенный субстрат — хлорпроизводное АМРРД (75) (фирма Tropic), которое обладает меньшим временем достижения максимума излучения и позволяет получать лучшее разрешение полос на секвенирующем геле [129].

Детекция биотина может осуществляться также с помощью антител [118]. В этом случае мышиные моноклональные антитела к биотину используются вместо (стрепт)авидина в методах, принцип которых схематически изображен на рис. 1, 2 и 3а (гаптен — биотин). Важно отметить, что применение антител позволяет регистрировать возрастание детектируемого сигнала от зонда, содержащего несколько молекул метки. Например, предел обнаружения ДНК фага М13, иммобилизованной на нитроцеллюлозной мембране, при гибридизации с монобиотинилированным зондом (17-мер) составил 1 нг, а в случае того же зонда, содержащего 8 остатков биотина, — 0,1 нг [118].

2.1.2. Другие аффинные метки

В принципе в олигонуклеотиды могут быть введены самые разнообразные гаптены с последующей детекцией при помощи специфических антител. Например, фосфамидит (76) был использован для автоматического синтеза оли-

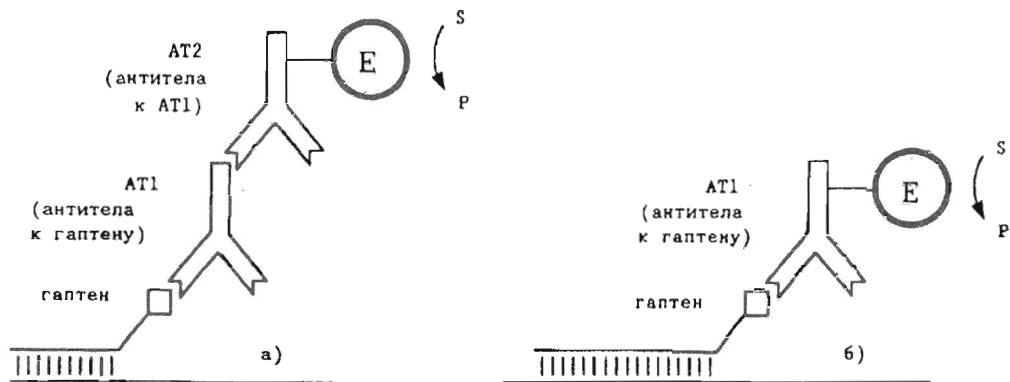
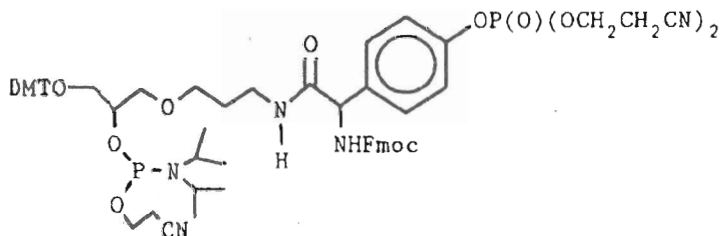


Рис. 3. Детекция гибридизации меченого зонда с помощью антител (обозначения такие же, как и на рис. 1)

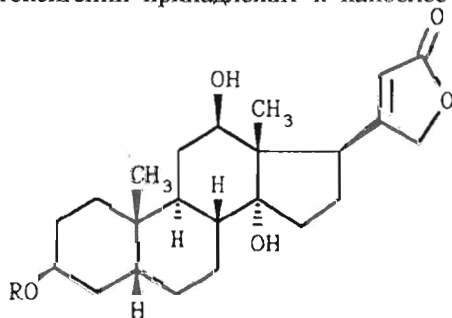
гонуклеотидов с несколькими остатками фосфотиозина с целью применения в качестве зондов (детекция, как показано на рис. 3а; гаптен — фосфотиозин) [118].



76

Фосфамидит, аналогичный веществу (51) и содержащий вместо биотинового остатка 2,4-динитрофенильную группу, использовался для синтеза олигонуклеотидов, детектируемых антителами к производным 2,4-динитрофенола [104, 114].

Мечение ДНК стероидным лактоном дигоксигенином (77) с последующей детекцией конъюгатом антитело—щелочная фосфатаза (рис. 3б, гаптен — дигоксигенин) в некоторых случаях оказывается более эффективным, чем ^{32}P -мечение, например для определения цитоплазматической мРНК в микросрезках тканей. В настоящее время дигоксигенин принадлежит к наиболее часто используемым гап-



77: R = H

78: R = $\text{SuNOCO}(\text{CH}_2)_5\text{NHCOCH}_2$

теновым меткам. Этот стероид встречается в природе лишь в растениях наперстянки (*Digitalis purpurea* и *D. lanata*); специфичные к нему антитела не проявляют аффинности к другим стероидам, например к стероидным гормонам человека [130].

Молекула (77) содержит щелочлабильную лактонную группировку, так что химический синтез реагента для прямого включения этого гаптена в олигонуклеотиды с помощью фосфамидитного метода едва ли возможен. Поэтому обычно используют включение дигоксигенина в ДНК с помощью ДНК-полимеразной реакции с участием в качестве субстрата 2'-дезоксисуридин-5'-трифосфата, меченного дигоксигенином по С5 [130]. Применяют также взаимодействие активированного производного дигоксигенина (78) с аминомодифицированными олигонуклеотидами (см., например, [47]).

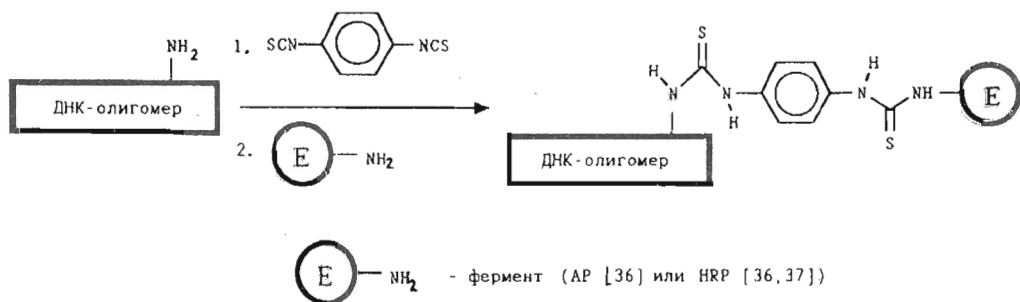
2.2. Ферментные метки

Использование в качестве репортерной группы фермента позволяет избежать нескольких стадий в анализе (по сравнению с биотином) и заметно повысить чувствительность детекции.

В качестве примеров присоединения ферментов к олигонуклеотидам следует упомянуть несколько работ. Общим для них подходом является использование бифункциональных сшивающих реагентов. Например, аминомодифицированный олигонуклеотид обрабатывали *n*-фенилендиизотиоцианатом, и последующая реакция с ферментами пероксидазой или щелочной фосфатазой приводила к целевым конъюгатам [36, 37] (схема 6). В сходном методе для тех же целей использовался дисукцинимидилсуберат [27, 131] (схема 7). В работе [27] методики изложены весьма подробно и заслуживают наибольшего доверия.

Мечение олигонуклеотидов с тиольной группой осуществляли щелочной фосфатазой, обработанной *N*-(*m*-малеимидобензоилокси)сукцинимидом [132] (схема 8). В еще одном методе в щелочную фосфатазу вводили бромацетильные остатки, которые селективно реагируют с SH-группами тиолмодифицированного олигонуклеотида [38] (схема 9).

Схема 6



Способы детекции ферментных меток рассмотрены выше (раздел 2.1.1).

Синтезы олигонуклеотид-ферментных конъюгатов обычно громоздки и трудновоспроизводимы, требуют высокой квалификации исполнителей, что препятствует массовому использованию подобных зондов. В настоящее время олигонуклеотиды, меченные щелочной фосфатазой, имеются в продаже (фирма Stratagene); это позволяет предположить, что в ближайшем будущем такие конъюгаты найдут более широкое применение.

В общем, синтез олигонуклеотид-ферментных конъюгатов, как правило, связан

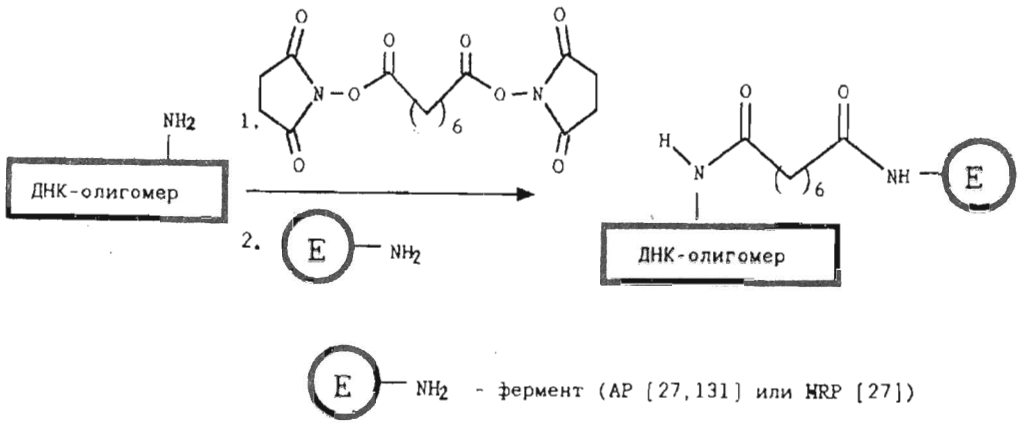


Схема 8

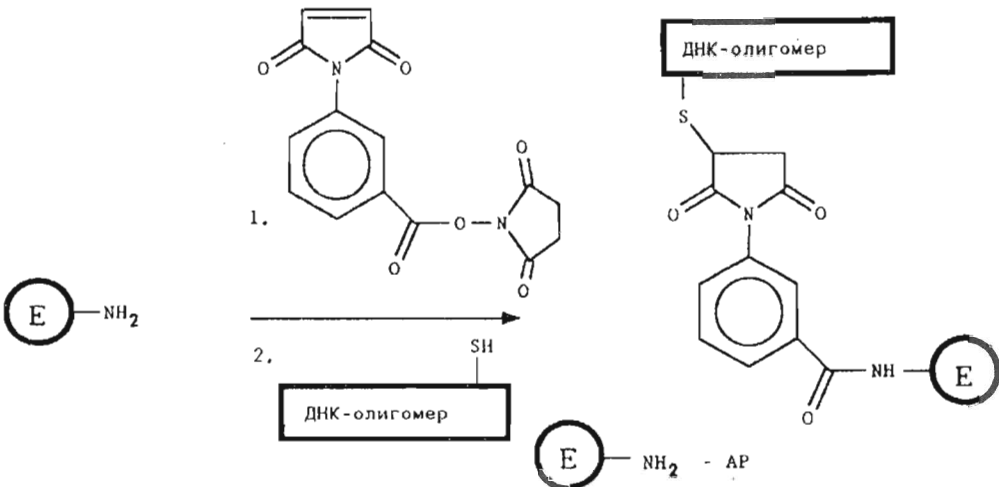
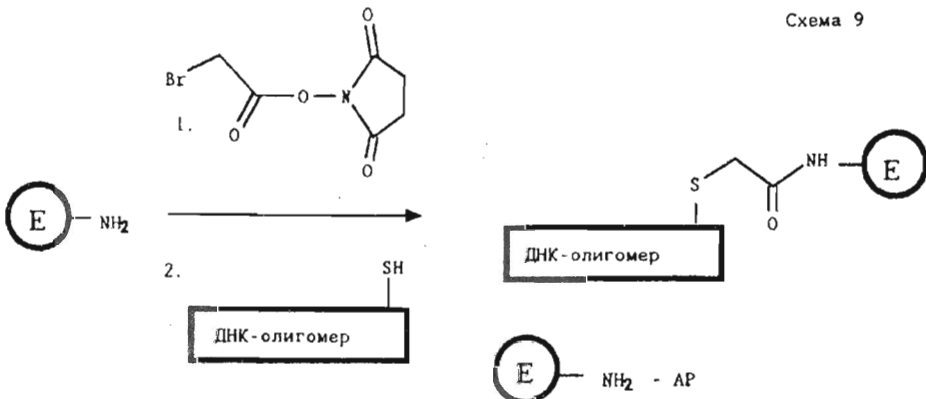


