

# Нуклеиновые кислоты, содержащие остаток ферроцена: синтез и электрохимические свойства

Т.С.Зацепин, С.Ю.Андреев, Т.Гианик, Т.С.Орещкая

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Химический факультет  
119992 Москва, Ленинские горы, факс (095) 939–3181

Университет Коменского

84248 Братислава, Млинска Долина F1, Словакия, факс +42(126)542–6774

Обобщены литературные данные по синтезу фрагментов нуклеиновых кислот, содержащих остаток ферроцена. Систематизированы известные методы, обсуждены их преимущества и недостатки. Рассмотрено применение конъюгатов нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов с ферроценом для создания систем электрохимического детектирования нуклеиновых кислот.

Библиография — 121 ссылка.

## Оглавление

|                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------|-----|
| I. Введение                                                   | 602 |
| II. Синтез фрагментов нуклеиновых кислот, содержащих ферроцен | 603 |
| III. Электрохимическое детектирование нуклеиновых кислот      | 612 |
| IV. Заключение                                                | 619 |

## I. Введение

Для изучения нуклеиновых кислот (НК) и их комплексов с белками необходимо создание высокочувствительных методов, позволяющих идентифицировать и количественно определять их присутствие в анализируемых пробах. Применение спектrophотометрических, автордиографических и электрохимических методов для анализа нуклеиновых кислот, как правило, предполагает присоединение к ним группировок, называемых в современной литературе репортерными. Введение репортерных групп увеличивает селективность определения и позволяет улавливать низкие концентрации НК при минимальном влиянии на их структуру и функции.

**Т.С.Зацепин.** Аспирант кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ. Телефон: (095)939–3148, e-mail: tsz@yandex.ru

**С.Ю.Андреев.** Аспирант той же кафедры. Телефон: (095)939–3148, e-mail: andreev@genebee.msu.ru

**Т.С.Орещкая.** Доктор химических наук, профессор той же кафедры. Телефон: (095)939–5411, e-mail: oretskaya@belozersky.msu.ru  
Область научных интересов авторов: синтез модифицированных нуклеозидов и их аналогов, автоматический твердофазный синтез модифицированных олигонуклеотидов, НК-белковые взаимодействия.

**Т.Гианик.** Доктор физических наук, профессор кафедры биофизики и химической физики Университета Коменского. Телефон: +42(126)029–5683, e-mail: hianik@fmph.uniba.sk  
Область научных интересов: электрохимические методы детектирования нарушения структуры ДНК, биосенсоры, молекулярная акустика, физика поверхностей и коллоидных систем.

Широко применяется мечение НК радиоактивными изотопами, особенно  $^{32}\text{P}$  (см.<sup>1</sup>). Введение изотопов фосфора осуществляют ферментативными методами с использованием меченых нуклеозид-5'-трифосфатов или нуклеозид-3',5'-бисфосфатов, причем эффективность этой реакции достаточно высока и для коротких, и для протяженных НК. Однако использование радиоактивных изотопов требует определенных мер предосторожности. Кроме того, к ограничениям этого метода относят короткие периоды полураспада используемых изотопов  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  и  $^{125}\text{I}$  и радиолит меченых НК.

Наибольшее распространение для детектирования нуклеиновых кислот получило использование флуоресцентных меток.<sup>2,3</sup> В настоящее время 5'-трифосфаты нуклеозидов, 2'-дезоксинуклеозидов и 2',3'-дидезоксинуклеозидов, содержащие разнообразные флуоресцентные метки, являются коммерчески доступными. Применение конъюгатов нуклеозидтрифосфатов с биотином в ферментативном синтезе НК позволяет проводить помимо детектирования избирательное выделение целевых олигонуклеотидов за счет образования стабильного комплекса биотина с авидином или стрептавидином, иммобилизованным на полимерном носителе.<sup>4</sup> Кроме того, активно развивается детектирование нуклеиновых кислот методом масс-спектрометрии (MALDI-MS (см.<sup>5</sup>) и ESI-MS (см.<sup>6</sup>)).

Электрохимическое детектирование имеет огромный потенциал для анализа нуклеиновых кислот. Высокая чувствительность, низкая стоимость и быстрота анализа, а главное, легкость миниатюризации делают перспективным использование электрохимического детектирования для создания ДНК-чипов,<sup>7</sup> при проведении ВЭЖХ и капиллярного электрофореза НК.<sup>8</sup>

Дата поступления 20 декабря 2002 г.

Одним из подходов к созданию электрохимических НК-сенсоров является синтез модифицированных нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов, содержащих различные металлокомплексы.<sup>9</sup> Конъюгаты модифицированных олигонуклеотидов с ионами металлов могут быть использованы также в качестве химических нуклеаз<sup>10,11</sup> и при изучении переноса электрона с участием ДНК.<sup>12–14</sup> Можно выделить несколько методов синтеза таких соединений: 1) конъюгация металлокомплекса и олигонуклеотида, содержащего химически активную группу на 5'-или 3'-конце;<sup>15,16</sup> 2) добавление ионов металла к олигонуклеотиду, связанному с хелатообразующей группировкой;<sup>17,18</sup> 3) получение амидофосфитного производного нуклеозида, содержащего металлокомплекс,<sup>19,20</sup> с последующим встраиванием его в состав олигонуклеотидной цепи в процессе автоматического твердофазного синтеза. Недавно был опубликован обзор<sup>21</sup>, посвященный синтезу комплексов олигонуклеотидов с ионами металлов платиновой группы.

Настоящий обзор посвящен методам синтеза и применению нуклеозидов, нуклеозид-5'-трифосфатов и олигонуклеотидов, содержащих остаток ферроцена, которые могут быть ферментативно встроены в состав НК или иммобилизованы на электрод. Производные ферроцена являются перспективными для получения металлосодержащих олигонуклеотидов благодаря небольшому размеру, высокой стабильности окисленной и восстановленной форм, обратимости и высокой скорости окислительно-восстановительной реакции, а также доступности.<sup>22</sup>

Иммобилизация ферроценосодержащих олигонуклеотидов на электроде позволяет определять первичную структуру НК<sup>†</sup> методом гибридизации. Другой возможный подход к изучению нуклеотидной последовательности предполагает синтез конъюгатов ферроцена с различными молекулами, способными селективно и эффективно связываться с НК.<sup>24</sup> В ряде случаев для этой цели применяют конъюгаты ферроцена с интеркаляторами.<sup>25–27</sup> Однако использование ферроценосодержащих олигонуклеотидов позволяет достичь наибольшей специфичности связывания с НК-мишенью по сравнению с другими предложенными производными ферроцена.

Электрохимическое детектирование НК на поверхности электрода представляет собой перспективный метод для изучения моноклеотидного полиморфизма — наиболее распространенного типа мутаций генома, встречающегося в среднем один раз на тысячу нуклеотидных звеньев. Показано,<sup>28</sup> что эти мутации ответственны за ряд генетических заболеваний. Методом прямого секвенирования было установлено,<sup>29</sup> что геном человека насчитывает около 1.42 млн однобуквенных замен. Другими распространенными методами распознавания однобуквенных замен являются полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием флуоресцентно-меченных нуклеозидтрифосфатов<sup>30</sup> и применение ДНК-чипов.<sup>31</sup> Кроме того, для изучения однобуквенных замен применяют анализ одноцепочечного<sup>32</sup> и двуцепочечного<sup>33</sup> конформационного полиморфизма, а также гибридизацию в растворе с последующим градиентным денатурирующим гель-электрофорезом<sup>34</sup> или гель-электрофорезом с градиентом температуры.

Таким образом, методы синтеза ферроценосодержащих олигонуклеотидов и их применение, которым посвящен данный обзор, представляют интерес для специалистов не только в области химии нуклеиновых кислот, но и в сфере диагностики генетических заболеваний.

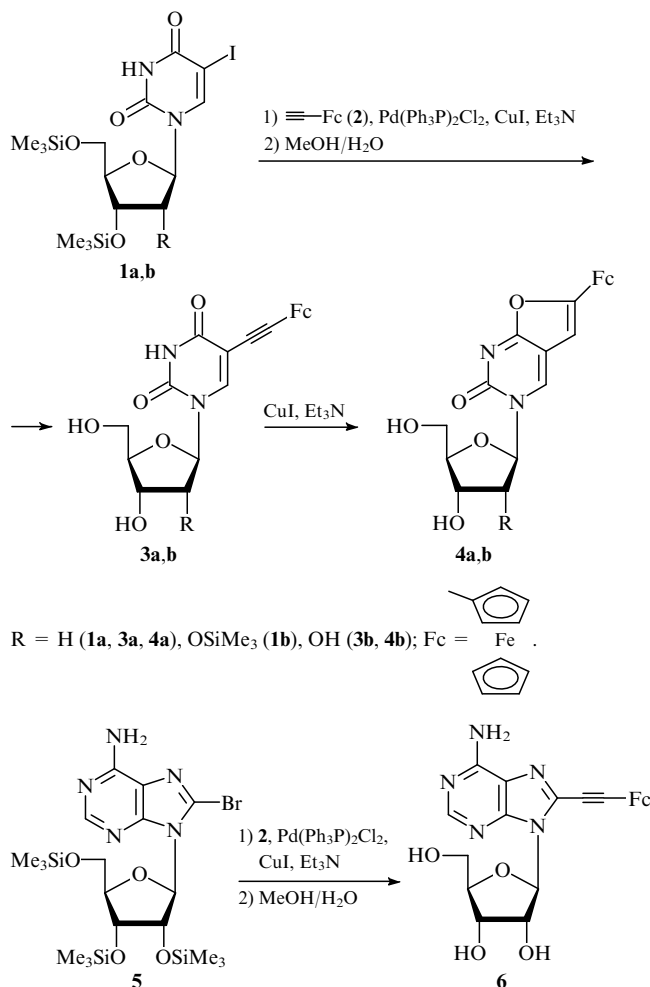
<sup>†</sup> Известно<sup>23</sup> об использовании пептидов, содержащих ферроцен на N-конце, для изучения пространственной структуры при помощи электрохимических методов и рентгеноструктурного анализа. К сожалению, аналогичные исследования ферроценосодержащих НК не проводились.

## II. Синтез фрагментов нуклеиновых кислот, содержащих ферроцен

### 1. Синтез фрагментов нуклеиновых кислот, содержащих ферроцен в гетероциклическом основании

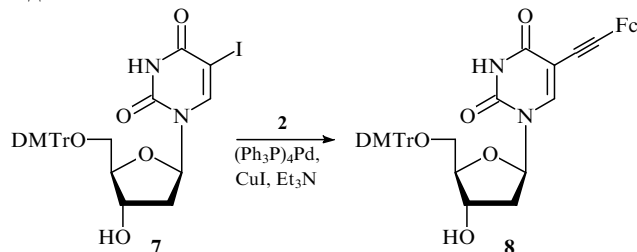
Первая работа, посвященная синтезу гетероциклических оснований и нуклеозидов, содержащих остаток ферроцена, была опубликована в 1991 г.<sup>35</sup> В ней описаны несколько стратегий синтеза.

Первый подход предполагает взаимодействие защищенного 5-йод-2'-дезоксиримидина (**1a**) или 5-йодуридина (**1b**) с алкинильным производным ферроцена **2** в условиях реакции Соногаширы: перемешивание раствора реагентов в триэтилamine в присутствии каталитических количеств дихлорида бис(трифенилфосфин)палладия и йодида меди(I) при 40°C.<sup>36,37</sup> После разложения триметилсилиловых эфиров выходы пиримидиновых производных **3a,b** составили лишь 10–15%, так как в условиях реакции Соногаширы они частично превращаются в ферроценилфуропиримидоны **4a,b**. Аналогично проводили реакцию в случае 8-бромаденозина **5**. Выход ферроценильного производного **6** составил 70%.<sup>35</sup>



В работе<sup>38</sup> показано, что производные 5-(ферроценил-этинил)уридина **3a,b** превращаются в ферроценилфуропиримидоны **4a,b** и в составе НК при стандартной постсинтетической обработке олигонуклеотидов водным раствором аммиака. Наличие фуропиримидона в составе олигонуклеотидной цепи приводит к уменьшению термической стабильности ДНК-дуплекса.

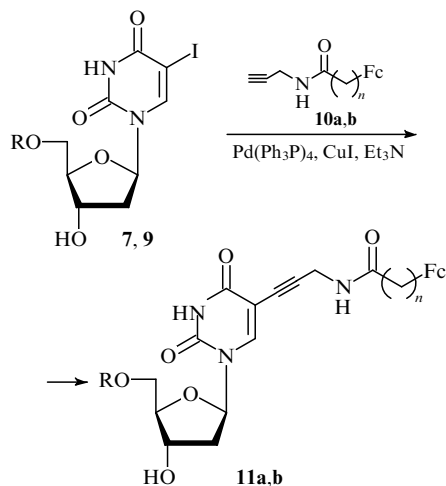
Позже Хултон с соавт.<sup>39</sup> применили другой палладиевый катализатор — тетраис(трифенилфосфин)палладий — и уменьшили температуру проведения реакции до комнатной. Изменение условий и наличие в исходном нуклеозиде **7** 5'-диметокситрильной защитной группы, повышающей его растворимость, увеличивает выход продукта замещения **8** до 75%.



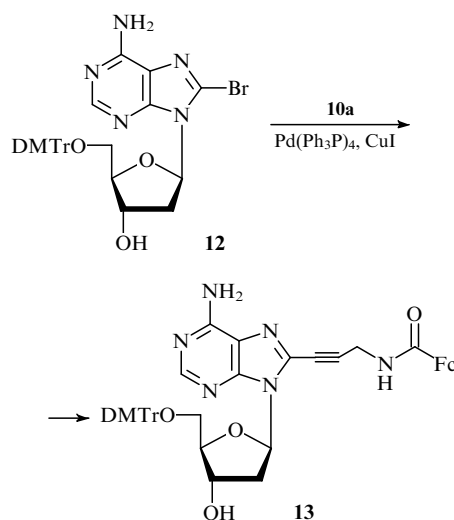
DMTr = (4-MeOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PhC.

Для включения нуклеозида **8** в состав олигонуклеотидной цепи его предварительно превращали в амидофосфитное производное. Применение в олигонуклеотидном синтезе ацетильных или феноксиацетильных групп для защиты экзоциклических аминогрупп гетероциклических оснований позволило проводить постсинтетическое деблокирование целевых олигомеров в более мягких условиях — вместо концентрированного раствора аммиака использовать 50 мМ раствор карбоната калия в метаноле, что понижает вероятность протекания реакции циклизации. Тем не менее последующий гидролиз синтезированных олигонуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного яда и щелочной фосфатазой показал, что около 50% ферроценсодержащих фрагментов в составе олигомеров находилось в виде ферроценилфуropyримидонов. При хранении олигонуклеотидов в растворе постепенно происходит окисление ферроцена кислородом воздуха с образованием катиона ферроценния, что установлено методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, поэтому для стабилизации модифицированных остатков уридина добавляли в раствор дитиотреит.<sup>39</sup>

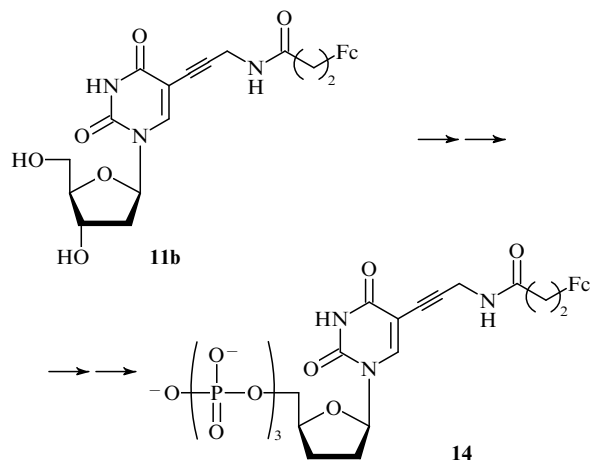
В настоящее время реакция Соногаширы по-прежнему является наиболее широко используемым методом введения ферроценильного остатка по гетероциклическому основанию.<sup>38–43</sup> Так, исходя из 5-иод-2'-дезоксйридина **9** или его 5'-диметокситрильного производного **7** и алкинильных производных ферроцена **10a,b** получены соединения **11a,b**. Взаимодействием алкинильного производного ферроцена **10a** с защищенным 8-бром-2'-дезоксаденозином **12** синтезирован модифицированный нуклеозид **13**.



