

# Аффинные сорбенты, содержащие нуклеиновые кислоты и их фрагменты

И.Г.Шишкина, А.С.Левина, В.Ф.Зарытова

Новосибирский институт биоорганической химии  
Сибирского отделения Российской академии наук  
630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8, факс (383)233–3677

Проанализированы литературные данные по основным методам получения носителей, содержащих нуклеиновые кислоты (НК) или их фрагменты (олигонуклеотиды). Особое внимание уделено химическим методам иммобилизации. Рассмотрены физические и физико-химические методы иммобилизации, методы с использованием ферментов и взаимодействий авидин–биотин, а также получение НК-содержащих носителей в процессе олиго-нуклеотидного синтеза непосредственно на носителях. Отдельная глава посвящена применению НК-содержащих носителей для выделения индивидуальных НК и белков, а также в гибридизационном анализе, в том числе с использованием ДНК-чипов и ДНК-биосенсоров.

Библиография — 391 ссылка.

## Оглавление

I. Введение	581
II. Носители и линкеры	582
III. Химические методы иммобилизации нуклеиновых кислот	585
IV. Иммобилизация нуклеиновых кислот в ходе твердофазного синтеза	597
V. Другие методы иммобилизации нуклеиновых кислот	598
VI. Иммобилизация нуклеиновых кислот с использованием ферментов и взаимодействий авидин–биотин	598
VII. Применение сорбентов, содержащих нуклеиновые кислоты	598
VIII. Заключение	602

## I. Введение

Полимерные носители, содержащие нуклеиновые кислоты (НК) и их фрагменты, давно привлекают внимание специалистов, работающих в различных областях биохимии, генной инженерии и молекулярной биологии. В последнее десятилетие такие носители успешно используют в гибридизационном анализе для исследовательских целей, а также в медицине для диагностики инфекционных, раковых, генетических и других заболеваний. Сорбенты, содержащие НК, являются эффективными инструментами для выделения индивидуальных НК и НК-зависимых ферментов. При создании разнообразных аффинных сорбентов используют один и тот же принцип: на

носитель (подложку, матрицу) через линкер или спейсер или без них иммобилизуют лиганды, в данном случае НК, олигонуклеотиды или полинуклеотиды. Олигонуклеотиды, благодаря развитию методов автоматического синтеза, стали легко доступными коммерческими соединениями, что делает их наиболее привлекательными лигандами. Для решения ряда задач в качестве лигандов для иммобилизации использовали нативные НК.

Условно все методы иммобилизации олигонуклеотидов и НК на полимерные носители можно разделить на два типа: чисто химические способы, когда ковалентное присоединение НК к носителю происходит в результате химической реакции, и другие способы, когда для присоединения НК к носителю помимо химических реагентов требуется либо введение ферментов, либо применение специального оборудования или техники (синтезаторов, облучения и т.п.).

В данном обзоре рассмотрены основные методы получения НК-содержащих сорбентов, описаны их свойства и очерчена область применения. Следует иметь в виду, что рассмотренные здесь методы можно применять для иммобилизации не только олиго(поли)нуклеотидов, но также их аналогов и пептид-нуклеиновых кислот, в которых сахарофосфатный остаток заменен на пептидную цепь. Отдельная глава посвящена применению НК-содержащих носителей для выделения индивидуальных НК и белков, а также в гибридизационном анализе (включая использование ДНК-чипов и ДНК-биосенсоров).

И.Г.Шишкина. Кандидат химических наук, младший научный сотрудник лаборатории химии нуклеиновых кислот НИБХ СО РАН. Телефон: (383)239–6275, e-mail: igshishkina@hotmail.com

А.С.Левина. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник той же лаборатории. Телефон: (383)239–6275, e-mail: Levina@niboch.nsc.ru

В.Ф.Зарытова. Доктор химических наук, профессор, заведующая той же лабораторией. Телефон: (383)239–6224, e-mail: Zarytova@niboch.nsc.ru

Область научных интересов авторов: биоорганическая химия, химия нуклеиновых кислот, аффинная хроматография, ДНК-чибы.

Дата поступления 15 марта 2001 г.

## II. Носители и линкеры

### 1. Носители

Прежде чем перейти к обсуждению различных методов иммобилизации НК, кратко рассмотрим свойства, которыми должен обладать полимерный носитель для создания «идеального» аффинного сорбента.

1. Нерастворимость (для предотвращения потери присоединенного лиганда и во избежание загрязнения выделяемого вещества растворившимся носителем).

2. Доступность иммобилизованного лиганда для образования комплексов со специфическими биомолекулами.

3. Нулевая адсорбционная емкость (для предотвращения неспецифического взаимодействия).

4. Реакционная способность, позволяющая проводить химическую модификацию поверхности носителя.

5. Химическая стабильность в условиях, в которых происходит присоединение лиганда, адсорбция, десорбция продуктов и регенерация сорбента.

6. Устойчивость к действию микробов и ферментов.

7. Гидрофильный характер, обеспечивающий уменьшение неспецифической сорбции за счет гидрофобных взаимодействий.

8. Коммерческая доступность.

Требования к природе и форме носителя, его механической прочности и составу могут меняться в зависимости от задачи. Наиболее распространенные носители можно разделить на две группы: природные и синтетические (табл. 1). Для аффинной хроматографии при высоких давлениях необходимо

димы жесткие материалы, в то время как для колоночной хроматографии при нормальном давлении это свойство может быть и не самым главным. Относительно малая площадь удельной поверхности в непористых носителях в значительной степени может быть компенсирована уменьшением размеров частиц носителя до микронного уровня при сохранении хороших гидродинамических свойств. Пористые носители пригодны для аффинной хроматографии, когда размер хроматографируемых молекул существенно меньше диаметра пор сорбента: в большинстве случаев они имеют сферические частицы размером 40–150 мкм. Носители на основе силикагеля для высокоеффективной аффинной хроматографии представляют собой частицы размером ~10 мкм.

В последнее время в качестве носителей часто используют мембранны. Обычно их изготавливают из различных полимерных материалов, таких как целлюлоза, полиамид (найлон), полиакрилонитрил, полисульфон, полипропилен, полизифиры, полиэтилен и др. Наиболее популярны — целлюлоза, найлон, лавсан, так как на их поверхность легко могут быть введены различные функциональные группы. Для гибридизационного анализа широко используют покровные стекла и полистирольные иммунологические пластины.

Ряд носителей с разнообразными функциональными группами (табл. 2), пригодных для иммобилизации лигандов, являются коммерчески доступными, но из-за потери активности при хранении требуют дополнительной модификации перед использованием. Поэтому в данном обзоре будут рассмотрены некоторые методы синтеза таких сорбентов вместе с основными известными методами получения аффинных сорбентов, содержащих НК или их фрагменты.

Таблица 1. Коммерческие носители.

Носители	Фирменное название	Фирма-производитель
<i>Природные носители</i>		
Агароза	Sepharose, Superose	Pharmacia, LKB
	Bio-Gel A	Bio-Rad
	Ultrogel	IBF
Целлюлоза	Cellulose	Whatman
Декстран	Sephadex	Pharmacia
<i>Синтетические носители</i>		
Полиакриламидные носители	Bio-GelP	Bio-Rad
	Trisacryl GF-2000, Sephacryl	IBF Biotechnics
	Ultrogel	Pharmacia
	Azlactone beads	IBF
	3M Emphaze biosupport	3M Corporation
		Pierce Chemical
Полиметакрилатные носители	TSK-Gel Toyopearl HW	Tosoh Corporation
	Fractogel TSK	EM Science, Merck
	HEMA	TESSEK Ltd.
	Separon, Spheron	Alltech Associates
	Eupergit	Rohm Pharma
Полистирольные носители	Porous supports	PerSeptive Biosystem
	Polystyrene balls	Pierce Chemical
	Dyno particles	Trondheim
	TentaGel	Rapp Polymers
	MerckoGel	Merck
<i>Носители на основе стекла</i>		
	Стекло CPG	Pierce Chemical
	Glass beads	Jenco, Supelco
	Microscope glass slides	Fisher Scientific
		Menzel-Glaser

### 2. Линкеры и спейсеры

Олигонуклеотиды и НК можно иммобилизовать непосредственно на поверхность носителя, однако при этом могут возникать стерические затруднения для последующих реакций с биомолекулами, особенно в случае использования планарных носителей (мембран и слайдов). Для их преодоления иммобилизацию проводят через линкеры или спейсеры, которые выносят лиганд на некоторое расстояние от поверхности носителя и тем самым делают его более доступным для последующих взаимодействий.

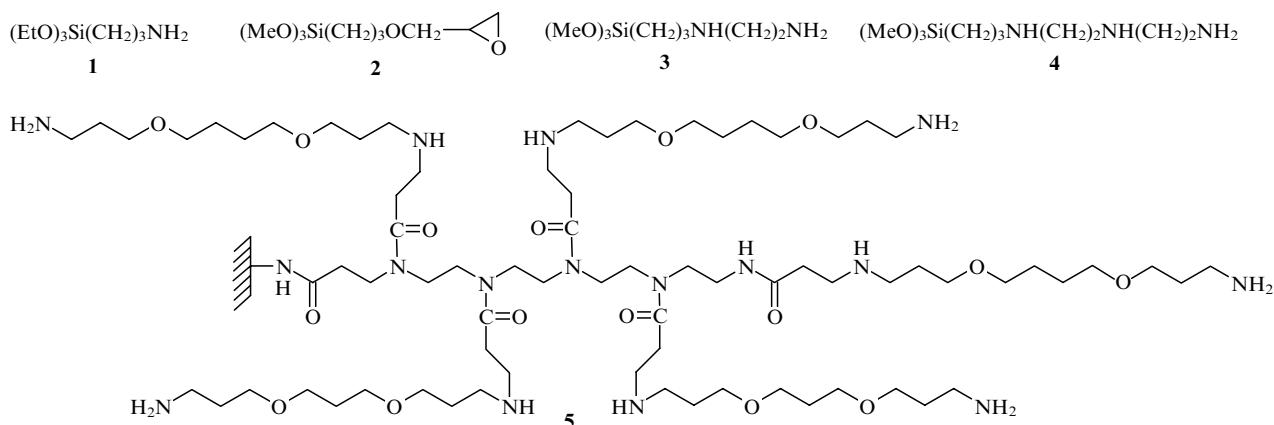
Без линкера иммобилизация происходит при использовании практически всех физических методов (УФ-облучения, высушивания и адсорбции на поверхности), а также при синтезе олигонуклеотидов непосредственно на стекле<sup>1</sup> или на аминированном полипропилене.<sup>2</sup> Однако чаще всего иммобилизацию проводят, используя спейсеры, предварительно введенные в олигонуклеотид и/или на поверхность носителя.<sup>3–40</sup> Чем более удалены иммобилизованные лиганды от поверхности носителя, тем они более доступны для реакции с молекулами в растворе. Наиболее часто роль линкера выполняют линейные алифатические цепи, содержащие различное число звеньев 1,6-гексаметилендиамина, 6-аминокапроновой кислоты, этиленгликоля. Помимо длины большую роль играет природа линкера, поскольку от этого может зависеть неспецифическая сорбция. С целью предотвращения неспецифической сорбции используют цепочки линкеров, состоящих из гидрофильных молекул: алифатических спиртов, например 1,3-диаминопропан-2-ола, или аминокислотных остатков. Гидрофильные линкеры любой длины можно сконструировать из амидофосфитов различных диолов<sup>8</sup> или поочередным присоединением 1,3-диаминопропан-2-ола и бромуксусной кислоты.<sup>9,10</sup> Обычно линкеры присоединяют к носителю теми же методами, что и лиганды. Силикагель и стекло предварительно модифицируют 3-аминопропилтриэтоксисиланом (1),<sup>11–13</sup> 3-глицидил-

Таблица 2. Носители для иммобилизации лигандов.

Функциональные группы носителей	Лиганд	Группы носителя, формируемые после иммобилизации лигандов	Фирменное название носителя	Фирма-производитель
$-\text{CONHNH}_2$	LCHO	$-\text{C}(\text{O})\text{NHN}=\text{CHL}$	Affi-Gel Hz gel, Affi-Prep Hz support Agarose adipic acid hydrazide Carboxymethylcellulose hydrazide 3M Emphaze hydrazide biosupport Hydrazide beads Polyacrylamide hydrazide Polyacrylhydrazidoagarose	Bio-Rad Pharmacia Sigma, Supelco Pierce Pierce, Sigma, Supelco Sigma, Supelco Pierce Pierce
$-\text{OC}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{HgCl}$	LSH	$-\text{OC}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{HgSL}$	Immobilized <i>p</i> -chloromercurebenzoate gel Affi-Gel 501 gel	Pierce Bio-Rad
$-\text{OCH}_2\text{CHCH}_2\text{SS}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}$	LSH	$-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SSL}$	Thiopropyl-activated Agarose Sephadose 6B Thiogalose	Sigma, Supelco Pharmacia, Sigma, Supelco ICN
$-\text{O}_\text{C}=\text{NCHCONHCHSS}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{C}$	LSH	$-\text{O}_\text{C}=\text{NCHCONHCHSSL}$	Activated thiolsepharose 4B	Pharmacia, Supelco
$-\text{O}_\text{C}=\text{NCHCONHCHSS}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{C}$	CO <sub>2</sub> H	$-\text{O}_\text{C}=\text{NCHCONHCHSSL}$	Immobilized TNB-thiol	Pierce
$-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{CH}_2)_3\text{SS}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$	LSH	$-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{CH}_2)_3\text{SSL}$	UltaLink iodoacetyl Bromoacetylagarose Bromoacetylcellulose	Pierce ICN, Calbiochem Sigma
$-\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{I}(\text{Br})$	LSH	$-\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{SL}$	Cyanogen bromide-activated Agarose, Sephadose 6M B Sephadose 4B	Sigma, Supelco Fluka, Sigma, Supelco, Pharmacia
$-\text{O}_\text{C}=\text{NH}$	LNH <sub>2</sub>	$-\text{O}_\text{C}=\text{NL}$	Epoxy-activated Agarose Sephadose 6B Eupergit C Oxirane acrylic beads Polymercarrier VA-epoxy	Pierce, Sigma, Supelco Pharmacia, Sigma, Supelco Rohm Pharma, Supelco Sigma Riedel-de Haen PerSeptive Biosystem Supelcosil epoxy 540 Toyopearl AF-epoxy-650M
$-\text{OCH}_2\overset{\text{O}}{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2$	LOH LNH <sub>2</sub>	$-\text{OCH}_2\overset{\text{OH}}{\text{C}}\text{HCH}_2\text{XL}$ $\text{X} = \text{O, NH}$	POROS 20 EP Supelcosil epoxy 540 Toyopearl AF-epoxy-650M	Supelco Supelco, Tosoh Co.

Таблица 2 (окончание).

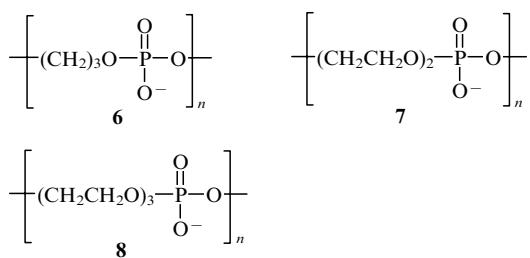
Функциональные группы носителей	Лиганд	Группы носителя, формируемые после иммобилизации лиганда	Фирменное название носителя	Фирма-производитель
	LNH <sub>2</sub>	—OC(O)NHL	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide-activated Agarose	Sigma, Supelco Fluka, Sigma, Supelco
			CH-Sepharose	Pharmacia
	LNH <sub>2</sub>	—OC(O)NHL	Sephadose, Superoxose Affi-Gel, Affi-Prep support Nitrophenyl-activated Agarose	Bio-Rad Sigma, Supelco
	LNH <sub>2</sub>	—OC(O)NHL	Carbonyldiimidazole(CDI)-activated Agarose	Sigma, Supelco IBF Biotechnics
			Trisacryl GF-200, TSK HW-65F Reacti-Gel (6X, GF-2000, HW-65F) Supports	Pierce
	LSH LNH <sub>2</sub>	—CH <sub>2</sub> XL X = NH, S	Tosyl-activated Agarose	Pierce, Sigma, Supelco Dynal Inc.
	LSH LNH <sub>2</sub>	—CH <sub>2</sub> XL X = NH, S	Tresyl-activated Agarose	Pierce, Schleicher & Schuell, Sigma, Supelco
	LNH <sub>2</sub>	—OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHL	Toyopearl AF-tresyl-650M Aldehydagarose	Tosoh Co. Sigma



оксипропилтреметоксисиланом (2),<sup>3,4,13–15</sup> *N*-(2-аминоэтил)-3-аминопропилтреметоксисиланом (3), дигильтриметоксипропилтреметоксисиланом (4)<sup>16</sup> или другими триалкоксисиланами.<sup>17–21</sup> Количество сайтов для иммобилизации может быть существенно увеличено при использовании разветвленных линкеров — дендримеров (5).<sup>22</sup>

На коммерчески доступные носители (см. табл. 2), имеющие относительно короткие линкеры (2–11 звеньев), иммобилизуют олигонуклеотиды с линкерами (3–11 звеньев), присоединенными к их 5'- (см.<sup>7,23–28</sup>) или 3'-концевым<sup>15,29</sup> фосфатам, по апуриновым сайтам,<sup>30</sup> к аминогруппе 5-метилдезоксицитидина,<sup>31,32</sup> к атому C(5) дезоксиуридина<sup>33–36</sup> или к атому C(8) дезоксиаденозина.<sup>37</sup>

Относительно влияния длины линкера на гибридизационные свойства иммобилизованных олигонуклеотидов в настоящее время нет единого мнения. В работах<sup>6,16</sup> отмечают, что с увеличением длины линкера гибридизационные свойства иммобилизованных олигонуклеотидов возрастают. Авторы работ<sup>8,38,39</sup> полагают, что для эффективной гибридизации необходимо подобрать оптимальную длину спейсера. Используют также линкеры (6–8), состоящие из различного числа повторяющихся звеньев.<sup>8</sup>



Наибольшая эффективность гибридизации достигается при  $n = 8–10$  для всех трех типов звеньев. Это означает, что выход продуктов гибридизации определяется не только длиной линкера, но и его структурой (в данном случае, возможно, числом отрицательных зарядов). Максимальное увеличение выхода продуктов гибридизации (в 150 раз по сравнению с выходом в отсутствие спейсера) наблюдали для линкеров 7 и 8 при  $n = 8$ . При дальнейшем увеличении числа звеньев гибридизационные свойства ухудшаются, и при  $n = 25–30$  выход продуктов гибридизации становится таким же, как и в отсутствие линкера.

Однако в работе<sup>40</sup> было показано, что длина линкера между полиакриламидным носителем и олигонуклеотидом не влияет на стабильность образующегося дуплекса. С этим фактом согласуются результаты работ, перечисленных выше, а также работ, посвященных секвенированию ДНК с помощью гибридизации на олигонуклеотидных микрочипах.<sup>41–47</sup> Очевидно, оптимальная длина линкера зависит от многих факторов — природы носителя, лиганда, самого линкера, и ее нужно подбирать экспериментально для каждой конкретной задачи. Следует лишь отметить, что если иммобилизацию на гранулированные носители, как правило, можно проводить, используя короткие линкеры, или обходиться вовсе без них, то для пленок и слайдов требуется более длинные линкеры.

Иногда для увеличения расстояния между поверхностью носителя и иммобилизируемым олигонуклеотидом носитель удлиняют, вводя дополнительные цепочки из тимидиновых звеньев (например, олиго(dT)<sub>1–400</sub>)<sup>17,19,48,49</sup> или незначимые олигонуклеотидные последовательности, как в носителе 9.<sup>7,18</sup>

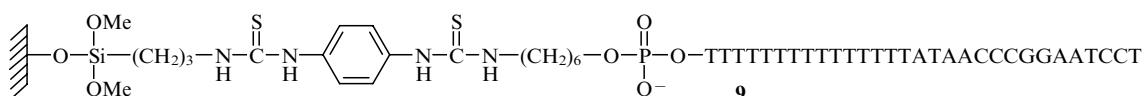
### III. Химические методы иммобилизации нуклеиновых кислот

Иммобилизация НК путем образования ковалентной связи с полимерными носителями происходит при взаимодействии имеющихся или дополнительно введенных функциональных групп олигонуклеотида с реакционноспособными группами носителя. В данном обзоре химические методы образования ковалентной связи между лигандом и полимером разделены на две следующие большие группы.

1. Иммобилизация функционализированных и/или активированных НК на нуклеофильные носители.

2. Иммобилизация НК на носители, имеющие электрофильные группировки.

Необходимо учесть, что функциональные группы природных НК (гидроксильные группы рибозы, остатки фосфорной кислоты, а также гетероциклические основания НК<sup>50</sup>) могут проявлять нуклеофильные свойства и вступать в реакции с электрофильными группами полимера. В результате таких реакций возникают многочисленные точки связывания лигандов с носителями, что приводит к потере полноценного взаимодействия иммобилизованных НК с биомолекулами. Для того чтобы этого избежать, НК модифицируют введением дополнительных функциональных групп, более реакционноспособных, чем функциональные группы природных НК.



## 1. Иммобилизация функционализированных и активированных нуклеиновых кислот на нуклеофильные носители

Иммобилизация НК и их фрагментов на носители, имеющие на своей поверхности нуклеофильные группы, такие как гидроксильные, тиольные или аминогруппы, возможна только при предварительной активации функциональных групп лиганда (рис. 1).

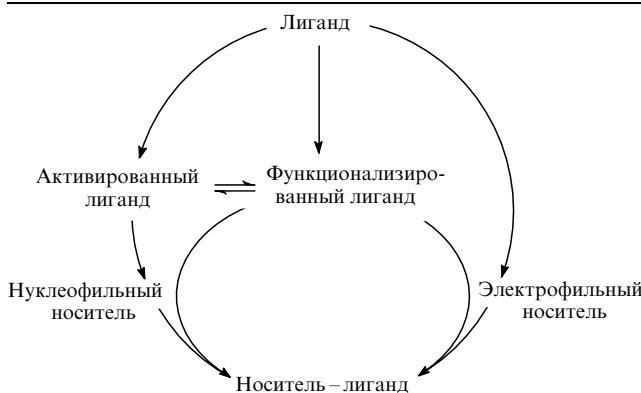


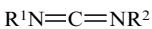
Рис. 1. Химические методы иммобилизации лиганда.

Введение различных функциональных групп в поли- и олигонуклеотиды рассматривают в ряде работ и обзоров.<sup>51–53</sup> Чаще всего постсинтетическое введение дополнительных функциональных групп осуществляют по концевым фосфатным группам, используя реагенты, которые в меньшей степени затрагивают остальные функциональные группы НК. Для этой цели часто используют карбодиимиды, аренсульфохлориды, хлорангидрид мезитиленкарбоновой кислоты и др.<sup>54–58</sup> Образующиеся активные производные олигонуклеотидов неустойчивы, и сразу после получения их используют для введения в олигонуклеотиды дополнительных функциональных групп или для непосредственной иммобилизации на носителе.

### а. Активация нуклеиновых кислот карбодиимидами

Присоединение НК с помощью карбодиимидов **10a–c** — один из ранних методов получения аффинных сорбентов, который до сих пор остается достаточно распространенным.<sup>50–64</sup> В основе метода лежит способность карбодиимидов активировать либо карбоксильные группы полимеров, либо концевую фосфатную группу НК. Активированные карбодиимидом олигонуклеотиды легко вступают в реакцию с амино- или сульфидрильными группами носителей. Несколько хуже идут реакции с гидроксилсодержащими носителями.

