

В. В. Щур, мл. науч.сотр.; Ю. П. Буренкова, мл. науч. сотр.;
А. В. Янцевич, канд. хим. наук, зав. лаб.
(ИБОХ НАН Беларуси, г. Минск)

ТЕМПЕРАТУРНАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ 5'-ДИМЕТОКСИТРИТИЛИРОВАННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Модификация 5'-ОН группы нуклеиновых кислот заместителями с различными физико-химическими свойствами имеет важное значение для молекулярной биологии. Интересным представляется исследование симметричного и ассиметричного замещения 5'-гидроксила синтетической двуцепочечной ДНК (дцДНК) 4,4'-диметокситритильной (ДМТ) группой [1]. Синтетическую дцДНК получают из множества частично перекрывающихся олигонуклеотидов путем их объединения и достраивания промежутков методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

ДМТ-группа – объемный, гидрофобный заместитель, который гипотетически может препятствовать ферментативным реакциям с участием 5'-конца дцДНК (например, лигированию) [1]. ДМТ-группа может быть введена в 5'-положение олигонуклеотида на этапе его автоматизированного фосфорамидитного синтеза и сохранена в процессе его очистки методом твердофазной экстракции на обращенно-фазовом сорбенте [1].

Симметричное замещение 5'-ОН конца дцДНК может значительно снизить временные и материальные затраты на таком этапе процесса получения синтетического гена, встроенного в плазмидный вектор, как скрининг трансформантов [1]. Это достижимо путем селективного лигирования дцДНК без 5'-ДМТ-заместителей в вектор по сравнению с побочными укороченными продуктами сборки, имеющими на своих 5'-концах ДМТ-группы [1].

Чтобы исследовать данную область применения 5'-ДМТ дцДНК необходимо выяснить, стабилен ли синтетический 5'-ДМТ олигонуклеотид в условиях ПЦР [1].

В данной работе в качестве модельного использован 5'-ДМТ дТ₁₅ олигонуклеотид [1]. В эксперименте (Рис. 1) в простейшем случае ПЦР-цикл моделировали, как нагревание при 98°C, а в более сложном случае использовали ПЦР-цикл, рекомендованный для DreamTaq ДНК полимеразы [1].

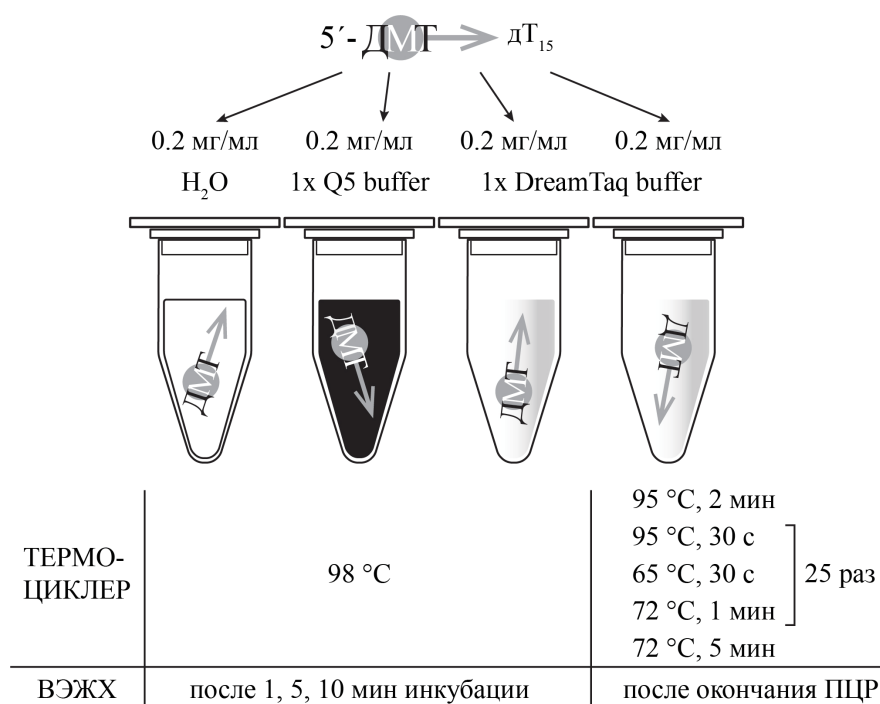
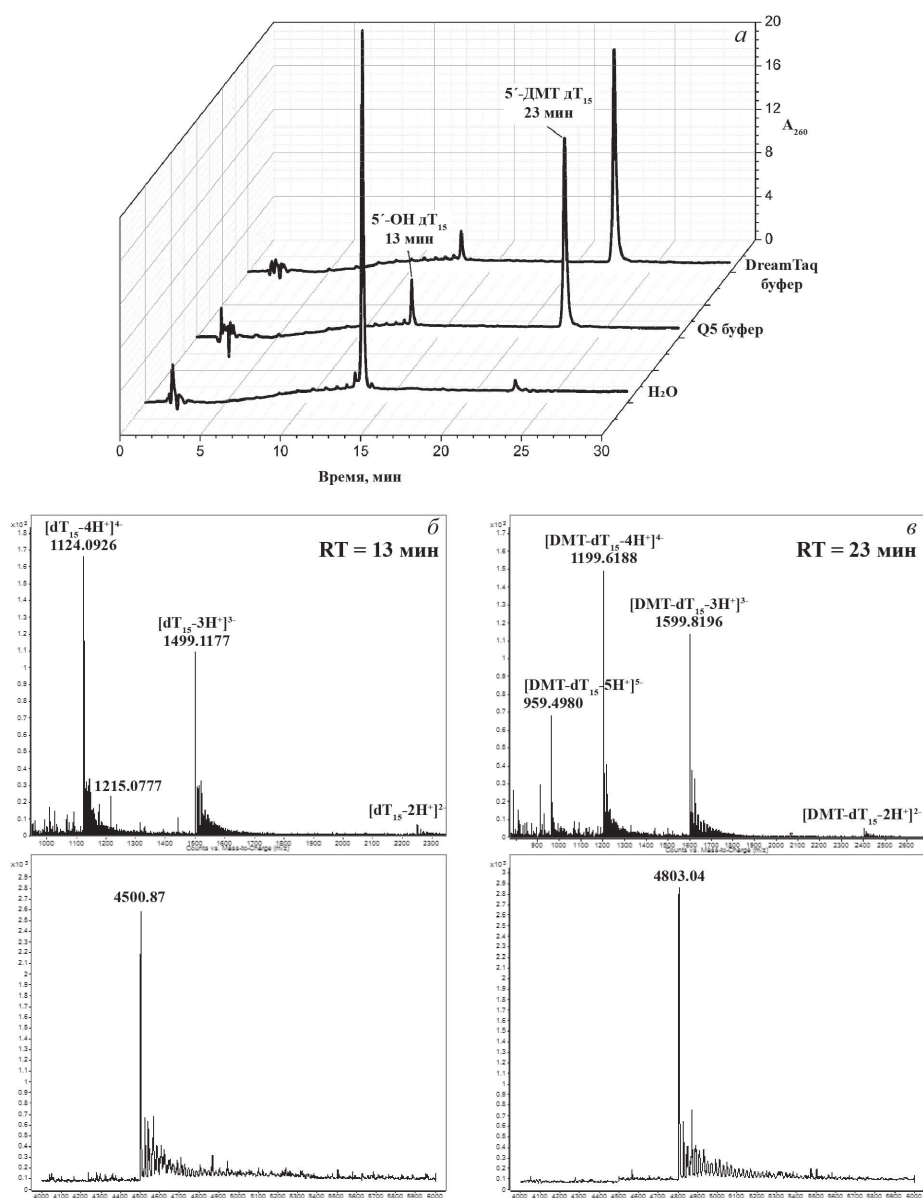