R = DMTr (**7**), H (**9**); n = 0 (**a**), 2 (**b**).

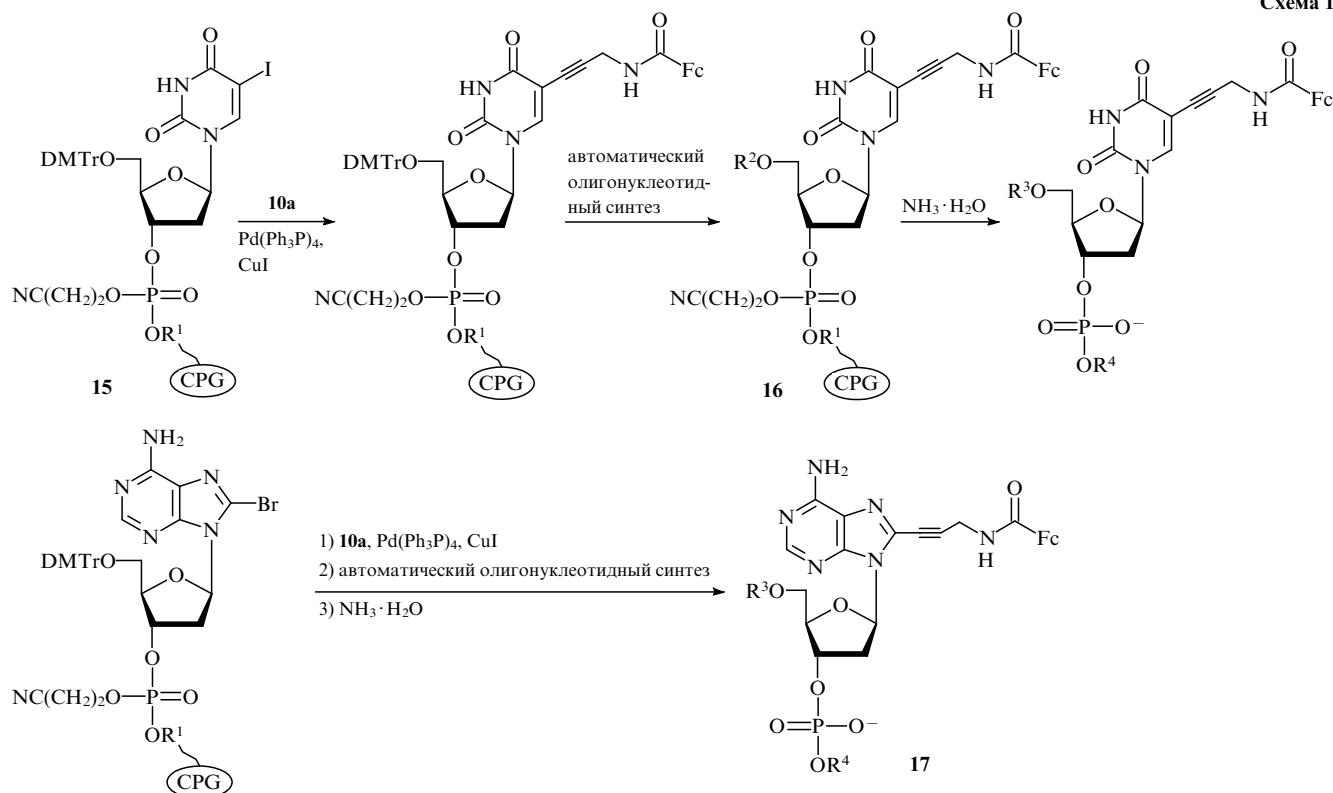


В работе<sup>42</sup> модифицированный 2'-дезоксйридин **11b**, содержащий производное ферроцена при атоме C(5), был превращен в 2',3'-дидезокси-5'-трифосфат **14** и введен на 3'-конец олигонуклеотида при помощи терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазы. Соединение **14** и его аналоги могут найти применение для определения нуклеотидной последовательности ДНК по методу Сенгера<sup>44</sup> с использованием электрохимического детектирования.



В работах Гринстаффа с соавт.<sup>40,41,45</sup> предложен оригинальный подход, предполагающий присоединение ферроценильного производного к растущей олигонуклеотидной цепи. К модифицированному олигомеру **15**, полученному в результате введения защищенного 5-иод-2'-дезоксйридина **7** на 5'-конец блокированного иммобилизованного олигонуклеотида, присоединяли пропинильное производное ферроцена **10a** в присутствии палладиевого катализатора и йодида меди(I), после чего продолжали олигонуклеотидный синтез. На последней стадии полученный модифицированный олигомер **16** деблокировали концентрированным водным раствором аммиака (схема 1). Аналогично получены олигонуклеотиды **17**, содержащие модифицированный остаток дезоксиаденозина. Реакция Соногаширы чрезвычайно чувствительна ко множеству факторов, в частности, к присутствию следовых количеств первичных аминов и воды, поэтому выходы олигонуклеотидов составили 20–50%. Следует отметить, что при попытке присоединения производного ферроцена **10a** после окончания олигонуклеотидного синтеза выход целевого продукта **16** уменьшался до 8%. Это может быть связано со стерическими затруднениями, создаваемыми 5'-концевой частью иммобилизованного олигонуклео-

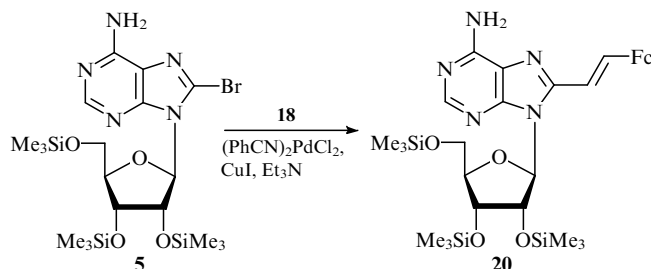
Схема 1



R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> — фрагменты защищенной олигонуклеотидной цепи; R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> — фрагменты олигонуклеотидной цепи; CPG — стекло с контролируемым размером пор (controlled pore glass).

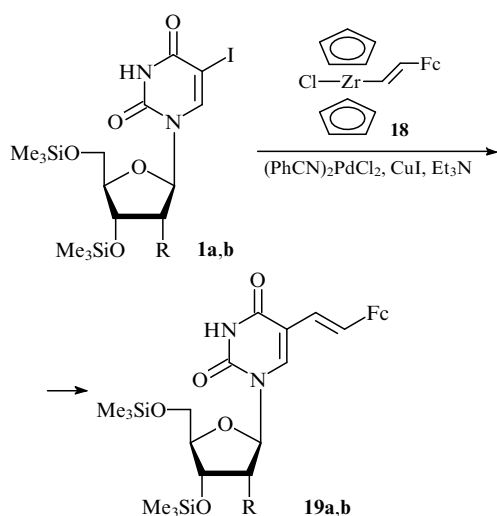
тида. При введении ферроценсодержащих нуклеозидов **11a** и **13** в состав олигонуклеотидной цепи выходы модифицированных олигомеров составляли 10–15%. Наличие в олигонуклеотидной цепи ферроценильного производного 2'-дезоксаденозина приводит к большей дестабилизации ДНК-дуплекса по сравнению с аналогичным производным 2'-дезоксуридина.

Другой подход<sup>35</sup> к получению фрагментов НК, содержащих остаток ферроцена в гетероциклическом основании, предполагает проведение конденсации галогеннуклеозидов **1a,b** и **5** с металлоорганическим производным винилферро-

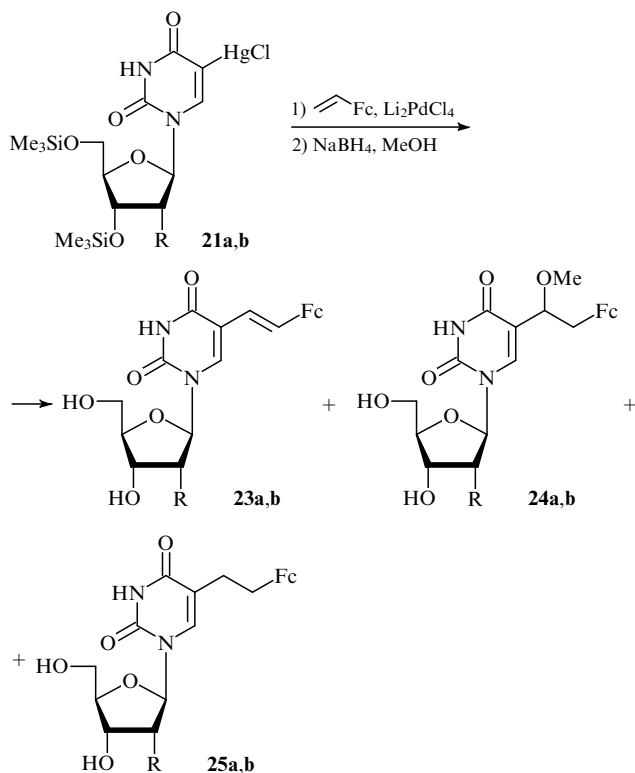


цена **18**. Выходы продуктов **19a,b** и **20** составили 15–20%, что заметно уступает синтезу по Соногашире.

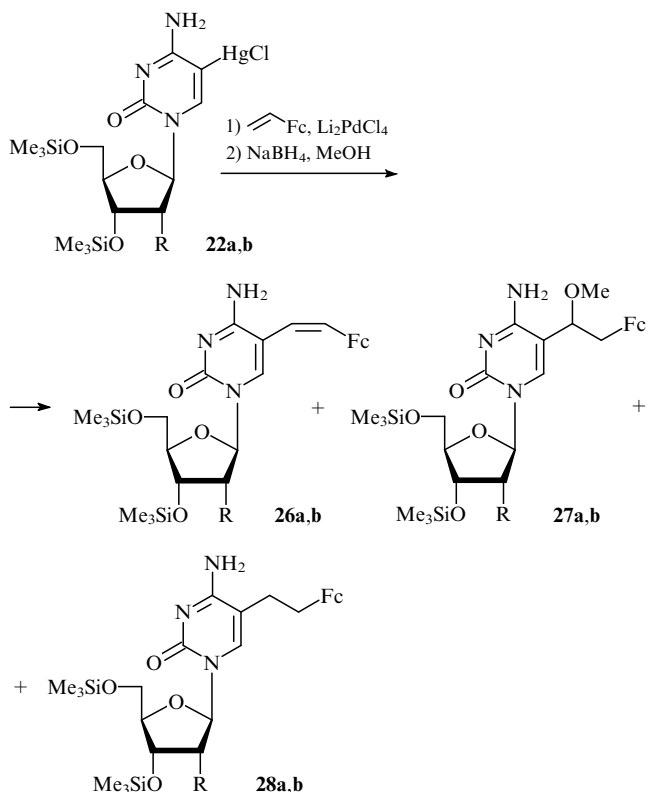
Третьим вариантом синтеза фрагментов нуклеиновых кислот, модифицированных ферроценом по гетероциклическому основанию,<sup>35</sup> является кросс-сочетание 5-хлормеркуриорганических производных уридина **21a,b** и цитозина **22a–c** с винилферроценом в присутствии тетрахлорпалладата лития с последующей обработкой боргидридом натрия в метаноле. Данный процесс представляет собой разновидность реакции Хека.<sup>46,47</sup> Содержащийся в реакционной смеси метанол может присоединяться по экзоциклической двойной связи модифицированного нуклеозида, а боргидрид натрия — частично ее восстанавливает. В результате реакции из производных уридина **21a,b** наряду с продуктами кросс-сочетания **23a,b** выделены также соединения **24a,b** и **25a,b**. При взаимодействии производных цитидина **22a,b** с винилферроценом получены соответствующие ферроценсодержащие нуклеозиды **26–28**. В обоих случаях суммарные выходы модифицированных нуклеозидов составляют 15–30%. Авторы работы<sup>35</sup> подобрали условия, позволяющие преимущественно получать один из продуктов.



R = H (a), OSiMe<sub>3</sub> (b).



**21:** R = H (**a**), OSiMe<sub>3</sub> (**b**); **23–25:** R = H (**a**), OH (**b**).

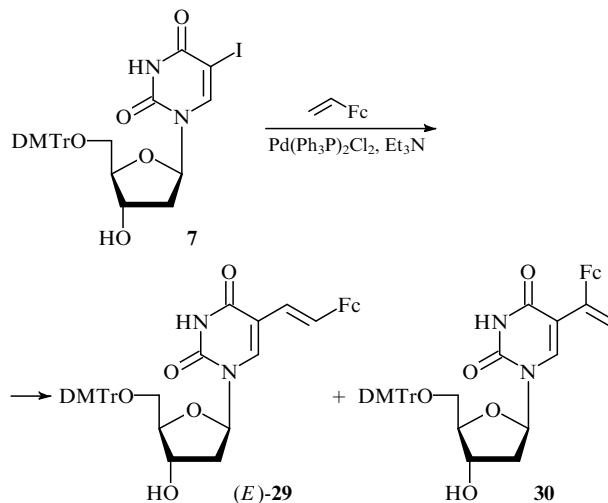


**22:** R = H (**a**), OSiMe<sub>3</sub> (**b**); **26–28:** R = H (**a**), OH (**b**).

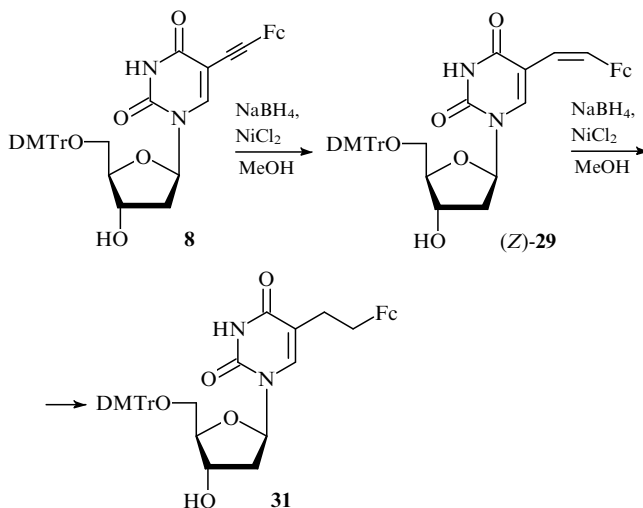
Проведено изучение цитотоксичности деблокированных 5-ферроценилвинил-2'-деоксиуридина **23a** и 5-ферроценилвинилуридина **23b** на линии клеток, L1210 *in vitro*.<sup>35</sup> Летальная доза, вызывающая гибель 50% клеток, (LD<sub>50</sub>) на несколько порядков уступает цитотоксичности традицион-

ного антибиотика адриамицина и соответствует цитотоксичности ферроценилметанола.