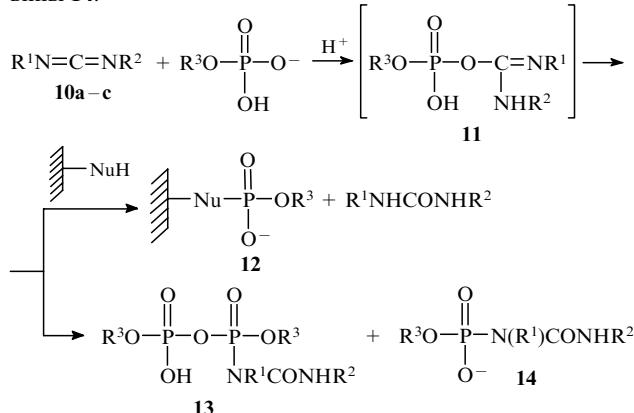
Карбодиимидный метод был применен для иммобилизации моно-, олиго-, полидезоксирибонуклеотидов и ДНК как в органических растворителях с использованием дциклогексилкарбодиимида (**10a**),<sup>50–62</sup> так и в водной среде с помощью водорастворимых карбодиимидов: 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (**10b**)<sup>13, 18, 24, 25, 65, 66</sup> или *n*-толуолсульфоната 1-циклогексил-3-[2-(*N*-метилморфиний)этил]карбодиимида (**10c**).<sup>25, 67</sup>



$\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{cyclo-C}_6\text{H}_{11}$  (**a**);  $\text{R}^1 = \text{Et}$ ,  $\text{R}^2 = \text{Me}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3$  (**b**);

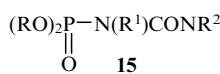
$\text{R}^1 = \text{cyclo-C}_6\text{H}_{11}$ ,  $\text{R}^2 = \left[ \text{O} \text{---} \text{N}(\text{Me})(\text{CH}_2)_2 \right]^+ [\text{SO}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{Me}-4]^-$  (**c**).

К настоящему времени достаточно подробно изучен механизм активации карбодиимидами фосфатных групп олигонуклеотидов и выявлен ряд побочных процессов.<sup>68–73</sup> Лимитирующей стадией реакции является протонирование карбодиимидов с образованием промежуточных неустойчивых реакционноспособных производных *O*-фосфорилизомочевины **11**.<sup>74</sup> Достаточно сильноосновные нуклеофильные группы носителя могут ингибировать эту стадию. Кроме того, протонированные нуклеофильные группы не способны вступать в реакцию с соединениями **11**. Вследствие этого выход конечного продукта **12** при использовании полимеров с высокосильными группами может уменьшиться. Замещенные *O*-фосфорилизомочевины **11** способны также трансформироваться в побочные продукты, например гидролизоваться с высвобождением исходной фосфатной группы и мочевины, либо претерпевать ряд последовательных превращений с образованием пирофосфатов, полифосфатов и производных *O*-фосфорилизомочевины.<sup>75</sup> Последние, в свою очередь, могут дать нереакционноспособные производные *N*-пирофосфорилмочевины **13**<sup>75, 76</sup> или *N*-фосфорилмочевины **14**.<sup>66, 77–79</sup>

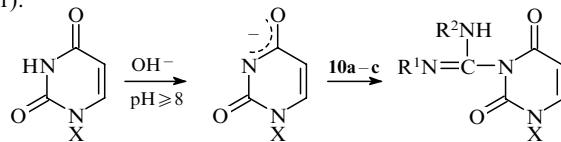


$\text{R}^3$  — остаток олигонуклеотида;  $\text{NuH} = \text{NH, SH, OH}$ .

В процессе активации олигонуклеотидов карбодиимидами наряду с образованием соединений **11–14** наблюдается модификация межнуклеотидных фосфатных групп<sup>76, 79</sup> и гетероциклических оснований.<sup>69, 80</sup> В случае олигодезоксирибонуклеотидов реакция по межнуклеотидным фосфатам приводит к производным мочевины **15**,<sup>76</sup> а в случае олигорибонуклеотидов — к изомеризации и расщеплению межнуклеотидных связей.<sup>51, 81</sup>



В условиях активации карбодиимидом концевой фосфатной группы олигонуклеотида в щелочной среде ( $\text{pH} \geq 8$ ) возможно нуклеофильное присоединение образующегося аниона гетероциклического основания к двойной связи карбодиимида. Реакция идет по основаниям, содержащим в гетероциклическом ядре группировку  $\text{CONH}$ : в остатках урацила и тимина по атому  $\text{N}(3)$ , а в остатках гуанина — по атому  $\text{N}(1)$ .<sup>69</sup>



$\text{X}$  — остаток олигонуклеотида.

Чтобы ускорить лимитирующую стадию, повысить выход конечного продукта **12** при иммобилизации олигонуклеотидных производных **11** и избежать модификации

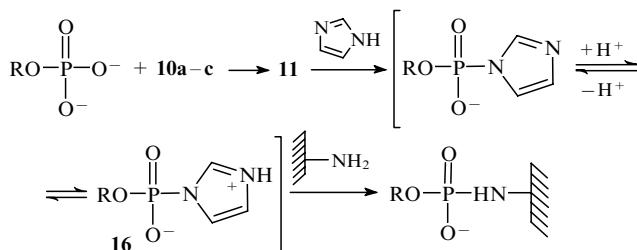
карбодиимидами межнуклеотидных фосфодиэфирных групп и гетероциклических оснований, реакцию проводят в слабокислой среде ( $\text{pH } 4.25-5$ ).<sup>80</sup> В этом случае преимущественно происходит взаимодействие активированной карбодиимидом концевой фосфатной группы олигонуклеотида с амино-, тиольными или гидроксильными группами на поверхности носителя.

Селективность и эффективность иммобилизации олигонуклеотидов несколько повышается после введения по их 5'-фосфатной группе линкера с концевой карбоксильной группой,<sup>18, 82</sup> которая после активации карбодиимидом реагирует с аминогруппами носителя.

Существует и обратный подход, когда с помощью карбодиимидов активируют карбоксильные группы полимера (см. раздел III.2). В этом случае иммобилизация нуклеотидов и олигонуклеотидов на носителе проходит по аминогруппам гетероциклических оснований или линкеров, предварительно присоединенных к 3'- (см.<sup>66, 83</sup>) или 5'- (см.<sup>25, 84</sup>) концевым фосфатам олигонуклеотидов.

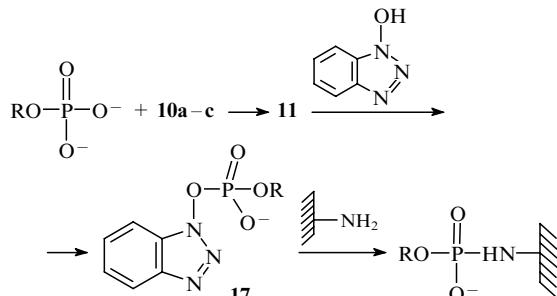
Нуклеиновые кислоты и олигонуклеотиды иммобилизованы карбодиимидным методом практически на все доступные носители (целлюлозу, сефарозу,<sup>59-63, 72, 85</sup> Sephadyl,<sup>23, 65, 67</sup> Sephadex,<sup>23, 73, 85</sup> на носителе на основе диоксида кремния (см.<sup>12, 18, 64, 65, 86, 87</sup>) и на разнообразные мембранные<sup>66, 82, 83, 88</sup>). Кроме широко распространенных носителей, применяют магнитные носители (частицы магнетита, покрытые полистиролом)<sup>25</sup> и латексные микросфера (полистирольные частицы, образующие коллоидные суспензии).<sup>24</sup> Полученные сорбенты используют в гибридизационном анализе<sup>12, 13, 18, 23, 25, 66, 67</sup> и аффинной хроматографии.<sup>63, 89</sup>

Для увеличения эффективности иммобилизации нуклеотидов на полимер активацию карбодиимидами проводят в присутствии нуклеофильных катализаторов — имидазола, триазола или тетразола, образующих соответствующие фосфамиды олигонуклеотидов,<sup>24, 25, 65, 73, 88</sup> которые после протонирования остатков азота являются высокореакционноспособными соединениями по отношению к нуклеофилам. Чаще всего получают фосфоимидазолиды **16**.<sup>88, 90, 91</sup>



R — остаток олигонуклеотида.

Добавление в реакционную смесь вместо нуклеофильных катализаторов соединений с повышенной кислотностью гидроксильных групп, таких как *N*-гидроксисукцинимид или *N*-гидроксибензотриазол, приводит к образованию активированных эфиров нуклеиновых кислот **17**.<sup>73, 92</sup>

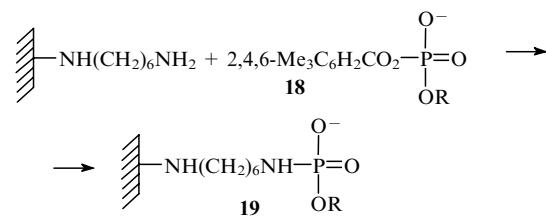


R — остаток олигонуклеотида.

Преимуществом последних двух подходов является отсутствие ряда побочных реакций, поскольку производные **16** и **17** стабильнее, чем *O*-фосфорилмочевины **11**. Соединения **16** и **17** более эффективно взаимодействуют с аминогруппами носителя, что способствует увеличению выхода при иммобилизации.

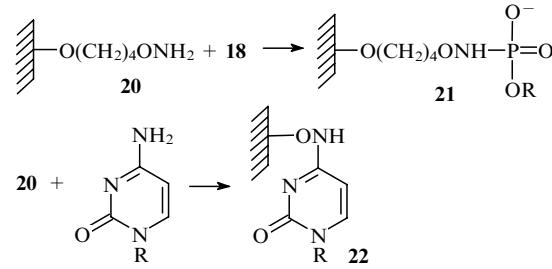
## 6. Активация нуклеиновых кислот хлорангидридом мезитиленкарбоновой кислоты

Высокая реакционная способность хлорангидрида мезитиленкарбоновой кислоты по отношению к концевой и межнуклеотидным фосфатным группам обеспечивает быстрое образование соответствующих смешанных ангидридов. При этом в водных средах сохраняется только смешанный ангидрид **18**, полученный с участием концевого фосфата.<sup>93, 94</sup> Его используют для иммобилизации дезоксирибонуклеиновых кислот на полимеры, несущие аминогруппы. В водной среде иммобилизация происходит посредством образования фосфамидной связи между концевой 5'-фосфатной группой олигонуклеотида и первичной аминогруппой носителя (продукт **19**).<sup>57, 95</sup>



R — остаток олигонуклеотида.

В работе Шумянцевой и Хомутова<sup>96</sup> олигонуклеотид **18**, активированный хлорангидридом мезитиленкарбоновой кислоты, иммобилизовали на аминооксибутилцеллюлозу **20**. Получившийся при этом аффинный сорбент **21** устойчив только при  $\text{pH } 7.0$  в силу высокой лабильности алcoxамида связи. Помимо этого зарегистрировано присоединение олигонуклеотидов к полимеру **20** по аминогруппам цитидина с образованием продуктов **22**, вероятнее всего, за счет реакции переаминирования в водной среде.<sup>56, 94</sup>

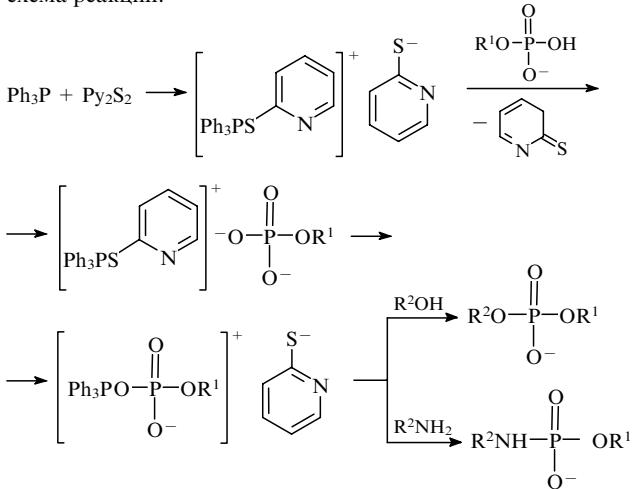


R — остаток олигонуклеотида.

Данный метод не получил широкого распространения, хотя TMP, AMP, CMP, d(pT)<sub>3</sub>, d(pA)<sub>3</sub> и другие олигонуклеотиды<sup>57, 95, 96</sup> были иммобилизованы на полисахаридные носители с довольно хорошими выходами (0.05–0.15 ммоль нуклеотида на 1 г носителя). Существенными недостатками метода являются продолжительность стадии иммобилизации ( $> 3$  сут) и побочные реакции (образование пирофосфатов олигонуклеотидов, реакции по межнуклеотидным фосфатам и гетероциклическим основаниям олигонуклеотидов). Этот метод нельзя рекомендовать для иммобилизации рибоолигонуклеотидов и РНК, поскольку смешанные ангидриды на стадии активации стимулируют образование циклофосфатов, последующую изомеризацию и разрыв межнуклеотидных связей.<sup>93</sup>

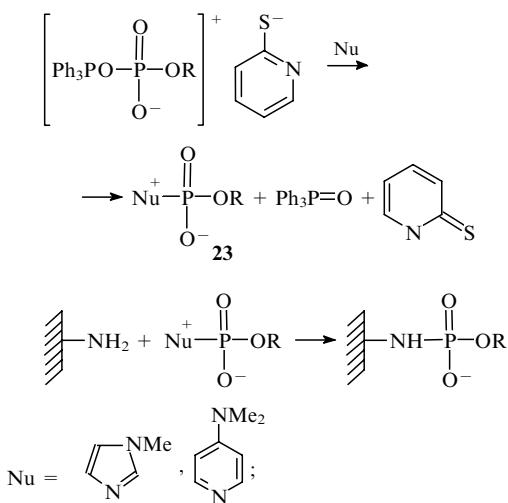
**в. Активация концевого фосфата олигонуклеотида окислительно-восстановительной парой трифенилfosфин–дипиридилдисульфид**

Впервые окислительно-восстановительная пара трифенилфосфин–дипиридилдисульфид ( $\text{Py}_2\text{S}_2$ ) была использована Мукайямой с сотр.<sup>97,98</sup> в качестве конденсирующего агента для синтеза пептидов и олигонуклеотидов. Предложена схема реакции.<sup>98</sup>



$\text{R}^1$  — остаток нуклеотида или олигонуклеотида;  $\text{R}^2$  = Alk, Ar.

Однако реакция олигонуклеотида с высокоосновными аминогруппами в присутствии пары  $\text{Ph}_3\text{P}-\text{Py}_2\text{S}_2$  протекает медленно и с низким выходом, что накладывает серьезные ограничения на ее использование. Детальное исследование этой системы в работах Зарытовой и соавт.<sup>99–102</sup> показало, что пара  $\text{Ph}_3\text{P}-\text{Py}_2\text{S}_2$  в присутствии нуклеофильного катализатора селективно активирует концевую фосфатную группу олигонуклеотидов с образованием цвиттер-ионных производных олигонуклеотидов **23**.



$\text{R}$  — остаток нуклеотида или олигонуклеотида.

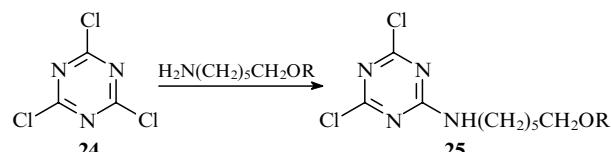
Следует подчеркнуть, что гетероциклические основания и межнуклеотидные фосфатные группы не участвуют в процессе активации, что предотвращает образование целого ряда побочных продуктов. Это позволяет также использовать данный подход для активации не только дезоксиолигонуклеотидов, но и их аналогов и, что особенно важно, рибоолигонуклеотидов без миграции межнуклеотидной связи  $\text{C}(3')-\text{C}(5')$ .

Активированные производные **23** быстро и практически количественно реагируют с первичными аминами с образованием фосфамидов олигонуклеотидов.<sup>100</sup> Если первичная аминогруппа находится на поверхности носителя, то активированный олигонуклеотид **21** может быть легко иммобилизован на поверхность.<sup>101,102</sup> Реакция иммобилизации протекает полностью за 2 ч в водной щелочной среде или в органических растворителях. До 97% исходного олигонуклеотидного материала связывается с носителем, что позволяет регулировать и заранее планировать емкость аффинных сорбентов. В качестве носителей может быть использован любой материал, но чаще всего применяют силикагель<sup>103–105</sup> или полиметакрилатные гели.<sup>101,106</sup> Полученные сорбенты с иммобилизованными олигонуклеотидами использованы для аффинной хроматографии НК-зависимых белков,<sup>101,106</sup> нуклеиновых кислот и их аналогов.<sup>102–105</sup> Пару  $\text{Ph}_3\text{P}-\text{Py}_2\text{S}_2$  можно рекомендовать для иммобилизации рибоолигонуклеотидов и РНК, поскольку она в отличие от известных конденсирующих реагентов (карбодиимида, аренсульфохлориды, хлорангидрид мезитиленкарбоновой кислоты и др.) не взаимодействует с межнуклеотидными фосфатами и нуклеофильными центрами гетероциклов и не дает соответствующих побочных продуктов.

**г. Активация нуклеиновых кислот бифункциональными реагентами**

Активация и последующая иммобилизация НК и их фрагментов может быть осуществлена с помощью бифункциональных реагентов. Реакции с участием бисоксиронов, дисукцинимидилкарбоната, карбонилдиимидазола, глутарового альдегида будут подробно рассмотрены в разделе III.2.

К бифункциональным реагентам можно отнести 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазин (**24**), который взаимодействует с первичной аминогруппой спейсера, введенного в олигонуклеотид в процессе его синтеза.<sup>27</sup>

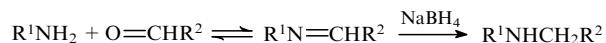


$\text{R}$  — остаток олигонуклеотида.

Триазиновые производные олигонуклеотидов **25** стабильны по крайней мере в течение одной недели при 4°C, и могут быть иммобилизованы на любые носители, имеющие амино- (см.<sup>6,27</sup>) или тиольные группы.<sup>6</sup> Полученные сорбенты имеют низкую неспецифическую сорбцию белков и НК и стабильны в условиях гибридизационного анализа.<sup>27,107</sup>

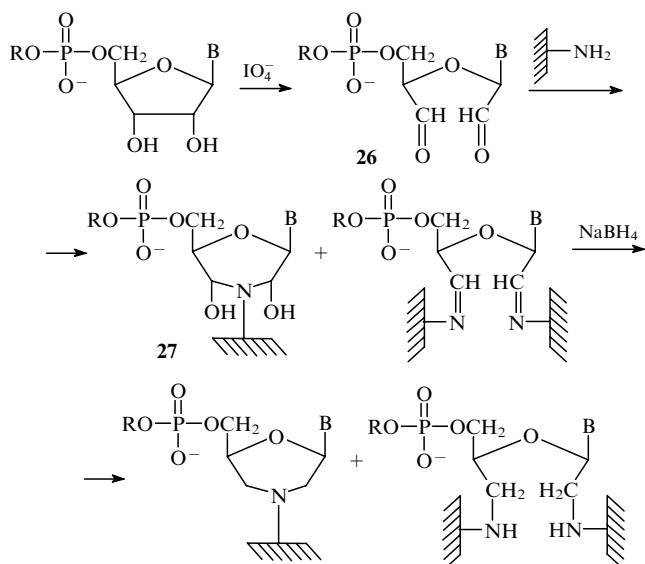
**д. Восстановительное аминирование с использованием нуклеиновых кислот и олигонуклеотидов, содержащих альдегидные группы**

В основе метода восстановительного аминирования лежит хорошо известная реакция альдегидов и кетонов с первичными аминами с образованием оснований Шиффа. Восстановление основания Шиффа боргидридом натрия дает стабильные вторичные амины.



Для иммобилизации с использованием этого метода в НК и олигонуклеотидах должны присутствовать альдегидные группы. Эта задача легко решается в случае рибоолигонуклеотидов, РНК, а также дезоксиолигонуклеотидов, несущих на 3'-конце рибо-звено. *цикло*-Диольную группировку

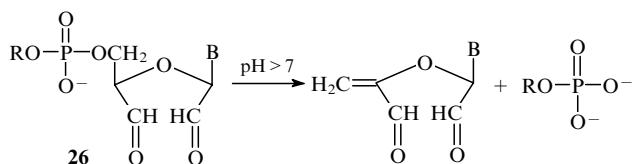
в концевом остатке рибозы можно избирательно окислить периодатом натрия. Образующиеся альдегидные группы в соединениях **26** способны взаимодействовать с носителями, содержащими на поверхности амино-<sup>108–111</sup> и гидразидные<sup>112–114</sup> группы.



R — рибоолигонуклеотид, РНК или дезоксиолигонуклеотид;  
B — гетероциклическое основание.

В ходе реакции могут образоваться как продукты взаимодействия диальдегида с одной аминогруппой носителя — производные морфолина **27**,<sup>50, 52</sup> так и бисаддукты. Поскольку производные типа **27** устойчивы только при  $\text{pH} > 9$ , а уже при  $\text{pH} < 8$  происходит отщепление фосфата по механизму  $\beta$ -элиминирования, их сразу после получения восстанавливают бор- или цианоборгидридом натрия.

Выход продуктов иммобилизации может понижаться также за счет того, что в щелочной среде в продуктах периодатного окисления **26** может происходить  $\beta$ -элиминирование с разрывом 5'-связи C—O и отщеплением модифицированного нуклеозида с 3'-конца РНК.<sup>50</sup>



Иммобилизация на носители, содержащие гидразидные группы, проходит с более высоким выходом, а гидразоны можно не обрабатывать восстановителями, поскольку они более стабильны, чем азометины.<sup>29</sup> Следует, однако, отметить, что связь олигонуклеотида с носителем за счет полученной после восстановления алифатической аминогруппы более стабильна,<sup>29</sup> чем связь за счет гидразиногруппы.

С помощью восстановительного аминирования с хорошими выходами осуществлена иммобилизация всех моно-, ди- и трифосфатов рибонуклеозидов<sup>114–118</sup> на целлюлозу и агарозу (сефарозу), модифицированные амино- или гидразидными группами. Полученные сорбенты использованы для аффинной хроматографии с целью выделения белков, например миозинов,<sup>118</sup> и факторов элонгации Tu и Ts.<sup>110</sup> Восстановительное аминирование является основным методом иммобилизации рибонуклеотидов. Осуществлено присоединение к полисахаридным носителям полиривонуклеотидов поли(A), поли(U) после окисления в них *cis*-гликольной группировки.<sup>111, 115, 119</sup> Среди множества работ по иммобилизации РНК этим методом<sup>112, 116, 119–121</sup> нужно отметить

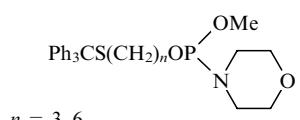
работы<sup>115, 117, 122, 123</sup>, в которых рибосомные РНК ковалентно присоединяли к гидразид-агарозе и затем на ней очищали и выделяли рибосомные белки. Иммобилизованные тРНК на полисахаридных матрицах<sup>111, 115, 124</sup> использованы для очистки аминоацил-тРНКситетаз.<sup>125–128</sup>

В последнее время в связи с развитием методов олигонуклеотидного синтеза появились работы, в которых специально синтезируют олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие концевое рибонуклеозидное звено. 3'-*cis*-Гликольную группировку в нем окисляют и используют для иммобилизации олигодезоксинуклеотида на носитель.<sup>29, 64, 129, 130</sup> Полученные этим методом аффинные носители широко применяют для гибридизационного анализа и секвенирования ДНК.<sup>42, 43, 45, 131–133</sup>

Иммобилизация НК и их фрагментов с помощью восстановительного аминирования может быть осуществлена также путем введения альдегидных групп на носители. Можно синтезировать полимеры практически любой природы с активными альдегидными группами. Методы их получения будут рассмотрены в разделе III.2.и.

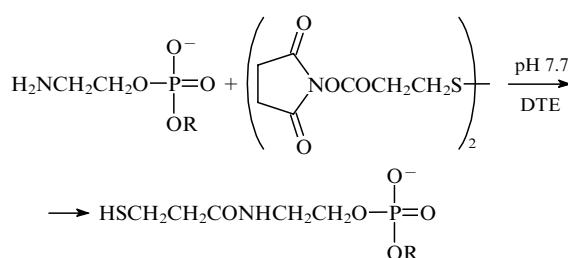
#### е. Иммобилизация нуклеиновых кислот, содержащих тиольные группы

Введение химически активных тиольных групп в НК и их фрагменты<sup>53</sup> позволяет с помощью некоторых стандартных методов специфично иммобилизовать лиганды, например, на носители с эпоксигруппами (раздел III.2.б) или на носители с активным атомом галогена (раздел III.2.д).<sup>134</sup> Могут быть применены некоторые специальные методы. Тиольные группы могут быть введены на последней стадии амидофосфитного синтеза олигонуклеотида, например с помощью коммерчески доступных фосфорилирующих реагентов — амидофосфитов *S*-защищенных меркаптоспиртов.<sup>49, 134, 135</sup>



После удаления всех защитных групп (в том числе и тритильной) с помощью нитрата серебра получается олигонуклеотид, имеющий тиольную группу на 5'-конце.<sup>49, 135</sup> Тиольные группы могут быть введены в 3'-конец олигонуклеотида либо на начальной стадии синтеза,<sup>16, 136</sup> либо в выделенный олигонуклеотид ферментативно с использованием АТР, содержащего  $\gamma$ -тиольную группу.<sup>137</sup>

Альтернативным является метод, в котором в концевую 5'-фосфатную группу олигонуклеотида предварительно вводят легко модифицируемую алифатическую аминогруппу.<sup>90</sup> В результате взаимодействия аминогруппы спейсера деблокированного олигонуклеотида с 3,3'-дитиобис-*N*-(пропионилоксисукцинимидом в присутствии восстановителя дисульфидной связи (дитиоэритрит (DTE), дитиотреит (DTT), цистein или меркаптоэтанол) образуется олигонуклеотид с тиольной группой.