Схема 9



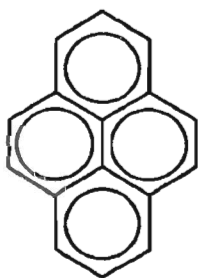
с проблемами контроля стехиометрии (необходима монофункционализация фермента олигонуклеотидом), выделения и очистки целевых продуктов. Выход реакций модификации часто невелик. В силу этих причин значение ферментов как меток намного меньше, чем, например, биотина или флуоресцентных красителей.

2.3. Флуоресцентные метки

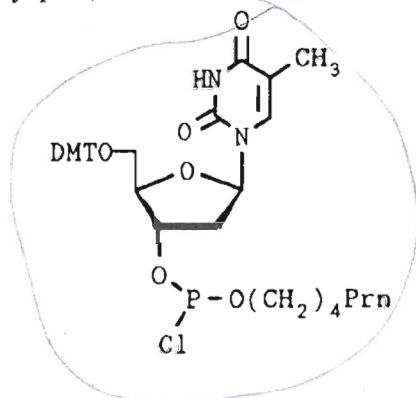
Флуорофоры являются метками прямой детекции, т. е. непосредственно регистрируется испускаемый меткой сигнал. Детекция молекул флуорофоров основана на их способности к поглощению энергии фотонов прямо или через сенсibilизатор с последующим излучением в виде света. Тот факт, что одна молекула флуоресцентного красителя способна многократно претерпевать цикл возбуждение — излучательная дезактивация, обуславливает высокую чувствительность, достигаемую с помощью флуоресцентных меток. Кроме того, большую ценность нередко имеет информация, получаемая из вида спектра флуоресценции, так как флуоресценция обычно очень чувствительна к структуре окружения. Благодаря этим достоинствам флуорофоры давно применяются для мечения различных зондов, используемых в анализе [133] или адресуемых в специфические компартменты клеток [134]. Флуоресцентное мечение ДНК-олигомеров разработано лишь в последнее десятилетие, что связано с развитием методов олигонуклеотидного синтеза, в том числе синтеза олигонуклеотидов с функциональными группами. В данном обзоре будут рассмотрены некоторые используемые флуоресцентные метки.

2.3.1. Пирен

Тетрациклический углеводород пирен (79) имеет самое большое время затухания флуоресценции среди зондов-неметаллов, поэтому он особенно чувствителен к различным тушителям флуоресценции. В спектре флуоресценции пирена наблюдаются две интенсивные полосы — при 372 и 393 нм. Благодаря большому времени затухания возбужденные молекулы пирена, диффундируя, успевают столкнуться с его невозбужденными молекулами. При этом электрон переносится с первой молекулы на вторую, и теперь уже заряженные молекулы притягиваются друг к другу, образуя возбужденный димер (эксимер); он излучает световой квант в области 470 нм [134]. Алкильные заместители или сульфогруппы практически не влияют на флуоресценцию пирена, сама молекула устойчива к различным химическим воздействиям, что позволяет легко синтезировать производные пирена, сохраняющие флуоресцентные свойства.

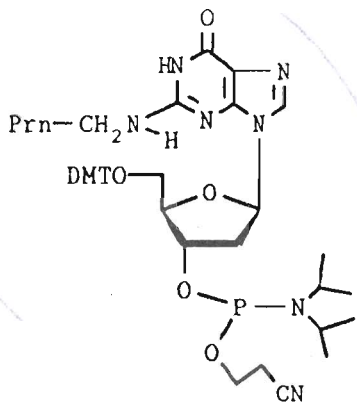


79 (Prn-H)

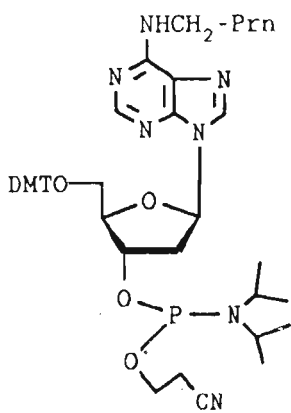


80

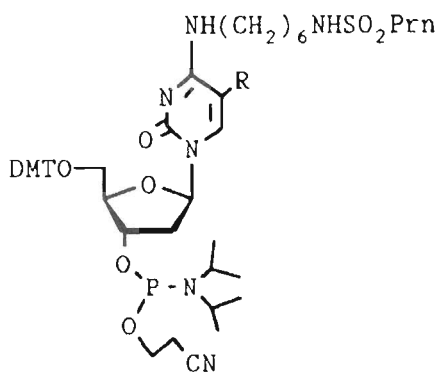
Впервые пиренсодержащий олигонуклеотид — d(T)₆ с присоединенной по межнуклеотидному фосфату пиренилбутильной группой — был синтезирован на основе мономерного блока (80) [135]. Позднее для этой цели использовали также носитель, содержащий димер dTrT с пиренилбутильным остатком по межнуклеотидному фосфату [136]. Мономерные фосфамидитные нуклеотидные блоки (81, 82) [137], (83) [114] могут служить для прямого химического синтеза олигонуклеотидов с пиреновым остатком, присоединенным по различным основаниям, а блок (84) [138—140] — по рибозному остатку.



81

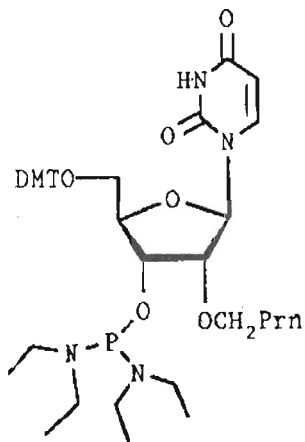


82

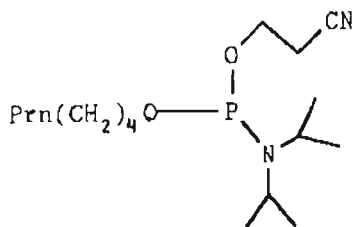


R = H, Me

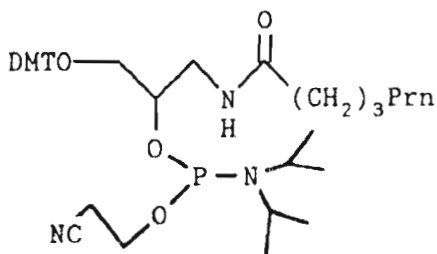
83



84



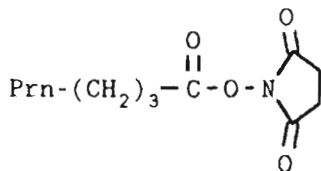
85



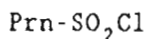
86

Описаны также ненуклеотидные пиренсодержащие реагенты. Фосфамидит (85) [141, 142] позволяет получать олигонуклеотиды, модифицированные по 5'-концу одним остатком пирена. С помощью реагента (86) [143] можно в автоматическом синтезаторе получать олигонуклеотиды, меченные несколькими пиренильными остатками.

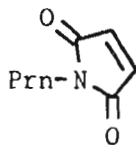
Мечение аминомодифицированных олигонуклеотидов пиреном осуществляли при помощи реакционноспособных производных (87) и (88) в среде DMF-боратный буфер [29]. Выходы в этих реакциях модификации были невелики (40—60%), что связано с малой растворимостью пиреновых соединений (87) и (88). Для растворения активированного эфира (87) использовался ацетон [144]. Мечение аминомодифицированных олигомеров реагентом (87) описано также в патентах [145, 146]. N-(1-Пиренил)малеимид (89) использовался для мечения тиолмодифицированных олигонуклеотидов [87—89].



87



88



89

Следует отметить способность пиреновой молекулы интеркалировать в ДНК-дуплексы [29, 135, 136, 138, 139], в результате чего изменяются ее спектральные свойства [29, 138, 139].

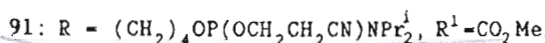
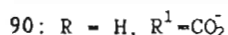
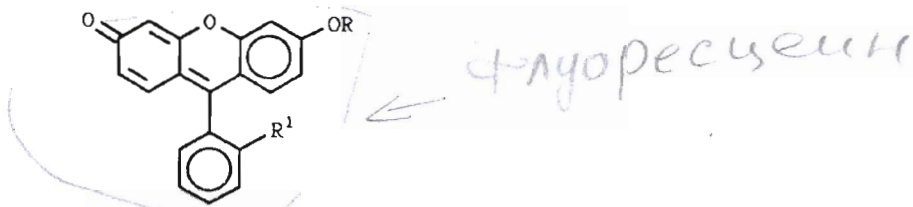
Пиреновая метка в силу ряда причин (эмиссия в коротковолновой области, тушение флуоресценции в водной среде и в присутствии ДНК) не используется для детекции в олигонуклеотидных зондах или праймерах для секвенирования. Интерес к пирену в настоящее время связан с попытками получения структурной информации с помощью спектров флуоресценции (см. раздел 3).

Несомненно, что возможности пиренового флуорофора весьма велики, так как он обладает высоким УФ-поглощением и квантовым выходом [147]. По-видимому, если будет решена проблема обеспечения благоприятного для флуоресценции гидрофобного микроокружения молекулы пирена (и отсутствия тушителей), то эту молекулу можно будет использовать и в качестве высококочувствительной метки.