При алкилировании защищенного 5-нод-2'-деоксиуридина **7** винилферроценом по Хеку происходило образование двух продуктов (*E*)-**29** и **30** в соотношении 3:1 с общим выходом 60%.<sup>39, 43</sup> Полученные вещества не удалось разделить методами ТСХ и ВЭЖХ, но после деблокирования 5'-гидроксильной группы (*E*)-5-ферроценилвинил-2'-деоксиуридин был выделен перекристаллизацией.

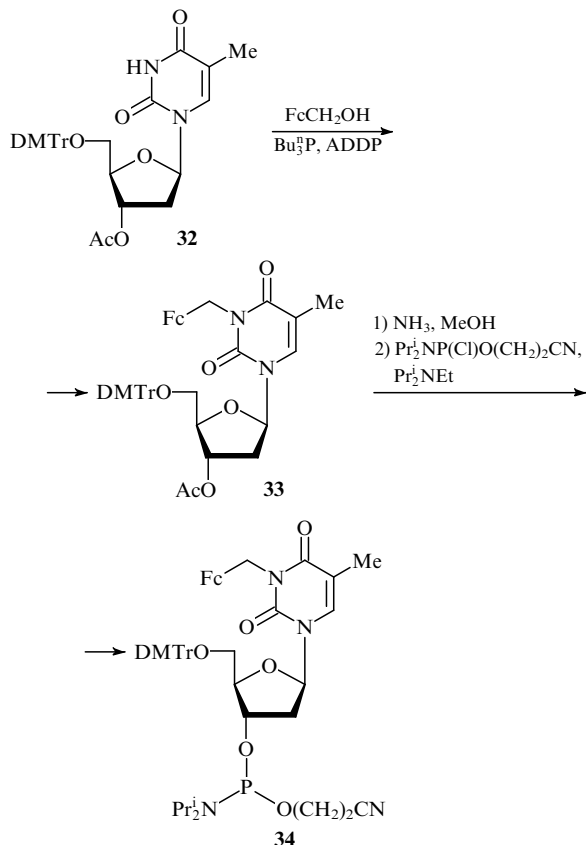


Z-Изомер защищенного 5-ферроценилвинил-2'-деоксиуридина **29** получен Хултоном с соавт.<sup>39, 43</sup> восстановлением блокированного 5-ферроценилэтил-2'-деоксиуридина **8** боргидридом натрия в присутствии хлорида никеля с выходом 30%. Дальнейшее восстановление соединения (*Z*)-**29** в тех же условиях приводило к получению 5'-диметокситрилит-5-ферроценилэтил-2'-деоксиуридина **31** с выходом 25%.

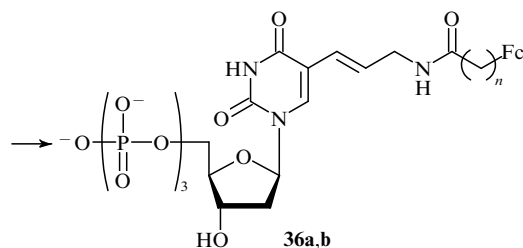
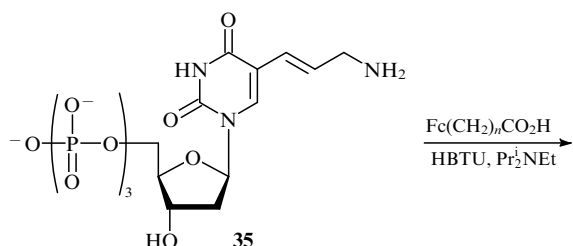


В работе<sup>48</sup> предложен метод введения ферроценильной группы по атому N(3) блокированного тимидина **32** в модифицированных условиях реакции Мицунобу:<sup>49</sup> взаимодействие с ферроценилметанолом в присутствии трибутилфосфина и 1,1'-(азодикарбонил)дипиперидина (ADDP) в бензоле при комнатной температуре. Модифицированный нуклеозид **33** далее был превращен в амидофосфитное производное **34**, которое использовали для получения ферроценсодержащих олигонуклеотидов. Стекинг-взаимодействия в таких олигонуклеотидах сильно нарушены, что было продемонстрировано методом спектроскопии КД. Как следствие, дуплексы,

образуемые этими олигонуклеотидами с ДНК и РНК, менее стабильны по сравнению с природными, что делает данную модификацию неприемлемой для создания НК-детекторов. Введение амидофосфитного производного модифицированного нуклеозида **34** в состав олигонуклеотидов приводило к увеличению термической стабильности образуемых ими триплексов с двуспиральной ДНК на 1–6°C, однако, согласно данным спектроскопии КД, их структура отличалась от классической. Авторы работы<sup>48</sup> не смогли объяснить причину стабилизации триплексов.

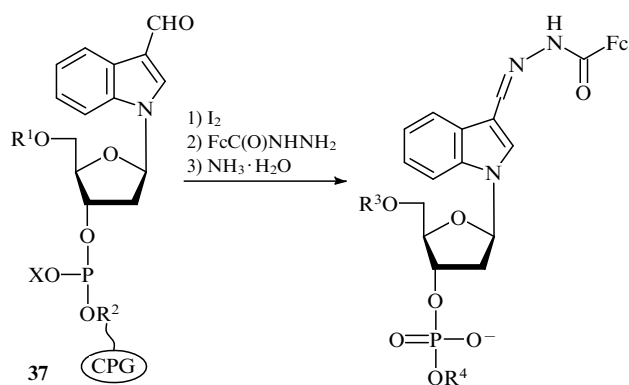


В работе<sup>50</sup> предложен метод синтеза модифицированного нуклеозидтрифосфата, содержащего ферроцен. Трифосфат 5-(3-аминопропен-1-ил)-2'-деоксиуридина **35** ацилировали ферроценкарбоновой и ферроценилуксусной кислотами в присутствии конденсирующего агента — гексафторфосфата *O*-(бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония (HBTU). Выходы соединений **36a,b** составили лишь 30 и 8% соответственно. Тем не менее этот метод представляется весьма перспективным из-за простоты проведения синтеза. Интересно отметить, что производное ферроценкарбоновой кислоты **36a** является субстратом ДНК-полимеразы, в то время как близкое по структуре производное ферроценилуксусной кислоты **36b** терминирует ферментативную реакцию удлинения олигонуклеотидной цепи.



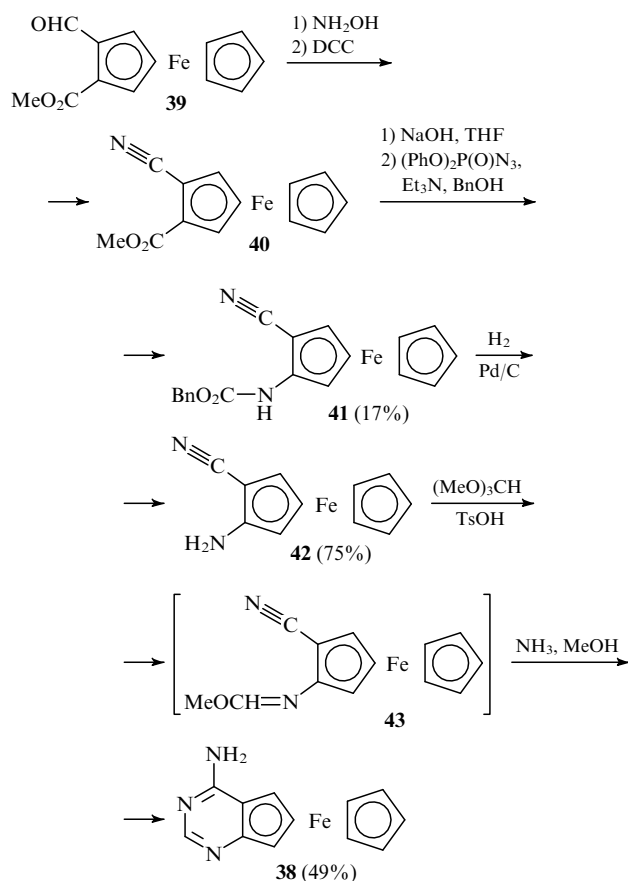
$n = 0$  (a), 1 (b).

Авторы статьи<sup>51</sup> предложили присоединить гидразид ферроценкарбоновой кислоты по альдегидной группе неприродного гетероциклического основания в составе олигонуклеотида **37**, иммобилизованного на полимерном носителе. Однако вызывает сомнение устойчивость свободной альдегидной группы в соединении **37** при окислении иодом в условиях амидофосфитного олигонуклеотидного синтеза, а также стабильность полученного гидразона при стандартной постсинтетической обработке водным аммиаком.



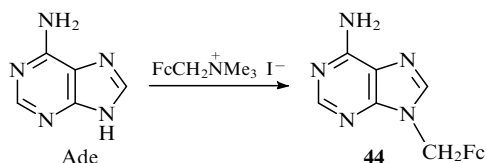
$\text{X} = \text{NC}(\text{CH}_2)_2$ ;  $\text{R}^1, \text{R}^2$  — фрагменты защищенной олигонуклеотидной цепи;  $\text{R}^3, \text{R}^4$  — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

В работе<sup>52</sup> представлен многостадийный синтез аналога аденина **38** исходя из производного ферроцена **39**, альдегидная группа в котором была превращена в цианогруппу в две стадии: реакцией с гидроксиламином с образованием оксима и последующей дегидратацией под действием дициклогексилкарбодиимиды в бензоле при кипячении. Сложноэфирная группа в полученном нитриле **40** была гидролизована раствором NaOH в ТГФ до карбоксильной. Реакция образовавшейся кислоты с дифенилазидофосфатом в присутствии триэтиламина и бензилового спирта сопровождалась перегруппировкой Курциуса и приводила к интермедиату **41**, который при каталитическом гидрогенолизе давал аминонитрил **42**. Взаимодействие последнего с ортомуравьиным эфиром в присутствии *n*-толуолсульфокислоты приводило к иминоэфиру **43**, который без выделения обрабатывали раствором аммиака в метаноле с образованием продукта **38**. Структура полученного соединения **38** подтверждена методами ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии. В дальнейшем предполагается синтезировать соответствующий аналог аденозина, который может быть введен в олигонуклеотидную цепь и использован для изучения переноса электрона в ДНК-дуплексах. Скорее всего, наличие подобной модификации в составе олигонуклеотидной цепи будет вызывать значительное нарушение стекинг-взаимодействий между расположенными «стопкой» гетероцическими основаниями.

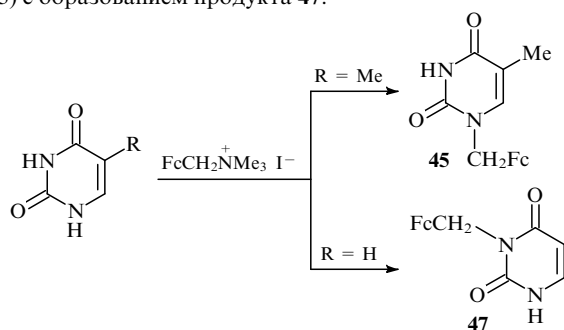


DCC = cyclo-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>-N=C=N-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>-cyclo.

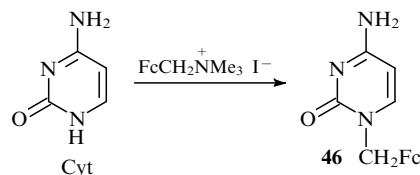
В работах <sup>53, 54</sup> описан синтез пуриновых и пиримидиновых гетероциклических оснований, содержащих остаток ферроцена. Для получения 9-ферроцилметиладена (44) проводили алкилирование аденина (Ade) иодидами триметил(ферроцилметил)аммония.<sup>53</sup>



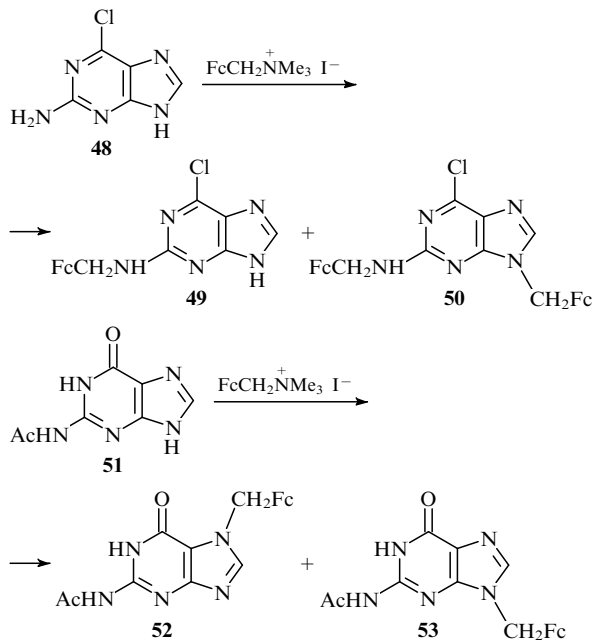
Использование этого алкилирующего агента позволяет получать в качестве основных продуктов N(1)-производные тимина (Thy) 45 и цитозина (Cyt) 46, тогда как для урацила (Ura) предпочтительнее оказалось алкилирование по атому N(3) с образованием продукта 47.<sup>54</sup>



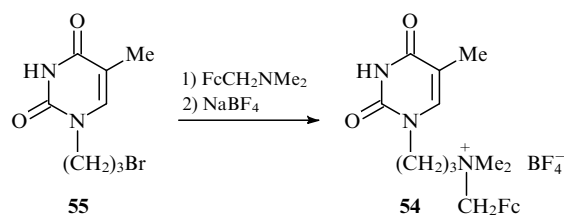
R = H (Ura), Me (Thy).



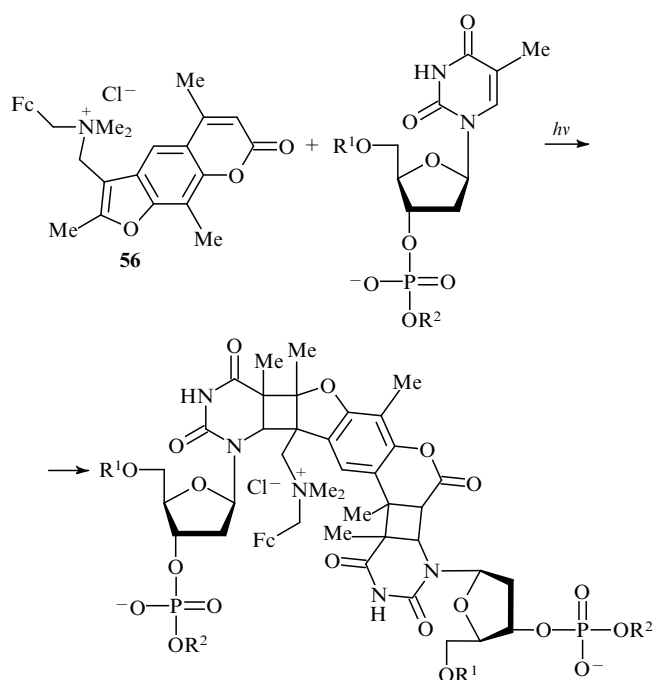
В случае пуринового предшественника гуанина — 2-амино-6-хлорпурина 48 — были выделены N(2)-моно- и N(2),N(9)-диалкильные производные 49 и 50, а алкилирование 2-ацетилгуанина 51 проходило по положениям N(7) и N(9) с образованием продуктов 52 и 53. Строение синтезированных соединений было установлено методом рентгеноструктурного анализа.