R — остаток олигонуклеотида; DTE — дитиоэритритол.

SH-Олигонуклеотиды можно селективно через образование дисульфидных связей иммобилизовать на твердые подложки, содержащие тиольные группы. Тиольные группы олигонуклеотидов перед иммобилизацией могут быть активированы 2,2'-дипиридилидисульфидом.<sup>6</sup>

В том случае, когда носители и олигонуклеотиды содержат неактивированные тиольные группы, образование дисульфидной связи между НК и носителем происходит под действием окислителей ( $I_2$  или  $H_2O_2$ ).<sup>49</sup> В качестве подложек могут быть использованы широко распространенные полисахаридные носители, стекло CPG,<sup>90</sup> частицы магнетита, покрытые кремнийсодержащим полимером (Biomag),<sup>49</sup> полиакриламид (Trisacryl, Sephacryl)<sup>28</sup> и полиметакрилат.<sup>6</sup> Благодаря легкости образования и разрушения дисульфидных связей под действием окислителей и восстановителей, тиосорбенты наиболее часто используют для обратимой иммобилизации олигонуклеотидов с тиольными группами.

Иммобилизация предварительно очищенных SH-олигонуклеотидов проходит быстро и специфично. Получающиеся сорбенты обладают достаточной стабильностью и чистотой для применения в гибридизационном анализе<sup>28, 49, 90</sup> и для очистки ДНК-зависимых белков.<sup>137</sup> Следует отметить, однако, что при их хранении могут возникать проблемы из-за неустойчивости тиольных групп к окислению. Со временем в таких олигонуклеотидах образуются межмолекулярные дисульфидные связи и появляются побочные продукты. Ниже (см. раздел III.2.е) будет рассмотрена иммобилизация SH-олигонуклеотидов на активированные или функционализированные носители.

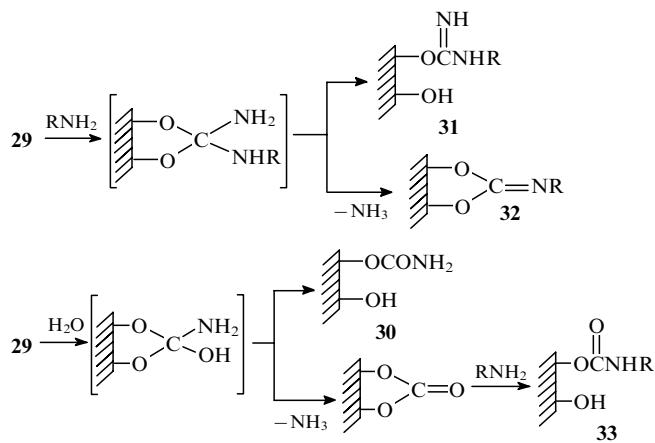
## 2. Иммобилизация нуклеиновых кислот на электрофильные носители

Нативные, немодифицированные НК и их фрагменты иммобилизуют на функционализированные и активированные носители. К таким носителям можно также присоединить НК, которые содержат первичную алифатическую амино- или тиольную группу, введенную в процессе синтеза или после него. Ниже будут рассмотрены методы введения на поверхность носителей функциональных группировок, способных взаимодействовать с соответствующими группами лиганда.

### а. Активация носителей бромцианом

Метод активации носителей, содержащих гидроксильные группы, галогенцианами был предложен в 1967 г. для иммобилизации белков и пептидов.<sup>138</sup> Активацию, как правило, проводят бромцианом при  $pH$  10–11.<sup>139–141</sup> Образующийся при активации лабильный цианат **28** при взаимодействии со свободной гидроксильной группой носителя превращается в циклический активный имидокарбонат **29** и неактивный карбамат **30**.<sup>142, 143</sup> Большой вклад в развитие этого метода внес Куатрекасас,<sup>144</sup> который подобрал условия иммобилизации различных лигандов, в том числе и НК.<sup>145</sup>

В начале 1970-х годов этот метод начали широко использовать для иммобилизации НК.<sup>84, 139, 140, 146–150</sup> Присоединение НК происходит по аминогруппам гетероциклических оснований полинуклеотида. Таким способом осуществлена иммобилизация полиуридилиловой,<sup>147, 149</sup> полиаденилиловой<sup>139</sup> кислот и РНК.<sup>84, 141, 150</sup> Непрореагировавшие активные



группы носителя после иммобилизации НК блокируют обработкой 1 М раствором аминоэтанола.

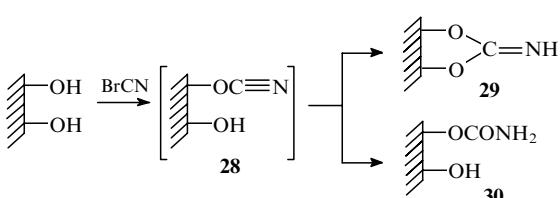
Показано, что при иммобилизации одноцепочечной ДНК в растворе 4-морфолинетансульфоновой кислоты (0.2 моль·л<sup>-1</sup>,  $pH$  8) в формамиде<sup>139, 145</sup> основными продуктами реакции являются производные изомочевины **31**, в меньшем количестве образуются *N*-замещенные имидокарбонаты **32** и карбаматы **33**.

Чаще всего этот метод используют для иммобилизации одноцепочечных ДНК<sup>139, 140, 146, 151, 152</sup> и РНК,<sup>84, 139, 141, 150</sup> при этом удается получать носители, обладающие не только большой емкостью, но и высокой специфичностью, несмотря на то, что с активированными носителями реагируют аминогруппы гетероциклов. Однако сорбенты с присоединенными короткими олигонуклеотидами обладают слабыми аффинными свойствами, поскольку группы  $NH_2$  гетероциклических оснований, вовлеченные в образование ковалентной связи с полимером, не могут участвовать в комплексообразовании.

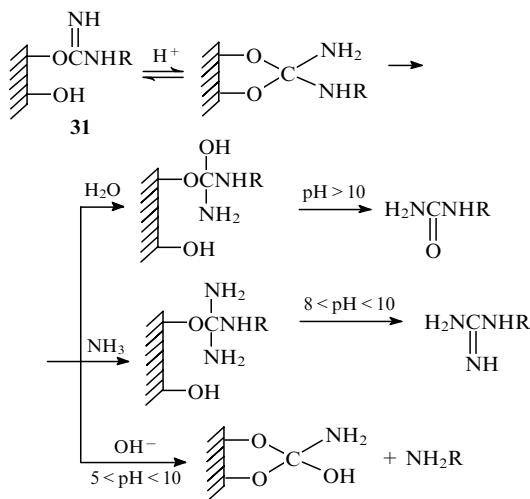
Намного избирательнее происходит иммобилизация поли- и олигонуклеотидов на активированные бромцианом носители при введении линкеров с алифатическими первичными аминогруппами в 5'- или 3'-конец нуклеотидной цепи<sup>54–58, 153</sup> или в межнуклеотидную фосфатную группу.<sup>154</sup> Однако и в этих случаях наблюдается частичная иммобилизация лиганда по гетероциклическим основаниям.<sup>155</sup>

Моно-, ди- и трифосфаты нуклеозидов, такие как AMP,<sup>156, 157</sup> ADP,<sup>158, 159</sup> ATP,<sup>160</sup> UMP,<sup>58, 161</sup> GTP<sup>58</sup> и dCp<sup>4</sup> (см.<sup>162</sup>), были иммобилизованы на сепарозу, активированную бромцианом (все нуклеотиды имели алифатическую первичную группу  $NH_2$ , введенную в фосфатные группы или гетероциклические основания). С помощью таких сорбентов были очищены рибонуклеотидредуктаза фага T4,<sup>160</sup> кэп-связывающийся белок<sup>163</sup> и дезоксинуклеотид киназа из *Lactobacillus*.<sup>162</sup>

Необходимо отметить недостатки метода. Во-первых, образующиеся при активации бромцианом реакционные группы недостаточно устойчивы, поэтому иммобилизация лиганда должна быть осуществлена немедленно после активации носителя. Во-вторых, бромциан — токсичное вещество. В-третьих, основные изомочевинные группы носителя **31** ( $pK_a = 9.5$ ), образующиеся при реакции с первичным амином, при физиологических значениях  $pH$  заряжены положительно, что придает таким аффинным сорбентам нежелательные анионообменные свойства. Кроме того, в этом случае получается много побочных продуктов, а место связывания нуклеотидов однозначно определить нельзя. С течением времени происходит постепенное отщепление лиганда от полимерного носителя.<sup>113, 146, 164</sup> Показано,<sup>153</sup> что аффинные сорбенты, которые получали иммобилизацией на бромцианцеллюзу олиготимидилатов, содержащих аминогруппу на 5'-конце, стабильны в водных условиях в течение



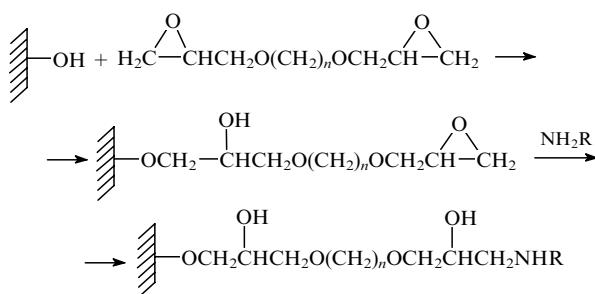
недели при 22°C и только в течение одного дня при 42°C. Это, скорее всего, вызвано нестабильностью *N*-замещенных производных изомочевины **31**.<sup>143</sup>



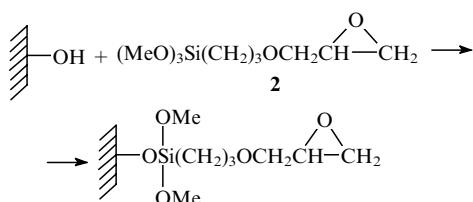
Однако, несмотря на перечисленные недостатки, этот метод широко используют для иммобилизации ДНК, РНК и синтетических олигонуклеотидов<sup>165–170</sup> с целью получения аффинных сорбентов для выделения и очистки ДНК-зависимых белков.

#### 6. Активация носителей оксиранами

Бифункциональные оксираны были сначала предложены для введения реакционноспособных групп на полимерные носители и одновременно для стабилизации гелей поперечной сшивкой.<sup>171</sup> Наиболее часто гидроксильные группы носителя активируют диглицидиловым эфиром бутан-1,4-диола при pH > 7.<sup>37, 172, 173</sup> При этом получается полимер с реакционноспособными эпоксигруппами, которые, в свою очередь, могут реагировать с нуклеофильными группами лигандов.

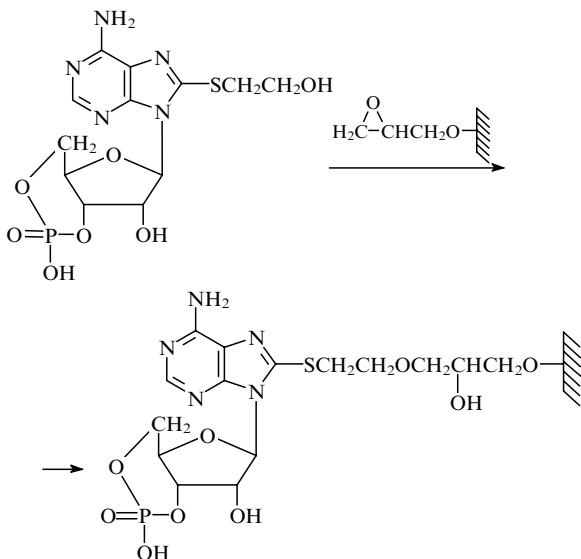


Для получения носителей с эпоксигруппами используют также эпихлоргидрин.<sup>78, 107, 114</sup> В последнее время наиболее часто эпоксигруппы вводят не на полисахаридные носители, а на силикагель<sup>3, 174</sup> и стекло,<sup>15, 175</sup> при этом используют триметоксисиланы **2**.



Как правило, иммобилизация лигандов, содержащих амино-, гидрокси- или другие нуклеофильные группы, на

носители с эпоксигруппами протекает легко в течение 8–20 ч при 20–25°C и значениях pH 9–13. Непрореагировавшие эпоксигруппы блокируют обработкой раствором амино-этанола (1 моль·л<sup>-1</sup>). Таким способом проведено ковалентное присоединение полинуклеотидов и ряда ДНК.<sup>37, 172, 173, 176</sup> Эффективность связывания полинуклеотидов изменялась в ряду поли(dT) > поли(dC) = поли(dA) > поли(dG).<sup>172</sup> Поскольку в нуклеотидах содержится много функциональных групп, точное место связывания полинуклеотидов определить трудно, и его не всегда указывают.<sup>172, 173</sup> Например, считают,<sup>37</sup> что иммобилизация С(8)-гидроксизилтиопроизводного cyclo-AMP на полимер, содержащий эпоксигруппы, происходит путем связывания с концевой гидроксильной группой.

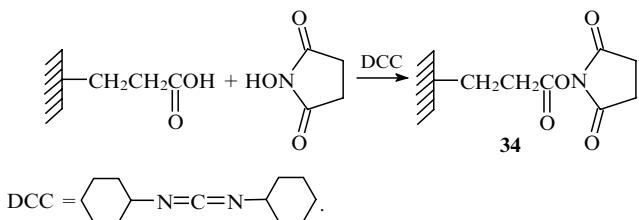


Показано, что в концентрированном (2.7 моль·л<sup>-1</sup>) растворе фосфата калия иммобилизация олигодезоксирибонуклеотидов идет преимущественно с участием пуриновых оснований.<sup>177</sup> Этот метод иммобилизации имеет практически единственный недостаток — неопределенность места связывания нуклеиновых кислот — и одновременно ряд преимуществ перед другими методами. Применение протяженного бисоксиранового реагента обеспечивает введение длинной не несущей заряда гидрофильной «ножки» между лигандом и поверхностью полимера, что особенно полезно при хроматографии больших биомолекул. Аффинные сорбенты, полученные на таких носителях, весьма устойчивы (так как лиганд присоединен через простую эфирную связь), и на них не происходит неспецифической сорбции биополимеров.<sup>15, 171</sup> Иммобилизация биологически активных лигандов на механически прочный силикагель, содержащий эпоксигруппы, позволяет получать сорбенты для высокоэффективной аффинной хроматографии. Однако следует иметь в виду, что некоторые носители нестабильны в щелочной среде, в которой происходит иммобилизация этим методом.

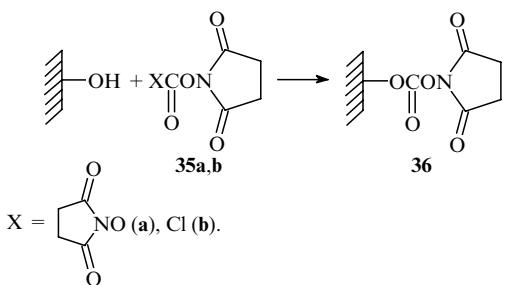
#### в. Носители с *N*-гидроксисукциниimidной группой

Идея использования эфиров *N*-гидроксисукциниимида в качестве активных групп носителей для образования амидной связи с первичными аминогруппами лигандов была высказана и реализована в работах, посвященных синтезу пептидов.<sup>178, 179</sup> Хорошая растворимость *N*-гидроксисукциниимида в воде и органических растворителях позволяет применять его для активации поверхности разнообразных полимеров.

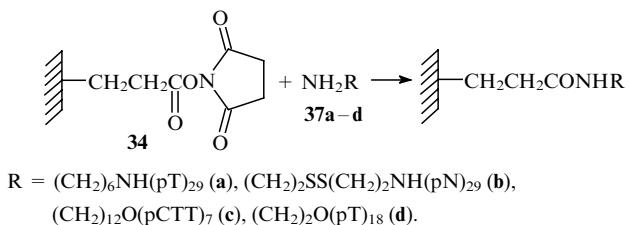
Носители, содержащие группировку эфира *N*-гидроксисукциниимида **34**, получают при модификации полимеров с концевыми карбоксильными группами *N*-гидроксисукциниимида в присутствии дициклогексилкарбодиимида (DCC) в абсолютных растворителях.<sup>26, 180</sup>



Для активации носителей с гидроксильными или аминогруппами используют бифункциональные реагенты — *N,N'*-дисукциниимилилкарбонат (**35a**) или *N*-сукциниимилилхлорформиат (**35b**).<sup>22, 181</sup>



Эфиры *N*-гидроксисукциниимида **34** и **36** в буферных растворах (pH 7.5–9) быстро образуют прочную амидную связь при взаимодействии с олигонуклеотидами **37a–d**, содержащими аминоалкильную группу на 5'-концевом фосфате, или с олигонуклеотидами, содержащими аминоалкильную группу в гетероциклическом основании.

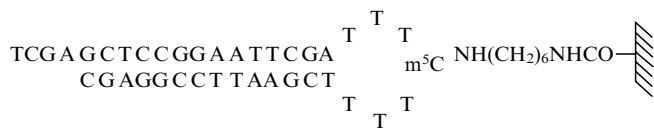


В работе<sup>65</sup> было показано, что иммобилизация 29-звенного олигонуклеотида идет преимущественно по 5'-NH<sub>2</sub>-группе 5'-аминогексилфосфамида (**37a**). Хуже идет иммобилизация по аминогруппе 5'-цистаминилфосфамида (**37b**), а по гетероциклическим основаниям протекает в незначительной степени. К сожалению, емкость аффинного сорбента, полученного таким способом, в самом лучшем случае не превышает 1 нмоль·г<sup>-1</sup>, по-видимому, из-за быстрого гидролиза активированного эфира **34**. Эффективность иммобилизации бывает выше в безводных средах, когда конкурентная реакция гидролиза сведена к минимуму.

Непрерагировавшие с лигандом группы активированного носителя **36** постепенно гидролизуются до исходного материала, в то время как при гидролизе концевых групп на поверхности носителя **34** образуются карбоксильные группы, которые могут придавать аффинному сорбенту ионнообменные свойства.

Интересный подход к иммобилизации двухцепочных фрагментов ДНК на сефарозу, активированную *N*-гидроксисукциниимида, предложен в работах<sup>31, 182</sup>. Авторы синтези-

ровали 39-звенный олигонуклеотид со шпилькой и в гетероциклическое основание петли шпильки ввели остаток 1,6-диаминогексана, по аминогруппе которого олигонуклеотид и был присоединен к полимеру.



Далее с помощью ДНК-лигазы могут быть присоединены любые двухцепочные фрагменты ДНК, имеющие соответствующие липкие концы.

Носители с иммобилизованными поли- и олигонуклеотидами использованы для гибридизационного анализа<sup>21, 22, 183</sup> и аффинной хроматографии.<sup>7, 26</sup> Так, на сефарозе с иммобилизованным аминосодержащим олигонуклеотидом (СТТ)<sup>7</sup> **37c** была выделена плазмида pXL2563 с GAA-участками за счет образования между ними триплекса;<sup>7</sup> на колонке с силикагелем СРГ с иммобилизованным 5'-аминоэтилоктадекатимидатом (**37d**) успешно разделена смесь аденилатов A<sub>12</sub>–A<sub>18</sub>.<sup>26</sup>

#### г. Диазотированные носители

Реакция азосочетания давно привлекает внимание исследователей, работающих в области иммобилизации нуклеотидов, поскольку введение на носитель ароматических аминогрупп происходит в мягких условиях. Способы получения носителей с ароматическими аминогруппами представлены на схеме 1.<sup>144, 184–186</sup> Чаще всего их получают восстановлением соответствующих ароматических нитросоединений.<sup>187</sup> Ароматические аминогруппы диазотируют в кислой среде нитритом натрия.

Иммобилизация нативных нуклеиновых кислот на диазотированные носители, такие как **38a–d** (см. схему 1), происходит исключительно по гетероциклическим основаниям.<sup>25, 67, 184</sup> Введение спейсерных групп в олигонуклеотиды, например остатков фенола в 5'-фосфатную группу, позволяет добиться преимущественной (до 87%) иммобилизации с участием данной группы.<sup>188</sup>

Азосочетание представляет собой реакцию электрофильного замещения, в которой атакующим агентом является ион диазония. За ходом реакции легко наблюдать по окрашиванию носителя. Примером может служить иммобилизация 5'-AMP (**39**) с участием атома C(8) гетероциклического основания на агарозу, содержащую диазогруппы.<sup>189</sup>

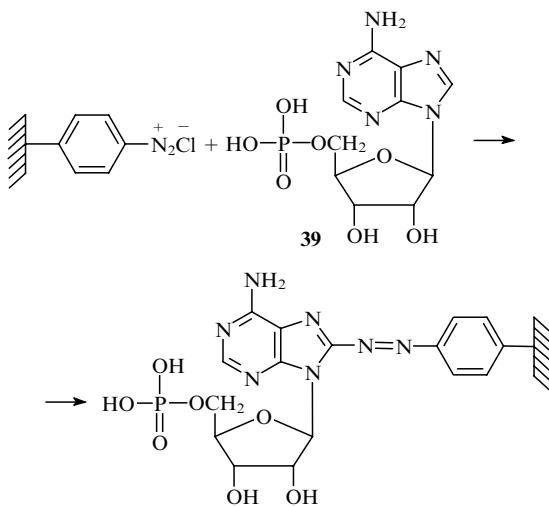
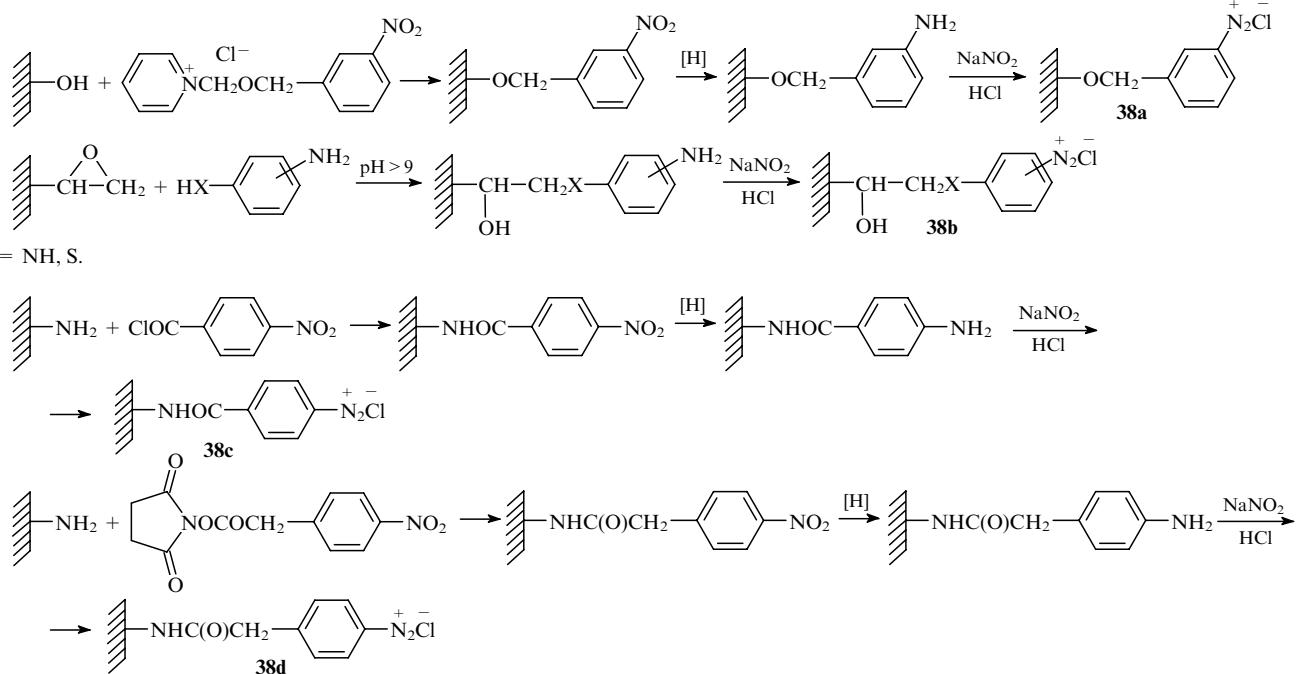
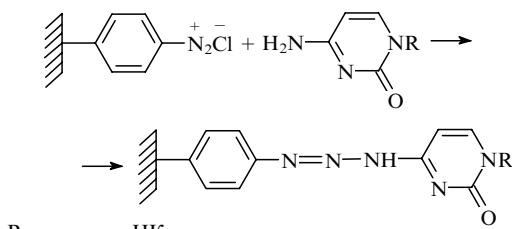


Схема 1



Одновременно с реакцией азосочетания может проходить реакция соли диазония с аминогруппами гетероциклических оснований с образованием диазоаминосоединения.<sup>190</sup>



R — остаток НК.