Рисунок 1 – Схема эксперимента [1]

На рисунке 2 (а) приведены хроматограммы растворов дТ₁₅ после нагревания в течение 5 мин при 98 °C [1]. Элюция 5'-ДМТ дТ₁₅ происходит на 23 минуте, а менее гидрофобного детритилированного 5'-ОН дТ₁₅ – на 13 минуте [1]. На рисунке 2 (б) отображены масс-спектры хроматографических пиков с указанными временами удерживания [1]. Данные для остальных времен инкубации при 98 °C, а также для ПЦР-цикла свидетельствуют о том, что в деионизированной воде более 90% олигонуклеотида теряет защитную группу уже в течение 5 мин нагревания при 98 °C [1]. Буферы для ДНК полимераз стабилизируют ДМТ-группу олигонуклеотида [1]. Так около 84% ДМТ-олигонуклеотида сохраняется в 1-кратном буфере DreamTaq ДНК полимеразы даже при нагревании до 98 °C в течение 15 минут, в буфере для Q5 ДНК полимеразы в том же температурно-временном режиме сохраняется около 72% ДМТ-олигонуклеотида, что можно объяснить присутствием в буфере β-меркаптоэтанола [1]. Сильный нуклеофил (атом серы в составе тиола) может быть эффективным акцептором ДМТ-катиона, что будет приводить к смещению равновесия в сторону реакции детритилирования [1].

Таким образом, методом ВЭЖХ с УФ (260 нм) и МС детекцией мы показали, что 5'-ДМТ-группа стабильна в составе синтетического олигонуклеотида дТ₁₅ в условиях ПЦР, однако присутствие тиольных соединений в буфере может снижать выход 5'-ДМТ-дцДНК [1].



а – Хроматограммы (ВЭЖХ-УФ). б – Масс-спектры хроматографических пиков (времена удерживания 13 и 23 мин) до (выше) и после (ниже) деконволюции [1]

Рисунок 2 – Детритилирование 5'-ДМТ-дТ₁₅ олигонуклеотида в воде и буферных растворах

Мы планируем дальнейшее изучение влияния 5'-ДМТ-группы в составе синтетической дцДНК на функционирование различных ферментов, взаимодействующих с 5'-концом одноцепочечных и двуцепочечных ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стабильность 5'-диметокситритильной защитной группы синтетического олигонуклеотида в условиях полимеразной цепной реакции / В.В. Щур [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. нав. 2020. Т. 56, № 4. С. 457–464.