1-[3-(N,N-Диметил-N-ферроцилметил)аммонипропил]-тимин 54 получен реакцией 1-(3-бромпропил)тимина 55 с диметил(ферроцилметил)амином и выделен в виде тетрафторбората.<sup>53</sup>



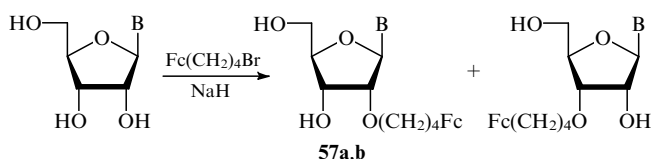
Авторами работы <sup>55</sup> предложен метод введения остатков ферроцена в олигонуклеотиды, основанный на фотохимической реакции ферроцильного производного псоралена с остатками тимина в составе двухцепочечных молекул ДНК. N,N-Диметиламинометилферроцен алкилировали хлорметильным производным псоралена и полученное соединение 56 вводили в реакцию с ДНК в буферном растворе, облучая реакционную смесь светом ртутной лампы ( $\lambda = 365$  нм) в течение 10 мин. При этом происходило эффективное образование ферроценсодержащих конъюгатов двухцепочечной ДНК. Наличие остатка ферроцена подтверждали с помощью циклической вольтамперометрии. Данный метод позволяет идентифицировать двухцепочечные ДНК электрохимическим путем, поскольку ферроцильное производное псоралена реагирует только с ДНК-дуплексом.



$R^1, R^2$  — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

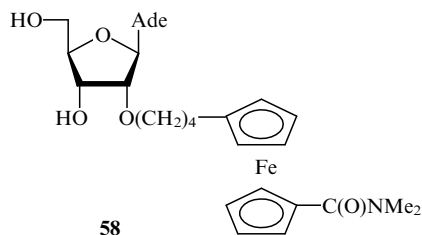
## 2. Синтез нуклеозидов и олигонуклеотидов, содержащих ферроцен в 2'-положении углеводного фрагмента

На сегодняшний день существует несколько методов синтеза 2'-*O*-алкилнуклеозидов,<sup>56</sup> среди которых одним из наиболее распространенных и эффективных является алкилирование свободного нуклеозида алкилгалогенидами в присутствии гидрида натрия. В этом случае селективное протекание реакции по 2'-гидроксильной группе объясняется ее большей кислотностью по сравнению с 3'- и, тем более, с 5'-гидроксильной группой. Авторы работ<sup>57,58</sup> предложили использовать этот метод для получения нуклеозидов, содержащих ферроценильный остаток в 2'-положении углеводного фрагмента.<sup>‡</sup> Выходы продуктов алкилирования аденозина **57a** и цитидина **57b** составили 40 (соотношение изомеров 2' : 3' = 2.7 : 1) и 76% (соотношение изомеров 2' : 3' = 1.8 : 1) соответственно.



B = Ade (a), Cyt (b).

Аналогично синтезировано соединение **58**, содержащее в 2'-положении аденозина остаток диметилкарбамоилферро-



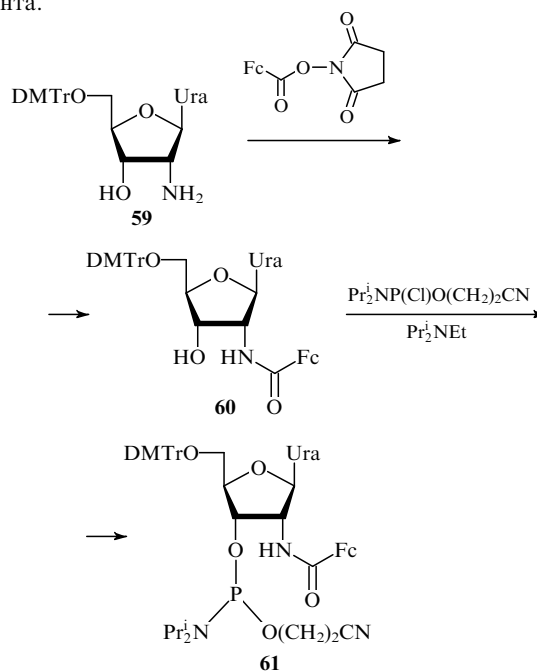
‡ Первое сообщение о применении олигонуклеотидов, содержащих ферроцен в 2'-положении углеводного фрагмента, без подробного описания их синтеза было опубликовано тремя годами ранее.<sup>59</sup>

цена, который обладает отличным от ферроцена окислительно-восстановительным потенциалом.

Далее нуклеозиды **57a,b** и **58** были превращены в амидофосфитные производные, которые использовали в автоматическом олигонуклеотидном синтезе. При введении модифицированных нуклеозидов в олигонуклеотидную цепь термическая стабильность ДНК-дуплексов практически не изменялась, что характерно для 2'-*O*-алкилнуклеозидов.<sup>60</sup>

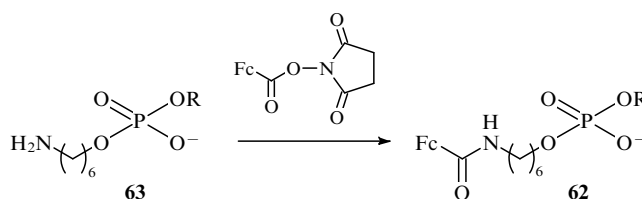
Результаты изучения термической стабильности ДНК-дуплексов, содержащих остатки ферроцена, представлены в табл. 1.

Авторы патентов<sup>61–63</sup> ацилировали 5'-защищенный 2'-амино-2'-дезоксирин **59** *N*-гидроксисукцинимидным эфиром ферроценкарбоновой кислоты. Последующая реакция фосфитилирования нуклеозида **60** протекала медленно и с невысоким выходом соединения **61** (30%) из-за наличия объемистого заместителя в 2'-положении углеводного фрагмента.



## 3. Синтез олигонуклеотидов, содержащих ферроцен на 5'- или 3'-конце

Впервые ферроценсодержащий олигонуклеотид **62** был получен ацилированием 5'-концевой аминогруппы в соединении **63** *N*-гидроксисукцинимидным эфиром ферроценкарбоновой кислоты,<sup>64–66</sup> содержащей изотоп <sup>57</sup>Fe. В дальнейшем этот подход неоднократно применялся.<sup>67–71</sup> В частности, было синтезировано аналогичное производное ферроценилуксусной кислоты.<sup>72</sup> Введение такой модификации в состав олигонуклеотида заметно стабилизирует триплекс с двуспиральной ДНК ( $\Delta T_{пл} = 2.5–2.6^\circ\text{C}$ ).



R — олигонуклеотид.

Недавно было предложено<sup>73</sup> использовать для модификации биомолекул иодацетамидное производное ферроцена,

**Таблица 1.** Изменение температуры плавления ( $\Delta T_{пл}$ ) ДНК-дуплексов при введении ферроценсодержащих нуклеозидов в олигонуклеотидную цепь.

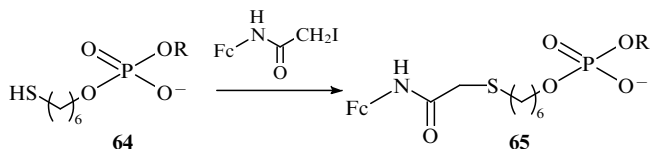
| Модифицированный нуклеозид | $\Delta T_{пл}$ , °C (см. <sup>а</sup> )                            | Условия <sup>б</sup>                                                  | Ссылки | Модифицированный нуклеозид | $\Delta T_{пл}$ , °C (см. <sup>а</sup> ) | Условия <sup>б</sup>                                                      | Ссылки |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------|----------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------|
|                            | –(1.2–2.6)                                                          | 5 мМ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 41<br>50 мМ NaCl,<br>pH 7.0   | 41     |                            | –0.8                                     | 300 мМ KН <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 50<br>pH 7.0 (см. <sup>с</sup> ) |        |
|                            | –(5.5–5.7)                                                          | 15 мМ цитрат натрия,<br>150 мМ NaCl,<br>pH 7.0                        | 38     |                            | –0.4 – +0.4                              | 15 мМ цитрат натрия,<br>150 мМ NaCl,<br>pH 7.0                            | 57     |
|                            | –(7.6–9)                                                            | 5 мМ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 41<br>50 мМ NaCl,<br>pH 7.0   | 41     |                            | 0.1                                      | То же                                                                     | 57, 58 |
|                            | –(0.4–7.7)<br>(вблизи 5'-конца)<br>–(4.7–14.1)<br>(в середине цепи) | 10 мМ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 48<br>100 мМ NaCl,<br>pH 7.0 |        |                            | –0.4                                     | »                                                                         | 58     |

$$^a \Delta T_{пл} = \frac{T_{пл}(\text{модифицированного ДНК-дуплекса}) - T_{пл}(\text{природного ДНК-дуплекса})}{\text{количество модифицированных звеньев в составе ДНК}}$$

<sup>б</sup> Концентрация ДНК-дуплекса — 2 мкмоль · л<sup>–1</sup>.

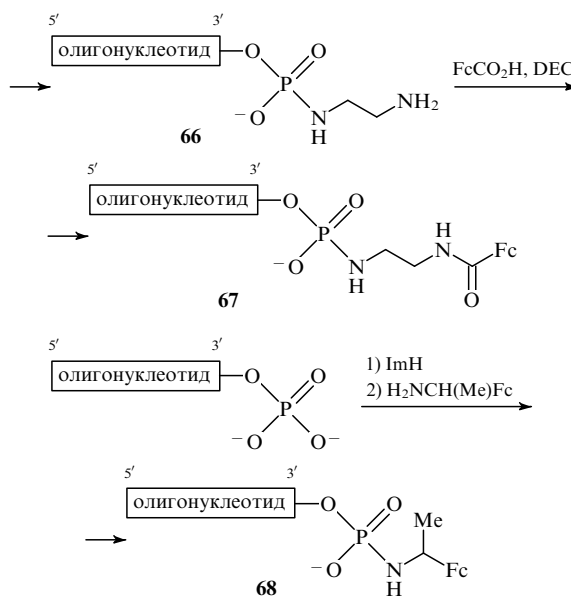
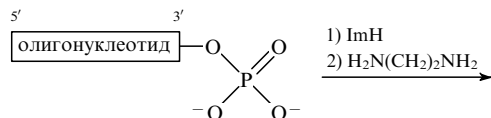
<sup>с</sup> Концентрация ДНК-дуплекса — 0.6 мкмоль · л<sup>–1</sup>.

способное селективно взаимодействовать с тиолами. Специфичность введения этого реагента продемонстрирована на примере 5'-тиолсодержащего олигонуклеотида **64**.



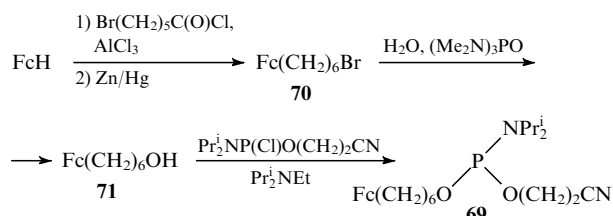
R — олигонуклеотид.

Введение ферроценильного остатка по 3'-концу олигонуклеотида проводили постсинтетическим ацилированием 3'-концевой аминогруппы олигонуклеотида **66** ферроценкарбонической кислотой в присутствии 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида (DEC)<sup>74</sup> или присоединением 1-амино-этилферроцена к активированной 3'-фосфатной группе.<sup>75</sup>

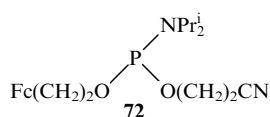


ImH — имидазол.

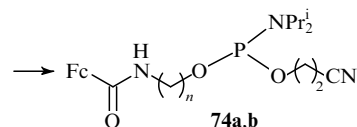
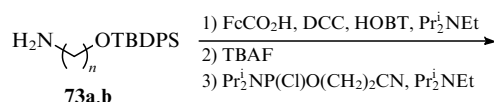
Летсингер с соавт.<sup>76</sup> для получения ферроценсодержащих олигонуклеотидов предложил использовать амидофосфитное производное **69**. Этот прием достаточно распространен для введения в состав олигонуклеотидов таких маркеров, как биотин, акридин, флуоресцеин и др. 6-Бромгексилферроцен **70** синтезировали ацилированием ферроцена хлорангидридом 6-бромкапроновой кислоты по Фриделю–Крафтсу с последующим восстановлением карбонильной группы амальгамой цинка. Бромпроизводное **70** превращали в спирт **71** и далее в амидофосфитное производное **69**.

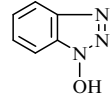


В работе<sup>57</sup> описано получение аналогичного амидофосфита **72** и использование его в синтезе модифицированных олигонуклеотидов.

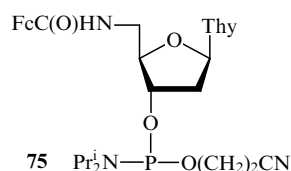


Синтез ряда амидофосфитных производных, в том числе нуклеозидной природы, позволяющих вводить остаток ферроцена по 5'-концу олигонуклеотида, предложен в статье<sup>77</sup>. С этой целью проводили ацилирование аминогрупп соединений **73a,b** ферроценкарбоновой кислотой в присутствии конденсирующего агента — дициклогексилкарбодиимида. После удаления *трет*-бутилдиизопропилсилильной защитной группы действием тетрабутиламмонийфторида полученные спиртовые компоненты превращали в амидофосфитные производные **74a,b**.

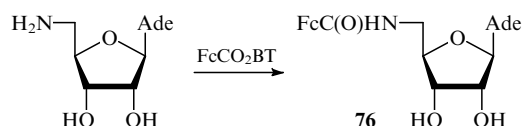


TBDPS = Bu<sup>t</sup>Pr<sub>2</sub>Si; HOBT = ; TBAF = Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup> F<sup>-</sup>; n = 2 (**a**), 4 (**b**).

Аналогично синтезировано амидофосфитное производное 5'-ферроценилкарбоксамидо-5'-дезокситимидина **75**.