Кроме реакций солей диазония с гетероциклическими основаниями нуклеиновых кислот, могут протекать также побочные реакции с водой (при этом образуются фенолы) и ароматическими аминогруппами, которые всегда имеются на поверхности носителей, содержащих диазогруппы. Если реакция азосочетания протекает медленно, то образование фенола и сшивание полимерного носителя могут стать основными процессами.<sup>185</sup>

Ароматические диазосоединения неустойчивы; их разложение происходит при повышении температуры и действии света. Поэтому обычно диазотированные носители используют сразу после получения. Их можно также обработать NaBF<sub>4</sub> или NaPF<sub>6</sub> и получить более устойчивые тетрафторбораты или гексафтормонфосфаты.<sup>185</sup>

Иммобилизованные этим методом денатурированные ДНК и РНК чаще всего использовали в гибридизационном анализе.<sup>184, 185, 191</sup> Хорошие результаты гибридизации были достигнуты при применении носителей 38b (см. схему 1), имеющих диазофенилтиоэфирные группы.<sup>140</sup> В работе<sup>192</sup> иммобилизованную циклическую ДНК использовали в качестве матрицы в асимметричной полимеразной реакции.

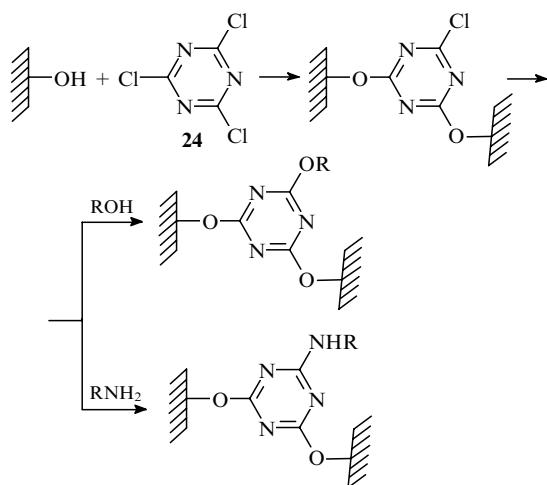
Эффективность метода иммобилизации на диазотированных носителях оценивается разными авторами по-разному: от 795 мкг нуклеотида на 1 г носителя<sup>146</sup> до следовых количеств.<sup>25</sup> Аффинные сорбенты, полученные азосочетанием, нестабильны. До 50% иммобилизованной ДНК теряется в течение двух-трех дней при 45°C, причем это

происходит независимо от природы сорбента.<sup>146</sup> Преимуществом диазосоединений является низкая неспецифическая сорбция на них биополимеров.

Чаще всего для иммобилизации ДНК используют целлюлозу или бумажные фильтры с диазогруппами, однако было показано, что лучшим полимером для такой иммобилизации является Sephadryl.<sup>67</sup> Были опробованы магнитные носители, но не очень успешно.<sup>25</sup>

#### д. Носители с активными атомами галогена

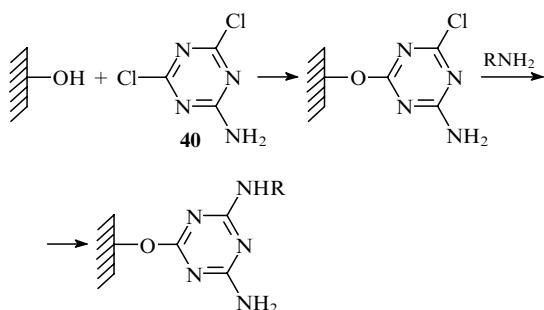
Активация олигонуклеотидов 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазином (24) была рассмотрена в разделе III.1.г. В этом разделе будет описано получение активированных 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазином носителей и иммобилизация на них лигандов, а также представлены результаты исследования реакций полинуклеотидов и НК с немодифицированными полисахаридами (целлюлозой и декстраном) в присутствии 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазина (24),<sup>107</sup> в которых можно проводить последовательное замещение атомов хлора.



R — остаток НК или олигонуклеотида.

При проведении активации в щелочной среде два атома хлора способны замещаться на гидроксильные группы носителей, что приводит к присоединению триазина к полимерам. При этом третий атом хлора остается непрореагировавшим и может быть замещен амино- или гидроксигруппами присоединяемого лиганда.<sup>193, 194</sup> Показано, что иммобилизация ДНК при помощи 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазина протекает в основном по аминогруппам гетероциклических оснований.<sup>107</sup> В итоге многоточечное связывание ДНК и олигонуклеотидов с носителем делает лиганд менее доступным для взаимодействия с комплементарными полинуклеотидами в растворе. Иммобилизация олигонуклеотидов, содержащих линкер с аминогруппой, протекает избирательно по введенной в 5'-конец аминогруппе.<sup>107, 194</sup> Однако даже в этом случае из-за малой доступности атома хлора триазинсодержащего носителя выход продуктов присоединения невелик.

С целью увеличения эффективности и селективности метода было предложено использовать для активации носителей 2-амино-4,6-дихлор-1,3,5-триазин (**40**).<sup>142, 193</sup>

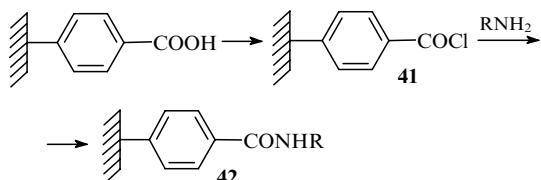


R — остаток олигонуклеотида.

Наличие аминогруппы в триазине **40** уменьшает чувствительность к нуклеофильной атаке атома хлора в положении 6 и тем самым предотвращает сшивание полимера. Оставшийся атом хлора может реагировать только с сильными нуклеофилами, например с алифатической аминогруппой спейсера, введенного в олигонуклеотид.<sup>193</sup>

Триазинактивированные полимеры достаточно устойчивы при повышенной температуре, а при 4°C могут храниться в течение нескольких недель. На сорбентах с иммобилизованными ДНК или поли(U) были выделены не только белки, но и комплементарные цепи НК.<sup>193</sup> Токсичность триазина ограничивает применение этого метода.

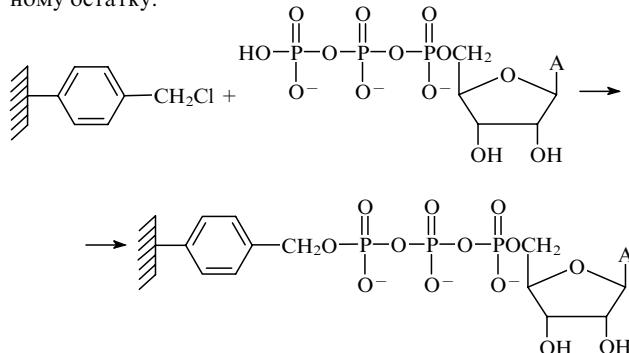
Карбоксильные группы лавсановой пленки (полиэтилен-терефталата) достаточно легко можно превратить в галогенангидридные при взаимодействии с  $\text{PCl}_3$ ,  $\text{PCl}_5$ ,  $\text{POCl}_3$ ,  $\text{SOCl}_2$ ,  $(\text{COCl})_2$  в присутствии ДМФА.



R — остаток НК или олигонуклеотида.

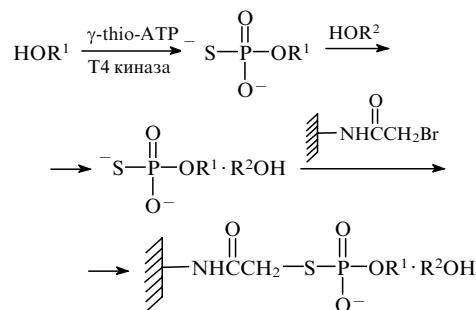
Полимеры **41**, содержащие галогенангидридные группы, реагируют с нуклеофильными группами лигандов. Иммобилизация в безводных условиях идет преимущественно по первичным аминогруппам спейсера, введенного по 5'-концевым фосфатным группам олигонуклеотидов.<sup>195</sup> Стабильность образовавшейся амидной связи обеспечивает устойчивость сорбентов **42**. Полученные этим методом пленки с иммобилизованными олигонуклеотидами были успешно применены в гибридизационном анализе.<sup>196</sup>

Иммобилизацию лигандов можно проводить на хлорметилированный сополимер стирола и дивинилбензола. Таким способом 5'-АТР был присоединен по концевому трифосфатному остатку.<sup>197</sup>



A — остаток аденина.

Из коммерчески доступных носителей, имеющих активные атомы галогена, наибольшее распространение получила галогеннацетилагароза (см. табл. 2). Этот сорбент устойчив к гидролизу, поэтому иммобилизация может проходить в водных буферах. Наилучшие результаты получены при иммобилизации олигонуклеотидов, имеющих тиольные группы. В работе  $^{137}\text{SH}$ -содержащий олигонуклеотид, полученный с помощью Т4 киназы и  $\gamma$ -тио-АТР, для предотвращения возможной иммобилизации по гетероциклическим основаниям гибридизовали с комплементарной цепью. Образовавшийся дуплекс затем присоединяли к бромацетилагарозе. Иммобилизация проходила исключительно по 5'-концевой тиофосфатной группе олигонуклеотида. При необходимости комплементарная цепь может быть удалена.



R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> — остатки комплементарных олигонуклеотидов.

#### е. Активированные носители для иммобилизации SH-содержащих олигонуклеотидов

Иммобилизация НК и их фрагментов, имеющих тиольные группы, на носителе, содержащие эпоксигруппы, и на носителе с активным атомом галогена<sup>134</sup> описана в разделах III.2.б и III.2.д соответственно. Существуют также другие методы иммобилизации SH-содержащих лигандов.

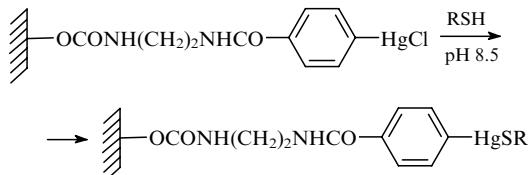
Олигонуклеотиды с тиольными группами через образование дисульфидных связей могут быть селективно иммобилизованы на твердые подложки, содержащие тиольные группы. Подложки предварительно обрабатывают *n*-хлор-



R — олигонуклеотид с алифатическим линкером.

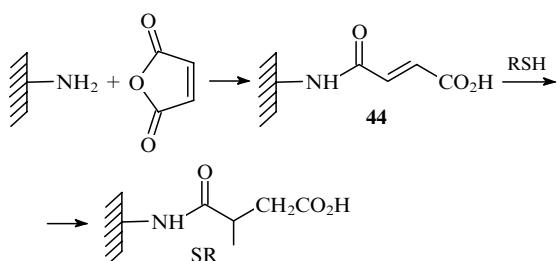
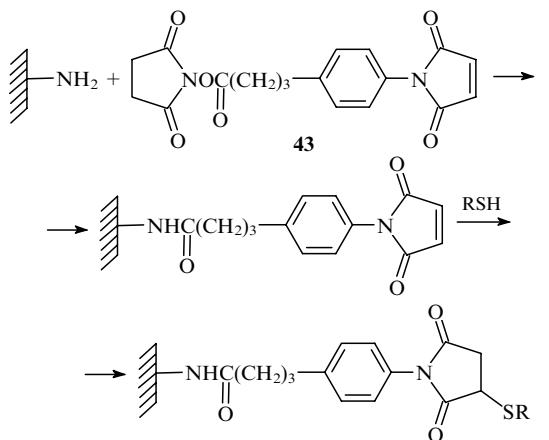
меркуриобензоатом, ди(4-нитро-3-этоксикарбонилфенил)-дисульфидом, 2,2'-дипиридилдисульфидом<sup>90,144</sup> или 2,2'-ди(5-нитропиридил)дисульфидом.

Повышенное средство ионов ртути к тиольным группам позволяет присоединять SH-содержащие олигонуклеотиды к модифицированным полимерам (например, к агарозе), имеющим группы  $\text{HgCl}_2^{90}$ .



R — олигонуклеотид с алифатическим линкером.

Еще одним методом, применяемым для иммобилизации SH-содержащих олигонуклеотидов, является реакция тиольных групп с остатками малеинимида, находящимися на поверхности носителя. Малеинимид с помощью сукцинимид-4-(малеинимидофенил)бутират (43) или малеинового ангидрида может быть иммобилизован практически на любые материалы, имеющие первичные аминогруппы.<sup>11, 16, 136</sup>

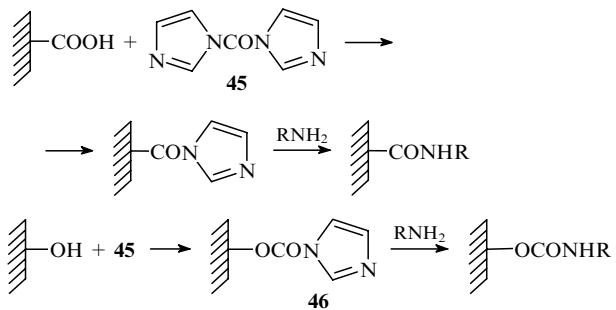


$B$  — остаток олигонуклеотида

Нуклеофильное присоединение SH-содержащих олигонуклеотидов к двойным связям носителя **44** проходит быстро (2 ч при 4°C) в водно-солевом буфере с образованием стабильной связи между носителем и олигонуклеотидом.

## ж. Активация носителей карбонилдимиидазолом

Гидроксильные и карбоксильные группы носителей могут быть легко активированы *N,N'*-карбонилдиimidазолом (45). Этот реагент, предложенный в свое время для пептидного синтеза,<sup>198</sup> успешно применяют для иммобилизации лигандов, содержащих первичную аминогруппу.<sup>199, 200</sup>

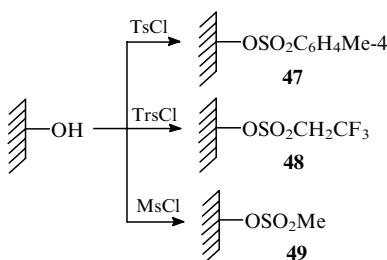


Активацию носителей проводят в безводной среде, условия для иммобилизации лиганда надо подбирать в каждом конкретном случае. В абсолютных растворителях из-за отсутствия конкурентного гидролиза присоединение лигандов происходит с большей эффективностью. Аффинные сорбенты, полученныеенным методом, достаточно устойчивы, поскольку образующаяся амидная связь между носителем и лигандом очень стабильна. Носитель **46** стабилен в абсолютных растворителях в течение нескольких лет. При его гидролизе время полупревращения составляет часы. Так, в водном буфере активированная агароза полностью теряет активность только через 30 ч при pH 8.5–9.<sup>200</sup> После отщепления CO<sub>2</sub> и имидазола носитель **46** переходит в исходный гидроксильный носитель без появления зарядов, что исключает проявление ионообменных свойств и неспецифическую сорбцию биомолекул. (Следует отметить, что при гидролизе носителей, активированных бромцианом или гидроксисукцинимидом, время полупревращения составляет несколько минут).

Однако, несмотря на описанные выше преимущества имидазольных носителей, иммобилизация, например (6-аминонекексил)fosфорил-dCTP и 5'-аминоалкилолигонуклеотидов, происходит с невысокими выходами.<sup>3,201</sup> Метод пока не нашел широкого применения для иммобилизации НК и их фрагментов.

### 3. Активация носителей сульфохлоридами

Органические сульфохлориды, такие как *n*-толуолсульфохлорид, 2,2,2-трифторэтансульфохлорид и метансульфохлорид, являются хорошими ацилирующими реагентами и превращают гидроксильные группы на носителе в активные сульфонаты, образуя носители **47**–**49**.<sup>202–204</sup>



TsCl = ClSO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Me-4, TrsCl = ClSO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, MsCl = ClSO<sub>2</sub>Me.

Иммобилизация олигонуклеотидов на носителе **48**<sup>205</sup> и **49**<sup>29</sup> проходит исключительно по аминогруппам спейсера, предварительно присоединенного к 5'- или 3'-концу олигонуклеотида. При отсутствии аминоспейсера иммобилизация проходит с меньшим выходом по гетероциклическим основаниям и концевым фосфатным группам олигонуклеотидов. Были отмечены<sup>29</sup> низкие выходы при иммобилизации на

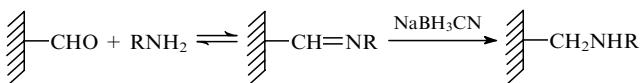
носители **49**, в то время как на основе полимеров **48** получаются аффинные сорбенты, обладающие достаточной емкостью, и их можно использовать для очистки ДНК-зависимых белков.<sup>205</sup> Остатки сульфокислот — хорошо уходящие группы: реакционная способность активированных носителей зависит от природы сульфоната и убывает в ряду  $\text{Trs} > \text{Ts} > \text{Ms}$ . Таким образом, носители **49** — самые устойчивые и наименее реакционноспособные. Носители **47**—**49** устойчивы в безводной среде. Они могут храниться несколько недель при  $4^\circ\text{C}$  в водном растворе  $\text{HCl}$  (1 моль  $\cdot \text{l}^{-1}$ ) без потери активности. Иммобилизация НК, содержащих тиольные или первичные аминогруппы, на активированные сульфонилхлоридами носители проходит путем нуклеофильного замещения остатка сульфокислоты с образованием стабильной связи между нуклеофилом и атомом углерода исходного носителя. Присоединение лиганда может быть осуществлено как в водной, так и в органической среде. Иммобилизация на более активные гели **48** происходит эффективно при нейтральных значениях  $\text{pH}$  и  $4^\circ\text{C}$ , в то время как иммобилизацию на носители **47** лучше проводить при  $\text{pH} 9$ — $11$ .<sup>204</sup>

#### и. Носители с альдегидной группой (восстановительное аминирование)

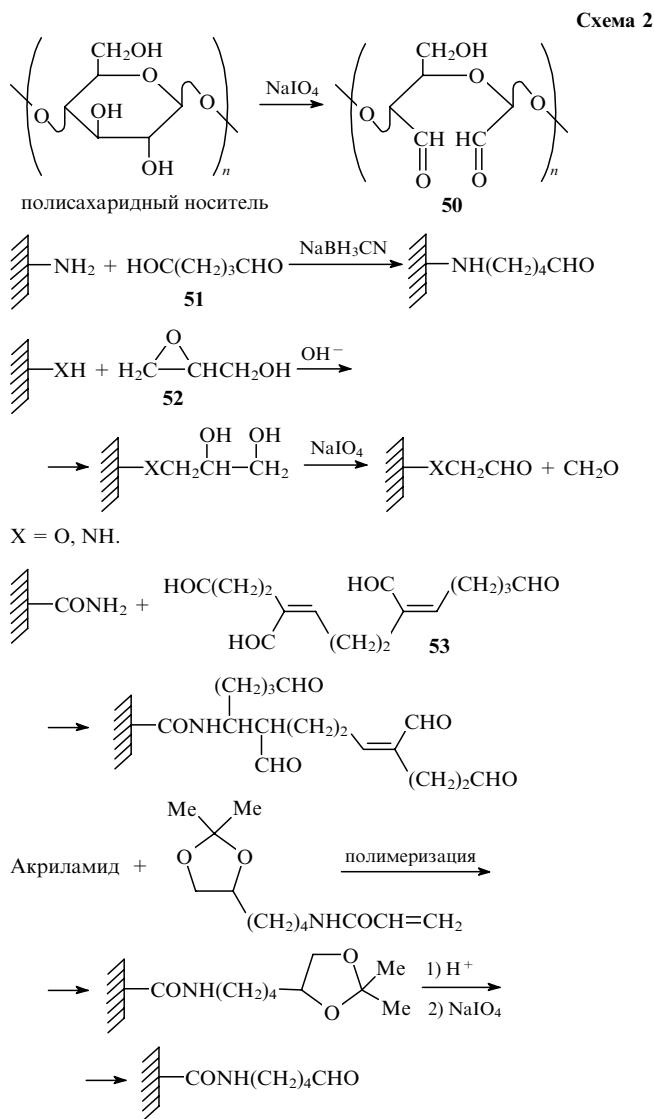
Иммобилизацию НК и их фрагментов с помощью восстановительного аминирования можно проводить двумя способами. Первый заключается во введении альдегидных групп в НК с последующей их иммобилизацией на носители, имеющие гидразидные или первичные алифатические аминогруппы (см. раздел III.1.д). Второй — в иммобилизации альдегидных групп на носителях, которые затем используют для иммобилизации НК по аминогруппам гетероциклических оснований или введенных спейсерных групп. В данном разделе рассмотрен второй способ.

Альдегидные группы могут быть введены на носители разными методами. Полисахаридные носители, имеющие диольные группы, окисляют периодатом натрия, в результате чего образуется модифицированный полимер **50** с высоким содержанием альдегидных групп. Носители, не имеющие гидроксильных групп, модифицируют глутаровым альдегидом (**51**), глицидолом (**52**), олигомером, имеющим альдегидные группы (**53**), или соединениями, которые в дальнейшем могут быть окислены периодатом. На схеме 2 приведены примеры получения носителей практически любой природы с активными альдегидными группами.

Альдегидные группы носителя легко образуют основания Шиффа с лигандами, имеющими первичные аминогруппы. Для восстановления оснований Шиффа используют  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  и комплекс пиридиния с бораном ( $\text{Ru} \cdot \text{BH}_3$ ). Последние два реагента быстро восстанавливают основания Шиффа, но, в отличие от боргидрида натрия, не восстанавливают альдегидные группы.<sup>29, 206</sup> Следует отметить также, что  $\text{NaBH}_4$  разрушается в кислой среде, в то время как  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  эффективно работает при  $\text{pH} 4$ — $10$ . Высокотоксичный  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  предложено заменять комплексом  $\text{Ru} \cdot \text{BH}_3$ .<sup>29</sup>



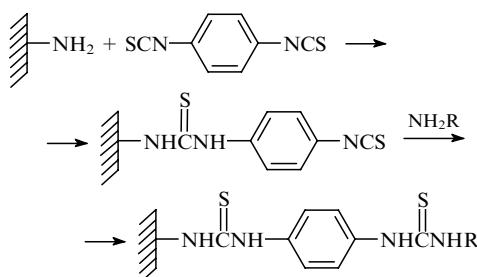
Олигонуклеотиды с введенными аминоспейсерами иммобилизуются на носителях с альдегидными группами с хорошими выходами, образуя прочные связи.<sup>11, 12, 29, 30</sup> Однако при этом происходит присоединение олигонуклеотидов по аминогруппам гетероциклических оснований. Особенно высокая неспецифическая иммобилизация была отмечена для носителей, активированных глутаровым альдегидом (**51**).<sup>29</sup>



С помощью глутарового альдегида (**51**) могут быть получены аффинные сорбенты с высоким содержанием НК. При этом происходит сшивка между первичными аминогруппами модифицированных полисахаридных носителей (аминоэтилцеллулозы,<sup>207</sup> аминогексилсесфарозы<sup>208</sup>) и гетероциклическими основаниями нуклеотидов и НК (НАД,<sup>208</sup> ДНК, РНК<sup>207</sup>). Большая концентрация лиганда на носителе достигается за счет дополнительных внутримолекулярных сшивок лиганда, что часто является недостатком, особенно для аффинной хроматографии.