2.3.2. Флуоресцеин и другие трифенилметановые красители

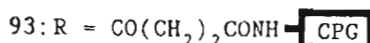
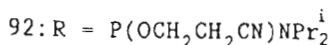
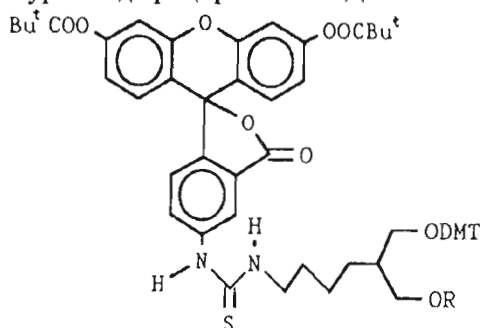
Флуоресцеин (90) и его аналоги относятся к числу наиболее распространенных красителей для флуоресцентной спектроскопии. Его важное свойство — растворимость в воде в слабощелочной среде; в этих условиях молекула существует в виде аниона (90), который и является собственно флуорофором. Высокая чувствительность детекции и положение максимума испускания в видимой области (для флуоресцеина $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} 516 \text{ nm}$), наличие разнообразных коммерчески доступных реакционноспособных производных способствуют популярности трифенилметановых красителей, в том числе и в качестве меток для ДНК.

Так, описан реагент (91) для введения одной молекулы флуоресцеина в олигонуклеотид в процессе автоматического синтеза [148—150]. Его недостатком является частичная утрата красителем флуоресцентных свойств после деблокирования водным аммиаком, вызываемая, как полагают, побочными реакциями с участием метоксикарбонильной группы и хиноидной структуры [151]. Поэтому для деблокирования авторы применяли раствор NaOH в метаноле.

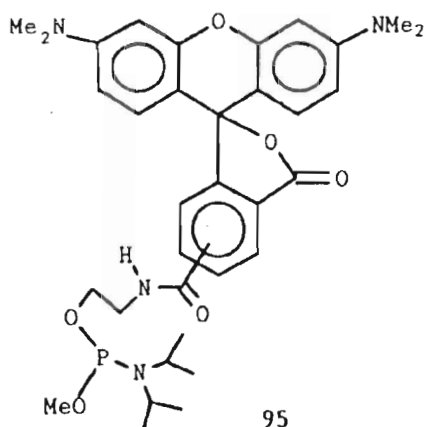
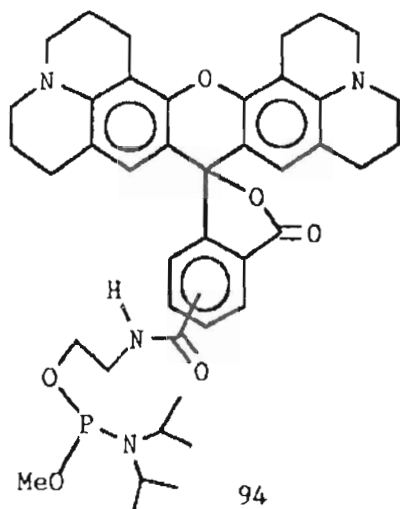


В настоящее время в продаже имеется фосфамидит (92) ([22], с. 117, [73]) фирмы Clontech, который позволяет в автоматическом режиме синтезировать олигонуклеотиды с различным числом остатков флуоресцеина. Эффективность модификации может контролироваться по поглощению катиона DMT⁺. Реагент с аналогичными характеристиками разрабатывается специалистами фирмы Amersham [152].

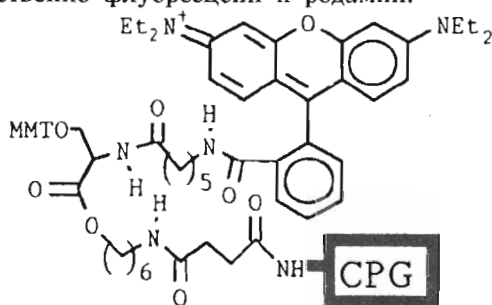
Вместе с тем необходимо отметить, что введение нескольких флуоресцеиновых остатков подряд не приводит к желаемому увеличению интенсивности флуоресценции [60]. Однако реагент (92) может оказаться полезным в исследованиях конформации и структуры модифицированных ДНК.



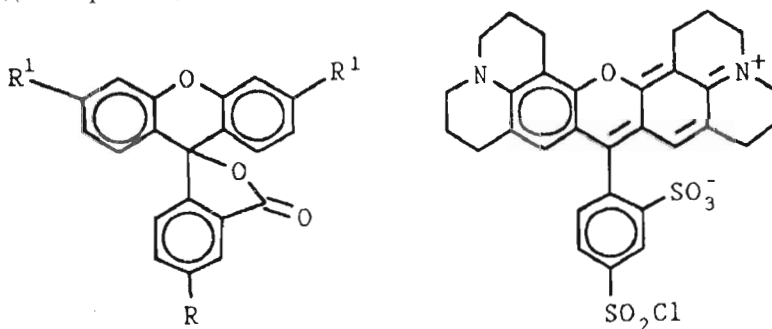
Фосфамидиты (94) и (95) (Applied Biosystems) позволяют получать олигонуклеотиды, меченные по 5'-концу одной молекулой производного родамина. Их можно использовать в автоматических синтезаторах, а чтобы избежать деградации красителя, для конечного деблокирования применяют не конц. водный NH_3 , а смесь метанол—вода—*трет*-бутиламин, 1 : 2 : 1 [153].



Для автоматического синтеза олигонуклеотидов с флуоресцентной меткой по 3'-концу используют носители (93) (Clontech) и (96) (Peninsula Laboratories), содержащие соответственно флуоресцеин и родамин.



Несмотря на доступность реагентов для введения флуоресцентных меток в ходе олигонуклеотидного синтеза, в большинстве случаев прибегают к ступенчатой дериватизации олигонуклеотидов, т. е. сначала синтезируют amino- или тиол-модифицированный олигомер, который затем обрабатывают реакционноспособным производным репортерной группы. Для мечения олигонуклеотидов с аминогруппами применяют FITC (97) [27, 29, 32, 36, 44, 45, 47, 53, 65, 67, 108, 154], сульфородамин 101 сульфохлорид (техасский красный) (101) [36, 44, 45], тетраметилродаминизотиоцианат (98) (TMRITC) [67], активированные эфиры карбоксифлуоресцеина (102) [60] и карбокси(тетраметилродамина) (103) [36]. Олигонуклеотиды с сульфгидрильной группой метят иодацетамидофлуоресцеином (99) [83, 94, 96, 98, 155] или эозинмалеимидом (104) [67]. Используется также взаимодействие SH-олигомера, активированного 2,2'-дипиридилдисульфидом, с тиолсодержащим производным флуоресцеина (100) [78]. В этом случае модификация обратима и метка может быть отщеплена в мягких условиях (при обработке дитиотреитом).



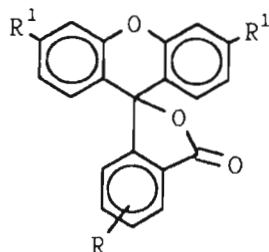
97: R = NCS, R¹ = -OH

101

98: R = NCS, R¹ = -NMe₂

99: R = NHCOCH₂I, R¹ = -OH

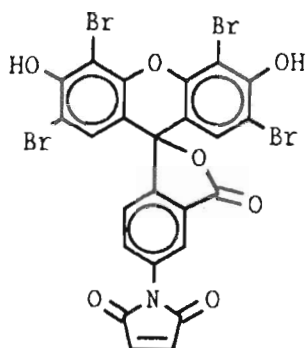
100: R = NHC(S)NHCH₂CH₂SH, R¹ = -OH



102: R = CO₂C₆F₅, R¹ = PrⁱCOO

103: R = SuNOCO, R¹ = Me₂N

Разработаны и коммерчески доступны модифицированные флуоресцеином 5'-трифосфаты дезоксинуклеозидов, служащие для химико-ферментативного синтеза меченых ДНК.



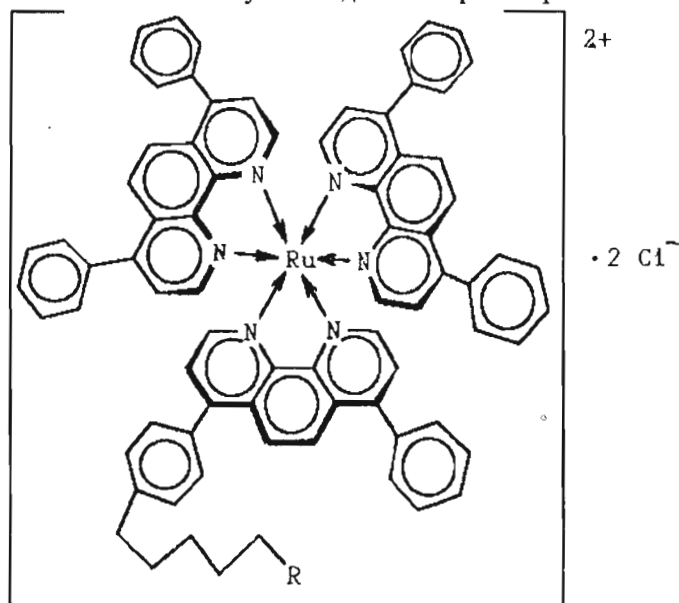
104

Флуоресцеин и его аналоги используются в автоматических секвенаторах ДНК (см., например, [155] и обзор [2]).

2.3.3. Металлокомплексы

Хелаты некоторых металлов, например европия, тербия и рутения, обладают наибольшим временем затухания флуоресценции, что позволяет измерять флуоресценцию с разрешением во времени, т. е. после наносекундного лазерного импульса возбуждения и паузы для излучения других флуорофоров регистрируется эмиссия лишь металлокомплекса, что позволяет практически полностью отсеять фоновую флуоресценцию.

Для прямого мечения олигонуклеотидов батофенантролиновым комплексом

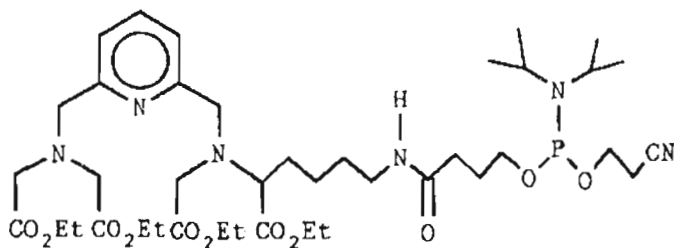


105a: R - OP(OCH₂CH₂CN)NPr₂ⁱ [56]

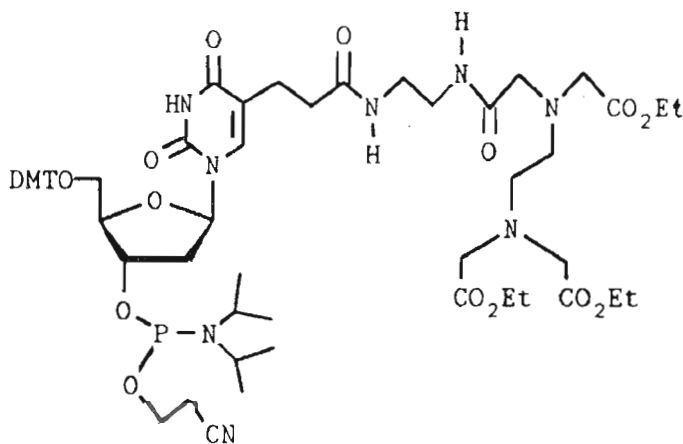
105b: R -COONSu [57]

рутения(II) используется фосфамидит (105a), приготовленный *in situ* [156]. Комплекс (105) стабилен в условиях фосфамидитного олигонуклеотидного синтеза и аммиачного деблокирования. Меченые олигонуклеотиды могут быть выделены и очищены офВЭЖХ или электрофорезом в ПААГ. Рутениевые комплексы можно присоединять к аминомодифицированным олигонуклеотидам, например в виде активированного производного (105б) [157]. Меченные комплексом рутения олигонуклеотиды использовались в качестве праймеров для секвенирования по методу Сенгера [158].