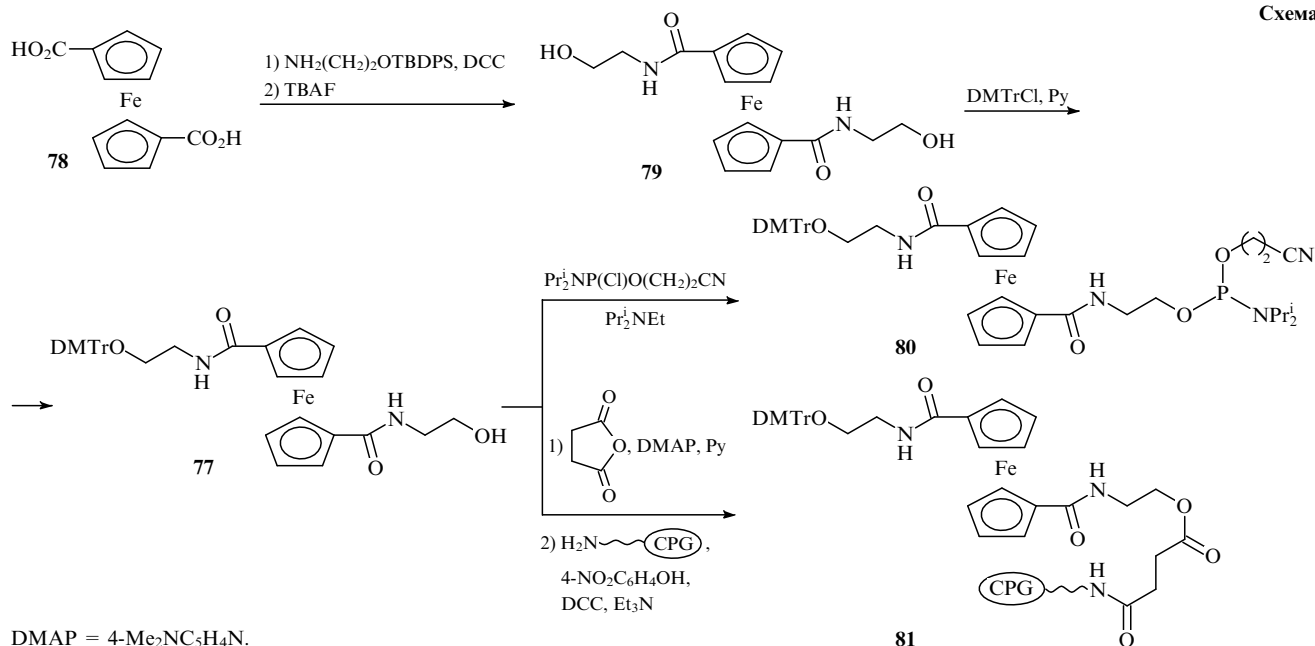


Синтез 5'-ферроценилкарбоксамидо-5'-дезоксаденозина **76** с использованием *N*-гидроксibenзотриазолового эфира ферроценкарбоновой кислоты предложен недавно Крацем с соавт.<sup>78</sup>



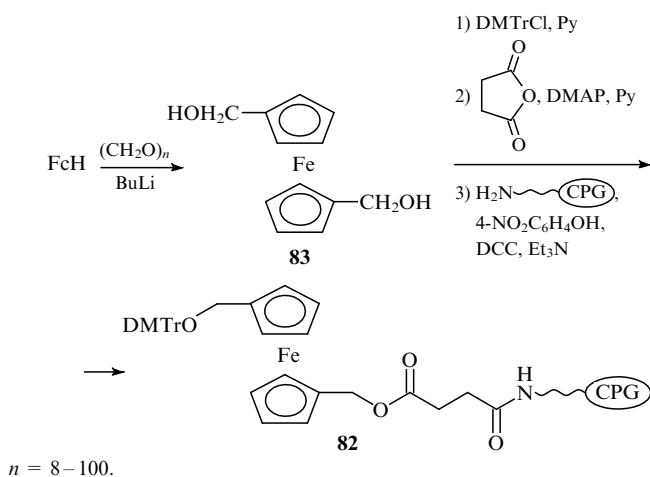
В работе<sup>79</sup> представлен синтез соединения **77**, которое может быть использовано для введения ферроцена в середину или на конец олигонуклеотидной цепи. Конденсацией 1,1'-ферроцендикарбоновой кислоты **78** с *O*-защищенным аминоэтанолом в присутствии дициклогексилкарбодиимида с последующим деблокированием гидроксильных групп получено соединение **79**, при обработке которого диметокситриэтилхлоридом в пиридине образуется монозащищенное производное **77**. Последующим фосфитированием соединения **77** превращали в стандартный синтон олигонуклеотидного синтеза **80**. В результате взаимодействия производного **77** с янтарным ангидридом и последующей иммобилизации на полимерном носителе, содержащем аминоалкильные группы, образуется соединение **81** (схема 2). Известно,<sup>80</sup>

Схема 2



что нуклеозидные вставки сильно дестабилизируют ДНК-дуплекс, поэтому соединение **80** вводили на 5'-конец олигонуклеотида на последней стадии синтеза, выход составил 50%. Введение ферроценсодержащего фрагмента на 3'-конец достигалось с использованием соединения **81**. Выход целевого олигонуклеотида составил 12%, что может быть обусловлено разрушением ферроцена во время автоматического олигонуклеотидного синтеза на стадии окисления фосфитов в фосфаты.

В той же работе<sup>79</sup> предложен синтез модифицированного полимерного носителя **82**, позволяющего получать конъюгаты олигонуклеотидов с ферроценом на 3'-конце, а также 5'-конъюгаты в случае инвертированного автоматического олигонуклеотидного синтеза. Взаимодействием ферроцена с параформальдегидом в присутствии бутиллития получен 1,1'-ферроцендиметилловый спирт **83**, в котором одну гидроксильную группу защищали действием диметокситриэтилхлорида, а другую ацилировали и присоединяли к полимерному носителю с образованием соединения **82**. Из производного ферроцена **83** может быть также синтезирован амидофосфит для встраивания в середину олигонуклеотидной цепи.



Недавно описан<sup>81,82</sup> синтез конъюгатов ферроцена с пептидо-нуклеиновыми кислотами. Известно,<sup>83</sup> что пептидо-нуклеиновые кислоты формируют с ДНК стабильные специфические дуплексы, наличие в которых некомплементарных пар оснований вызывает существенную дестабилизацию. Это свойство было использовано для создания ДНК-сенсора.<sup>61,84</sup>

### III. Электрохимическое детектирование нуклеиновых кислот

Необходимость идентификации и количественного определения НК привела к появлению большого числа новых аналитических методов. Кроме того, ряд уже известных методов был адаптирован для детектирования данных биомолекул. Электрохимические методы занимают важное место среди разнообразных способов качественного и количественного детектирования ДНК.

Электрохимическая активность НК была открыта около 40 лет назад,<sup>85</sup> а позднее с помощью электрохимических методов было получено одно из первых подтверждений полиморфизма двойной спирали ДНК.<sup>86</sup>

При взаимодействии НК с заряженной поверхностью электрода обычно наблюдается сильная адсорбция, сопровождающаяся реакциями с переносом заряда. По возникающим электрохимическим сигналам можно делать выводы о типе адсорбированных молекул, их концентрации, а также об изменениях в структуре молекул и их взаимодействии с

различными соединениями. Таким образом, иммобилизованные на поверхности электродов фрагменты НК могут служить основой для создания НК-детекторов.<sup>87</sup> Для анализа природных ДНК используют ртутные или углеродные, реже золотые, платиновые, медные или серебряные электроды. Для исследования окисления ДНК наиболее подходящими являются твердые металлические электроды; на углеродных электродах также протекает окисление гуанина и аденина, тогда как восстановление удобнее регистрировать на поверхности ртутных электродов. Фрагментами НК, участвующими в процессах окисления – восстановления на электродах, являются прежде всего гетероциклические основания.

Наличие в составе электрохимически активных молекул ДНК водородных связей, образованных комплементарными парами оснований, оказывает существенное влияние на сигналы восстановления аденина и цитозина на ртутных электродах, что позволяет судить не только о наличии или отсутствии комплементарных взаимодействий на электродной поверхности, но и о структурных переходах и локальных конформационных изменениях в молекулах ДНК.<sup>88,89</sup>

Процессы окисления – восстановления природных ДНК являются необратимыми, и для их осуществления требуется приложение высоких положительных или отрицательных потенциалов, что может привести к нежелательной деструкции цепей ДНК. Для увеличения чувствительности аналитических методов в структуру ДНК вводят различные электроактивные репортерные группы, ковалентно или нековалентно связанные с одноцепочечной ДНК или ДНК-дуплексом. Вводимые маркеры способны к обратимым окислительно-восстановительным превращениям при низких значениях потенциала на электроде. Нековалентное связывание репортерных молекул с природной ДНК может осуществляться тремя способами: 1) электростатическое и, как следствие, неспецифическое связывание с заряженными фосфатными группами в составе ДНК; 2) взаимодействие с малой или большой бороздкой ДНК-дуплекса, при котором молекулы маркера эффективно связываются только с экспонированными группами оснований; 3) интеркаляция, или внедрение ароматических молекул между гетероциклическими основаниями в составе ДНК-дуплекса. В качестве маркеров часто используют хелатные комплексы переходных металлов,<sup>90,91</sup> в частности, производные ферроцена.

Существуют два принципиально различных подхода к детектированию ДНК. В первом случае в качестве метки применяют комплексы стабильных изотопов железа или других металлов. Введение в состав ДНК-прайммера одинаковых по химической природе меток, содержащих разные изотопы одного элемента, практически не вызывает изменения физико-химических характеристик, например электрофоретической подвижности. Это позволяет проводить секвенирование протяженных фрагментов НК с большой точностью. Для идентификации меченых фрагментов ДНК в этом случае используют резонансную ионизационную спектроскопию или масс-спектрометрию. Якобсон с соавт.<sup>64,65</sup> продемонстрировал возможности данного метода детектирования НК при секвенировании по Сэнгеру и при проведении амплификации ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Несмотря на успехи, достигнутые в начале 1990-х годов, этот метод не получил распространения, так как многие реагенты и материалы, применяемые в молекулярной биологии, например нейлоновые мембраны,<sup>92</sup> содержат железо. Как следствие, чувствительность метода сильно понижается.

Во втором случае используют амперометрические методы, которые позволяют регистрировать сигнал, возникающий в результате окисления – восстановления Fe(II)/Fe(III). Следует отметить, что при применении в

качестве маркера ферроцена и его производных возможно направленное изменение потенциала полуволны ( $E_{1/2}$ ) окислительно-восстановительной пары за счет влияния индуктивного эффекта различных заместителей в цикlopentadiеновых кольцах. Таким образом, можно варьировать электрохимические свойства репортерных групп без существенных изменений их размера и реакционной способности.<sup>66</sup>

### 1. Окислительно-восстановительные свойства ферроценосодержащих нуклеиновых кислот

Важной характеристикой молекул, активных в окислительно-восстановительных процессах, является потенциал полуволны окисления – восстановления  $E_{1/2}$ , экспериментально измеряемый амперометрическими методами.

Введение электронодонорных групп в цикlopentadiеновое кольцо ферроцена приводит к уменьшению величины  $E_{1/2}$ , а при наличии электроакцепторных групп окислительно-восстановительный потенциал возрастает, как

было показано в 1974 г. Моррисом.<sup>93</sup> Можно выделить несколько групп ферроценильных производных нуклеозидов и олигонуклеотидов с близкими значениями окислительно-восстановительных потенциалов (табл. 2). Одновременное использование нескольких ферроценильных производных позволяет проводить параллельное детектирование различных фрагментов НК, в том числе и в потоке.

Изменение окислительно-восстановительного потенциала при адсорбции ферроценосодержащего производного на электроде обусловлено увеличением диэлектрической составляющей потенциала для адсорбированной молекулы. В работе<sup>57</sup> проведено сравнение  $E_{1/2}$  окисления ферроцена в составе олигонуклеотидов (на конце алкильного линкера в 2'-положении углеводного фрагмента) и в составе водорастворимого ферроценилэтилфосфата, не имеющего звеньев нуклеотидной природы. Показано, что электрохимические характеристики ферроценосодержащих олигонуклеотидов в растворе незначительно отличаются от аналогичных данных для других производных ферроцена.

**Таблица 2.** Окислительно-восстановительные потенциалы (относительно Ag/AgCl) конъюгатов фрагментов НК с ферроценом.

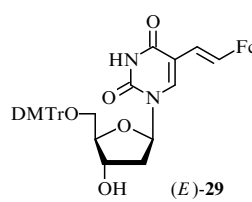
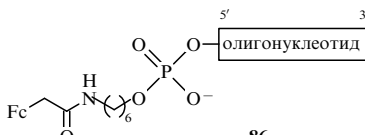
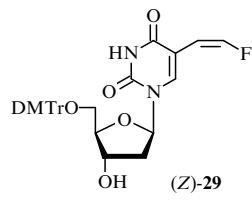
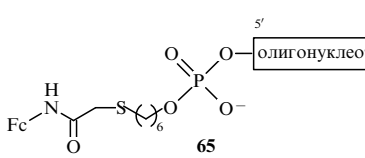
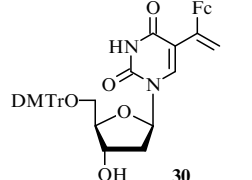
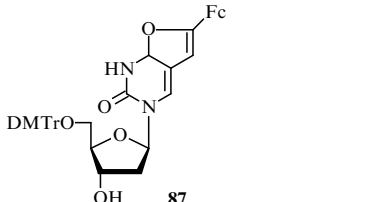
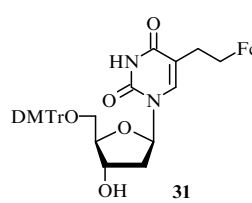
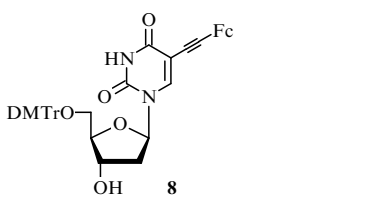
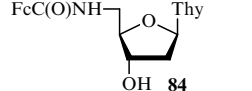
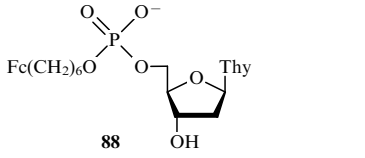
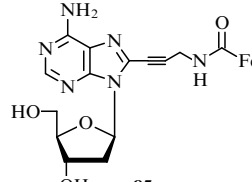
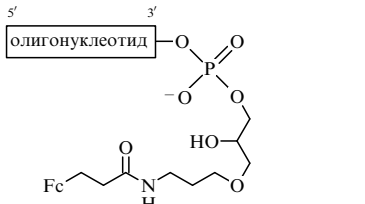
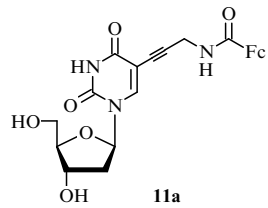
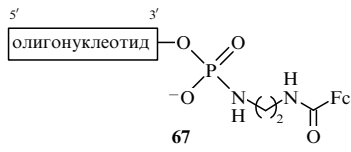
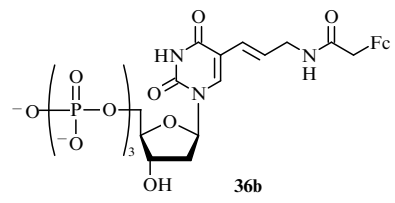
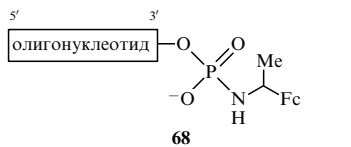
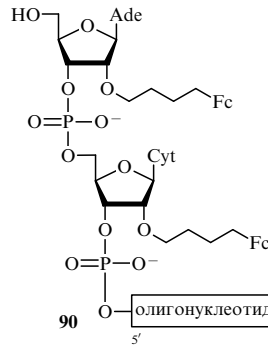
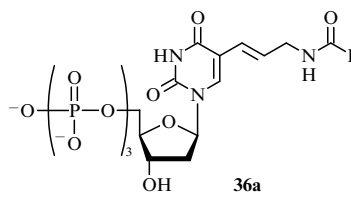
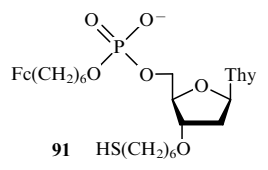
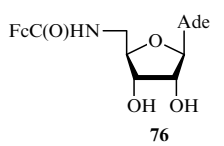
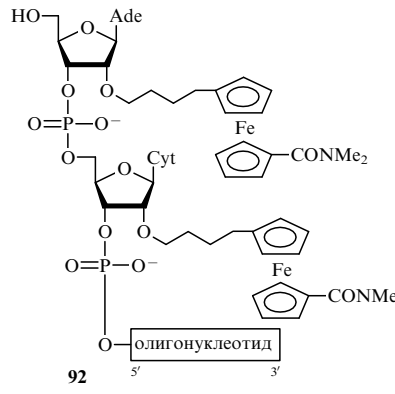
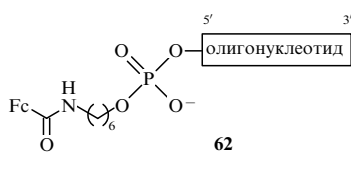
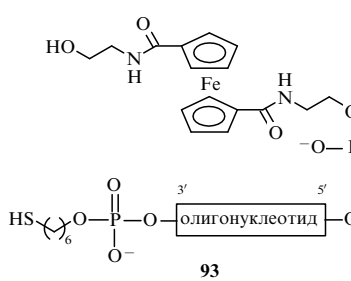
| Соединение                                                                                    | $E_{1/2}$ , мВ  | Ссылки | Соединение                                                                                 | $E_{1/2}$ , мВ   | Ссылки |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|--------|
| <br>(E)-29  | 27 <sup>a</sup> | 39     | <br>86   | 60               | 72     |
| <br>(Z)-29 | 29 <sup>a</sup> | 39     | <br>65 | 16 <sup>b</sup>  | 73     |
| <br>30     | 21 <sup>a</sup> | 39     | <br>87 | 131 <sup>a</sup> | 39     |
| <br>31     | 16 <sup>a</sup> | 39     | <br>8  | 140 <sup>a</sup> | 39     |
| <br>84     | 24              | 41     | <br>88 | 110              | 76     |
| <br>85     | 48              | 41     | <br>89 | 135 <sup>c</sup> | 94     |