#### к. Носители с изотиоцианатной группой

Изотиоцианатная группировка — еще одна функциональная группа, которая способна быстро реагировать с алифатическими первичными аминогруппами с образованием устойчивых производных тиомочевины. С помощью 1,4-фенилендиизоцианата могут быть активированы любые носители, имеющие первичные аминогруппы.<sup>17, 19, 22</sup> Иммобилизация олигонуклеотидов на изотиоцианатные носители проходит с хорошими выходами,<sup>17, 19</sup> при этом не наблюдается иммобилизация немодифицированных олигонуклеотидов.<sup>19, 22</sup> Непререагировавшие с лигандом группы активированного носителя постепенно гидролизуются до аминогрупп, которые могут придавать аффинному сорбенту ионообменные свойства.

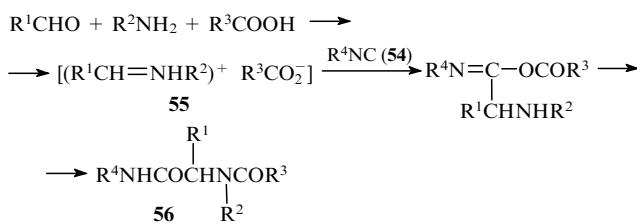


Для модификации поверхности стекол можно использовать 3-изотиоцианатопропилтриэтиоксисилен<sup>209</sup> или 1-(3-триметоксисилилпропил)-3-(4-изотиоцианатофенил)тиомочевину.<sup>19</sup> При этом в одну стадию получаются стекла с активными изотиоцианатными группами.

#### л. Четырехкомпонентная конденсация

Реакция Уги — это многокомпонентная конденсация, которая в мягких условиях приводит к образованию *N*-алкилированных амидов.<sup>171, 210–212</sup> К изоцианидам **54** присоединяются электрофильные соединения с кратными связями C=N по механизму  $\alpha$ -присоединения. На первой стадии реакции образуется соль иммона **55** с участием карбоновой кислоты, амина или альдегида (кетона), которая присоединяется к изоцианиду. Затем в результате внутримолекулярной реакции ацилирования, образуется конечный продукт **56**.

Три растворимых компонента реакции можно варьировать в зависимости от того, какие функциональные группы (изоцианидные,<sup>201</sup> карбоксильные, альдегидные или амино-группы<sup>212</sup>) имеются на поверхности носителя.



Пример использования реакции Уги для получения модифицированных носителей — реакция 5'-AMP с сефарозой, модифицированной 4,4'-диаминодифенилметаном, в присутствии циклогексилизоцианата и ацетальдегида.<sup>171, 212, 213</sup> В данном случае в роли аниона в соли иммона **55** вместо карбоксильной группы выступает остаток фосфорной кислоты 5'-AMP (схема 3).

В работе<sup>212</sup> наилучшие результаты (39 мг·г<sup>-1</sup>) были получены при иммобилизации РНК на сефарозу, содержащую аминогруппы. Метод не нашел широкого применения из-за побочных реакций, в которые вступают функциональ-

ные группы нуклеотидов с компонентами этой сложной системы.

#### IV. Иммобилизация нуклеиновых кислот в ходе твердофазного синтеза

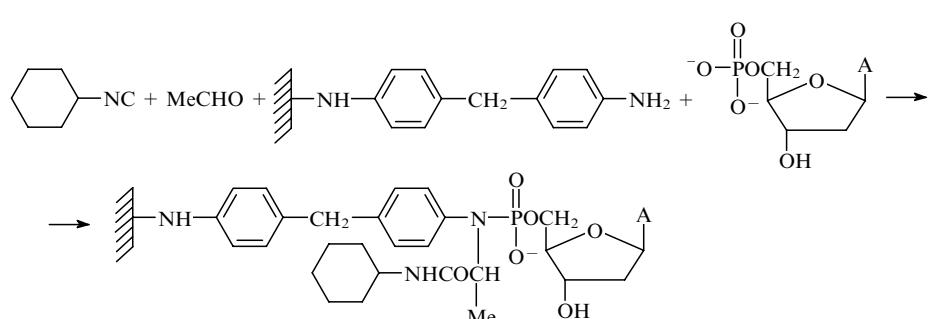
С развитием автоматических методов олигонуклеотидного синтеза появилась дополнительная возможность получения аффинных сорбентов с ковалентно присоединенными олигонуклеотидами. Носитель, на котором был осуществлен олигонуклеотидный синтез, используют в качестве аффинного сорбента. При этом исчезает необходимость сначала удалять нуклеотидный материал с носителя, а потом снова иммобилизовать его на нужный сорбент. Но вместе с тем пропадает и довольно важная стадия — очистка синтезированного олигонуклеотида и определение качества иммобилизованного материала.

Последний этап твердофазного синтеза олигонуклеотидов предусматривает удаление защитных групп с гетероциклическими основаниями и отщепление нуклеотидного материала от носителя с помощью обработки концентрированным аммиаком. Для того чтобы исключить возможность отщепления нуклеотидного материала в условиях снятия защитных групп, можно синтезировать олигодезокситимидилаты,<sup>214</sup> в которых защитные группы отсутствуют. Можно также использовать носители, содержащие первичные алифатические амино-<sup>8, 22, 215</sup> или гидроксильные<sup>1, 216–218</sup> якорные группы или же гидроксильные группы предварительно присоединенных нуклеозидов.<sup>31, 219</sup> После олигонуклеотидного синтеза на таких носителях между носителем и олигонуклеотидом образуется устойчивая к обработке аммиаком простая эфирная связь. Для синтеза аффинных сорбентов также можно использовать мономеры, содержащие гетероциклические основания с нестандартными защитными группами. Удаление этих групп происходит в более мягких условиях,<sup>220</sup> в которых не разрушается сложноэфирная связь между носителем и нуклеотидом.

Наряду с крупнопористым стеклом<sup>8, 31, 214, 216, 217, 220</sup> и стеклянными слайдами<sup>22</sup> в качестве носителей для синтеза олигонуклеотидов используют полиакрилмурфорид,<sup>31</sup> полипропилен,<sup>215</sup> силикагель<sup>31</sup> и тефлоновые сополимеры.<sup>216</sup> Аффинные сорбенты, полученные на основе этих носителей, демонстрируют хорошие гибридизационные свойства,<sup>8, 215, 217</sup> и с их помощью возможно выделение мРНК<sup>214</sup> и ДНК-специфичных белков.<sup>216</sup>

В обзоре<sup>218</sup> подробно анализируют преимущества и недостатки различных носителей, используемых для получения олигонуклеотидных библиотек (комбинаторный синтез). Наилучшим гранулированным носителем признан TentaGel (Rapp Polymere GmbH), представляющий собой полистирольные гранулы, покрытые поликсизиленом, и Merck-Gel (Merck KgaA) — частично гидролизованный поливинил-акетатный носитель. Емкость этих носителей по первому звену (нуклеозиду) составляет 120 и 700 мкмоль·г<sup>-1</sup> соответ-

Схема 3



A — остаток аденина.

ственno (это намного выше обычных  $30-50$  мкмоль·г $^{-1}$ ); при этом высокий выход в процессе наращивания олигонуклеотидной цепи сохраняется.

В последние годы развиваются также методы и соответствующая аппаратура для синтеза олигонуклеотидов на пленках и стеклянных слайдах, которые затем используют в качестве ДНК-чипов и ДНК-сенсоров (см. далее раздел VII.2.6).

## V. Другие методы иммобилизации нуклеиновых кислот

Физические и физико-химические методы начали применять для иммобилизации НК раньше, чем все остальные. В настоящее время наиболее широко используют адсорбцию, УФ-облучение и механическое включение в разнообразные гели.

Адсорбция ДНК на целлюлозу — очень простой и довольно распространенный метод, заключающийся в лиофильном<sup>221-223</sup> или обычном<sup>222,224</sup> высушивании целлюлозы, пропитанной раствором НК. Полученную этим методом ДНК-целлюлозу успешно используют для очистки ДНК-зависимых белков. Из-за нестабильности и легкой десорбции нуклеотидного материала при изменении температуры и в буферах с низкой ионной силой такая ДНК-целлюлоза не всегда пригодна для гибридизации НК. Однако нековалентная сорбция фрагментов ДНК на нитроцеллюлозные фильтры,<sup>225</sup> несмотря на недостатки (потеря нуклеотидного материала в ходе многостадийного гибридизационного анализа, хрупкость самой целлюлозы после обработки в вакууме), является очень распространенным методом приготовления образцов.

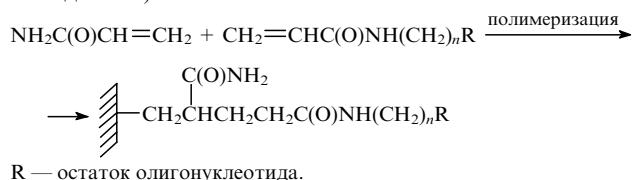
В настоящее время с развитием полимерразно-цепной реакции (ПЦР) и методов гибридизационного анализа появилась необходимость в быстрой иммобилизации фрагментов НК на поверхность всевозможных планшет. Адсорбцию олигонуклеотидов на такие поверхности проводят в присутствии солей в высокой концентрации (NaCl, хлорида тетраметиламмония) и(или) в присутствии катионных детергентов (бромида цетилtrimетиламмония, гидрохлорида октилдиметиламина).<sup>88,226-229</sup> Возможно, в этом случае иммобилизация происходит за счет гидрофобных взаимодействий молекул олигонуклеотида с поверхностью носителя.<sup>88</sup> В работе<sup>22</sup> отмечается, что адсорбция проходит далеко не на все поверхности, а только на те, которые обладают гидрофильными свойствами.<sup>226</sup> Несмотря на то, что механизм такой иммобилизации не вполне понятен, приготовленные этим методом образцы широко используют в гибридизационном анализе.<sup>88,227,228</sup>

Существуют методы, в которых стеклянные поверхности покрывают полизелектролитными пленками; на них происходит сорбция ДНК или полинуклеотидов за счет ионообменных взаимодействий.<sup>230,231</sup>

Нуклеиновые кислоты, а также их фрагменты могут быть иммобилизованы на разнообразные носители при облучении их УФ-светом.<sup>155,222,223,232-235</sup> Побочные процессы, протекающие при этом в лигандах, проходят в незначительной степени и не мешают использовать полученные системы для аффинной хроматографии ферментов и белков.<sup>222,232,234</sup> Применение специально приготовленных светочувствительных носителей — целлюлозы<sup>236</sup> или микропористого каприна,<sup>237</sup> содержащих остатки арилазидов, — позволяет значительно увеличить максимальную емкость и эффективность фотоиммобилизации НК. При этом чувствительность гибридизационного анализа возрастает в 2–4 раза по сравнению с традиционной сорбцией на нитроцеллюлозу, что, вероятно, связано с довольно мягкими условиями иммобилизации, незначительно нарушающими структуру НК.

Иммобилизация НК или их фрагментов в процессе сшивки с полиакриламидом,<sup>238,239</sup> агаром<sup>240</sup> или акриламидными группами, предварительно введенными на поверхность стеклянных слайдов,<sup>20,241</sup> позволяет получать сорбенты с высоким содержанием нуклеотидного материала. Преимуществом этого метода является то, что сшивку можно проводить практически на любой поверхности.<sup>241,242</sup>

Для достижения большей избирательности при иммобилизации можно проводить сополимеризацию с олигонуклеотидами, в которые введены функциональные группы с кратными связями (пирролильная,<sup>242</sup> аллильная<sup>20</sup> или акриламидная<sup>241</sup>).



## VI. Иммобилизация нуклеиновых кислот с использованием ферментов и взаимодействий авидин–биотин

В настоящее время широко распространены стрептавидин- или авидинсодержащие сорбенты, которые используют для присоединения ДНК или олигонуклеотидов, модифицированных биотином. В результате получаются носители, в которых иммобилизация олигонуклеотидов происходит не за счет образования ковалентной связи, а за счет образования прочного комплекса авидина с биотином ( $K_d \approx 10^{-15}$  моль·л $^{-1}$ ). Такие носители при наличии стрептавидинового носителя и модифицированного биотином олигонуклеотида можно быстро приготовить простым смешиванием. На них выделяют различные белки и ферменты,<sup>35,36,243-246</sup> секвенируют ДНК,<sup>34,247</sup> их используют в гибридизационном анализе.<sup>248,249</sup> Однако такие сорбенты обладают рядом недостатков. Основным из них является неспецифическая сорбция белков, которая в большей степени проявляется в случае авидинсодержащих сорбентов,<sup>250,251</sup> чем в случае стрептавидиновых носителей.<sup>252</sup> Непрореагировавшие группы авидина блокируют бычьим сывороточным альбумином или метилманинозидом,<sup>253</sup> а для хроматографии используют буферы с большой ионной силой.

Короткие и гомогенные олигонуклеотиды более доступны и иммобилизовать их легче, чем длинные фрагменты НК. В настоящее время широко распространены сорбенты, содержащие олиго(dT) (особенно олиго(dT)<sub>25</sub>-Dynabeads) и олиго(dA).<sup>254-256</sup> Иммобилизацию больших фрагментов НК на такие или любые другие носители с присоединенными относительно короткими олигонуклеотидами (10–20 нуклеотидных остатков) можно осуществить ферментативно с помощью лигазы путем присоединения специально синтезированных или выделенных длинных фрагментов НК.<sup>24,257</sup> Можно также использовать ДНК полимеразы, достраивая мРНК<sup>258,259</sup> или ДНК-матрицу,<sup>260</sup> которая образует комплекс с коротким олигонуклеотидом на носителе.

## VII. Применение сорбентов, содержащих нуклеиновые кислоты

### 1. Аффинная хроматография

Для решения ключевых проблем молекулярной биологии и биохимии, связанных с исследованием структуры и взаимодействия биополимеров, важно иметь методы, позволяющие

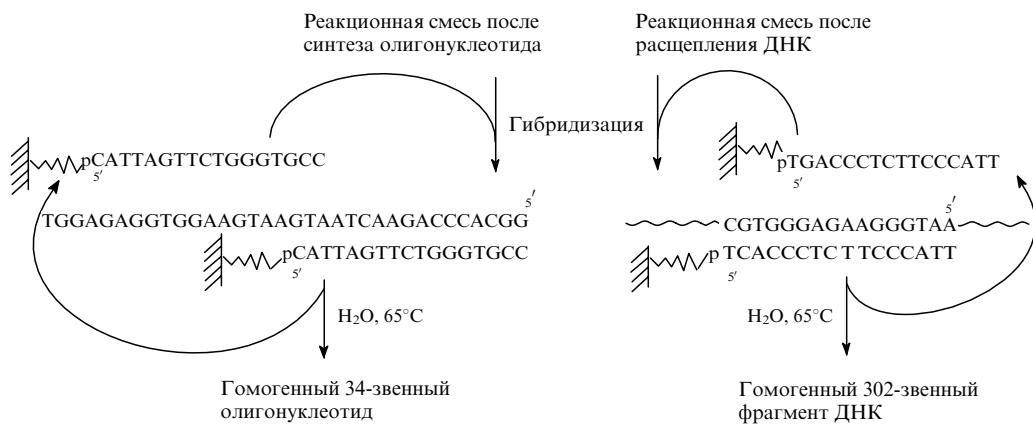


Рис. 2. Аффинная хроматография.

из сложных многокомпонентных смесей выделять исследуемые биополимеры в индивидуальном состоянии. Так, для изучения структуры, а также белково-нуклеинового, ДНК-ДНК- и РНК-ДНК-узнавания необходимы чистые препараты белков, ферментов, НК, олигонуклеотидов и их аналогов. Такие биополимеры могут быть выделены с помощью метода аффинной хроматографии на сорбентах с иммобилизованными НК или олигонуклеотидами. Основой этого метода является способность лигандов, иммобилизованных на нерастворимые носители, образовывать с макромолекулами высокоспецифичные комплексы, которые диссоциируют только при определенных условиях (либо при изменении ионной силы или pH элюента, либо при повышении температуры).

#### а. Выделение индивидуальных нуклеиновых кислот и их фрагментов

В литературе принцип аффинной хроматографии НК впервые описан для выделения олиго- и полинуклеотидов гомогенной последовательности. Еще в первых работах<sup>60, 61, 261</sup> отмечали возможность фракционирования олигонуклеотидов на сорбентах с иммобилизованными полинуклеотидами. В конце 1980-х – начале 1990-х годов в связи с развитием методов синтеза олигонуклеотидов и доступностью новых носителей появился ряд работ, посвященных аффинной хроматографии поли(A)-мРНК<sup>214, 254, 262, 263</sup> НК или олигонуклеотидов, содержащих гомогенные последовательности.<sup>26, 264</sup> Однако таким методом не удалось выделить индивидуальные олигонуклеотиды или более длинные последовательности, не содержащие гомогенных вставок. В настоящее время широко применяют коммерчески доступные носители с иммобилизованными гомогенными олигонуклеотидами, чаще всего олиго(Т)-носители. Использование в качестве носителя прочных материалов, таких как силикагель, стекло и некоторые сополимеры на основе метакрилата, позволяет проводить высокоэффективную аффинную хроматографию и добиваться полного разделения олигонуклеотидов, различающихся по длине на одно основание.<sup>105</sup>

После появления эффективных способов иммобилизации гетерогенных олигонуклеотидов на нерастворимые подложки, стала возможна аффинная хроматография гетерогенных олигонуклеотидов и НК. Для выделения синтетических достаточно протяженных (более 30 звеньев) олигонуклеотидов, которые весьма сложно очистить до гомогенного состояния обычными хроматографическими методами, было предложено использовать сорбенты с иммобилизованными относительно короткими олигонуклеотидными фрагментами (10–15 звеньев), комплементарными участку

подлежащего очистке олигонуклеотида.<sup>102, 104</sup> Такой подход был реализован при выделении синтетического 34-звенного олигонуклеотида — дезоксикопия фрагмента РНК вируса клещевого энцефалита на полимере LiChrosorb-NH<sub>2</sub> с присоединенным 17-звенным олигонуклеотидом, комплементарным 5'-концу 34-членного фрагмента<sup>102</sup> (рис. 2).

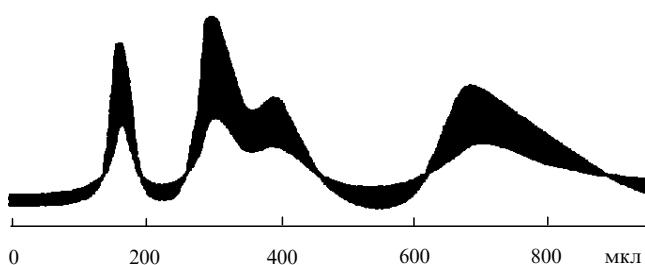
Кроме синтетических олигонуклеотидов с помощью аффинной хроматографии могут быть выделены фрагменты ДНК из сложных смесей, получающихся при расщеплении ДНК ферментами рестрикции (см. рис. 2),<sup>102, 104</sup> а также индивидуальные НК. Таким способом получен высокообогащенный препарат tРНК<sup>Phe</sup> из плаценты человека<sup>103</sup> с помощью двух последовательных аффинных хроматографий, вначале на сорбенте с олигонуклеотидом, комплементарным ССА-концу, а потом на сорбенте с иммобилизованным пентануклеотидом, комплементарным участку антиодонной петли tРНК<sup>Phe</sup>. Активность полученного препарата была сравнима с активностью коммерческих образцов.

Из клеточных экстрактов на сорбентах с иммобилизованными специфическими олигонуклеотидами могут быть выделены не только одноцепочные, но и двухцепочные НК. В этом случае олигонуклеотиды должны быть способны образовать тройные комплексы с определенными участками НК. Примером такого подхода может служить очистка ДНК-плазмид pTS2<sup>265</sup> и pXL2563<sup>7</sup> из клеточных экстрактов.

#### б. Разделение смесей диастереомеров неионных аналогов олигонуклеотидов

Большой интерес к аналогам олигонуклеотидов с блокированной межнуклеотидной фосфатной группой — метилфосфатам и фосфотриэфиром — объясняется особенностями их физико-химических и биологических свойств: устойчивостью к нуклеазам, способностью быстро адсорбироваться на клеточных мембранах и проникать внутрь клеток, образовывать комплексы с комплементарными участками НК. Из-за наличия асимметрического межнуклеотидного атома фосфора эти аналоги являются смесью большого числа диастереомеров, различающихся стабильностью образуемых комплементарных комплексов. Для детального исследования физико-химических свойств и биологического поведения олигонуклеотидных аналогов в клеточных системах, как правило, необходимы индивидуальные диастереомеры.

Впервые хроматографическое разделение диастереомеров на фракции было проведено на колонке с иммобилизованной на сепарозе поли(А), модифицированной бромцианом<sup>266</sup> (фракционировали октаэтиловый эфир нонатимидилуринина). Однако индивидуальные диастереомеры неионных ана-



**Рис. 3.** Профиль хроматографического разделения смеси четырех диастереомеров этиловых фосфотриэфиров октануклеотида GpCpCpAроЕ·АроЕ·АрCрА на аффинном сорбенте LiChrosorb с иммобилизованным по 5'-концевой фосфатной группе рТГТТГГС.<sup>105</sup>

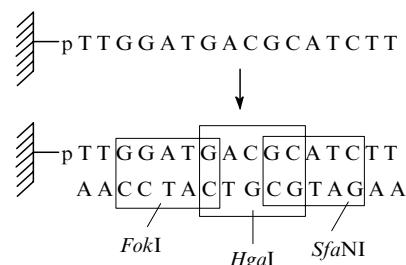
логов олигонуклеотидов удалось получить только используя метод высокоеффективной аффинной хроматографии.

Индивидуальные диастереомеры этиловых фосфотриэфиров гетерогенного октануклеотида GCCAAACА были выделены с использованием силикагельного сорбента LiChrosorb с иммобилизованным по 5'-концевой фосфатной группе октануклеотидом рТГТТГГС при постоянной температуре колонки.<sup>105</sup> Таким способом удалось разделить стереоизомеры октануклеотида GCCAAACА, содержащего одну, две или три фосфотриэфирные группировки (рис. 3). Этот же аффинный сорбент был успешно использован для получения индивидуальных диастереомеров гептануклеозид-метилфосфоната СрМеСрМеАрМеАрМеСрМеА, для которых были определены их абсолютные конфигурации.<sup>267</sup>

#### в. Выделение НК-зависимых ферментов

В настоящее время аффинная хроматография на целлюлозе и сепарозе, содержащих ДНК тимуса теленка, стала рутинным методом получения чистых препаратов неспецифичных к нуклеотидной последовательности НК-зависимых белков. Для очистки сайт-специфичных белков используют олигонуклеотидсодержащие сорбенты, имеющие соответствующие сайты узнавания. Основную массу выделенных белков составляют белковые факторы транскрипции и репликации, достаточно полный список которых приведен в обзорах<sup>181, 268, 269</sup>. Этот список можно дополнить еще несколькими работами<sup>36, 137, 270, 271</sup>, в которых описаны методы получения аффинных сорбентов для очистки данных белков. Аффинная хроматография была также использована для выделения ряда рецепторов.<sup>62, 168, 252</sup>

Наибольший интерес вызывают работы по выделению сайт-специфичных ферментов рестрикции, поскольку аффинные сорбенты в данном случае должны быть устойчивы к действию рестриктаз. Эндонуклеазы рестрикции EcoRI<sup>272</sup> и SphI<sup>273</sup> гидролизуют ДНК только в присутствии ионов Mg<sup>2+</sup>, в то время как связываются с сайт-содержащей ДНК и в отсутствие ионов магния. Это свойство используют для их выделения. Для выделения рестриктаз IIS-типа (FokI, HgaI, SfaNI), которые гидролизуют ДНК в определенном сайте, не совпадающем с сайтом узнавания, был синтезирован дуплекс, включающий в себя сайты узнавания этих ферментов, но не содержащий участков, по которым происходит гидролиз ДНК.<sup>101</sup> Ниже приведена структура полученного дуплекса, в которой рамками обозначены соответствующие сайты узнавания. Один из олигонуклеотидов дуплекса был ковалентно присоединен к метакрилатному полимерному носителю.



Для выделения ферментов репарации, которые ответственны за коррекцию миссматчей в ДНК, используют сорбенты с иммобилизованными олигонуклеотидными дуплексами, содержащими неканоническую пару оснований. Однако выделить заметные количества тимин-ДНК гликозилазы<sup>274, 275</sup> на аффинном ДНК-сорбенте, имеющем миссматч dG:U, не удалось. В работе<sup>106</sup> с помощью аффинной хроматографии выделены высокоочищенные биологически активные образцы миссматч-специфичных ДНК гликозилаз (MutM и MutY), которые ответственны за удаление окисленной формы гуанина из ДНК и за коррекцию миссматчей. Для этого был использован носитель Toyopearl-AF с иммобилизованным олигонуклеотидным дуплексом, содержащим неканонические пары N8<sup>oxo</sup>-dC или тA-dG (где N8<sup>oxo</sup> — 8-оксогуанин — аналог окисленной формы гуанина).