Хелаты редкоземельных элементов менее стабильны и не могут быть прямо введены в олигонуклеотиды. Поэтому сначала синтезируют олигомер, несущий лиганд (хелатор), а затем проводят обработку раствором соли металла. Для синтеза олигонуклеотидов, содержащих лиганды, использовались фосфамидиты (106) [103], (107) [159].



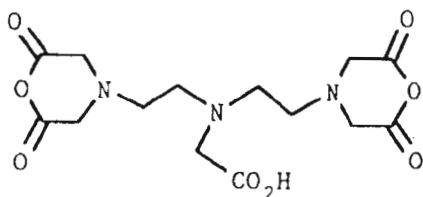
106



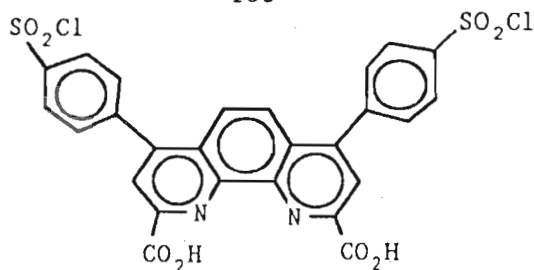
107

Комплексы Eu(III) или Tb(III) могут быть присоединены к аминомодифицированной ДНК реакцией с диангидридом диэтилентриаминпентауксусной кислоты (108) [160, 161] или реакционноспособным производным 1,10-фенантролина (109) [162] с последующей обработкой солью лантаноида либо непосредственно взаимодействием с хелатом (110), содержащим изотиоцианатную группу [103, 163, 164].

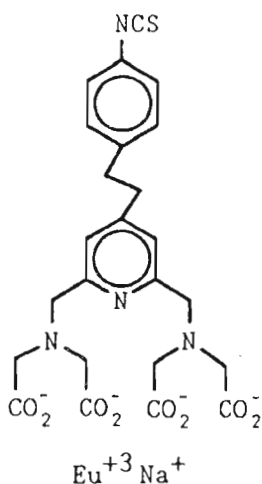
Метод времяразрешенной флуориметрии обладает высокой чувствительностью и легко поддается автоматизации, однако требует довольно дорогой аппаратуры. Серьезным препятствием является также отсутствие удобного способа мечения, так как в рассмотренных выше примерах применяются довольно сложные реагенты и многоступенчатые процессы.



108



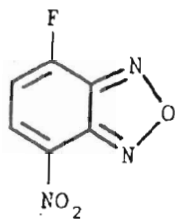
109



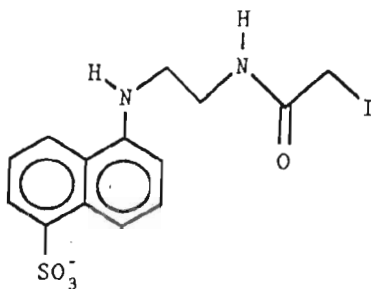
110

2.3.4. Другие флуоресцентные метки

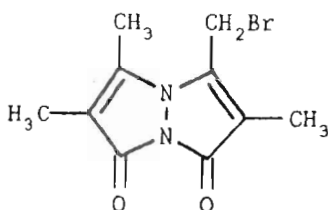
Поскольку в продаже имеется большое число реакционноспособных производных различных флуоресцентных красителей (например, реагенты фирмы Molecular Probes) [165], которыми можно селективно модифицировать аминокли или сульфгидрильные группы, синтез флуоресцентно меченных олигонуклеотидов сделался рутинным. Обычно сначала синтезируют олигонуклеотид, содержащий -NH₂, -SH или фосфотиоатные группы, а затем проводят модификацию флуоресцентными реагентами. Например, аминокли модифицируют 4-фтор-7-нитробензфуразаном (111) [44, 45, 65, 67], а для реакции по SH-группам используют 1,5-иодацетилэтилендиаминонафталинсульфокилоту (1,5-I-AEDANS) (112) [67, 79, 80, 94, 98], монобромбиман (113) [53, 67, 94, 96—98], 7-(N,N-диэтиламино)-4-метил-3-(4-малеимидофенил)кумарин (114) [67, 160].



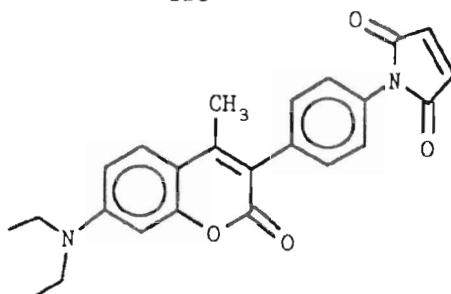
111



112

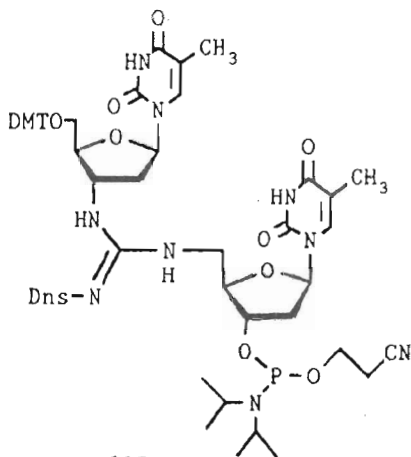


113

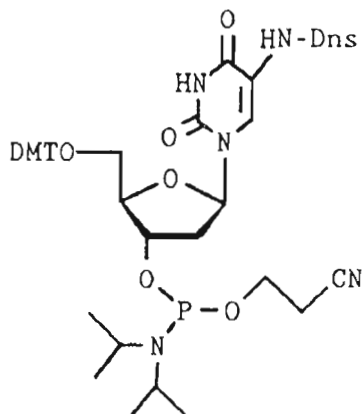


114

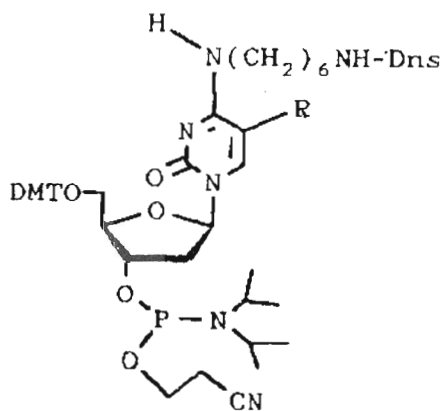
Иногда синтезируют фосфамидит, содержащий метку. Например, олигонуклеотиды с дансильным остатком были синтезированы с помощью нуклеотидных блоков (115) [166], (116) [167], (117) [114, 115] и (118) [168].



115

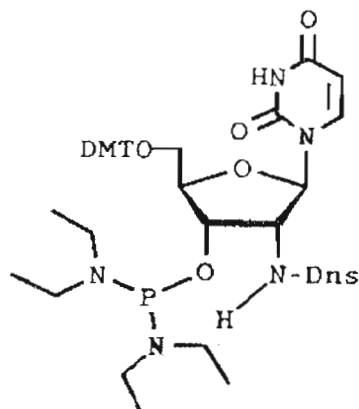


116



R = H, Me

117



118

Олигонуклеотиды, содержащие фосфотиоатную и аминогруппу, селективно модифицировали двумя различными флуоресцентными реагентами — FITC (97) и монобромбиманом (113) [53].

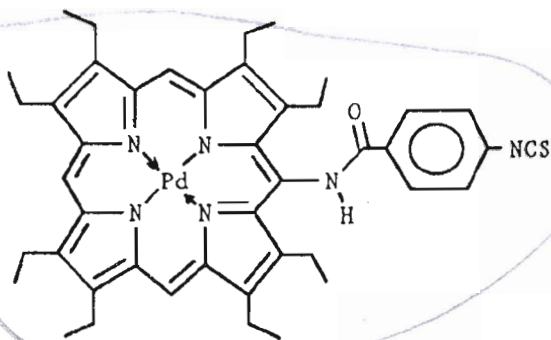
Другие примеры модификации олигонуклеотидов флуоресцентными красителями можно найти в обзорах [7, 8].

2.4. Фосфоресцентные метки (металлопорфирины)

Фосфоресценцию (эмиссию фотона возбужденной молекулой в триплетном состоянии) меток затруднительно использовать для детекции, так как время жизни молекулы в триплетном состоянии относительно велико (достигает секунд), что увеличивает вероятность безызлучательной дезактивации. Так, в водных растворах фосфоресценция практически не наблюдается. Однако недавно в качестве фосфоресцентных меток предложено использовать порфириновые комплексы Pd(II), способные фосфоресцировать в обескислороженных водных растворах

[169]. Большое время затухания (сотни микросекунд) позволяет в этих условиях, когда безызлучательная дезактивация не происходит, проводить измерения во времяразрешенном режиме (как и для флуоресцирующих металлохелатов) и таким образом сводить к минимуму фоновый сигнал. Дополнительным преимуществом фосфоресцентных меток является значительное различие положений максимумов возбуждения и эмиссии.

Конъюгаты Pd(II)-порфиринов с олигонуклеотидами были синтезированы взаимодействием олигонуклеотидов, содержащих аминогруппу, с реакционноспособными металлопорфириновыми производными [170—172], например с соединением (119) [171, 172].