Таблица 2 (окончание).

| Соединение                                                                          | $E_{1/2}$ , мВ   | Ссыл-<br>ки | Соединение                                                                           | $E_{1/2}$ , мВ          | Ссыл-<br>ки |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------|
|    | 262              | 40          |    | 300                     | 74          |
|    | 260              | 50          |    | 290                     | 75          |
|   | 181              | 57          |    | 398                     | 50          |
|  | 220 <sup>d</sup> | 76          |    | 412                     | 78          |
|  | 324              | 58          |  | 430<br>645 <sup>c</sup> | 68<br>70    |
|                                                                                     |                  |             |  | 574 <sup>d</sup>        | 79          |

<sup>a</sup> Раствор в ацетонитриле. <sup>b</sup> Относительно стандартного углеродного электрода. <sup>c</sup> Относительно насыщенного каломельного электрода.

<sup>d</sup> Нуклеотид иммобилизован на электроде. <sup>e</sup> Олигонуклеотид гибридизован с мишенью, иммобилизованной на электроде.

В работе <sup>68</sup> методом циклической вольтамперометрии установлено, что электрохимические характеристики остатка ферроцена практически не зависят от структуры комплексов ферроценсодержащих олигонуклеотидов с ДНК (дуплекс или триплекс), а также от их нуклеотидного состава. Небольшое уменьшение (на 10–30 мВ) потенциала полуволны окисления остатка на ферроцена 5'-конце короткого олигонуклеотида при включении его в состав триплекса может быть обуслов-

лено взаимодействием ферроценильного катиона с фосфатными группами, вследствие чего он меньше экспонирован в раствор. На основании этих данных авторами работы <sup>68</sup> был сделан вывод о том, что ферроцен может быть использован в качестве универсальной электрохимической метки, причем не только для детектирования, но и для количественного определения ДНК.

## 2. Электрохимическое детектирование ферроценосодержащих фрагментов ДНК и их комплексов при ВЭЖХ-анализе и капиллярном электрофорезе

Высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-детектированием является традиционным методом очистки и анализа НК,<sup>95,96</sup> который очень широко используют вследствие высокой эффективности и относительной дешевизны. Власов и Кинг<sup>50</sup> провели сравнение УФ- и электрохимического методов детектирования ферроценосодержащих олигонуклеотидов и показали, что последний позволяет проводить количественное определение ДНК в фемтомолярных концентрациях, тогда как чувствительность оптического метода ограничена пикомолярной концентрацией (табл. 3), т.е. примерно на три порядка ниже.

Такенака с соавт.<sup>67</sup> предложил высокочувствительный метод определения полинуклеотидов в растворе посредством их гибридизации с комплементарными олигонуклеотидами, содержащими остатки ферроцена на 5'-конце, и последующим ВЭЖХ-анализом с электрохимическим детектированием. Чувствительность этого метода сравнима с пределом обнаружения радиоактивных меток ( $10^{-15}$  моль, см. табл. 3). Следует отметить, что флуоресцентный и люминесцентный методы анализа, для которых необходимо предварительно проводить ферментативную амплификацию ДНК с использованием модифицированных нуклеозидтрифосфатов, являлись более чувствительными на момент проведения исследования, однако они уступали предложенному электрохимическому методу оперативностью (2–3 дня по сравнению с 2–3 часами). Метод ВЭЖХ с электрохимичес-

**Таблица 3.** Пределы обнаружения ферроценосодержащих олигонуклеотидов различными методами анализа.

| Метод анализа                                                                                                                                                                | Предел обнаружения, моль (концентрация образца, моль · л <sup>-1</sup> )                      | Ссылка   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| ВЭЖХ с электрохимическим детектором                                                                                                                                          | $1 \cdot 10^{-15}$<br>( $1 \cdot 10^{-9}$ )                                                   | 50       |
| ВЭЖХ с электрохимическим детектором (гибридизация ферроценосодержащего олигонуклеотида с мишенью)                                                                            | $1 \cdot 10^{-15}$                                                                            | 67       |
| ВЭЖХ с электрохимическим детектором, предварительное проведение ПЦР                                                                                                          | $1 \cdot 10^{-19}$                                                                            | 69       |
| Капиллярный гель-электрофорез с детектированием методом синусоидальной вольтамперометрии                                                                                     | $3 \cdot 10^{-14}$<br>( $3 \cdot 10^{-9}$ )<br>$1.8 \cdot 10^{-15}$<br>( $9 \cdot 10^{-10}$ ) | 72<br>97 |
| Гибридизация ферроценосодержащего олигонуклеотида с мишенью, связанной с иммобилизованным на электроде олигонуклеотидом; дифференциальная импульсная вольтамперометрия       | $1 \cdot 10^{-15}$                                                                            | 71       |
| Гибридизация ферроценосодержащего олигонуклеотида с мишенью, иммобилизованной на стеклянном электроде с хитозановым покрытием; дифференциальная импульсная вольтамперометрия | $2 \cdot 10^{-11}$<br>( $2 \cdot 10^{-9}$ )                                                   | 75       |
| Гибридизация ферроценосодержащего олигонуклеотида с мишенью, иммобилизованной на углеродном электроде; дифференциальная импульсная вольтамперометрия                         | $5 \cdot 10^{-11}$<br>( $5 \cdot 10^{-9}$ )                                                   | 74       |

ким детектированием успешно применен авторами работы<sup>67</sup> для количественного определения ряда природных полинуклеотидов: транспортного гена холина дрожжей, онкогена *v-myc* и эукариотической м-РНК. Анализ м-РНК облегчается наличием 3'-концевой последовательности полиаденозина, что позволяет использовать в качестве сигнального олигонуклеотида гомотимидиновую последовательность.

В 1997 г. авторы работы<sup>69</sup> предложили усовершенствованный способ определения ДНК в растворе, основанный на комбинации описанного метода ВЭЖХ<sup>67</sup> с ПЦР, которая позволяет увеличить число копий ДНК.<sup>98</sup> В качестве праймеров были использованы ферроценосодержащие олигонуклеотиды. Продукты амплификации анализировали методом ВЭЖХ с использованием электрохимического детектора, что позволило значительно снизить предел обнаружения (см. табл. 3). Преимущество данного метода заключается также в том, что для проведения анализа не требуется контрольный образец ДНК, амплификацию которой при традиционном количественном анализе с помощью ПЦР обычно приходится осуществлять в одной пробирке с анализируемой ДНК. Метод применили для количественного определения онкогена *v-myc* и гена мышечного дистрофина человека.

Капиллярный гель-электрофорез в течение последнего десятилетия активно используют для анализа ДНК, в частности, при секвенировании ДНК этот метод является стандартным и наиболее эффективным.<sup>99</sup> Широкое распространение в рамках этого метода получило применение флуоресцентно-меченных НК. Кроме того, активно развивается детектирование с помощью масс-спектрометрии.<sup>100</sup> В недавно опубликованных работах<sup>8,101</sup> при капиллярном электрофорезе ферроценосодержащих производных НК — продуктов ПЦР<sup>72,97</sup> — использовали электрохимическое детектирование.

Авторы работы<sup>8</sup>, создавшие устройство для электрохимического детектирования биомолекул при капиллярном гель-электрофорезе амперометрическим методом, предложили направленно вводить в состав исследуемых молекул электрохимические метки. Этот подход дает возможность одновременного детектирования различных молекул аналогично флуоресцентному детектированию на нескольких длинах волн.

В работе<sup>97</sup> для селективного определения продуктов амплификации ДНК использовали капиллярный гель-электрофорез с детектированием методом синусоидальной вольтамперометрии (см.<sup>102</sup>). Этот метод позволяет добиться высоких отношений сигнал/шум и с максимальной селективностью идентифицировать электрохимически активные молекулы на основе их уникальных частотных спектров. В качестве праймеров для ПЦР использовали олигонуклеотиды **62**, **86**, **90**, **92**, содержащие остатки ферроцена в составе 5'-концевых звеньев. Электрохимическая индивидуальность каждого из четырех олигонуклеотидных праймеров достигалась благодаря наличию в ферроценосодержащих фрагментах заместителей, влияющих на потенциал окисления — восстановления ферроцена. Это позволило определить присутствие и распределение в электрофоретических фракциях того или иного ферроценосодержащего олигонуклеотида. Кроме того, с помощью циклической вольтамперометрии показано, что статические вольтамперограммы ферроценосодержащих праймеров практически не отличаются от записанных в условиях электрического поля при электрофорезе. Это расширяет область использования метода, поскольку не требуется вводить дополнительные поправки на наличие электрического поля.

Авторы работы<sup>72</sup> предложили применить метод синусоидальной вольтамперометрии для анализа капиллярным гель-электрофорезом продуктов реакции удлинения олигонуклеотидной цепи на одно звено. Для этого проводили

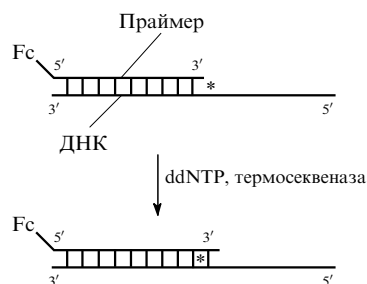


Рис. 1. Схема реакции удлинения олигонуклеотидной цепи на одно звено.<sup>72</sup>

гибридизацию ДНК-пробы с ферроценсодержащим праймером, добавляли 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфат (ddNTP), комплементарный изучаемому нуклеотиду, и термостабильную Ampli Taq полимеразу из *Thermus aquaticus* — термостеквенза (рис. 1). При наличии точечной мутации в составе ДНК-пробы реакция удлинения олигонуклеотидной цепи останавливалась. Для разделения непрореагировавшего праймера и продукта реакции использовали капиллярный гель-электрофорез.<sup>8</sup> Фракции анализировали с помощью синусоидальной вольтамперометрии. Предложенный метод электрохимического детектирования легко поддается миниатюризации, поэтому удобен для создания автоматической переносной системы для определения мононуклеотидного полиморфизма в геноме.

### 3. Электрохимическое детектирование ферроценсодержащих фрагментов ДНК и их комплексов на поверхности электрода

Биосенсор, или биодетектор, состоит из элемента, избирательно узнающего биологически активные молекулы, который связан с датчиком, преобразующим молекулярный процесс узнавания в физически измеримую величину.<sup>103</sup> Стандартный электрохимический детектор ДНК-гибридизации представляет собой электрод, на поверхности которого иммобилизованы короткие олигонуклеотиды, обычно 15–20-звенные (рис. 2). При помещении такого электрода в раствор, содержащий определяемую последовательность ДНК, на его поверхности формируется дуплекс. Изменения в поверхностном слое могут быть зафиксированы электрохимическим или гравиметрическим методом. Выбор материала электрода и метода иммобилизации на нем олигонуклеотидов является наиболее важным при создании ДНК-сенсоров.

Для иммобилизации олигонуклеотидов используют различные методики, предусматривающие ковалентное или нековалентное связывание с поверхностью электрода. Для иммобилизации на углеродных и ртутных электродах применяют метод электростатической адсорбции. На положительно заряженном электроде адсорбция происходит за счет электростатического притяжения к нему отрицательно заряженных фосфатных групп, благодаря чему гетероциклические основания остаются свободными для взаимодействия с определяемыми последовательностями ДНК из раствора.

Ковалентную иммобилизацию олигонуклеотидов на поверхности электрода с участием реакционноспособных групп гетероциклических оснований не рекомендуется ис-

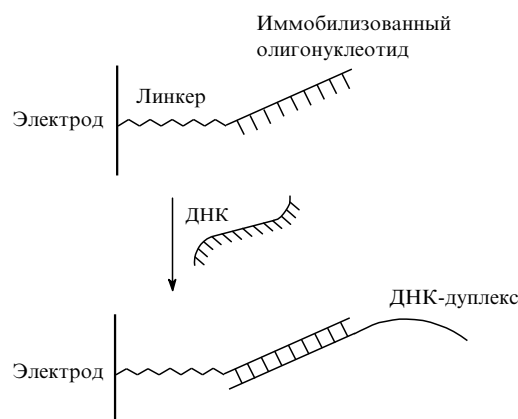


Рис. 2. Формирование дуплекса на поверхности электрода.

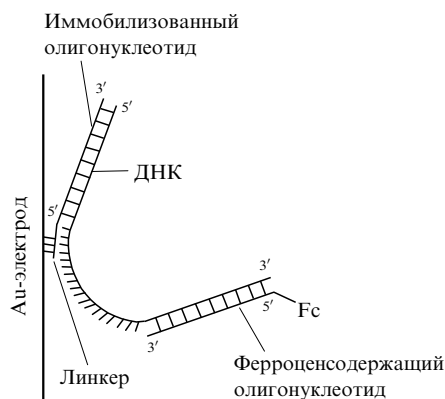
пользовать по причине снижения чувствительности ДНК-сенсора. Наиболее эффективным методом является связывание с поверхностью электрода одного из концов молекул олигонуклеотидов. В общем случае ковалентная иммобилизация олигонуклеотидов оказывается более удобной для создания биосенсоров, поскольку позволяет избежать неспецифического связывания электрохимически активных молекул.<sup>87</sup>

На сегодняшний день для хемосорбции олигонуклеотидов на электродах можно использовать как модифицированные олигонуклеотиды, так и электроды с модифицированной поверхностью.<sup>104</sup>

Летсингер с соавт.<sup>76</sup> в 1996 г. предложил метод электрохимической характеристики монослоя, образованного молекулами иммобилизованного нуклеотида **99** на поверхности золотого электрода. Данный подход предусматривает введение в состав нуклеотида одновременно 3'-концевого линкера с меркаптогруппой, необходимой для иммобилизации, и остатка ферроцена на 5'-конец. После хемосорбции таких молекул на поверхности электрода образовавшийся монослой изучали методом циклической вольтамперометрии. Согласно полученным данным, поверхностная плотность молекул нуклеотида на золоте составляет  $3.0 \cdot 10^{-10}$  моль  $\cdot$  см<sup>-2</sup>. Авторами работы<sup>76</sup> показана возможность использования подобных систем для детектирования гибридации ДНК.