Аффинная хроматография на олигонуклеотидсодержащих сорбентах позволяет не только выделять НК-зависимые белки, но и изучать взаимодействие данных белков с иммобилизованным фрагментом НК.<sup>106, 276</sup>

#### 2. Гибридизационный анализ

Метод молекулярной гибридизации НК основан на фундаментальном свойстве комплементарных цепей НК образовывать прочный дуплекс. Метод позволяет быстро тестировать мутированные, вирусные НК, вириоиды и обладает высокой специфичностью, чувствительностью и воспроизводимостью. Основные стадии гибридизационного анализа подробно описаны в литературе.<sup>277–282</sup>

Чувствительность метода определяется выбором способа детекции олигонуклеотидных зондов с радиоактивными (<sup>32</sup>P), флуоресцентными и другими метками.

Проблема выбора подложки (носителя) и метода иммобилизации НК или олигонуклеотида для любого твердофазного метода гибридизационного анализа является ключевой и в каждом случае определяется конкретной задачей исследования.

При дот-гибридизации, как правило, проводят иммобилизацию денатурированного анализируемого образца суммарной НК на нитроцеллюлозу.<sup>283–289</sup> Для автоматизации серийных анализов клинических образцов удобно использовать полистирольные иммунологические планшеты.<sup>290, 291</sup> Иммобилизацию НК-мишеней или специфических клонированных фрагментов проводят припеканием при 80°C или УФ-облучением.

Более эффективным методом анализа является блот-гибридизация, при которой препарат НК, гидролизованной ферментами рестрикции, фракционируют (разделяют по относительной массе) гель-электрофорезом и переносят с геля на носитель. Фиксированные на носителях НК гибридизуют с меченными зондами. Анализ ДНК таким методом носит название гибридизации по Саузерну,<sup>225</sup> тогда как анализ РНК называют гибридизацией по Нозерну.<sup>292</sup> В последнее время гибридизацию по Саузерну часто используют для детекции продуктов ПЦР и определения ее специфичности.<sup>293–295</sup> Обычно для фиксации нуклеотидного материала используют нитроцеллюлозные фильт-

ры<sup>225, 292, 296, 297</sup> и нейлоновые мембранны<sup>298, 299</sup> (реже *n*-азидобензоилцеллюлозу<sup>236</sup>) или высушивают гель, в котором проводили фракционирование фрагментов НК.<sup>300</sup> Сэндвич-гибризация — перспективный метод для анализа НК в неочищенных препаратах, содержащих белки, полисахариды и другие примеси.<sup>301</sup> Метод основан на использовании двух разных олиго- или полинуклеотидных фрагментов, комплементарных различным участкам анализируемой НК. Один из фрагментов иммобилизован на носителе, а другой, находящийся в растворе, несет репортерную группу: радиоактивную метку, остаток биотина и т.п. После отмычки от примесей и избытка второго зонда комплементарно связавшейся с носителем анализируемой НК проводят детектирование метки, содержащейся в анализируемой системе. Для сэндвич-гибризации опробовано большое количество разнообразных твердых подложек и методов иммобилизации. На начальных стадиях этих исследований применяли нитроцеллюлозные фильтры,<sup>302, 303</sup> от которых постепенно перешли к более механически прочным нейлоновым мембранам<sup>304</sup> и более удобным в обращении полипропиленовым или полистирольным иммунологическим планшетам.<sup>32, 305–307</sup> Один из способов значительного ускорения гибридизации — проведение реакции гибридизации исследуемой НК с олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными на поверхности микроранулированных сорбентов. Описаны разные варианты такого подхода с использованием в качестве твердой фазы сефакрила,<sup>67</sup> полиакриламида,<sup>28</sup> шариков нейлона,<sup>27</sup> полистирола<sup>304, 308, 309</sup> и магнитных микрочастиц.<sup>25, 219, 304, 310</sup> Применение магнитных микрочастиц имеет дополнительное преимущество, так как их можно легко концентрировать из суспензии, что существенно упрощает манипуляции с образцами.

Метод обратной дот-гибридизации<sup>48</sup> предполагает введение метки в анализируемую НК или ее фрагмент, полученный в процессе ПЦР. После гибридизации меченой НК с олигонуклеотидом, иммобилизованным на твердой подложке, образование комплементарного гибрида выявляют детектированием метки, связавшейся с полимерной подложкой. Для использования в обратной дот-гибридизации предложены нейлоновые<sup>48, 66, 83, 311</sup> и полiamидные (лавсановые)<sup>195, 312, 313</sup> мембранны, иммунологические микропланшеты<sup>314, 315</sup> и стекло.<sup>17, 316</sup> Использование стекла (покровных стекол) в гибридизационном анализе особенно удобно: стекло доступно, недорого, имеет хорошо изученную поверхность, поддающуюся модификации, и пригодно для флуоресцентного детектирования. Для иммобилизации олигонуклеотидов используют фотохимический и разнообразные химические методы.

### 3. ДНК-чики и ДНК-сенсоры

Разработка эффективных методов иммобилизации олигонуклеотидов и развитие автоматизации процессов нанесения иммобилиземых образцов на поверхность привели к созданию микрочипов с иммобилизованными наборами олигонуклеотидов. Такие ДНК-чики, представляющие собой слайды (как правило, стеклянные) с большим числом иммобилизованных олигонуклеотидов (десятки тысяч ДНК-фрагментов), используют для решения широкого спектра задач молекулярной биологии, медицины, биотехнологии.

Первоначально микрочипы применяли для определения последовательности нуклеиновых кислот (метод SBH).<sup>132, 317–319</sup> Предполагалось, что использование чипов с полным набором иммобилизованных октануклеотидов (65536 = 4<sup>8</sup>) позволит определять неизвестные последовательности нуклеиновых кислот путем гибридизационного анализа. Однако оказалось, что в методе SBH существуют серьезные проблемы, и больших успехов пока не достигнуто. Исследования показали, что использование микрочипов

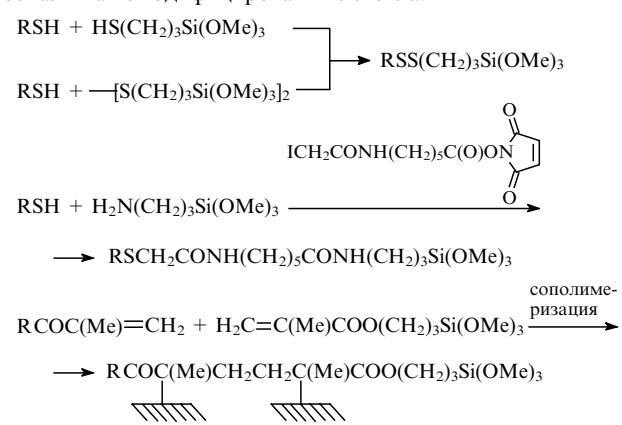
может найти применение для анализа экспрессии генов, анализа мутаций, диагностики генетических, инфекционных и онкологических заболеваний.<sup>320–334</sup>

Существует два подхода к получению ДНК-микрочипов: синтез олигонуклеотидов непосредственно на поверхностях<sup>4, 5, 8, 175, 215, 217, 218, 321, 333–341</sup> и иммобилизация заранее синтезированных олигонуклеотидов на стеклянных (или другие) слайды.<sup>17, 19, 22, 30, 131, 133, 248, 322, 323, 330–332, 342–344</sup>

В рамках первого подхода в последние годы развиваются методы комбинаторной фотолитографии на стеклянных слайдах или других подложках с использованием фотоактивных защитных групп.<sup>321, 337–341</sup> Облучение слайда, на котором происходит синтез, через трафаретную маску ведет к деблокированию в заданных точках, в которых и происходит присоединение очередного мономерного блока к растущей олигонуклеотидной цепи. Сдвигая трафарет и повторяя процедуру облучения и синтеза, получают в конечном итоге поверхность, покрытую большим числом различных олигонуклеотидов заданной последовательности в определенных точках. Такой способ — синтез олигонуклеотидов непосредственно на поверхностях — при кажущейся экономической целесообразности имеет существенный недостаток: методы синтеза не могут обеспечить получение гомогенных олигонуклеотидов, что может приводить к ошибкам при последующем анализе.

Второй подход к получению ДНК-микрочипов предполагает использование выделенных и очищенных олигонуклеотидов.

Чрезвычайно важной стадией является подготовка слайдов для иммобилизации, включающая тщательную промывку и травление. Эти стадии нужны для удаления примесей (жира, грязи, пыли и т.д.) и для генерирования гидроксильных групп на поверхности.<sup>345, 346</sup> Для промывки используют органические растворители (чаще всего метанол) или сильные окислители (например, пероксид водорода). Поверхность стекла активируют с помощью неорганических кислот или щелочей (HF, HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> или NaOH). После этого на поверхность слайдов должны быть введены функциональные группы для проведения последующих реакций. Для этого используют различные силианы общей формулы (R<sup>1</sup>O)<sub>3</sub>Si(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>R<sup>2</sup>, где R<sup>1</sup> = Me, Et, а R<sup>2</sup> — какая-либо функциональная группа (см. соединения 1–4 в разделе III.2). Для ковалентного присоединения олигонуклеотидов на поверхность стеклянных слайдов используют реакции, рассмотренные в предыдущих главах. Здесь мы отметим только работу<sup>344</sup>, авторы которой применили интересный подход: олигонуклеотиды или кДНК, содержащие на 5'-конце линкеры с группами SH или CH<sub>2</sub>=CH, предварительно инкубировали с соответствующими триметоксисилианами и затем полученные коньюгаты иммобилизовали на немодифицированные стекла.



R — остаток олигонуклеотида или кДНК.

Важным фактором для успешной гибридизации является природа и длина линкера, связывающего олигонуклеотид с поверхностью. Чтобы обеспечить стерическую доступность олигонуклеотидов для комплементарного взаимодействия, желательно использовать достаточно протяженные линкеры. Эффективность гибридизации увеличивается в несколько раз при использовании необходимой длины спейсера<sup>8, 38, 320, 331–333</sup> (см. также раздел III.2). Другой важной характеристикой ДНК-чипов является поверхностная емкость по олигонуклеотиду, т.е. количество иммобилизованного олигонуклеотида на единице площади, которое не должно превышать некоторого оптимального значения, чтобы избежать стерических затруднений при последующей гибридизации. Как правило, достигается не очень высокая емкость ( $0.01–1.00 \text{ пмоль} \cdot \text{мм}^{-2}$ )<sup>8, 15–17, 19, 20, 242, 333</sup> однако ее оказывается достаточно для успешного проведения анализов. В работе<sup>17</sup> рекомендуют оптимальную емкость  $0.25–0.35 \text{ пмоль} \cdot \text{мм}^{-2}$  для иммобилизации полинуклеотидов длиной 150–350 пар оснований.

Понятно, что с увеличением емкости повышается чувствительность гибридизационного анализа. С этой целью используют различные способы: олигонуклеотиды присоединяют к разветвленным линкерам (дендримерам),<sup>22</sup> но на поверхности стекла формируют акриламидную,<sup>20, 29, 30, 45, 347–349</sup> агарозную<sup>183</sup> или желатиновую<sup>350</sup> подложки, что обеспечивает «трехмерное» присоединение олигонуклеотидов. В этом случае емкость по олигонуклеотиду на единицу площади может быть существенно выше (до  $30 \text{ пмоль} \cdot \text{мм}^{-2}$ )<sup>45</sup> по сравнению с «двумерной» иммобилизацией при сохранении стерической доступности олигомеров для последующей гибридизации.

Первоначально для детекции сигналов в гибридизационном анализе интенсивно использовали пробы с радиоактивными метками. Однако широкое распространение получили другие метки, вводимые в олигонуклеотидные пробы: биотин, дигоксигенин, хемилюминофоры, флуоресцентные и ферментативные метки.<sup>302, 308, 351</sup>

В последние годы с развитием технологии ДНК-чипов начали применять различные физические методы детектирования. Создаваемые ДНК-сенсоры (или ДНК-биосенсоры), подобно другим биосенсорам, обеспечивают быстрое и прямое детектирование как с метками, так и без них. Применение биосенсоров дает возможность изучать кинетику гибридизационных процессов. Проводят исследования топологии иммобилизованных олигонуклеотидов в пленке на поверхности слайдов и деталей молекулярных взаимодействий, происходящих на границе пленка–раствор.<sup>337–341, 352–356</sup> Так, в работах<sup>4, 357, 358</sup> исследовали, как влияют на эффективность гибридизации форма, длина и состав образующейся двойной спирали.

При создании ДНК-сенсоров может быть использована пьезоэлектрическая техника, когда измеряют изменение частоты колебаний кристалла с иммобилизованным олигонуклеотидом в процессе сорбции комплементарной цепи ДНК.<sup>359–362</sup> техника поверхностного плазменного резонанса (в этом случае изменяется показатель преломления на металлической поверхности, когда лиганд в растворе связывается с лигандом, иммобилизованным на металлическую пленку),<sup>363–366</sup> техника сканирующей микроскопии,<sup>352, 367</sup> рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (XPS).<sup>353</sup> При электрохимическом детектировании используют различные электроды с иммобилизованными олигонуклеотидами, которые в процессе гибридизации меняют электрические характеристики.<sup>365, 368–370</sup> Широко применяют также оптические сенсоры, детектирующие изменение оптических свойств пленок (например, показателя преломления, интерференции) в процессе гибридизации цепей ДНК на поверхности с иммобилизованными олигонуклеотидами.<sup>230, 371–373</sup>

Перечисленные методы обеспечивают высокую чувствительность, при которой можно детектировать нано- и пикограммовые количества вещества.

Создание ДНК-чипов и ДНК-сенсоров является бурно развивающейся областью науки и биотехнологии. Достижения в этой области могут в ближайшем будущем обеспечить прорыв в диагностике генетических, онкологических и инфекционных заболеваний, в медицине и фармакологии.

#### 4. Ферментативный синтез на НК-матрицах

Применение иммобилизованных синтетических олигонуклеотидов и НК в качестве матриц или затравок для ферментативного синтеза олиго- и полинуклеотидов позволяет многократно использовать их для синтеза комплементарной олигонуклеотидной цепи, а также упрощает процедуру отделения конечного продукта от матриц. Последнее важно, поскольку помимо матрицы или затравки в реакционной среде в большом избытке находятся нуклеозидтрифосфаты (NTP), являющиеся субстратами для ферментов биосинтеза НК, и сами ферменты.

Для твердофазного ферментативного синтеза ДНК или фрагментов ДНК используют ДНК полимеразы бактериофага T7,<sup>34, 374</sup> полимеразу I *E. coli*, фрагмент Кленова<sup>85, 257, 260, 375, 376</sup> и Тац полимеразу.<sup>377–380</sup> Наиболее часто в качестве матриц используют кДНК, которые синтезируют на олиго(dT)-носителях (целлюлозе,<sup>258, 259, 381</sup> латексе<sup>382–384</sup>) или магнитных частицах<sup>374</sup> путем транскрипции соответствующей поли(A)–мРНК РНК-зависимой ДНК полимеразой (обратной транскриптазой). В ряде работ предложено иммобилизовать на носители плазмиды<sup>34</sup> или бактериофаги<sup>192, 376</sup> со встроенным чужеродным ДНК, в том числе с кДНК,<sup>192</sup> которые в дальнейшем используют при ферментативном синтезе в качестве матриц. Применяя праймеры, комплементарные 3'-концевому участку исследуемой иммобилизованной матрицы, можно получать полные комплементарные ДНК.<sup>85, 192, 257, 380</sup> Ферментативный матричный синтез позволяет вводить в синтезируемые ДНК и их фрагменты различные функциональные группы и метки.<sup>257, 375</sup> Функциональные группы и метки могут нести праймеры, dNTP либо терминирующие дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты (ddNTP). Добавление в реакционную смесь вместе с четырьмя dNTP одного или всех четырех ddNTP, но с разными метками, позволяет получать набор продуктов и определять последовательность иммобилизованной ДНК.<sup>34, 378, 379</sup>

Химический синтез олигорибонуклеотидов и РНК несколько сложнее синтеза олигодезоксирибонуклеотидов, поэтому понятен интерес к ферментативным методам их получения. Матричный биосинтез РНК осуществляют с помощью ДНК-зависимых РНК полимераз: РНК полимеразы T7<sup>129, 385, 386</sup> и РНК полимеразы *E. coli*.<sup>381, 387, 388</sup> В качестве матриц для синтеза олигорибонуклеотидов используют иммобилизованные олигодезоксирибонуклеотиды,<sup>129, 385, 386, 388</sup> для синтеза мРНК — иммобилизованные кДНК.<sup>381, 387</sup> Для увеличения количества конечного продукта применяют современные методы ПЦР, а для упрощения выделения продуктов синтеза — современные магнитные носители (Dynabeads).

Ферментативный синтез на иммобилизованных НК-матрицах используют для репликации, транскрипции, секвенирования нуклеиновых кислот, для введения функциональных групп и меток, создания геномных и кДНК-библиотек.

#### VIII. Заключение

Рассмотренные в настоящем обзоре работы свидетельствуют о существовании огромного количества различных методов иммобилизации НК на твердые носители. Широко

используют методы иммобилизации НК на активированные носители. При этом нативная НК иммобилизуется неспецифично по многим точкам. Однако благодаря этому могут быть получены аффинные сорбенты с большой емкостью. Намного более избирательно происходит присоединение нуклеотидов и олигонуклеотидов, имеющих реакционноспособные группы; при этом гетероциклические основания не затрагиваются и остаются способными к аффинным взаимодействиям.

Физические методы иммобилизации отличаются непредсказуемостью и неспецифичностью. Преимуществом химических способов является возможность выбора метода иммобилизации, соответствующего конкретной задаче. Стабильность аффинных сорбентов в различных условиях и способ удаления лиганда с носителя можно определить заранее при условии, что известна природа связи между лигандом и носителем.

Наибольшее распространение среди методов иммобилизации НК и их фрагментов на полимерные носители получили реакции амино- или тиосодержащих лигандов с активными группами носителя. Часто используют метод присоединения олигонуклеотидов, содержащих амино-группы, к носителям с альдегидными группами. Для присоединения олигонуклеотидов с концевым фосфатом к гранулированным носителям хорошо зарекомендовал себя метод с использованием в качестве активирующего агента системы  $\text{Ph}_3\text{P}-\text{Py}_2\text{S}_2$ . В случае планарных носителей (пленок и стекол) более целесообразно использование методов, предполагающих активацию функциональных групп носителя, или применение бифункциональных спивающих реагентов (например, 1,4-фенилендиизоцианата). Следует, однако, отметить, что не существует универсального метода иммобилизации: в каждом конкретном случае надо подбирать и носитель, и метод иммобилизации.

Носители, содержащие НК, широко применяют как для исследовательских, так и для прикладных целей. За последние годы опубликован ряд обзоров на эту тему.<sup>326, 328, 347, 389–391</sup> Носители с иммобилизованными олигонуклеотидами используют как сорбенты для аффинной хроматографии в тех случаях, когда необходимо получить высокоочищенные индивидуальные препараты НК или их фрагментов. Для разделения смесей диастереомеров неионных аналогов олигонуклеотидов аффинная хроматография является, пожалуй, единственным эффективным методом. Показана высокая эффективность аффинных олигонуклеотидсодержащих сорбентов для выделения нуклеотидзависимых ферментов. Такие носители используют также для проведения твердофазного ферментативного синтеза ДНК, РНК и их фрагментов.

Особо следует подчеркнуть использование НК-содержащих носителей в гибридизационном анализе, который находит все большее применение в медицинской практике. На принципе гибридизационного анализа основана диагностика многих заболеваний. С помощью гибридизационного анализа обнаруживают мутации, вирусные и бактериальные НК и т.п. Этот метод все шире применяют для генетической экспертизы в медицинской и криминалистической практике.

В последние годы бурно развивается направление по созданию и применению ДНК-микрочипов. Они проявили себя как полезные инструменты в различных областях биологии и медицины. Их уникальные свойства основаны на том, что на малой площади стеклянного слайда располагается большое количество иммобилизованных олигонуклеотидов, что дает возможность проводить одновременно большое число параллельных анализов.

Использование иммобилизованных олигонуклеотидов в качестве биосенсоров добавляет новые уникальные возможности в арсенал современных методов анализа; при этом

гораздо быстрее, проще и дешевле получать информацию, чем при традиционных методах гибридизационного анализа. Новые приборы — ДНК-биосенсоры — обладают огромным потенциалом для самых разных приложений, включая проведение клинических анализов, анализов для судебно-медицинской экспертизы, мониторинга состояния окружающей среды, качества продуктов питания и т.д.