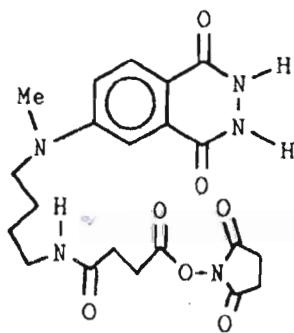


119

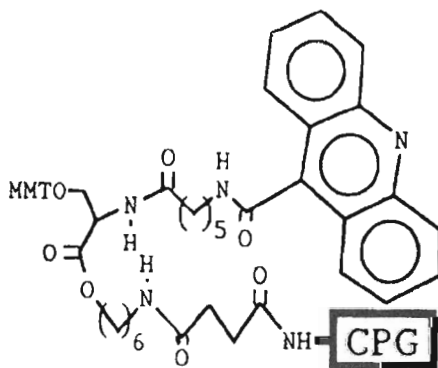
Поскольку в присутствии порфиринов происходит эффективное фоторасщепление ДНК (см., например, [173]), порфирин-олигонуклеотидные конъюгаты привлекли внимание в качестве реагентов для направленной модификации комплементарной ДНК-мишени [174—177]. Представляет интерес также влияние порфиринов на скорость поглощения конъюгатов клетками (см., например, [178]).

2.5. Хемилюминесцентные метки

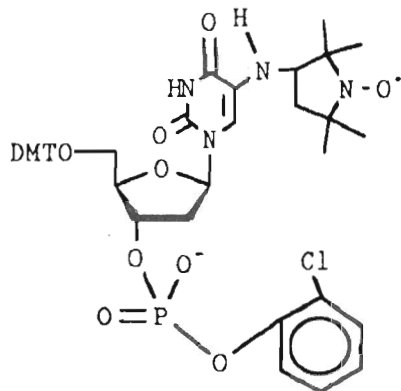
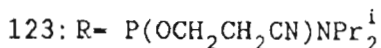
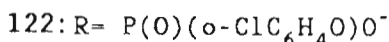
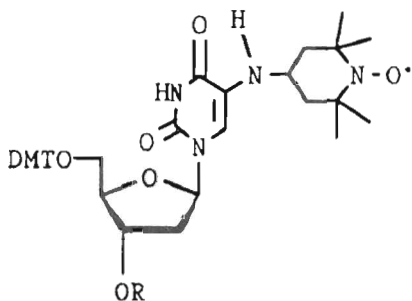
Поскольку термический или «включаемый» ферментом распад 1,2-диоксетанов [122] намного превосходит по эффективности другие хемилюминесцентные системы, такие системы редко используются для детекции ДНК-зондов. В работе [36] описано получение конъюгата олигонуклеотид—изолуоинол с использованием активированного производного (120). Для синтеза олигонуклеотидов, содержащих остатки акридина по 3'-концу, коммерчески доступен носитель (121) (Peninsula Laboratories).



120



121



124

Не нашло применения присоединение к олигонуклеотиду хемилюминесцентного субстрата, необратимо распадающегося в процессе детекции (например, производного акридина). Хемилюминесценция используется в схемах детекции с участием ферментов (см. раздел 2.1.1).

2.6. Спиновые метки

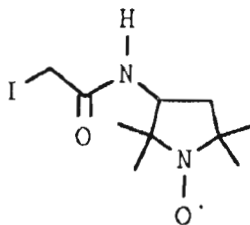
Присоединение к олигонуклеотиду спиновых меток, т. е. веществ, молекулы которых содержат неспаренный электрон, может осуществляться при помощи прямого синтеза меченых олигомеров с использованием блоков для фосфотриэфирного синтеза (122, 124) или фосфамидитного блока (123) [179, 180].

При этом фосфамидитный метод дает меньший выход меченого продукта (определен по интенсивности сигнала ЭПР). Спиновые метки с помощью тиол-специфичного реагента (125) могут вводиться в фосфотиоатсодержащие олигонуклеотиды [94, 96, 98]. Из-за высокой стоимости аппаратуры и умеренной чувствительности детекции эти метки не имеют самостоятельного значения; интерес к ним связан с влиянием микроокружения на спектр ЭПР, например в результате гибридизации с комплементарной последовательностью [179], что может быть использовано для структурного анализа.

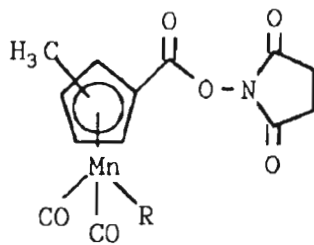
2.7. Инфракрасные метки

В качестве новых нерадиоизотопных меток для олигонуклеотидов недавно предложены производные циклопентадиенилтрикарбонилмарганца, детектируемые с помощью ИК-спектроскопии с фурье-преобразованием [181]. После обработки аминомодифицированного универсального праймера для секвенирования ДНК фага M13 активированными эфирами (126)—(129) получают конъюгаты, поглощающие при разных частотах в области 1900—2200 см⁻¹, которая прозрачна практически для всех органических молекул.

Меченые продукты элонгации разделяют капиллярным электрофорезом и детектируют посредством ИК-спектрометра с ИК-микроскопом. Предел обнаружения конъюгата составляет 100 фмоль. К недостаткам данного метода относятся высокая стоимость аппаратуры для детекции и неустойчивость используемых металлоорганических соединений в водных растворах в присутствии воздуха.

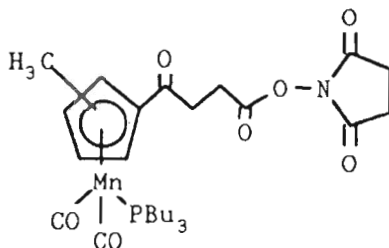


125

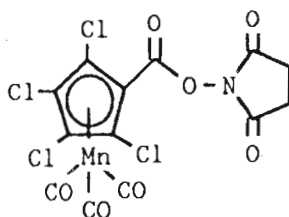


126: R = CO

127: R = P(OEt)₃



128



129

2.8. Сравнительная чувствительность нерадиоактивных меток

В табл. 1 и 2, взятых из работ [27] и [122], приведены данные, позволяющие судить об относительной чувствительности нерадиоактивных меток. Видно, что наиболее чувствительны методы с использованием «включаемой» ферментом хемилюминесценции.

3. Детекция гибридизации ДНК в растворе

Использование изотопно- или неизотопномеченых олигонуклеотидов в качестве гибридизационных зондов может осуществляться в различных вариантах. При традиционном способе анализируемый образец сначала связывается с нерастворимым носителем (чаще всего это иммобилизация на нитроцеллюлозном или нейлоновом фильтре), затем следуют гибридизация с зондом, отмывка от избытка зонда и детекция [5]. Второй вариант проведения анализа, так называемая сэндвич-гибридизация [182], предполагает использование двух олиго- или полинуклеотидных зондов, комплементарных разным участкам анализируемой нуклеиновой кислоты. Один из зондов иммобилизуют на подложке, проводят его гибридизацию с анализируемым образцом и отмывают от несвязавшейся части образца, а затем операции гибридизации и отмывки проводят со вторым зондом,

Сравнение методов детекции ДНК-зондов [122] (значения взяты в основном из работы [36])

Детекция	Метка	Субстрат	Способ детекции	Предел детекции, моль	
				для метки	меченого зонда
Радиоактивность	^{32}P		Сцинтилляционный счетчик	$5 \cdot 10^{-17}$	$5 \cdot 10^{-17}$
Окрашивание	HRP	о-Фенилендиамин	Фотометр	$1 \cdot 10^{-16}$	$1 \cdot 10^{-16}$
Флуоресценция	AP	NBT/BCIP	»	$2 \cdot 10^{-16}$	$5 \cdot 10^{-16}$
	AP	NPP	»	$5 \cdot 10^{-15}$	$5 \cdot 10^{-15}$
	Флуоресцеин		Флуориметр	$2 \cdot 10^{-14}$	$5 \cdot 10^{-13}$
	Родамин		»	$5 \cdot 10^{-15}$	$1 \cdot 10^{-13}$
Хемилюминесценция	Техасский красный		»	$2 \cdot 10^{-14}$	$1 \cdot 10^{-13}$
	AP	MUBP	»	$8 \cdot 10^{-20}$	$1 \cdot 10^{-19}$
		Изолуминол	Люминометр	$1 \cdot 10^{-15}$	$1 \cdot 10^{-13}$
		Акридиновые эфиры	»	$2 \cdot 10^{-18}$	$2 \cdot 10^{-17}$
	HRP	Люминол и усилитель	»	$5 \cdot 10^{-17}$	$5 \cdot 10^{-17}$
	AP	D-Люциферин-О-фосфат	»	$5 \cdot 10^{-20}$	$1 \cdot 10^{-19}$
	AP	1,2-Диоксетан	Фотопленка	$1 \cdot 10^{-20}$	$1 \cdot 10^{-19}$

Таблица 2

Сравнение чувствительности для репортерных групп, присоединенных к олигонуклеотидам [27]

Репортерная группа	Детекция	Количество детектируемой метки *		Относительная интенсивность сигнала
		моль	молекул	
Акридин	Люминесценция	$8 \cdot 10^{-17}$	$5 \cdot 10^7$	1
Флуоресцеин	Флуоресценция	$5 \cdot 10^{-17}$	$3 \cdot 10^7$	2
HRP	Окрашивание (DAB)	$1 \cdot 10^{-17}$	$8 \cdot 10^6$	6
Биотин	Стрептавидин—AP; NBT/BCIP	$1 \cdot 10^{-17}$	$6 \cdot 10^6$	8
$5' \text{-}^{32}\text{P}$	Авторадиография (24 ч)	$6 \cdot 10^{-18}$	$3 \cdot 10^6$	17
AP	Окрашивание (NBT/BCIP)	$2 \cdot 10^{-18}$	$1 \cdot 10^6$	50
AP	Флуоресценция (MUBP)	$5 \cdot 10^{-19}$	$3 \cdot 10^5$	166
AP	Люминесценция	$1 \cdot 10^{-19}$	$6 \cdot 10^4$	833

* Предел детекции определялся для одного и того же 22-звенного олигонуклеотида при гибридизации с плазмидной мишенью, иммобилизованной на мембране.

несущим метку. Достоинство сэндвич-варианта заключается в возможности непосредственно перед детекцией денатурировать дуплексы нагреванием и перевести зонд с меткой в раствор. Иногда это делает процедуру более точной, например в случае ферментных меток [5].