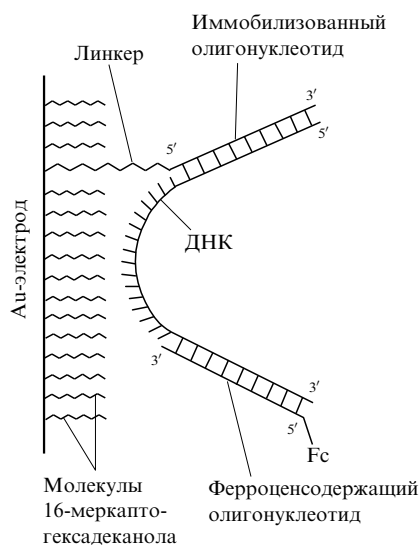
Оригинальный метод геной диагностики предложен в работе<sup>70</sup>. В состав 5'-концевого фрагмента олигонуклеотида, комплементарного участку ДНК-мишени, вводили несколько тиофосфатных групп и иммобилизовывали его на золотом электроде. После проведения гибридации с определяемой ДНК электрод обрабатывали раствором ферроценсодержащего олигонуклеотида **62**, комплементарного другому, свободному участку молекулы ДНК (рис. 3). Детектирование проводили с использованием дифференциальной импульсной вольтамперометрии. При наличии в растворе ДНК-мишени, комплементарной обоим указанным фрагментам, на поверхности золотого электрода происходило образование сэндвичевой системы, благодаря чему на вольтамперограмме возникал пик анодного окисления остатка ферроцена в составе олигонуклеотида **62**. Концентрация определяемого фрагмента ДНК в растворе составляла  $\sim 50$  мкмоль  $\cdot$  л<sup>-1</sup>. В контрольных экспериментах с нуклеотидной последовательностью, отличной от ДНК-мишени, и с олигонуклеотидом, содержащим только одно некомплементарное основание на узнающем участке из семи нуклеотидов, пик анодного окисления ферроцена практически отсутствовал.

§ Следует отметить, что этот метод позволяет разделять отличающиеся по длине на одно звено олигонуклеотиды, содержащие до 250 оснований.



**Рис. 3.** Образование трехкомпонентной сэндвичевой системы, иммобилизованной на золотом электроде.<sup>70</sup>

Позднее иммобилизация тиофосфатсодержащего олигонуклеотида и последующая гибридизация его с определяемой ДНК и сигнальным олигомером **62** детально исследованы<sup>71</sup> методом микрогравиметрии на кварцевом кристалле. На основании полученных данных рассчитана плотность молекул на поверхности электрода, составившая  $77 \text{ пмоль} \cdot \text{см}^{-2}$ . Исходя из величины площади, приходящейся на одну молекулу ферроцена в составе комплекса с ДНК ( $\sim 200 - 700 \text{ \AA}^2$ ), авторы сделали вывод о высокой плотности молекул внутри слоя. В данном исследовании не учитывали шероховатость поверхности электрода, поэтому рассчитанная теоретическая плотность упаковки слоя может быть существенно завышена. Это, в свою очередь, может служить причиной избыточной плотности заряда и вызывать значительное (на 215 мВ) увеличение окислительно-восстановительного потенциала ферроценсодержащего олигонуклеотида **62** по сравнению с потенциалом его окисления в растворе (см. табл. 2). Повышение потенциала объясняется дестабилизацией окисленной формы ферроцена в составе конъюгата, поскольку цепь ДНК с повышенной плотностью анионных фосфатных групп затрудняет подход противоионов к ферроценил-катиону. Этот результат согласуется с данными Летсингера и соавт.,<sup>76</sup> согласно которым разница в значениях потенциалов

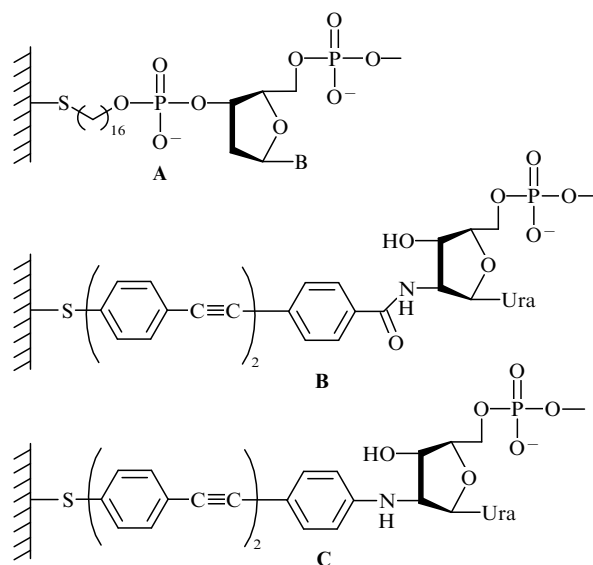


**Рис. 4.** Модифицированный вариант электрохимического анализа ДНК.<sup>58, 59</sup>

окисления – восстановления ферроцена в составе иммобилизованного олигонуклеотида и в растворе составляет 110 мВ. Описанный метод оказался весьма чувствительным к однобуквенным заменам.<sup>71</sup>

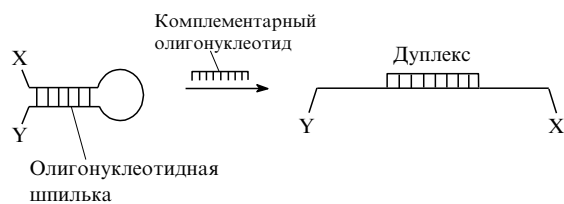
Этот подход был модифицирован авторами работ <sup>58, 59, 61, 62, 105</sup>. После иммобилизации олигонуклеотида на золотом электроде к нему добавляли 16-меркаптогексадеканол для блокирования поверхности электрода от молекул, способных неспецифически адсорбироваться и влиять на результаты измерений (рис. 4). В результате эффективность детектирования увеличилась.

Для иммобилизации олигонуклеотида на поверхности золотого электрода использовали три типа линк-  
ров:<sup>58, 59, 61, 62</sup> стандартный линкер А и линкеры В и С, улуч-  
шающие перенос электрона.<sup>106</sup>



Используя иммобилизацию серосодержащих олигонуклеотидов на поверхности золотого электрода, авторы работы<sup>58</sup> создали ДНК-чип, с помощью которого определяли наличие мутантного фрагмента ДНК в растворе при концентрации  $\sim 50$  нмоль  $\cdot$  л<sup>-1</sup>. Для этой цели применяли два ферроценсодержащих олигонуклеотида, отличающихся значениями окислительных потенциалов и комплементарных участкам ДНК природного и мутантного типа соответственно (брали 5–10-кратный избыток зонда по отношению к определяемой ДНК). Гибридизацию этих олигонуклеотидов с ДНК проводили при повышенной температуре, оптимальной для образования совершенных дуплексов. Ферроценсодержащие ДНК-дуплексы детектировали с помощью вольтамперометрии переменного тока. Показано,<sup>58</sup> что такая система позволяет четко идентифицировать наличие мононуклеотидного полиморфизма.

Та же группа исследователей<sup>105, 107</sup> на базе описанной схемы<sup>58</sup> создала новый вариант электрохимического детектирования ДНК с использованием ДНК-чипов. Метод основан на сравнении температурных зависимостей интенсивности сигналов, возникающих на вольтамперограммах, для процессов образования с ферроценсодержащим олигонуклеотидом идеального и неидеального дуплексов. При увеличении температуры неидеальные дуплексы становятся нестабильными, что позволяет однозначно определить наличие мононуклеотидного полиморфизма в составе протяженных (до 100 оснований) фрагментов ДНК. Преимуществом указанного метода, по мнению авторов работ<sup>105, 107</sup>, является возможность длительной эксплуатации биосенсора без потери интенсивности электрохимического сигнала. Предложено использовать подобные ДНК-чипы для опреде-



**Рис. 5.** Разворачивание шпильчатой структуры НК в присутствии комплементарного олигонуклеотида.<sup>114, 115</sup>  
X — флуорофор, Y — тушитель флуоресценции.

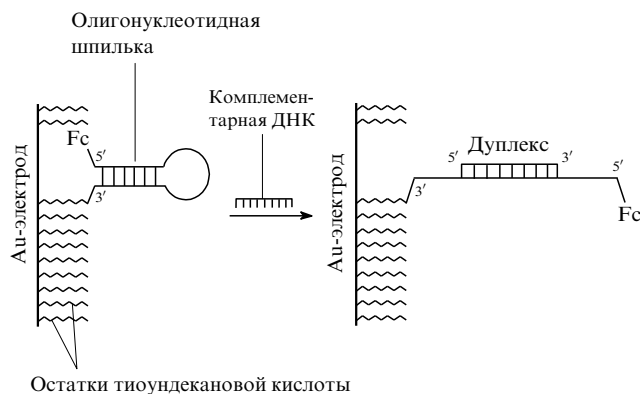
ления наличия мононуклеотидных замен в образцах ДНК человека.<sup>108, 109</sup> Применение ДНК-чипов на основе ферроцен-содержащих олигонуклеотидов для клинической диагностики подробно описано в обзорах<sup>110, 111</sup>.

Альтернативный подход к иммобилизации олигонуклеотидов недавно предложен Хултоном с соавт.,<sup>112, 113</sup> которые синтезировали НК непосредственно на поверхности, в дальнейшем использованной в качестве подложки.

Известно,<sup>114, 115</sup> что только взаимодействие с полностью комплементарным олигонуклеотидом может способствовать разворачиванию шпильчатой структуры НК. Для исследования и детектирования шпильчатых структур обычно используют флуорофор и тушитель флуоресценции, присоединенные к противоположным концам олигонуклеотидной «шпильки» (рис. 5). При образовании дуплекса, конкурирующего со шпилькой, увеличивается расстояние между флуорофором и тушителем флуоресценции, в результате происходит возгорание флуоресценции. Такая схема была реализована для олигонуклеотида, иммобилизованного на наночастицах золота,<sup>116</sup> которые выступали в качестве тушителя флуоресценции.

Этот подход послужил основой для создания ДНК-сенсора (рис. 6).<sup>45, 79</sup> Шпилька, иммобилизованная на золотом электроде, сохраняет структуру в присутствии некомплементарных олигонуклеотидных фрагментов, а при наличии комплементарной определяемой последовательности ДНК образуется дуплекс. При этом увеличивается расстояние между ферроценом и электродом, что приводит к изменению эффективности переноса электронов и, как следствие, силы тока.

Метод детектирования ДНК на поверхности электрода, предложенный в работе<sup>74</sup>, состоит в следующем. Анализируемые односторонние протяженные фрагменты ДНК предва-



**Рис. 6.** Электрохимическое детектирование ДНК с помощью олигонуклеотида-шпильки.<sup>45, 79</sup>

рительно иммобилизуют на углеродном электроде приложением потенциала +0.5 В по методу Ванга.<sup>117</sup> Затем проводят их гибридизацию с электрохимически активными фрагментами ДНК, содержащими остаток ферроценкарбоновой кислоты. Полученные конъюгаты анализируют методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии.

Позже этот метод был оптимизирован.<sup>75</sup> Вместо углеродного электрода впервые было предложено использовать стеклянный электрод, покрытый слоем хитозана — полисахарида, содержащего аминогруппы, которые способны электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженными фосфатными остатками в молекуле ДНК. Благодаря этому анализируемая ДНК максимально прочно связывалась с поверхностью электрода. В качестве зонда использовали комплементарную ДНК, содержащую ферроценильный остаток на 3'-конце. После гибридизации зонда с анализируемой ДНК сигнал окисления ферроцена регистрировали методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии. В этом случае предел обнаружения удалось понизить до  $2 \cdot 10^{-11}$  моль (см. табл. 3) в сочетании с высокой селективностью. Однако вызывает сомнение способность ДНК, иммобилизованной на хитозане за счет электростатических взаимодействий, гибридизоваться с зондом с образованием двойной спирали без нарушения этих взаимодействий.

Интересное применение ферроценсодержащего олигонуклеотида, иммобилизованного на золотом электроде, в качестве модели для изучения гибкости молекулы ДНК описано в работе<sup>94</sup>. В качестве модельной ДНК был выбран 20-звенный гомотиминовый олигонуклеотид, содержащий тиольную группу на 5'- и ферроцен на 3'-конце. Данный олигомер обладает минимальной жесткостью по сравнению с другими последовательностями. После гибридизации иммобилизованного олигонуклеотида с комплементарной матрицей происходит уменьшение подвижности 3'-концевого фрагмента, содержащего остаток ферроцена, что было показано методом циклической вольтамперометрии. При высокой скорости сканирования на вольтамперограмме происходило исчезновение пика окисления ферроцена.

В работе<sup>118</sup> предложен метод определения ферроценсодержащих молекул поточно-инжекционным методом. В этом случае для количественного анализа электроактивных молекул используют буферный раствор, содержащий так называемый «жертвующий реагент» — гексацианоферрат(II) калия, — при окислении которого образуются гексацианоферрат(III)-ионы. Возможность непосредственного окисления «жертвующего реагента» на поверхности золотого электрода исключают путем предварительной иммобилизации на нем алкантиольного моно слоя (рис. 7). Гидрофобные по природе остатки ферроцена, связанные с определяемыми молекулами, способны внедряться в алкантиольный моно слой. Иммобилизованный на поверхности электрода ферроцен при приложении потенциала служит каталитическим медиатором окисления гексацианоферрат(II)-аниона, которое регистрируют вольтамперометрически. Данный метод характеризуется достаточно низкими пределами обнаружения ферроцена (300-кратным увеличением чувствительности по сравнению с прямым определением ферроценсодержащих молекул в растворе).

В общем случае, как следует из данных табл. 3, методы ВЭЖХ и капиллярного электрофореза в сочетании с электрохимическим детектированием позволяют добиться более низких пределов обнаружения ДНК в исследуемом растворе, чем иммобилизация олигонуклеотидов на электроде. Тем не менее последний подход является весьма перспективным для детектирования однобуквенных замен.

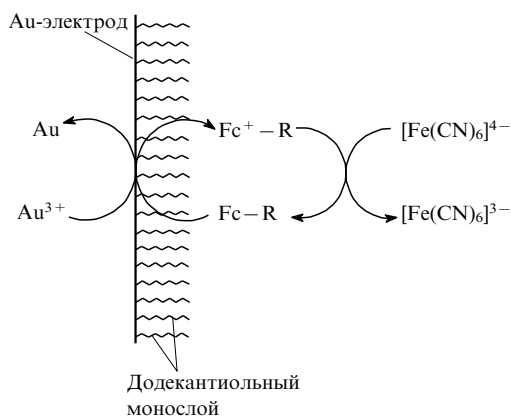


Рис. 7. Определение ферроценсодержащих молекул поточно-инжекционным методом.<sup>118</sup>  
R — определяемая молекула.