## Литература

1. G.Cohen, J.Deutsch, J.Fineberg, A.Levine. *Nucl. Acids Res.*, **25**, 911 (1997)
2. R.S.Matson, J.B.Rampal, P.J.Coassin. *Anal. Biochem.*, **217**, 306 (1994)
3. K.Ernst-Cabrera, M.Wilchek. *Anal. Biochem.*, **159**, 267 (1986)
4. U.Maskos, E.M.Southern. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 1679 (1992)
5. E.M.Southern, S.C.Case-Green, J.K.Elder, M.Johnson, K.U.Mir, L.Wang, J.C.Williams. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 1368 (1994)
6. H.Hakala, H.Lönnberg. *Biocoujugate Chem.*, **8**, 232 (1997)
7. P.Wils, V.Escriou, A.Warnery, F.Lacroix, D.Lagneaux, M.Ollivier, J.Crouzet, J.-F.Mayaux, D.Scherman. *Gene Ther.*, **4**, 323 (1997)
8. M.S.Shchepinov, S.C.Case-Green, E.M.Southern. *Nucl. Acids Res.*, **25**, 1155 (1997)
9. J.Turkova. *Affinity Chromatography*. Elsevier, Amsterdam, 1978
10. V.Jirku, J.Turkova. *Methods Enzymol.*, **135**, 341 (1987)
11. M.Yang, R.Y.C.Kong, N.Kazmi, A.K.C.Leung. *Chem. Lett.*, 257 (1998)
12. M.Zammatteo, L.Jeanmart, S.Hamels, S.Courtois, P.Louette, L.Hevesi, J.Remacle. *Anal. Biochem.*, **280**, 143 (2000)
13. L.Henke, P.A.E.Piunno, A.C.McClure, U.J.Krull. *Anal. Chim. Acta*, **344**, 210 (1997)
14. B.Sproat, D.M.Brown. *Nucl. Acids Res.*, **13**, 2979 (1985)
15. J.B.Lamture, K.L.Battie, B.E.Burke, M.D.Eggers, D.J.Ehrlich, R.Fowler, M.A.Hollis, B.B.Kosicki, R.K.Reich, S.R.Smith, R.S.Varma, M.E.Hogan. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 2121 (1994)
16. L.A.Chrisey, G.U.Lee, C.E.O'Ferrall. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 3031 (1996)
17. Z.Guo, R.A.Guilfoyle, A.J.Thiel, R.Wang, L.M.Smith. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 5456 (1994)
18. B.Joos, H.Kuster, R.Cone. *Anal. Biochem.*, **247**, 96 (1997)
19. D.Chen, Z.Yan, D.L.Cole, G.S.Srivatsa. *Nucl. Acids Res.*, **27**, 389 (1999)
20. A.V.Vasiliskov, E.N.Timofeev, S.A.Surzhikov, A.L.Drobshev, V.V.Shick, A.D.Mirzabekov. *Biotechniques*, **27**, 592 (1999)
21. N.P.Gerry, N.E.Witowski, J.Day, R.P.Hammer, G.Barany, F.Barany. *J. Mol. Biol.*, **292**, 251 (1999)
22. M.Beier, J.D.Hoheisel. *Nucl. Acids Res.*, **27**, 1970 (1999)
23. T.R.Gingeras, D.Y.Kwoh, G.R.Davis. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 5373 (1987)
24. J.N.Kremsky, J.L.Wooters, J.P.Dougherty, R.E.Meyers, M.Collins, E.L.Brown. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 2891 (1987)
25. V.Lund, R.Schmid, D.Rickwood, E.Hornes. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 10861 (1988)
26. T.A.Goss, M.Bard, H.W.Jarrett. *J. Chromatogr.*, **508**, 279 (1990)
27. J.Van Ness, S.Kalbfleisch, C.R.Petrie, M.W.Reed, J.C.Tabone, N.M.J.Vermeulen. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 3345 (1991)
28. E.Fahy, G.R.Davis, L.J.DiMichele, S.S.Ghosh. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 1819 (1993)
29. E.N.Timofeev, S.V.Kochetkova, A.D.Mirzabekov, V.L.Florentiev. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 3142 (1996)
30. D.Proudnikov, E.Timofeev, A.Mirzabekov. *Anal. Biochem.*, **259**, 34 (1998)
31. S.Pochet, T.Huynh-Dinh, J.Igolen. *Tetrahedron*, **43**, 3481 (1987)
32. J.A.Running, M.S.Urdea. *Biotechniques*, **8**, 276 (1990)
33. M.Shimkus, J.Levy, T.Herman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2593 (1985)
34. T.Hultman, S.Stahl, E.Hornes, M.Uhlen. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 4937 (1989)
35. M.Leblond-Francillard, M.Dreyfus, F.Rougeon. *Eur. J. Biochem.*, **166**, 351 (1987)

36. O.S.Gabrielsen, E.Hornes, L.Korsnes, A.Ruet, T.B.Øyen. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 6253 (1989)
37. W.Weber, C.-W.Vogel, H.Hilz. *FEBS Lett.*, **99**, 62 (1979)
38. E.Southern, K.Mir, M.Shchepinov. *Nat. Genet.*, **21**, 5 (1999)
39. P.A.E.Piunno, U.J.Krull, R.H.E.Hudson, M.J.Damha, H.Cohen. *Anal. Chim. Acta*, **288**, 205 (1994)
40. A.V.Fotin, A.L.Drobyshov, D.Y.Proudnikov, A.N.Perov, A.D.Mirzabekov. *Nucl. Acids Res.*, **26**, 1515 (1998)
41. Ю.П.Лысов, А.А.Черный, А.А.Балаев, Ф.Н.Гнучев, К.Л.Битти, А.Д.Мирзабеков. *Мол. биология*, **29**, 104 (1995)
42. М.А.Livshits, V.L.Florentiev, A.D.Mirzabekov. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **11**, 783 (1994)
43. D.Guschin, G.Yershov, A.Zaslavsky, A.Gemmell, V.Shick, D.Proudnikov, P.Arenkov, A.Mirzabekov. *Anal. Biochem.*, **250**, 203 (1997)
44. A.Kunitsyn, S.Kochetkova, E.Timofeev, V.Florentiev. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **14**, 239 (1996)
45. S.Parinov, V.Barsky, G.Yershov, E.Kirillov, E.Timofeev, A.Belgovskiy, A.Mirzabekov. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 2998 (1996)
46. S.Dubiley, E.Kirillov, Y.Lysov, A.Mirzabekov. *Nucl. Acids Res.*, **25**, 2259 (1997)
47. И.Б.Иванов, Г.М.Ершов, В.Е.Барский, А.И.Бельговский, Е.В.Кириллов, Э.Я.Крейндлин, С.В.Паринов, Н.В.Мологина, А.Д.Мирзабеков. *Мол. биология*, **31**, 159 (1997)
48. R.K.Saiki, P.S.Walsh, C.H.Levenson, H.A.Erlich. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6230 (1989)
49. P.J.R.Day, P.S.Flora, J.E.Fox, M.R.Walker. *Biochem. J.*, **278**, 735 (1991)
50. Н.К.Кочетков, Э.И.Будовский, Е.Д.Свердлов, Н.А.Симукова, М.Ф.Турчинский, В.Н.Шибаев. В кн. *Органическая химия нуклеиновых кислот. Химия*, Москва, 1970
51. Д.Г.Кнорре, В.Ф.Зарытова, А.Г.Бадашкесва, О.С.Федорова. *Биотехнология. Т. 37. (Итоги науки и техники)*. Наука, Москва, 1991
52. S.Agrawal. *Methods Mol. Biol.*, **26**, 93 (1994)
53. J.A.Fidanza, H.Ozaki, L.W.McLaughlin. *Methods Mol. Biol.*, **26**, 121 (1994)
54. B.Chu, L.E.Orgel. *Methods Mol. Biol.*, **26**, 145 (1994)
55. D.G.Knorre, V.V.Vlassov, V.F.Zarytova, A.V.Lebedev, O.S.Fedorova. In *Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994. Р. 101
56. B.B.Шумянцева, Р.М.Хомутов. *Биоорг. химия*, **3**, 1471 (1977)
57. V.V.Shumyantzeva, N.I.Sokolova, Z.A.Shabarova. *Nucl. Acids Res.*, **3**, 903 (1976)
58. B.Н.Шибаев, Ю.Ю.Кусов, Н.А.Калинчук, Н.К.Кочетков. *Биоорг. химия*, **3**, 120 (1977)
59. E.K.F.Bautz, B.D.Hall. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **48**, 400 (1962)
60. P.T.Gilham. *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1311 (1962)
61. P.T.Gilham. *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 4982 (1964)
62. S.C.Gross, S.A.Kumar, H.W.Dickerman. *J. Biol. Chem.*, **257**, 4738 (1982)
63. T.Y.Shih, M.A.Martin. *Biochemistry*, **13**, 3411 (1974)
64. WO PCT 9009393; *Chem. Abstr.*, **149**, 247682 (1990)
65. S.S.Ghosh, G.F.Musso. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 5353 (1987)
66. М.Г.Ивановская, И.А.Козлов, Н.А.Нарышкин, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **21**, 535 (1995)
67. J.A.Langdale, A.D.Malcolm. *Gene*, **36**, 201 (1985)
68. Г.Корана. *Новые направления в химии биологически важных эфиров фосфорной кислоты*. Мир, Москва, 1964
69. З.А.Шабарова, А.А.Богданов. *Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. Химия*, Москва, 1978
70. J.P.Riehm, H.A.Scheraga. *Biochemistry*, **5**, 99 (1966)
71. A.Williams, I.T.Ibrahim. *Chem. Rev.*, **81**, 589 (1981)
72. P.T.Gilham. *Biochemistry*, **7**, 2809 (1968)
73. D.Rickwood. *Biochim. Biophys. Acta*, **269**, 47 (1972)
74. Г.Т.Бабкина, Д.Г.Кнорре, Л.Г.Оленчич. *Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук*, (1), 120 (1972)
75. В.Ф.Зарытова, Е.М.Иванова, А.В.Лебедев. *Биоорг. химия*, **2**, 189 (1976)
76. D.G.Knorre, V.F.Zarytova. *Nucl. Acids Res.*, **3**, 2709 (1976)
77. М.Г.Ивановская, Н.А.Нарышкин, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **21**, 454 (1995)
78. Д.Г.Кнорре, Т.Н.Шубина. *Кинетика и катализ*, **5**, 637 (1964)
79. В.Ф.Зарытова, Е.М.Иванова, А.В.Лебедев. *Биоорг. химия*, **2**, 1196 (1976)
80. M.G.Ivanovskaya, M.B.Gottikh, Z.A.Shabarova. *Nucleosides Nucleotides*, **6**, 913 (1987)
81. В.Ф.Зарытова, В.К.Райт, Т.С.Черникова. *Биоорг. химия*, **3**, 1626 (1977)
82. М.Г.Ивановская, И.А.Козлов, И.В.Лебедева, З.А.Шабарова. *Мол. биология*, **28**, 1176 (1994)
83. Y.Zhang, M.Y.Coyne, S.G.Will, C.H.Levenson, E.S.Kawasaki. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 3929 (1991)
84. M.V.Berridge, A.I.Aronson. *Anal. Biochem.*, **53**, 603 (1973)
85. A.Panet, H.G.Khorana. *J. Biol. Chem.*, **249**, 5213 (1974)
86. W.H.Scouten. In *Affinity Chromatography. Bioselective Adsorption on Inert Matrices. Vol. 59*. Wiley, New York, 1981. Р. 349
87. В.И.Латич, В.П.Варламов, Н.Н.Семенова, С.В.Рогожин. *Биохимия*, **45**, 1597 (1980)
88. T.T.Nikiforov, Y.H.Rogers. *Anal. Biochem.*, **227**, 201 (1995)
89. V.G.Allfrey, A.Inoue. *Methods Cell Biol.*, **17**, 253 (1978)
90. R.Bischoff, J.M.Coull, F.E.Regnier. *Anal. Biochem.*, **164**, 336 (1987)
91. В.С.Чу, G.M.Wahl, L.E.Orgel. *Nucl. Acids Res.*, **11**, 6513 (1983)
92. М.Б.Готтих, М.Г.Ивановская, Е.А.Скрипкин, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **16**, 514 (1990)
93. V.L.Drutsa, V.F.Zarytova, D.G.Knorre, A.V.Lebedev, N.I.Sokolova, Z.A.Shabarova. *Nucl. Acids Res.*, **5**, 185 (1978)
94. В.Л.Друца, В.Ф.Зарытова, Д.Г.Кнорре, А.В.Лебедев, Н.И.Соколова, З.А.Шабарова. *Докл. АН СССР*, **233**, 595 (1977)
95. В.В.Носова, И.С.Вельмога, Н.И.Соколова, З.А.Шабарова, М.А.Прокофьев. *Докл. АН СССР*, **219**, 1134 (1974)
96. В.В.Шумянцева, Р.М.Хомутов. *Биоорг. химия*, **4**, 1477 (1978)
97. T.Mukaiyama, R.Matsueda, M.Suzuki. *Tetrahedron Lett.*, 1901 (1970)
98. T.Mukaiyama, M.Hashimoto. *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 8528 (1972)
99. V.F.Zarytova, T.S.Godovikova, I.V.Kutayavin, L.M.Khalimskaya. In *Reactive Oligonucleotide Derivatives as Affinity Reagents and Probes in Molecular Biology*. (Eds K.S.Bruzik, W.J.Stec). Elsevier, Amsterdam, 1987. Р. 149
100. Т.С.Годовикова, В.Ф.Зарытова, Л.М.Халимская. *Биоорг. химия*, **12**, 475 (1986)
101. С.Х.Дегтярев, П.А.Белавин, И.Г.Шишкина, В.Ф.Зарытова, Л.П.Гаврюченкова, С.Н.Морозов. *Биоорг. химия*, **15**, 358 (1989)
102. V.F.Zarytova, I.G.Shishkina. *Anal. Biochem.*, **188**, 214 (1990)
103. В.Ф.Зарытова, Г.Г.Карпова, Д.А.Мундус, И.Г.Шишкина. *Биоорг. химия*, **16**, 1069 (1990)
104. Т.В.Абрамова, Н.В.Амирханов, В.В.Горн, В.Ф.Зарытова, Е.И.Фролова, И.Г.Шишкина. *Биоорг. химия*, **17**, 232 (1991)
105. И.А.Вторушина, Ю.А.Горбунов, В.Ф.Зарытова, Н.И.Комарова, А.В.Лебедев, С.Г.Лохов, А.В.Манаенков, А.Н.Синяков, И.Г.Шишкина. *Биоорг. химия*, **18**, 92 (1992)
106. I.G.Shishkina, N.V.Bulychev, A.P.Grollman, F.Johnson. *Int. J. Bio-Chromatogr.*, **3**, 329 (1997)
107. Б.М.Куриненко, Ф.Ф.Шаги-Мухамедова, А.М.Нужина. *Биоорг. химия*, **1**, 1624 (1975)
108. P.T.Gilham. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **42**, 173 (1974)
109. P.T.Gilham. *Methods Enzymol.*, **21**, 191 (1971)
110. G.R.Jacobson, J.P.Rosenbusch. *FEBS Lett.*, **79**, 8 (1977)
111. A.A.Недоспасов, Р.М.Хомутов. *Биоорг. химия*, **4**, 645 (1978)
112. D.L.Robberson, N.Davidson. *Biochemistry*, **11**, 533 (1972)
113. A.Weissbach, M.Poonian. *Methods Enzymol.*, **34**, 463 (1974)
114. M.Wilchek, R.Lamed. *Methods Enzymol.*, **34**, 475 (1974)
115. М.Б.Устав, Я.Л.Ремме, А.Я.Линд, Р.Л.-Э.Виллемс. *Биоорг. химия*, **5**, 365 (1979)
116. N.Ulbrich, I.G.Wool, E.Ackerman, P.B.Sigler. *J. Biol. Chem.*, **255**, 7010 (1980)
117. H.R.Burrell, J.Horowitz. *FEBS Lett.*, **49**, 306 (1975)
118. A.Oplatka, O.Muhlrad, R.Lamed. *J. Biol. Chem.*, **251**, 3972 (1976)
119. А.С.Бугорин, С.К.Василенко. *Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук*, (9), 143 (1976)

120. E.Junowicz, S.E.Charm. *Biochim. Biophys. Acta*, **428**, 157 (1976)
121. N.V.Belitsina, S.M.Elizarov, M.A.Glukhova, A.S.Spirin, A.S.Butorin, S.K.Vasilenko. *FEBS Lett.*, **57**, 262 (1975)
122. M.Ustav, R.Villems, A.Lind. *FEBS Lett.*, **82**, 259 (1977)
123. J.O.Langland, S.M.Pettiford, B.L.Jacobs. *Protein Expr. Purif.*, **6**, 25 (1995)
124. Д.Г.Кнорре, С.Д.Мызина, Л.С.Сандахчиев. *Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук*, (3), 135 (1964)
125. C.M.Joyce, J.R.Knowles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1278 (1974)
126. P.Remy, C.Birmele, J.P.Ebel. *FEBS Lett.*, **27**, 134 (1972)
127. S.Bartkowiak, J.Pawelkiewicz. *Biochim. Biophys. Acta*, **272**, 137 (1972)
128. J.J.Befort, N.Befort, G.Petrissant, P.Remy, J.P.Ebel. *Biochimie*, **56**, 625 (1974)
129. А.А.Ёлов, Е.М.Волков, Т.Г.Рейнтамм, Т.С.Орецкая, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **15**, 159 (1989)
130. S.Agrawal, C.Christodoulou, M.J.Gait. *Nucl. Acids Res.*, **14**, 6227 (1986)
131. Ю.П.Лысов, В.П.Флорентьев, А.А.Хорлин, К.Р.Храпко, В.В.Шик, А.Д.Мирзабеков. *Докл. АН СССР*, **303**, 1508 (1988)
132. K.R.Khrapko, Y.P.Lysov, A.A.Khorlin, V.V.Shik, V.L.Florentiev, A.D.Mirzabekov. *FEBS Lett.*, **256**, 118 (1989)
133. K.R.Khrapko, Y.P.Lysov, A.A.Khorlin, I.B.Ivanov, G.M.Eershov, S.K.Vasilenko, V.L.Florent'ev, A.D.Mirzabekov. *DNA Sequence*, **1**, 375 (1991)
134. R.Blanks, L.W.McLaughlin. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 10283 (1988)
135. B.A.Connolly, P.Rider. *Nucl. Acids Res.*, **13**, 4485 (1985)
136. L.A.Chrisey, C.E.O'Ferrall, B.J.Spargo, C.S.Dulcey, J.M.Calvert. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 3040 (1996)
137. S.-H.Kang, X.Xu, O.Heidenreich, S.Gryaznov, M.Nerenberg. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 2344 (1995)
138. R.Axen, J.Porath, S.Ernback. *Nature (London)*, **214**, 1302 (1967)
139. M.S.Poonian, A.J.Schlabach, A.Weissbach. *Biochemistry*, **10**, 424 (1971)
140. D.J.Arndt-Jovin, T.M.Jovin, W.Bähr, A.-M.Frischauf, M.Marquardt. *Eur. J. Biochem.*, **54**, 411 (1975)
141. A.F.Wagner, R.L.Bugianesi, T.Y.Shen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 184 (1971)
142. Б.А.Клящицкий, В.С.Шапот. *Успехи биол. химии*, **17**, 234 (1976)
143. J.Kohn, M.Wilchek. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 878 (1982)
144. P.Cuatrecasas. *J. Biol. Chem.*, **245**, 3059 (1970)
145. S.C.March, I.Parikh, P.Cuatrecasas. *Anal. Biochem.*, **60**, 149 (1974)
146. H.Bünemann, P.Westhoff, R.G.Herrmann. *Nucl. Acids Res.*, **10**, 7163 (1982)
147. U.Lindberg, T.Persson. *Eur. J. Biochem.*, **31**, 246 (1972)
148. G.Vassart, H.Brocas, P.Nokin, J.E.Dumont. *Biochim. Biophys. Acta*, **324**, 575 (1973)
149. J.N.Ihle, K.-L.Lee, F.T.Kenney. *J. Biol. Chem.*, **249**, 38 (1974)
150. J.Kempf, N.Pfleider, J.M.Egly. *J. Chromatogr.*, **147**, 195 (1978)
151. S.G.Siddell. *Eur. J. Biochem.*, **92**, 621 (1978)
152. J.C.Schabot. *J. Chromatogr.*, **73**, 253 (1972)
153. L.Clerici, F.Campagnari, J.F.M.de Rooij, J.H.van Boom. *Nucl. Acids Res.*, **6**, 247 (1979)
154. Н.И.Соколова, И.В.Пономаренко, З.А.Шабарова, М.А.Прокофьев. *Докл. АН СССР*, **253**, 1395 (1980)
155. C.R.Lowe, P.D.G.Dean. In *Affinity Chromatography*. Wiley, London, 1974. P. 200
156. P.D.G.Dean, D.B.Craven, M.J.Harvey, C.R.Lowe. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **42**, 99 (1974)
157. H.Guilford, P.-O.Larsson, K.Mosbach. *Chem. Scr.*, **2**, 165 (1972)
158. P.Brodelius, P.-O.Larsson, K.Mosbach. *Eur. J. Biochem.*, **47**, 81 (1974)
159. I.P.Trayer, H.R.Trayer, D.A.P.Small, R.C.Bottomley. *Biochem. J.*, **139**, 609 (1974)
160. O.Berglund, F.Ecstein. *Eur. J. Biochem.*, **28**, 492 (1972)
161. R.Barker, K.W.Olsen, J.H.Shaper, R.L.Hill. *J. Biol. Chem.*, **247**, 7135 (1972)
162. S.Ikeda, R.P.Swenson, D.H.Ives. *Biochemistry*, **27**, 8648 (1988)
163. N.R.Webb, R.V.J.Cham. *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 177 (1984)
164. G.I.Tesser, H.-U.Fisch, R.Schwyzer. *Helv. Chim. Acta*, **57**, 1718 (1974)
165. J.T.Kadonaga, R.Tjian. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5889 (1986)
166. Z.Hostomsky, J.Smrk, L.Arnold, Z.Tocik, V.Paces. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 4849 (1987)
167. D.Staiger, F.Becker, J.Schell, C.Koncz, K.Palme. *Eur. J. Biochem.*, **199**, 519 (1991)
168. G.G.F.Mason, A.-M.Witte, M.L.Whitelaw, C.Antonsson, J.McGuire, A.Wilhelmsen, L.Poellinger, J.-A.Gustafsson. *J. Biol. Chem.*, **269**, 4438 (1994)
169. A.Denizli, E.Pikin. *J. Chromatogr. B, Biomed. Sci. Appl.*, **666**, 215 (1995)
170. G.S.Cox, D.W.Gutkin, M.J.Haas, D.E.Cosgrove. *Biochim. Biophys. Acta*, **1396**, 67 (1998)
171. J.Porath. *Biochimie*, **55**, 943 (1973)
172. L.G.Moss, J.P.Moore, L.Chan. *J. Biol. Chem.*, **256**, 12655 (1981)
173. P.A.Lazo. *Biochem. J.*, **217**, 331 (1984)
174. P.O.Larsson, M.Glad, L.Hansson, M.-O.Mansson, S.Ohlon, K.Mosbach. *Adv. Chromatogr.*, **21**, 41 (1983)
175. E.M.Southern, U.Maskos, J.K.Elder. *Genomics*, **13**, 1008 (1992)
176. H.Potuzak, P.D.G.Dean. *Nucl. Acids Res.*, **5**, 297 (1978)
177. J.B.Wheatley, M.H.Lytte, M.D.Hocker, D.E.Schmidt Jr. *J. Chromatogr. A*, **726**, 77 (1996)
178. G.W.Anderson, J.E.Zimmerman, F.M.Callahan. *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1839 (1964)
179. S.Sakakibara, N.Inukai. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **38**, 1979 (1965)
180. M.Wilchek, K.L.Knudsen, T.Miron. *Bioconjugate Chem.*, **5**, 491 (1994)
181. M.Wilchek, T.Miron, J.Kohl. *Methods Enzymol.*, **104**, 3 (1984)
182. S.Pochet, B.Arcangioli, T.Huynh-Dinh. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 1619 (1988)
183. V.Afanassiev, V.Hanemann, S.Wölfl. *Nucl. Acids Res.*, **28**, e66 (2000)
184. B.E.Noyes, G.R.Stark. *Cell*, **5**, 301 (1975)
185. B.Seed. *Nucl. Acids Res.*, **10**, 1799 (1982)
186. J.K.Inman, H.M.Dintzis. *Biochemistry*, **8**, 4074 (1969)
187. Р.Дж.Линдсей. В кн. *Общая органическая химия. Т. 3.* (Под ред. Д.Бартона, У.Д.Оллеса). Химия, Москва, 1982. С. 168
188. M.Fontanel, H.Bazin, R.Téoule. *Bioconjugate Chem.*, **4**, 380 (1993)
189. В.В.Коршак, М.И.Штильман. В кн. *Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений*. Наука, Москва, 1984
190. E.N.Moudrianakis, M.Beer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **53**, 564 (1965)
191. J.C.Alwine, D.J.Kemp, G.R.Stark. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5350 (1977)
192. P.L.Ashley, R.J.MacDonald. *Anal. Biochem.*, **140**, 95 (1984)
193. J.F.M.de Rooij, G.Wille-Hazeleger, A.B.J.Vink, J.H.van Boom. *Tetrahedron*, **35**, 2913 (1979)
194. J.H.van Boom, J.F.M.de Rooij, L.Clerici, F.Campagnari. *Nucl. Acids Res. (Spec. Publ.)*, **4**, 85 (1978)
195. Т.С.Годовикова, Т.Н.Орлова, Е.Ю.Добркова, В.А.Шаманин, В.Ф.Зарытова, Н.В.Воробьева, Н.А.Сердюкова, Н.Ю.Шаманина, И.О.Петрусева, Н.Д.Пиценко. *Биоорг. химия*, **20**, 1196 (1994)
196. Пат. 1808014 РФ; *Бюл. изобрет.*, (13), 227 (1993)
197. M.A.Harpold, M.Calvin. *Nature (London)*, **219**, 486 (1968)
198. R.Paul, G.W.Anderson. *J. Org. Chem.*, **27**, 2094 (1962)
199. G.J.Bartling, H.D.Brown, S.K.Chattopadhyay. *Nature (London)*, **243**, 342 (1973)
200. M.T.W.Hearn. *Methods Enzymol.*, **135**, 102 (1987)
201. G.S.Bethell, J.S.Ayers, W.S.Hancock, M.T.W.Hearn. *J. Biol. Chem.*, **254**, 2572 (1979)
202. K.Nilsson, K.Mosbach. *Eur. J. Biochem.*, **112**, 397 (1980)
203. K.Nilsson, K.Mosbach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 449 (1981)
204. K.Nilsson, K.Mosbach. *Methods Enzymol.*, **135**, 65 (1987)
205. H.-C.Kirch, H.Krüger, H.S.Holthausen. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 3156 (1991)