Так называемые методы с разделением компонентов, упомянутые выше, не свободны от недостатков, главными из которых являются многоступенчатость и

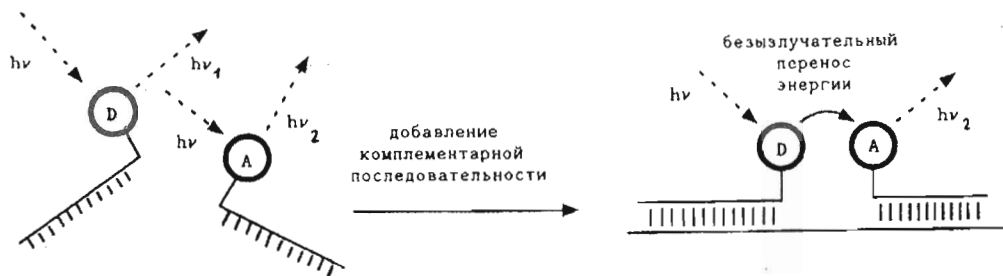


Рис. 4. Перенос энергии между флуорофорами, сближенными в результате гибридизации двух зондов



Рис. 5. Сопряженное функционирование двух ферментных меток (E_1 — глюкозооксидаза, E_2 — пероксидаза) при гибридизации двух зондов

продолжительность анализа. В последнее время предпринимаются попытки разработать эффективные зонды, позволяющие детектировать гибридизацию ДНК в растворе. Для этой цели предложено несколько подходов с использованием флуоресцентных меток, один из которых основан на резонансном переносе энергии флуоресценции. Если положения максимумов эмиссии одного флуорофора близки или совпадают друг с другом, а молекулы обоих красителей сближены, происходит безызлучательный перенос энергии с молекулы одного флуорофора (донора) на молекулу другого (акцептора) (см. обзор [183]); эффективность этого процесса обратно пропорциональна шестой степени расстояния между донором и акцептором. При этом перенос энергии регистрируется по увеличению флуоресценции акцептора и уменьшению флуоресценции донора. Чтобы наблюдать перенос энергии при гибридизации ДНК, необходимо снабдить зонды соответствующими друг другу флуоресцентными метками, которые сближались бы при гибридизации. Обычно для этого синтезируют 5'- и 3'-меченые олигонуклеотиды, метки которых сближаются на комплементарной матрице (рис. 4). В качестве системы донор—акцептор применяли пары родамин—флуоресцеин [184], родамин (пирен, тхасский красный) — флуоресцеин [144, 145, 185], салицилат — Тб(III) — хелат [161], пирен — P(V)-порфирин [136], люмазин (синоним птеридин-2,4(1H,3H)-диона) — батофенантролиновый комплекс Ru(II) (105) [186, 187]. Донором может также служить хемилюминесцентная система, например пероксидаза — люминол — H_2O_2 , индуцирующая люминесценцию флуорофора-акцептора [188, 189].

Предложен также метод усиления сигнала, основанный на сближении двух присоединенных к олигонуклеотидам ферментов (рис. 5). В этом случае продукт одной ферментативной реакции должен быть субстратом второго фермента, как, например, в случае пары глюкозооксидаза—пероксидаза [190]. Осуществление такого подхода связано с рядом проблем (подбор pH, состава буфера и концентрации субстрата для функционирования обоих ферментов, оптимизация методики анализа, хранение компонентов для анализа и др.), главной из которых является синтез олигонуклеотид-ферментных конъюгатов.

Второй подход к детекции гибридизации в растворе состоит в использовании лишь одного зонда с меткой, свойства которой должны сильно изменяться в

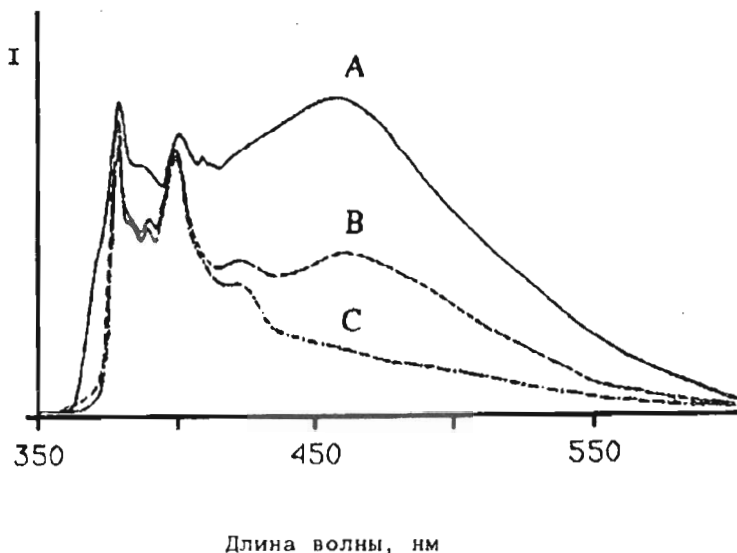
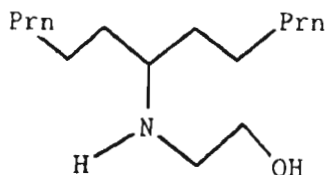


Рис. 6. Спектры флуоресценции соединения (116) ($A_{341} = 0,05$) в присутствии 0 (A), $1,8 \cdot 10^{-5}$ (B), $3,5 \cdot 10^{-5}$ М (C) poly(dT)-poly(dA)

результате взаимодействия с образующимся при гибридизации дуплексом. На основе самых общих соображений предпринимаются попытки создания таких меток. Так, очевидно, что флуорофор должен быть максимально приближен к области уотсон-криковских взаимодействий. Японские исследователи присоединяли дансильную и пиренильную группу по C2'-атому тимидина. Изучались гибридизационные и флуоресцентные свойства меченых олигонуклеотидов, полученных с помощью фосфамидитных блоков (118) [168] и (84) [138, 139]. В случае пиренового флуорофора отмечается значительное влияние гибридизации на флуоресценцию. Например, при связывании олигомера $d(U^*(T)_{10})$ (U^* — звено, полученное с помощью реагента (84)) с poly(A) наблюдалось усиление флуоресценции в 20 раз.

Отличие флуоресценции пиренового эксимера от флуоресценции мономера может быть использовано для детекции дуплексной ДНК. В спектре вещества (130), содержащего два сближенных пиренильных остатка, проявляется интенсивный широкий максимум флуоресценции эксимера. В присутствии дуплексной ДНК интенсивность флуоресценции ослабевает (рис. 6) [191]. По-видимому, это связано с тем, что один из пиреновых остатков интеркалирует в ДНК-дуплекс и эксимерное возбужденное состояние становится невозможным.



130

После того как будет найдена подходящая флуоресцентная система, этот принцип может стать основой нового метода гомогенного гибридизационного анализа, лишенного недостатков методов с разделением компонентов. Кроме того, метод позволит приблизить к реальности количественную детекцию одноцепочечных нуклеиновых кислот непосредственно в клетке.

За время подготовки обзора к печати появилось значительное число статей,

посвященных синтезу и использованию функционализированных и содержащих репортерные группы олигонуклеотидов. Так, можно упомянуть новый носитель для 3'-аминомодификации олигонуклеотидов [192], реагенты на основе 2'-дезокситидина и 2'-деоксиуридина, содержащие аминоалкильную группу в положении 5 [193], разветвляющий реагент для синтеза 5'-полиметченых олигомеров [194], синтез олигорибонуклеотида с 5'-пиренилбутирильной меткой [195], мечение ДНК новым Eu^{3+} -хелатом [196], использование безызлучательного переноса энергии на паре красителей флуоресцеин-родамин для детекции одноцепочечной ДНК в растворе [197], использование эффекта внутримолекулярного гашения флуоресценции в комбинации флуорофора и гасителя, присоединенных к олигонуклеотиду, для дифференциации геномных аллелей в растворе [198], а также новые обзоры [199, 200].

Авторы благодарны К. В. Балакину и Д. И. Орлову за подготовку к печати иллюстративного материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Caruthers M. H.//Accounts Chem. Res. 1991. V. 24. № 9. P. 278—284.
2. Краев А. С.//Молекулярн. биология. 1991. Т. 25. № 6. С. 1447—1482.
3. Wetmur J. G.//Crit. Revs Biochem. and Mol. Biol. 1991. V. 26. № 3/4. P. 227—259.
4. Кнорре Д. Г.//Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1989. Т. 34. № 1. С. 52—60.
5. Бадашкева А. Г., Кнорре Д. Г.//Молекулярн. биология. 1991. Т. 25. № 2. С. 309—324.
6. Uhlmann E., Peyman A.//Chem. Revs. 1990. V. 90. № 4. P. 543—584.
7. Englisch U., Gauss D. H.//Angew. Chem. Int. Ed. 1991. V. 30. № 6. P. 613—629.
8. Goodchild J.//Bioconjugate Chem. 1990. V. 1. № 3. P. 165—187.
9. Landegren U., Kaiser R., Caskey C. T., Hood L.//Science. 1988. V. 242. № 4876. P. 229—237.
10. Beaucage S. L., Caruthers M. H.//Tetrahedron Lett. 1981. V. 22. № 20. P. 1859—1862.
11. Sinha N. D., Biernat J., McManus J., Köster H.//Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 11. P. 4539—4557.
12. Efimov V. A., Buryakova A. A., Dubey I. Y., Polushin N. N., Chakhmakhcheva O. G., Ovchinnikov Y. A.//Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 16. P. 6525—6540.
13. Froehler B. C., Matteucci M. D.//Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 4. P. 469—472.
14. Garegg P. J., Lindh I., Reberg T., Stawinski J., Stromberg R.//Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 34. P. 4051—4057.
15. Schulhof J. C., Molko D., Teoule R.//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 2. P. 397—416.
16. Uznanski B., Grajkowski A., Wilk A.//Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 12. P. 4863—4871.
17. Stengele K.-P., Pfleiderer W.//Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 18. P. 2548—2552.
18. Usman N., Ogilvie K. K., Jiang M.-J., Cedergren R. J.//J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 109. № 25. P. 7845—7854.
19. Ogilvie K. K., Usman N., Nicoghosian K., Cedergren R. J.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 16. P. 5764—5768.
20. Wu T., Ogilvie K. K., Pon R. T.//Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 9. P. 3501—3517.
21. Scaringe S. A., Franclyn C., Usman N.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 18. P. 5433—5441.
22. Clontech. Catalog 1992/93.
23. Bergstrom D. E., Ruth J. L.//J. Amer. Chem. Soc. 1976. V. 98. № 6. P. 1587—1589.
24. Ruth J. L.//DNA. 1984. V. 3. № 1. P. 123.
25. Ruth J. L., Morgan C., Pasko A.//DNA. 1985. V. 4. № 1. P. 93.
26. Ruth J. L.//Pat. US 4948882 (1987).
27. Ruth J. L.//Oligonucleotides and Analogues. A Practical Approach/Ed. F. Eckstein. Oxford: IRL Press, 1991. P. 255—282.
28. Cook A. F., Vuocolo E., Brakel C. L.//Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 9. P. 4077—4095.
29. Telsner J., Cruickshank K. A., Morrison L. E., Netzel T. L.//J. Amer. Chem. Soc. 1989. V. 111. № 18. P. 6966—6976.
30. Povic T. J., Dervan P. B.//J. Amer. Chem. Soc. 1990. V. 112. № 25. P. 9428—9430.
31. Gibson K. J., Benkovic S. J.//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 16. P. 6455—6467.
32. Haralambidis J., Chai M., Tregear G. W.//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 12. P. 4857—4876.