206. R.F.Borch, M.D.Bernstein, H.D.Durst. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2897 (1971)
207. B.B.Романов, В.К.Старостина. *Биотехнология*, **7**, 618 (1987)
208. H.Ukeda, K.Ono, M.Imabayashi, P.Matsumoto, Y.Osajima. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 235 (1989)
209. F.B.Anspach, H.-J.Wirth, K.K.Unger, P.Stanton, J.R.Davies, M.T.W.Hearn. *Anal. Biochem.*, **179**, 171 (1989)
210. A.Freeman, M.Sokolovsky, L.Goldstein. *Biochim. Biophys. Acta*, **571**, 127 (1979)
211. I.Ugi. *Angew. Chem.*, **74**, 9 (1962)
212. P.Vretblad, R.Axen. *Acta Chem. Scand.*, **27**, 2769 (1973)
213. R.Axen, P.Vretblad, J.Porath. *Acta Chem. Scand.*, **25**, 1129 (1971)
214. T.Chow, C.Juby, L.Yuen. *Anal. Biochem.*, **175**, 63 (1988)
215. R.S.Matson, J.Rampal, S.L.Pentoney Jr, P.D.Anderson, P.Coassin. *Anal. Biochem.*, **224**, 110 (1995)
216. C.H.Duncan, S.L.Cavalier. *Anal. Biochem.*, **169**, 104 (1988)
217. U.Maskos, E.M.Southern. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 1675 (1992)
218. H.Seliger, R.Bader, M.Hinz, B.Rotte, F.Eisenbeiss, S.Gura, B.Nitzan, S.Margel. *React. Funct. Polym.*, **43**, 325 (2000)
219. C.Albretsen, K.-H.Kalland, B.-I.Haukanes, L.-S.Havarstein, K.Kleppe. *Anal. Biochem.*, **189**, 40 (1990)
220. Y.Hayakawa, S.Wakabayashi, H.Kato, R.Noyori. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 1691 (1990)
221. B.M.Alberts, F.J.Amodio, M.Jenkins, E.D.Gutmann, F.J.Ferris. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **33**, 289 (1968)
222. H.Potuzak, U.Wintersberger. *FEBS Lett.*, **63**, 167 (1976)
223. R.M.Litman. *J. Biol. Chem.*, **243**, 6222 (1968)
224. R.F.Baker. *Anal. Biochem.*, **78**, 569 (1977)
225. E.M.Southern. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503 (1975)
226. T.T.Nikiforov, R.B.Rendle, P.Goelet, Y.-H.Rogers, M.L.Kotewicz, S.Anderson, G.L.Trainor, M.R.Knapp. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 4167 (1994)
227. P.Cros, R.Kurfürst, P.Allibert, N.Battail, N.Piga, V.Roig, N.T.Thuong, B.Mandrand, C.Hélène. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 2951 (1994)
228. M.M.DeAngelis, D.G.Wang, T.L.Hawkins. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 4742 (1995)
229. V.Balladur, A.Theretz, B.Mandrand. *J. Colloid Interface Sci.*, **194**, 408 (1997)
230. J.Piehler, A.Brecht, G.Gauglitz, M.Zerlin, C.Maul, R.Thiericke, S.Grabley. *Anal. Biochem.*, **249**, 94 (1997)
231. Б.И.Сухоруков, Г.Б.Сухоруков, Л.И.Шабарчина, М.М.Монтрель. *Биофизика*, **45**, 40 (2000)
232. R.J.Britten. *Science*, **142**, 963 (1963)
233. S.Fukui, K.Sonomoto, N.Itoh, A.Tanaka. *Biochimie*, **62**, 381 (1980)
234. E.W.Khandjian. *Mol. Biol. Rep.*, **11**, 107 (1986)
235. С.М.Калачиков, В.А.Адричев, Г.М.Дымшиц. *Биоорг. химия*, **18**, 52 (1992)
236. Л.А.Фрумгарц, С.М.Калачиков, Г.М.Дымшиц, М.И.Добриков, Г.В.Шишкін. *Ізв. СО АН ССР. Сер. хим. наук*, (1), 81 (1988)
237. М.И.Добриков, Т.А.Приходько, И.В.Сафонов, Г.В.Шишкін. *Сиб. хим. журнал*, **2**, 18 (1992)
238. A.Wada, A.Kishizaki. *Biochim. Biophys. Acta*, **166**, 29 (1968)
239. Л.И.Гуськова, В.П.Демушкин. *Успехи химии*, **43**, 1241 (1974)
240. E.T.Bolton, B.J.McCarthy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **48**, 1390 (1962)
241. F.N.Rehman, M.Audeh, E.S.Abrams, P.W.Hammond, M.Kenney, T.C.Boles. *Nucl. Acids Res.*, **27**, 649 (1999)
242. T.Livache, A.Roget, E.Dejean, C.Barthet, G.Bidan, R.Téoule. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 2915 (1994)
243. J.G.Morgan, G.M.Dolganov, S.E.Robbins, L.M.Hinton, M.Lovett. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 5173 (1992)
244. H.Ji, L.M.Smith. *Anal. Chem.*, **65**, 1323 (1993)
245. J.Ostrowski, K.Bomsztyk. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 1045 (1993)
246. G.Gadaleta, D.D'Elia, L.Capuccio, C.Saccone, G.Pepe. *J. Biol. Chem.*, **271**, 13537 (1996)
247. T.Hultman, S.Stahl, T.Moks, M.Uhlen. *Nucleosides Nucleotides*, **7**, 629 (1988)
248. D.O'Meara, P.Nilsson, P.-Å.Nygren, M.Uhlén, J.Lundeberg. *Anal. Biochem.*, **255**, 195 (1998)
249. S.W.Lucas, M.M.Harding. *Anal. Biochem.*, **282**, 70 (2000)
250. R.C.Duhamel, J.S.Whitehead. *Methods Enzymol.*, **184**, 201 (1990)
251. G.S.Wood, R.Warnke. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 1196 (1981)
252. R.Alon, E.A.Bayer, M.Wilchek. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **170**, 1236 (1990)
253. G.Bussolati, P.Gugliotta. *J. Histochem. Cytochem.*, **31**, 1419 (1983)
254. K.S.Jakobsen, E.Breivold, E.Hornes. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 3669 (1990)
255. I.R.Rodriguez, G.J.Chader. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 3528 (1992)
256. W.H.Scouten, P.Konecny. *Anal. Biochem.*, **205**, 313 (1992)
257. T.Goldkorn, D.J.Prockop. *Nucl. Acids Res.*, **14**, 9171 (1986)
258. M.P.Vitek, S.G.Kreissman, R.H.Gross. *Nucl. Acids Res.*, **9**, 1191 (1981)
259. T.G.Wood, J.B.Lingrel. *J. Biol. Chem.*, **252**, 457 (1977)
260. L.R.Solomon, L.R.Massom, H.W.Jarrett. *Anal. Biochem.*, **203**, 58 (1992)
261. P.T.Gilham, W.E.Robinson. *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 4985 (1964)
262. H.Tsurui, A.Suyama, A.Wada. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, **19**, 49 (1988)
263. А.С.Буторин, В.В.Власов, Е.М.Иванова, А.С.Райт, И.Г.Шишкіна, Л.В.Юрченко, Л.А.Якубов. *Биополимеры и клетка*, **5**, 71 (1989)
264. U.Baumann, U.Lehmann, K.Schwellnus, J.H.van Boom, H.Kuhn. *Eur. J. Biochem.*, **170**, 267 (1987)
265. T.Schluep, C.L.Cooney. *Nucl. Acids Res.*, **26**, 4524 (1998)
266. Г.Г.Карпова, Л.О.Козлова, Н.П.Пичко. *Ізв. СО АН ССР. Сер. хим. наук*, (7), 96 (1983)
267. E.V.Vyazovkina, E.V.Savchenko, S.G.Lokhov, J.W.Engels, E.Wickstrom, A.V.Lebedev. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 2404 (1994)
268. J.T.Kadonaga. *Methods Enzymol.*, **208**, 10 (1991)
269. S.Eisenberg, S.C.Francrsconi, Ch.Civalier, S.S.Walker. *Methods Enzymol.*, **182**, 521 (1990)
270. H.Kawaguchi, A.Assai, Y.Ohtsuka, H.Watanabe, T.Wada, H.Handa. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 6229 (1989)
271. C.DiRusso, R.P.Rogers, H.W.Jarrett. *J. Chromatogr. A*, **677**, 45 (1994)
272. C.Pozidis, G.Vlatakis, V.Bouriotis. *J. Chromatogr.*, **630**, 151 (1993)
273. G.Vlatakis, V.Bouriotis. *Anal. Biochem.*, **195**, 352 (1991)
274. P.Neddermann, J.Jiricny. *J. Biol. Chem.*, **268**, 21218 (1993)
275. P.Neddermann, J.Jiricny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1642 (1994)
276. G.Schnapp, H.P.Rodi, W.J.Rettig, A.Schnapp, K.Damm. *Nucl. Acids Res.*, **26**, 3311 (1998)
277. J.Meinkoth, G.Wahl. *Anal. Biochem.*, **138**, 267 (1984)
278. H.G.Pereira. *BioEssays*, **4**, 110 (1986)
279. J.A.Matthews, L.J.Kricka. *Anal. Biochem.*, **169**, 1 (1988)
280. U.Landegren, R.Kaiser, C.T.Caskey, L.Hood. *Science*, **242**, 229 (1988)
281. G.S.Sayler, A.C.Layton. *Ann. Rev. Microbiol.*, **44**, 625 (1990)
282. А.Г.Бадашківа, Д.Г.Кнорре. *Мол. біологія*, **25**, 309 (1991)
283. A.H.Al-Hakim, R.Hull. *Biochem. J.*, **251**, 935 (1988)
284. J.J.Leary, D.J.Brigati, D.C.Ward. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4045 (1983)
285. H.Yokota, K.Yokoo, Y.Nagata. *Biochim. Biophys. Acta*, **868**, 45 (1986)
286. C.R.Petrie III, A.D.Adams, M.Stamm, J.van Ness, S.M.Watanabe, R.B.Meyer Jr. *Bioconjugate Chem.*, **2**, 441 (1991)
287. A.Oser, W.K.Roth, G.Valet. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 1181 (1988)
288. V.A.Shamanin, A.G.Pletnev, S.G.Rubin, V.I.Zlobin. *J. Gen. Virol.*, **71**, 1505 (1990)
289. K.Yamakawa, H.Oyamada, O.Nakagomi. *Mol. Cell Probes*, **3**, 397 (1989)
290. A.Oser, G.Valet. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 8178 (1988)
291. P.Hurskainen, P.Dahlen, J.Ylikoski, M.Kwiatkowski, H.Siitari, T.Lövgren. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 1057 (1991)
292. P.S.Thomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5201 (1980)
293. D.Y.Kwoh, G.R.Davis, K.M.Whitfield, H.L.Chappelle, L.J.DiMichele, T.R.Gingeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1173 (1989)
294. V.Deubel, M.Laille, J.P.Hugnot, E.Chungue, J.L.Guesdon, M.T.Drouet, S.Bassot, D.Chevrier. *J. Virol. Methods*, **30**, 41 (1990)

295. M.Shibata, H.Takano, T.Hironaka, K.Hirai. *J. Virol. Methods*, **46**, 279 (1994)
296. P.Frossard, K.L.Sisco, D.L.Rucknagel. *Anal. Biochem.*, **134**, 265 (1983)
297. T.K.Christopoulos, E.P.Diamandis, G.Wilson. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 6015 (1991)
298. G.M.Church, W.Gilbert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1991 (1984)
299. S.Beck. *Anal. Biochem.*, **164**, 514 (1987)
300. M.Purrello, I.Balazs. *Anal. Biochem.*, **128**, 393 (1983)
301. P.J.Nicholls, A.D.Malcolm. *J. Clin. Lab. Anal.*, **3**, 122 (1989)
302. M.Ranki, A.Palva, M.Virtanen, M.Laaksonen, H.Soderlund. *Gene*, **21**, 77 (1983)
303. A.C.Syvanen. *Med. Biol.*, **64**, 313 (1986)
304. D.V.Morrissey, M.Lombardo, J.K.Eldredge, K.R.Kearney, E.P.Groody, M.L.Collins. *Anal. Biochem.*, **181**, 345 (1989)
305. P.Dahlen, A.C.Syvanen, P.Hurskainen, M.Kwiatkowski, C.Sund, J.Ylikoski, H.Soderlund, T.Lovgren. *Mol. Cell Probes*, **1**, 159 (1987)
306. G.H.Keller, D.-P.Huang, M.M.Manak. *Anal. Biochem.*, **177**, 27 (1989)
307. H.Kohsaka, A.Taniguchi, D.D.Richman, D.A.Carson. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 3469 (1993)
308. M.S.Urdea, J.A.Running, T.Horn, J.Clyne, L.Ku, B.D.Warner. *Gene*, **61**, 253 (1987)
309. D.V.Morrissey, M.L.Collins. *Mol. Cell. Probes*, **3**, 189 (1989)
310. A.Jungell-Nortamo, A.C.Syvanen, P.Luoma, H.Soderlund. *Mol. Cell Probes*, **2**, 281 (1988)
311. Y.Tsuruta, T.Yoshioka, R.Suzuki, T.Sakata. *J. Immunol. Methods*, **169**, 17 (1994)
312. T.I.Vener, M.F.Turchinsky, V.P.Zubov, T.S.Godovikova, T.N.Orlova, V.A.Shamanin, V.F.Kulikova. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, **24**, 267 (1991)
313. T.S.Godovikova, T.N.Orlova, V.F.Zarytova, V.A.Shamanin, N.V.Vorobjova, N.A.Serdjukova, A.G.Romashchenko. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, **24**, 284 (1991)
314. S.Kawai, S.Maekawajiri, A.Yamane. *Anal. Biochem.*, **209**, 63 (1993)
315. M.Shindo, A.M.Di Bisceglie, J.Silver, T.Limjoco, J.H.Hoofnagle, S.M.Feinstone. *J. Virol. Methods*, **48**, 65 (1994)
316. U.Maskos, E.M.Southern. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 2267 (1993)
317. W.Bains, G.Smith. *J. Theor. Biol.*, **135**, 303 (1988)
318. R.Drmanac, I.Labat, I.Brukner, R.Crkvenjakov. *Genomics*, **4**, 114 (1989)
319. C.R.Cantor, A.Mirzabekov, E.Southern. *Genomics*, **13**, 1378 (1992)
320. D.J.Duggan, M.Bittner, H.Chen, P.Meltzer, J.M.Trent. *Nat. Genet.*, **21**, 10 (1999)
321. R.J.Lipshutz., T.Fodor, T.R.Gingeras, D.J.Lokhart. *Nat. Genet.*, **21**, 20 (1999)
322. D.D.Bowtell. *Nat. Genet.*, **21**, 25 (1999)
323. A.Vente, M.Korn, G.Zehetner, A.Poustka, H.Lehrach. *Nat. Genet.*, **21**, 22 (1999)
324. C.M.Niemeyer, D.Blohm. *Angew. Chem.*, **38**, 2865 (1999)
325. T.Pastinen, A.Kurg, A.Metspalu, L.Peltonen, A.C.Syvanen. *Genome Res.*, **7**, 606 (1997)
326. A.Metspalu, J.M.Shumaker. In *Microsystem Technology. A Power Tool for Biomolecular Studies. Vol. 10.* (Eds J.M.Kohler, T.Mejeva, H.P.Saluz). Birkhauser Verlag, Basel; Boston; Berlin, 1999. P. 371
327. Z.Guo, Q.Liu, L.M.Smith. *Nat. Biotechnol.*, **15**, 331 (1997)
328. G.Ramsay. *Nat. Biotechnol.*, **16**, 40 (1998)
329. S.Granjeaud, F.Bertucci, B.R.Jordan. *BioEssays*, **21**, 781 (1999)
330. M.Schena, D.Shalon, R.W.Davis, P.O.Brown. *Science*, **270**, 467 (1995)
331. V.G.Cheung, M.Morley, F.Aguilar, A.Massimi, R.Kucherlapati, G.Childs. *Nat. Genet.*, **21**, 15 (1999)
332. J.G.Hacia. *Nat. Genet.*, **21**, 42 (1999)
333. J.S.Fruchtel, G.Jung. *Angew. Chem.*, **108**, 19 (1996)
334. R.J.Lipshutz, D.Morris, M.Chee, E.Hubbell, M.J.Kozal, N.Shah, N.Shen, R.Yang, S.P.A.Fodor. *Biotechniques*, **19**, 442 (1995)
335. A.C.Pease, D.Solas, E.J.Sullivan, M.T.Crovin, C.P.Holmes, S.P.A.Fodor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5022 (1994)
336. G.Lowe. *Chem. Soc. Rev.*, **24**, 309 (1995)
337. G.H.McGall, A.D.Barone, M.Diggelmann, S.P.A.Fodor, E.Gentalen, N.Ngo. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 5081 (1997)
338. M.C.Pirrung, L.F.G.MacGall. *J. Org. Chem.*, **63**, 241 (1998)
339. S.P.Fodor, J.L.Read, M.C.Pirrung, L.Stryer, A.T.Lu, D.Solas. *Science*, **251**, 767 (1991)
340. M.Beier, J.D.Hoheisel. *Nucl. Acids Res.*, **28**, e11 (2000)
341. E.Gentalen, M.Chee. *Nucl. Acids Res.*, **27**, 1485 (1999)
342. Yu.-H.Rogers, P.Yiang-Baum, Z.-J.Huang, V.Bogdanov, S.Anderson, M.T.Boyce-Jacino. *Anal. Biochem.*, **266**, 23 (1999)
343. T.Strother, R.J.Hamers, L.M.Smith. *Nucl. Acids Res.*, **28**, 3535 (2000)
344. A.Kumar, O.Larsson, D.Parodi, Z.Liang. *Nucl. Acids Res.*, **28**, e71 (2000)
345. L.C.Shriver-Lake. In *Immobilised Biomolecules in Analysis*. (Eds T.Cass, F.S.Liger). Oxford University Press, Oxford, 1998. P. 1
346. J.J.Cras, C.A.Rowe-Taitt, D.A.Nivens, F.S.Ligler. *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 683 (1999)
347. A.D.Mirzabekov. *Trends Biotechnol.*, **12**, 27 (1994)
348. G.Yershov, V.Barsky, A.Belgovsky, E.Kirillov, E.Kreindlin, I.Ivanov, S.Parinov, D.Gushin, A.Drobyshev, S.Dubiley, A.Mirzabekov. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4913 (1996)
349. A.L.Drobyshev, A.S.Zasedatelev, G.M.Yershov, A.D.Mirzabekov. *Nucl. Acids Res.*, **27**, 4100 (1999)
350. E.Ermantraut, K.Wohlfart, S.Wölf, T.Schulz, M.Kohler. In *Microreaction Technology. Proceedings of the 1st International Conference on Microreaction*. (Ed. W.Ehrfeld). Springer-Verlag, Berlin; Heidelberg, 1997. P. 332
351. L.-J.van Doorn, B.Kleter, J.Voermans, G.Maertens, H.Brouwer, R.Heijtnik, W.Quint. *J. Med. Virol.*, **42**, 22 (1994)
352. L.T.Mazzola, S.P.Fodor. *Biophys. J.*, **68**, 1653 (1995)
353. T.M.Herne, M.J.Tarlov. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 8916 (1997)
354. R.Levicky, T.M.Herne, M.J.Tarlov, S.Satija. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 9798 (1998)
355. A.B.Steele, T.M.Herne, M.J.Tarlov. *Anal. Chem.*, **70**, 4670 (1998)
356. S.O.Kelley, N.M.Jackson, M.G.Hill, J.K.Barton. *Angew. Chem.*, **111**, 991 (1999)
357. U.Maskos, E.M.Southern. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 4663 (1993)
358. J.C.Williams, S.C.Case-Green, K.U.Mir, E.M.Southern. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 1365 (1994)
359. N.C.Fawcett, J.A.Evans, L.C.Chien, N.Flowers. *Anal. Lett.*, **21**, 1099 (1988)
360. H.Su, K.M.R.Kallury, M.Thomson, A.Roach. *Anal. Chem.*, **66**, 769 (1994)
361. C.Nicolini, V.Erokhin, P.Facci, S.Guerzoni, A.Ross, P.Pashkevitsch. *Biosens. Bioelectron.*, **12**, 613 (1997)
362. J.Wang, P.-E.Nielsen, M.Jiang, X.Cai, J.R.Femandez, D.H.Grant, M.Ozsoz, A.Begleiter, M.Mowat. *Anal. Chem.*, **69**, 5200 (1997)
363. E.F.A.de Vries, R.B.M.Schafstorf, J.van der Plas, J.Greve. *Biosens. Bioelectron.*, **9**, 509 (1994)
364. A.A.Kruchinin, Y.G.Vlasov. *Sensors Actuators B*, **30**, 77 (1996)
365. M.Yang, M.E.McGovern, M.Thomson. *Anal. Chim. Acta*, **346**, 259 (1997)
366. S.Sawata, E.Kai, K.Ikebukuro, T.Iida, T.Honda, I.Karube. *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 397 (1999)
367. S.Kossek, C.Padeste, L.X.Tiefenauer, H.Siegenthaler. *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 31 (1998)
368. K.M.Millan, A.Saraullu, S.R.Mikelsen. *Anal. Chem.*, **66**, 2943 (1994)
369. J.Wang, G.Rivas, X.Cai, E.Palecek, P.E.Nielsen, H.Shiraishi, N.Dontha, D.Luo, C.Parrado, M.Chicharro, P.A.M.Farias, F.Valera, D.Grant, M.Ozsoz, M.N.Flair. *Anal. Chim. Acta*, **347**, 1 (1997)
370. G.Marazza, I.Chianella, M.Mascini. *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 43 (1999)
371. G.B.Sukhorukov, M.M.Montrel, A.I.Petrov, L.I.Shabarchina, B.I.Sukhorukov. *Biosens. Bioelectron.*, **11**, 913 (1996)
372. M.Sauer, A.Brech, K.Charisse, M.Maier, M.Gerster, I.Stemmler, G.Gauglitz, E.Bayer. *Anal. Chem.*, **71**, 2850 (1999)
373. C.Xiao, X.-E.Zhang, Y.-Q.Chai, W.-P.Hu, Z.-P.Zhang, X.-M.Zhang, A.F.G.Cass. *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 451 (1998)
374. T.M.Jovin, A.Kornberg. *J. Biol. Chem.*, **243**, 250 (1968)

375. V.V.Didenko. *Anal. Biochem.*, **213**, 75 (1993)
376. C.Hansen, F.Libert, G.Vassart, D.Christophe. *Anal. Biochem.*, **162**, 130 (1987)
377. I.Raineri, C.Moroni, H.P.Senn. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 4010 (1991)
378. A.Rolfs, I.Weber. *Biotechniques*, **17**, 782 (1994)
379. A.Rosenthal, D.S.C.Jones. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 3095 (1990)
380. S.Stamm, J.Brosius. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 1350 (1991)
381. C.R.Thrash, R.T.Schimke. *J. Biol. Chem.*, **252**, 5615 (1977)
382. K.Kurabayashi-Ohta, S.Tamatsukuri, M.Hikata, C.Miyamoto, Y.Furuichi. *Biochim. Biophys. Acta*, **1156**, 204 (1993)
383. E.Hara, T.Kato, S.Nakada, S.Sekiya, K.Oda. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 7097 (1991)
384. K.Kurabayashi, M.Hikata, O.Hiraoka, C.Miyamoto, Y.Furuichi. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, **19**, 61 (1988)
385. А.А.Ёлов, Е.М.Волков, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **17**, 789 (1991)
386. H.A.Marble, R.H.Davis. *Biotechnol. Prog.*, **11**, 393 (1995)
387. R.H.Davis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **6**, 213 (1995)
388. Л.Я.Денисова, С.Н.Загребельный, Н.М.Пустошилова, А.Г.Веняминова, В.В.Горн, В.Ф.Зарытова, М.Н.Репкова, И.Г.Шишкина. *Биоорг. химия*, **15**, 562 (1989)
389. H.W.Jarrett. *J. Chromatogr.*, **618**, 315 (1993)
390. V.Delpech. *Ann. Biol. Clin.*, **58**, 29 (2000)
391. M.J.O'Donnell-Maloney, C.L.Smith, C.R.Cantor. *Trends Biotechnol.*, **14**, 401 (1996)

## AFFINITY SORBENTS CONTAINING NUCLEIC ACIDS AND THEIR FRAGMENTS

**I.G.Shishkina, A.S.Levina, V.F.Zarytova**

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences  
8, Prospr. Akad. Lavrent'eva, 630090 Novosibirsk, Russian Federation, Fax +7(383)233–3677*

Published data on the main methods for the preparation of carriers containing nucleic acids (NA) and their fragments (oligonucleotides) are analysed. Primary attention is devoted to the chemical methods of immobilisation. The physical and physicochemical methods of immobilisation, those using enzymes and avidin–biotin interactions, as well as the preparation of NA-containing carriers during oligonucleotide synthesis directly on these carriers are also considered. A special section covers the use of NA-containing carriers for the isolation of individual NA and proteins and for hybridisation analysis including that using DNA chips and DNA biosensors.

Bibliography — 391 references.

*Received 15th March 2001*