33. Markiewicz W. T., Kierzek R., Hernes B.//Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 1/2. P. 269—272.
34. Kierzek R., Markiewicz W. T.//Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 1/2. P. 403—405.
35. Urdea M. S., Warner B., Horn T.//Pat. EP 225807 (1985).
36. Urdea M. S., Warner B. D., Running J. A., Stempien M., Clyne J., Horn T.//Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 11. P. 4937—4956.
37. Urdea M. S., Running J. A., Horn T., Clyne J., Ku L., Warner B. D.//Gene. 1987. V. 61. № 3. P. 253—264.
38. Li P., Medon P. P., Skingle D. C., Lanser J. A., Symons R. H.//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 13. P. 5275—5287.
39. Gmeiner W. H., Luo W., Pon R. T., Lown J. W.//Bioorg. and Med. Chem. Lett. 1991. V. 1. № 9. P. 487—490.
40. Roduit J.-P., Shaw J., Chollet Ang., Chollet And.//Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 1/2. P. 349—352.
41. Krzymanska-Olejnik E., Adamiak R. W.//Nucleosides and Nucleotides. 1991. V. 10. № 1/3. P. 595—597.
42. Cosstick R., Douglas M. E.//J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1991. № 4. P. 1035—1040.
43. Bashkin J. K., McBeath R. J., Modak A. S., Sample K. R., Wise W. B.//J. Org. Chem. 1991. V. 56. № 9. P. 3168—3176.
44. Smith L. M., Fung S., Hunkapiller M. W., Hunkapiller T. J., Hood L. E.//Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 7. P. 2399—2412.
45. Smith L. M., Kaiser R. L., Sanders J. Z., Hood L. E.//Meth. Enzymol. 1987. V. 155. P. 260—301.
46. Sproat B. S., Beijer B., Rider P.//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 15. P. 6181—6196.
47. Manoharan M., Guinosso C. J., Cook P. D.//Tetrahedron Lett. 1991. V. 32. № 49. P. 7171—7174.
48. Chollet A., Kawashima E. H.//Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 5. P. 1529—1541.
49. Бросалина Е. Б., Грачев С. А.//Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 248—256.
50. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М.//Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 475—481.
51. Letsinger R. L., Schott M. E.//J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. № 24. P. 7394—7398.
52. Agrawal S., Tang J.-Y.//Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 11. P. 1543—1546.
53. Agrawal S., Zamecnik P. C.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 18. P. 5419—5423.
54. Филиппов С. А., Калининско С. В., Есипов Д. С., Шибаюнова Е. В., Шингарова Л. Н., Коробко В. Г., Добрынин В. Н.//Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 8. С. 1045—1051.
55. Seliger H., Krist B., Berner S.//Nucleosides and Nucleotides. 1991. V. 10. № 1/3. P. 303—306.
56. Haralambidis J., Tregear G. W.//Pat. PCT WO 89/03849 (1987).
57. Haralambidis J., Duncan L., Angus K., Chai M., Pownall S., Tregear G. W.//Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1988. № 20. P. 115—116.
58. Haralambidis J., Duncan L., Tregear G. W.//Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. № 43. P. 5199—5202.
59. Haralambidis J., Duncan L., Angus K., Tregear G. W.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 3. P. 493—499.
60. Haralambidis J., Angus K., Pownall S., Duncan L., Chai M., Tregear G. W.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 3. P. 501—505.
61. Tong G., Lawlor J. M., Tregear G. W., Haralambidis J.//J. Org. Chem. 1993. V. 58. № 8. P. 2223—2231.
62. Wachter L., Jablonski J.-A., Ramachandran K. L.//Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 20. P. 7985—7994.
63. Applied Biosystems Inc. Model 380 B DNA Synthesizer Users Manual. User Bulletin № 38 (1986).
64. Coull J. M., Weith H. L., Bischoff R.//Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 34. P. 3991—3994.
65. Agrawal S., Christodoulou C., Gait M. J.//Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 15. P. 6227—6245.
66. Connolly B. A.//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 7. P. 3131—3139.
67. Sinha N. D., Cook R. M. //Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 6. P. 2659—2669.
68. Sinha N. D., Striepeke S.//Oligonucleotides and Analogues. A Practical Approach/Ed. F. Eckstein. Oxford: IRL Press, 1991. P. 185—210.
69. Applied Biosystems Inc. Model 380 B DNA Synthesizer Users Manual. Users Bulletin № 49 (1988).
70. Nelson P. S., Sherman-Gold R., Leon R.//Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 18. P. 7179—7186.
71. Arnold L. J., Reynolds M. A., Bhatt R. S.//Pat. PCT WO 89/02439 (1987).

72. Juby C. D., Richardson C. D., Brousseau R.//Tetrahedron Lett. 1991. V. 32. № 7. P. 879—882.
73. Nelson P. S., Kent M., Muthini S.//Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. № 23. P. 6253—6259.
74. Nelson P. S., Frye R. A., Liu E.//Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 18. P. 7187—7194.
75. Asseline U., Thuong N. T.//Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 1. P. 81—84.
76. Petrie C. R., Reed M. W., Adams A. D., Meyer R. B.//Bioconjugate Chem. 1992. V. 3. № 1. P. 85—87.
77. Sproat B. S., Beijer B., Rider P., Neuner P.//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 12. P. 4837—4848.
78. Zuckermann R., Corey D., Schultz P.//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 13. P. 5305—5321.
79. Gupta K. C., Sharma P., Sathyanarayana S., Kumar P.//Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 17. P. 2417—2474.
80. Gupta K. C., Sharma P., Kumar P., Sathyanarayana S.//Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 11. P. 3019—3025.
81. Guzaev A. P.//Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1991. № 24. P. 236.
82. Connolly B. A.//Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. № 4. P. 463—466.
83. Bonfils E., Thuong N. T.//Tetrahedron Lett. 1991. V. 32. № 26. P. 3053—3056.
84. Connolly B. A.//Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 12. P. 4485—4502.
85. Mori K., Subasinghe C., Stein C. A., Cohen J. S.//Nucleosides and Nucleotides. 1989. V. 8. № 5/6. P. 649—657.
86. Bannwarth W., Wippler J.//Helv. chim. acta. 1990. V. 73. № 4. P. 1139—1147.
87. Kumar A., Advani S.//Nucleosides and Nucleotides. 1992. V. 11. № 5. P. 999—1002.
88. Kumar A., Malhotra S.//Nucleosides and Nucleotides. 1992. V. 11. № 5. P. 1003—1007.
89. Kumar A., Advani S., Dawar H., Talwar G. P.//Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 16. P. 4561.
90. Ferentz A. E., Verdine G. L.//J. Amer. Chem. Soc. 1991. V. 113. № 10. P. 4000—4002.
91. Gao H., Fathi R., Gaffney B. L., Goswami B., Kung P.-P., Jin R., Jones R. A.//J. Org. Chem. 1992. V. 57. № 25. P. 6954—6959.
92. Eritja R., Pons A., Escarceller M., Giralt E., Albericio F.//Tetrahedron. 1991. V. 47. № 24. P. 4113—4120.
93. Brill W. K.-D., Nielsen J., Caruthers M. H.//J. Amer. Chem. Soc. 1991. V. 113. № 10. P. 3972—3980.
94. Caruthers M. H., Beaton G., Wu J. V., Wiesler W.//Meth. Enzymol. 1992. V. 211A. P. 3—20.
95. Stec W. J.//Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1991. № 25. P. 171—172.
96. Fidanza J. A., Ozaki H., McLaughlin L. W.//J. Amer. Chem. Soc. 1992. V. 114. № 14. P. 5509—5517.
97. Conway N. E., Fidanza J., McLaughlin L. W.//Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1989. № 21. P. 43—44.
98. Conway N. E., Fidanza J., O'Donnel M. J., Narekian N. D., Ozaki H., McLaughlin L. W.//Oligonucleotides and Analogues. A Practical Approach/Ed. F. Eckstein. Oxford: IRL Press, 1991. P. 211—239.
99. Ozaki H., McLaughlin L. W.//Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. № 19. P. 5205—5214.
100. Gildea B. D., Coul J. M., Köster H.//Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 49. P. 7095—7098.
101. Li T., Rokita S. E.//J. Amer. Chem. Soc. 1991. V. 113. № 20. P. 7771—7773.
102. Pierlot C., Sergheraert C.//Bioorg. and Med. Chem. Lett. 1992. V. 2. № 3. P. 267—270.
103. Kwiatkowski M., Sund C., Hurskainen P.//Pat. PCT WO 90/00622 (1988).
104. Bazin H., Roget A., Teoule R.//Nucleosides and Nucleotides. 1991. V. 10. № 1/3. P. 363—366.
105. Horn T., Warner B. D., Running J. A., Downing K., Clyne J., Urdea M. S.//Nucleosides and Nucleotides. 1989. V. 8. № 5/6. P. 875—877.
106. Korshun V. A., Borekov Yu. G., Pestov N. B., Berlin Yu. A.//Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1991. № 24. P. 269.
107. Korshun V. A., Pestov N. B., Prokhorenko I. A., Berlin Yu. A.//International Symposium on Nucleic Acids and Membranes. (Abstracts). Vancouver, Canada. 1993. P. 30—31.
108. Gryaznov S., Loginoxa L., Potapov V., Stecenko D., Veselovskaja S.//Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1991. № 24. P. 207—208.
109. Avidin-biotin Technology/Eds Bayer E. A., Wilchek M.—Meth. Enzymol., 1990. V. 184.
110. Alves A. M., Holland D., Edge M. D.//Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 23. P. 3089—3092.
111. Cocuzza A. J.//Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 46. P. 6287—6290.
112. Cocuzza A. J., Zagursky R. J.//Nucleosides and Nucleotides. 1991. V. 10. № 1/3. P. 413—414.
113. Pon R. T.//Tetrahedron Lett. 1991. V. 32. № 14. P. 1715—1718.
114. Roget A., Bazin H., Teoule R.//Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 19. P. 7643—7651.

115. Roget A., Teoule R., Bazin H.//Pat. PCT WO 89/12642 (1988).
116. Pielas U., Sproat B. S., Lamm G. M.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 15. P. 4355—4360.
117. Misiura K., Durrant I., Evans M. R., Gait M. J.//Nucleosides and Nucleotides. 1991. V. 10. № 1/3. P. 671—672.
118. Misiura K., Durrant I., Evans M. R., Gait M. J.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 15. P. 4345—4354.
119. Коршун В. А., Ножевникова Е. В., Берлин Ю. А.//Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. № 1. С. 139—141.
120. Köster H., Beck S., Coull J. M., Dunne T., Gildea B. D., Kissinger C., O'Keeffe T.//Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1991. № 24. P. 318—321.
121. Шарипов Г. Л., Казаков В. П., Толстиков Г. А. Химия и хемилюминесценция 1,2-диоксетанов. М.: Наука, 1990, 288 с.
122. Beck S., Köster H.//Anal. Chem. 1990. V. 62. № 21. P. 2258—2270.
123. Schaap A. P., Sandison M. D., Handley R. S.//Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. № 11. P. 1159—1162.
124. Beck S., O'Keeffe T., Coull J. M., Köster H.//Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 13. P. 5115—5123.
125. Bronstein I., Voyta J. C., Lazzari K. G., Murphy O., Edwards B., Kricka L. J.//BioTechniques. 1990. V. 8. № 3. P. 310—313.
126. Tizard R., Cate R. L., Ramachandran K. L., Wysk M., Voyta J. C., Murphy O. J., Bronstein I.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 12. P. 4514—4518.
127. Cate R. L., Ehrenfels C. W., Wysk M., Tizard R., Voyta J. C., Murphy III O. J., Bronstein I.//Gen. Analysis Techn. and Applications. 1991. V. 8. № 3. P. 102—106.
128. Creasey A., D'Angio L., Dunne T. S., Kissinger C., O'Keeffe T., Perry-O'Keeffe H., Moran L. S., Roskey M., Schildkraut I., Sears L. E., Slatko B.//BioTechniques. 1991. V. 11. № 1. P. 102—104, 106, 108—110.
129. Martin C., Bresnick L., Juo R.-R., Voyta J. C., Bronstein I.//BioTechniques. 1991. V. 11. № 1. P. 110—113.
130. DNA Labeling and Detection Nonradioactive. Applications Manual. Boehringer Mannheim GmbH, 1989.
131. Jablonski E., Moomaw E. W., Tullis R. H., Ruth J. L.//Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 15. P. 6115—6128.
132. Alves A. M., Holland D., Edge M. D., Carr F. J.//Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 17. P. 8722.
133. Савицкий А. П.//Успехи биол. химии. М.: Наука, 1990. Т. 31. С. 209—240.
134. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 1989.
135. Yamana K., Letsinger R. L.//Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1985. № 15. P. 169—172.
136. Kitamura M., Nimura A., Kunitomo K., Segawa H., Shimidzu T.//Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1991. № 25. P. 13—14.
137. Lee H., Hinz M., Stezowski J. J., Harvey R. G.//Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 47. P. 6773—6776.
138. Yamana K., Gokota T., Ohashi Y., Ozaki H., Kitamura M., Nakano H., Sangen O., Shimidzu T.//Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1990. № 22. P. 103—104.
139. Yamana K., Ohashi Y., Nunota K., Kitamura M., Nakano H., Sangen O., Shimidzu T.//Tetrahedron Lett. 1991. V. 32. № 44. P. 6347—6350.
140. Yamana K., Gokota T., Ozaki H., Nakano H., Sangen O., Shimidzu T.//Nucleosides and Nucleotides. 1992. V. 11. № 2/4. P. 383—390.
141. Berlin Yu. A., Korshun V. A., Boreskov Yu. G.//Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1991. № 25. P. 85—86.
142. Mann J. S., Shibata Y., Meehan T.//Bioconjugate Chem. 1992. V. 3. № 6. P. 554—558.
143. Korshun V. A., Pestov N. B., Birikh K. R., Berlin Yu. A.//Bioconjugate Chem. 1992. V. 3. № 6. P. 559—562.
144. Morrison L. E., Halder T. C., Stols L. M.//Anal. Biochem. 1989. V. 183. № 2. P. 231—244.
145. Morrison L. E.//Pat. EP 232967 (1987).
146. McCapta F.//Pat. EP 345776 (1988).
147. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. В 3-х т. М.: Мир, 1984. Т. 2. С. 94.
148. Schubert F., Ahlert K., Cech D., Rosenthal A.//Nucl. Acids Res. 1991. V. 18. № 11. P. 3427.
149. Schubert F., Cech D., Wagner K.//Pat. DE 4023212 (1989).

150. Cech D., Schubert F., Moller U.//Nucl. Acids Symp. Ser. 1991. № 24. P. 205—206.
151. Cech D.//Частное сообщение.
152. Fowler S. J., Durrant I., Gait M. J., Misiura K., Evans M. R.//Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1991. № 24. P. 221.
153. Woo S. L., Menchen S. M., Fung S.//Pat. US 4965349 (1987).
154. Bonfils E., Depierreux C., Midoux P., Thuong N. T., Monsigny M., Roche A. C.//Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. № 17. P. 4621—4629.
155. Ansorge W., Sproat B., Stegemann J., Schwager C., Zenke M.//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 11. P. 4593—4602.
156. Bannwarth W., Schmidt D.//Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 12. P. 1513—1516.
157. Bannwarth W., Schmidt D., Stallard R. L., Hornung C., Knorr R., Muller F.//Helv. chim. acta. 1988. V. 71. № 8. P. 2085—2099.
158. Bannwarth W.//Anal. Biochem. 1989. V. 181. № 2. P. 216—219.
159. Dreyer G. B., Dervan P. B.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 2. P. 968—972.
160. Oser A., Roth W. K., Valet G.//Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 3. P. 1181—1196.
161. Oser A., Valet G.//Angew. Chem. Int. Ed. 1990. V. 29. № 10. P. 1167—1169.
162. Chan A., Diamandis E. P., Krajden M.//Anal. Chem. 1993. V. 65. № 2. P. 158—163.
163. Hurskainen P., Dahlen P., Ylikoski J., Kwiatkowski M., Siitari H., Lovgren T.//Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 5. P. 1057—1061.
164. Sund C., Ylikoski J., Hurskainen P., Kwiatkowski M.//Nucleosides and Nucleotides. 1988. V. 7. № 5/6. P. 655—659.
165. Haugland R. P.//Molecular Probes. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. 1992.
166. Vandendriessche F., Voortmans M., Hoogmartens J., Van Aerschot A., Herdewijn P.//Bioorg. and Med. Chem. Lett. 1993. V. 3. № 2. P. 193—198.
167. Barawkar D. A., Ganesh K. N.//Bioorg. and Med. Chem. Lett. 1993. V. 3. № 2. P. 347—352.
168. Ohashi Y., Yamana K., Nakano H., Sangen O.//Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1991. № 25. P. 15—16.
169. Савицкий А. П., Папковский Д. Б., Пономарев Г. В., Березин И. В.//Докл. АН СССР. 1989. Т. 304. № 4. С. 1005—1009.
170. Fedorova O. S., Savitskii A. P., Shoikhet K. G., Ponomarev G. V.//FEBS Lett. 1990. V. 259. № 2. P. 335—337.
171. Шойхет К. Г., Федорова О. С.//Сиб. хим. журн. 1991. Вып. 4. С. 32—35.
172. Shoikhet K. G., Kazantsev A. V., Fedorova O. S.//Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1991. № 24. P. 248.
173. Praseuth D., Gaudemer A., Verlhac J.-B., Kraljic I., Sissoeff I., Guille E.//Photochem. and Photobiol. 1986. V. 44. № 6. P. 717—724.
174. Le Doan T., Perrouault L., Helene C., Chassignol M., Thuong N. T.//Biochemistry. 1986. V. 25. № 22. P. 6736—6739.
175. Le Doan T., Perrouault L., Chassignol M., Thuong N. T., Helene C.//Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 21. P. 8643—8659.
176. Thuong N. T., Asseline U.//Oligonucleotides and Analogues. A Practical Approach/Ed. F. Eckstein. Oxford: IRL Press, 1991. P. 283—308.
177. Pitie M., Casas C., Lacey C. J., Pratiel G., Bernadou J., Meunier B.//Angew. Chem. 1993. B. 105. № 4. S. 607—609.
178. Boutorine A. S., Le Doan T., Battioni J. P., Helene C.//Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1991. № 24. P. 273.
179. Strobel O. K., Kryak D. D., Bobst E. V., Bobst A. M.//Bioconjugate Chem. 1991. V. 2. № 2. P. 89—95.
180. Persichetti R. A., Sinden R. R., Duh J.-L., Bobst A. M.//Synth. Commun. 1991. V. 21. № 8/9. P. 1013—1019.
181. Wang Z., Roe B. A., Nicholas K. M., White R. L.//J. Amer. Chem. Soc. 1993. V. 115. № 10. P. 4399—4400.
182. Ranki M., Palva A., Virtanen M., Laaksonen M., Soderlund H.//Gene. 1983. V. 21. № 1/2. P. 77—85.
183. Векшин Н. Л.//Итоги науки и техники. Сер. Радиационная химия и фотохимия. 1989. Т. 7. 174 с.
184. Cardullo R. A., Agrawal S., Flores C., Zamecnik P. C., Wolf D. E.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 23. P. 8790—8794.
185. Heller M. J., Jablonski E. J.//Pat. EP 229943 (1986).

+ не в. в. в.

186. Bannwarth W., Pfeleiderer W., Müller F.//*Helv. chim. acta.* 1991. V. 74. № 8. P. 1991—1999.
187. Bannwarth W., Müller F.//*Helv. chim. acta.* 1991. V. 74. № 8. P. 2000—2008.
188. Heller M. J., Morrison L. E., Prevatt W. D., Akin G.//*Pat. EP 70685* (1982).
189. Taub F.//*Pat. PCT WO 86/03227* (1985).
190. Albarella J. P., Anderson DeRiemer L. H., Carrico R. J.//*Pat. EP 146039* (1984).
191. Kitamura M., Nimura A., Yamana K., Shimidzu T.//*Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 1991. № 25. P. 67—68.
192. Thaden J., Miller P. S.//*Bioconjugate Chem.* 1993. V. 4. № 5. P. 395—401.
193. Hashimoto H., Nelson M. G., Switzer Ch.//*J. Amer. Chem. Soc.* 1993. V. 115. № 16. P. 7128—7134.
194. Teigelkamp S., Ebel S., Will D. W., Brown T., Beggs J. D.// *Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. № 19. P. 4651—4652.
195. Kierzek R., Turner D. H., Berilacqua P. C.//*J. Amer. Chem. Soc.* 1993. V. 115. № 12. P. 4985—4992.
196. Saha A. K., Kross K., Kloszewski E. D., Upson D. A., Toner J. L., Snow R. A., Black C. D. V., Desai V. C.//*J. Amer. Chem. Soc.* 1993. V. 115. № 23. P. 11032—11033.
197. Morrison L. E., Stols L. M.//*Biochemistry.* 1993. V. 32. № 12. P. 3095—3104.
198. Lee L. G., Connell C. R., Bloch W.//*Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. № 16. P. 3761—3766.
199. Beaucage S. L., Iyer R. P.//*Tetrahedron.* 1993. V. 49. № 10. P. 1925—1963.
200. Beaucage S. L., Iyer R. P.//*Tetrahedron.* 1993. V. 49. № 28. P. 6123—6194.

Поступила в редакцию
9.IV.1993

После доработки
17.XI.1993

V. A. Korshun, Yu. A. Berlin *

INTRODUCTION OF NONRADIOACTIVE REPORTER GROUPS INTO SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES AND THEIR DETECTION

M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow

Key words: modified oligonucleotides, non-radioisotope labels.

Reviewed are methods of functionalization of oligonucleotides, introduction of nonradioactive labels of various types into these compounds and their analysis, as well as some aspects of the use of the labeled oligonucleotides.

* Yu. A. Berlin, Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow V-437, 117871 Russia.