#### IV. Заключение

К настоящему времени разработано большое количество методов, позволяющих вводить остаток ферроцена как по 5'- или 3'-концу, так и в середину олигонуклеотидной цепи. Некоторые из этих методов дают возможность встраивать ферроценильные производные в процессе автоматического олигонуклеотидного синтеза, другие применимы для постсинтетической модификации. Выбор оптимального метода определяется задачей конкретного исследования, но предпочтение отдают постсинтетическому присоединению ферроцена. В первую очередь это связано с коммерческой доступностью нуклеозидов и олигонуклеотидов, содержащих реакционноспособные группы, в то время как ферроценсодержащие нуклеозиды и их амидофосфитные производные коммерчески недоступны. Кроме того, ферроцен частично подвергается разрушению в стандартных условиях олигонуклеотидного синтеза на стадии окисления фосфитных групп, а также при постсинтетической обработке в щелочной среде. Проблему деградации ферроцена на стадии окисления можно решить заменой раствора иода на более мягкие окислители — *трет*-бутилгидропероксид или (1*S*)-(+)-(10-камфорсульфонил)оксазирин, которые являются коммерчески доступными. Также следует рекомендовать использование амидофосфитных производных нуклеозидов с лабильными ацетильными или феноксиацетильными защитными группами, которые могут быть удалены в очень мягких условиях. Эти меры позволяют увеличить выходы модифицированных ферроценсодержащих олигонуклеотидов.

Другим направлением синтеза фрагментов НК, содержащих остаток ферроцена, является получение модифицированных нуклеозидтрифосфатов. В обзоре<sup>119</sup> показано, что оптимальными модифицированными субстратами для ДНК- и РНК-полимераз являются соответствующие нуклеозидтрифосфаты, содержащие заместители при атоме С(5) пиримидиновых или С(8) пуриновых гетероциклических оснований. Ранее было обнаружено,<sup>120</sup> что производные 2'-дезоксириндинтрифосфата, модифицированные по атому С(5) пропилильной или (*E*)-пропенильной группами, являются субстратами Таq полимеразы, а на (*Z*)-пропенильные и пропилильные производные этот фермент не действует. На основании этих данных можно выделить две стратегии синтеза: 1) получение конъюгата ферроцена с модифицированным нуклеозидтрифосфатом, содержащим химически активную группу, и 2) алкилирование или алкилирование нуклеозида производным, содержащим ферроцен, и

последующее превращение его в трифосфат. Однако необходимо учитывать, что зачастую (*E*)-пропенильные<sup>50</sup> и пропилильные<sup>121</sup> производные нуклеозидтрифосфатов не являются субстратами ДНК-полимераз, т.е. необходимо индивидуальное тестирование каждого трифосфата модифицированного нуклеозида.

Возможность введения остатка ферроцена в заранее заданное положение олигонуклеотидной цепи открывает широкие перспективы для создания различных систем электрохимического детектирования фрагментов нуклеиновых кислот. Для анализа ДНК применяют два подхода. Первый предполагает ферментативный синтез НК методом ПЦР с использованием трифосфатов ферроценсодержащих нуклеозидов либо 5'-ферроценсодержащих праймеров. Далее продукт анализируют методом ВЭЖХ или капиллярного электрофореза с электрохимическим детектированием. Кроме того, возможно проведение гибридизации ферроценсодержащего олигонуклеотида с НК-мишенью и детектирование такого дуплекса. Этот подход позволяет определять, в том числе и количественно, малые концентрации (до аттомолей) полинуклеотидов.

Второй способ включает детектирование ДНК на поверхности электродов, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды, которые связаны с остатками ферроцена. В этом случае применяют различные схемы детектирования, которые открывают широкие возможности для анализа одноклеточных замен в протяженных фрагментах ДНК. К преимуществам данного подхода следует отнести высокую чувствительность и избирательность, но, как следствие, для анализа требуются большие количества НК по сравнению с первым подходом.

Электрохимическое детектирование сильно уступает флуоресцентному при проведении параллельного капиллярного электрофореза, но имеет хорошие перспективы для создания ДНК-чипов. По результатам работ<sup>57–59, 105</sup> созданы ДНК-чипы марки eSensor™ (Motorola Clinical Micro Sensors, Pasadena, CA, USA) и прибор eSensor™ 4800 Reader, который способен параллельно анализировать ДНК на 48 чипах.

Авторы выражают благодарность О.Ю.Смирновой (DKFZ Heidelberg, Germany) за помощь в подготовке обзора.

Работа выполнена при поддержке гранта NATO SfP-978003.

#### Литература

1. G.H.Keller, M.M.Manak. *DNA Probes*. Stockton Press, New York, 1989
2. L.J.Kricka. *Nonisotopic DNA Probe Technique*. Academic Press, New York, 1992
3. J.Y.Ju, A.N.Glazer, R.A.Mathies. *Nat. Med. (N.Y.)*, **2**, 246 (1996)
4. P.R.Langer, A.A.Waldrop, D.C.Ward. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6633 (1981)
5. J.Leushner. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **1**, 11 (2001)
6. C.G.Huber, H.Oberacher. *Mass Spectrom. Rev.*, **20**, 310 (2001)
7. S.Abramowitz. *J. Biomed. Dev.*, **1**, 107 (1999)
8. A.T.Wooley, K.Q.Lao, A.N.Glazer, R.A.Mathies. *Anal. Chem.*, **70**, 684 (1998)
9. M.E.Napier, C.R.Loomis, M.F.Sistare, J.Kim, A.E.Eckhardt, H.H.Thorp. *Bioconjugate Chem.*, **8**, 906 (1997)
10. B.N.Travick, A.T.Daniher, J.K.Bashkin. *Chem. Rev.*, **98**, 939 (1998)
11. J.K.Bashkin. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 752 (1999)
12. B.Giese. *Acc. Chem. Res.*, **33**, 631 (2000)
13. M.E.Nunez, J.K.Barton. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**, 199 (2000)
14. F.D.Lewis, R.L.Letsinger, M.R.Wasielewski. *Acc. Chem. Res.*, **34**, 159 (2001)
15. P.J.Dandliker, M.E.Nunez, J.K.Barton. *Biochemistry*, **37**, 6491 (1998)

16. R.E.Holmin, P.J.Dandliker, J.K.Barton. *Bioconjugate Chem.*, **10**, 1122 (1999)
17. H.Weizman, Y.Tor. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3375 (2001)
18. K.Tanaka, M.Tasaka, H.Cao, M.Shionoya. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **13**, 77 (2001)
19. S.I.Khan, M.W.Grinstaff. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4704 (1999)
20. J.J.Rack, E.S.Krider, T.J.Meade. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6287 (2000)
21. A.E.Beilstein, M.T.Tierney, M.W.Grinstaff. *Comments Inorg. Chem.*, **22**, 105 (2000)
22. A.J.Deeming. In *Comprehensive Organometallic Chemistry. Vol. 4.* (Eds G.Wilkinson, F.G.A.Stone). Pergamon Press, New York, 1982. P. 475
23. H.-B.Kraatz, M.Galka. *Met. Ions Biol. Syst.*, **38**, 385 (2001)
24. S.Takenaka. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **74**, 217 (2001)
25. S.Takenaka, Y.Uto, H.Saita, M.Yokoyama, H.Kondo, W.D.Wilson. *Chem. Commun.*, 1111 (1998)
26. K.Yamashita, M.Takagi, K.Uchida, H.Kondo, S.Takenaka. *Analyst*, **126**, 1210 (2001)
27. S.Takenaka, K.Yamashita, M.Takagi, Y.Uto, H.Kondo. *Anal. Chem.*, **72**, 1334 (2000)
28. M.Cargill, D.Altshuler, J.Ireland, P.Sklar, K.Ardlie, N.Patil, C.R.Lane, E.P.Lim, N.Kalyanaraman, J.Nemesh, L.Ziaugra, L.Friedland, A.Rolfe, J.Warrington, R.Lipshutz, G.Q.Daley, E.S.Lander. *Nat. Genet.*, **22**, 231 (1999)
29. R.Sachidanandam, D.Weissman, S.C.Schmidt, J.M.Kakol, L.D.Stein, J.C.Mullikin, B.J.Mortimore, D.L.Willey, S.E.Hunt, C.G.Cole, P.C.Coggill, C.M.Rice, Z.Ning, J.Rogers, D.R.Bentley, P.Y.Kwok, E.R.Mardis, R.T.Yeh, B.Schultz, L.Cook, R.Davenport, M.Dante, L.Fulton, L.Hillier, R.H.Waterston, J.D.McPherson, B.Gilman, S.Schaffner, W.J.van Etten, D.Reich, J.Higgins, M.J.Daly, B.Blumenstiel, J.Baldwin, N.Stange-Thomann, M.C.Zody, L.Linton, E.S.Lander, D.Altshuler. *Nature (London)*, **409**, 928 (2001)
30. K.H.Buetow, M.Edmonson, R.MacDonald, R.Clifford, P.Yip, J.Kelley, D.P.Little, R.Strausberg, H.Koester, C.R.Cantor, A.Braun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 581 (2001)
31. D.G.Wang, J.-B.Fan, C.-J.Siao, A.Berno, P.Young, R.Sapolsky, G.Ghandour, N.Perkins, E.Winchester, J.Spencer, L.Kruglyak, L.Stein, L.Hsie, T.Topaloglou, E.Hubbell, E.Robinson, M.Mittmann, M.S.Morris, N.Shen, D.Kilburn, J.Rioux, C.Nusbaum, S.Rozen, T.J.Hudson, R.Lipshutz, M.Chee, E.S.Lander. *Science*, **280**, 1077 (1998)
32. H.J.Tian, A.Jaquins-Gerstl, N.Munro, M.Truccho, L.C.Brody, J.P.Landers. *Genomics*, **63**, 25 (2000)
33. H.J.Tian, L.C.Brody, J.P.Landers. *Genome Res.*, **10**, 1403 (2000)
34. R. De Santis, A.Azzi. *J. Virol. Methods*, **85**, 101 (2000)
35. P.Meunier, I.Ouattara, B.Gautheron, J.Tirouflet, D.Camboli, J.Besanson. *Eur. J. Med. Chem.*, **26**, 351 (1991)
36. K.Sonogashira, Y.Tohda, N.Hagihara. *Tetrahedron Lett.*, 4467 (1975)
37. В.А.Коршун, Е.В.Манасова, Ю.А.Берлин. *Биоорг. химия*, **23**, 324 (1997)
38. C.J.Yu, H.Yowanto, Y.Wan, T.J.Meade, Y.Chong, M.Strong, L.H.Donilon, J.F.Kayyem, M.Gozin, G.F.Blackburn. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6767 (2000)
39. A.R.Pike, L.C.Ryder, B.R.Horrocks, W.Clegg, M.R.J.Elsegood, B.A.Connolly, A.Houlton. *Chem. Eur. J.*, **8**, 2891 (2002)
40. A.E.Beilstein, M.W.Grinstaff. *Chem. Commun.*, 509 (2000)
41. A.E.Beilstein, M.W.Grinstaff. *J. Organomet. Chem.*, **637**, 398 (2001)
42. A.Anne, B.Blanc, J.Moiroux. *Bioconjugate Chem.*, **12**, 396 (2001)
43. L.Ryder, A.Pike, B.R.Horrocks, A.Houlton. *J. Inorg. Biochem.*, **86**, 414 (2001)
44. F.Sanger, S.Nicklen, A.R.Coulson. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463 (1977)
45. X.Hu, S.J.Lee, M.W.Grinstaff. *Methods Enzymol.*, **353**, 548 (2002)
46. R.F.Heck, J.P.Nolley. *J. Org. Chem.*, **37**, 2320 (1972)
47. W.Cabri, I.Candiani. *Acc. Chem. Res.*, **28**, 2 (1995)
48. E.Bucci, L.De Napoli, G.Di Fabio, A.Messere, D.Montesarchio, A.Romanelli, G.Piccialli, M.Varra. *Tetrahedron*, **55**, 14435 (1999)
49. O.Mitsunobu. *Synthesis*, 1 (1981)
50. W.A.Wlassoff, G.C.King. *Nucleic Acids Res.*, **30**, e58 (2002)
51. A.Okamoto, K.Tainaka, I.Saito. *Tetrahedron Lett.*, **43**, 4581 (2002)
52. R.S.Glass, N.Y.T.Stessman. *Tetrahedron Lett.*, **41**, 9581 (2000)
53. C.Price, M.Aslanoglu, C.J.Isaac, M.R.J.Elsegood, W.Clegg, B.R.Horrocks, A.Houlton. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 4115 (1996)
54. A.Houlton, C.J.Isaac, A.E.Gibson, B.R.Horrocks, W.Clegg, M.R.J.Elsegood. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3229 (1999)
55. K.Nakano, S.Shirakawa, S.Taguchi, M.Maeda. *Anal. Sci.*, **17**, i291 (2001)
56. Т.С.Зацепин, Е.А.Романова, Т.С.Орецкая. *Успехи химии*, **71**, 586 (2002)
57. C.J.Yu, H.Wang, Y.Wan, H.Yowanto, J.C.Kim, L.H.Donilon, C.Tao, M.Strong, Y.Chong. *J. Org. Chem.*, **66**, 2937 (2001)
58. C.J.Yu, Y.Wan, H.Yowanto, J.Li, C.Tao, M.D.James, C.L.Tan, G.F.Blackburn, T.J.Meade. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 11155 (2001)
59. E.K.Wilson. *Chem. Eng. News*, **76**, 47 (1998)
60. S.M.Freier, K.-H.Altmann. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4429 (1997)
61. Пат. 6090933 США (2000)
62. Пат. 6096273 США (2000)
63. Пат. 6221583 США (2001)
64. H.F.Arlinghaus, N.Thonnard, M.T.Spaar, R.A.Sachleben, F.W.Larimer, R.S.Foote, R.P.Woychik, G.M.Brown, F.V.Sloop, K.B.Jacobson. *Anal. Chem.*, **63**, 402 (1991)
65. K.B.Jacobson, H.F.Arlinghaus, H.W.Schmitt, R.A.Sachleben, G.M.Brown, N.Thonnard, F.V.Sloop, R.S.Foote, F.W.Larimer, R.P.Woychik, M.W.England, K.L.Burchett, D.A.Jacobson. *Genomics*, **9**, 51 (1991)
66. F.V.Sloop, G.M.Brown, R.A.Sachleben, M.L.Garrity, J.E.Elbert, K.B.Jacobson. *New J. Chem.*, **18**, 317 (1994)
67. S.Takenaka, Y.Uto, H.Kondo, T.Ihara, M.Takagi. *Anal. Biochem.*, **218**, 436 (1994)
68. T.Ihara, Y.Maruo, S.Takenaka, M.Takagi. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4273 (1996)
69. Y.Uto, H.Kondo, M.Abe, T.Suzuki, S.Takenaka. *Anal. Biochem.*, **250**, 122 (1997)
70. T.Ihara, M.Nakayama, M.Murata, K.Nakano, M.Maeda. *Chem. Commun.*, 1609 (1997)
71. M.Nakayama, T.Ihara, K.Nakano, M.Maeda. *Talanta*, **56**, 857 (2002)
72. S.A.Brazill, W.G.Kuhr. *Anal. Chem.*, **74**, 3421 (2002)
73. K.K.-W.Lo, J.S.-Y.Lau, D.C.-M.Ng, N.Zhu. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1753 (2002)
74. C.Xu, P.He, Y.Fang. *Anal. Chim. Acta*, **411**, 31 (2000)
75. C.Xu, H.Cai, P.He, Y.Fang. *Analyst*, **126**, 62 (2001)
76. R.C.Mucic, M.K.Herrlein, C.A.Mirkin, R.L.Letsinger. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 555 (1996)
77. A.E.Beilstein. Ph.D.Thesis. Duke University, USA, 2001
78. M.Chahma, J.S.Lee, H.-B.Kraatz. *J. Organomet. Chem.*, **648**, 81 (2002)
79. X.Xu. Ph.D.Thesis. Duke University, USA, 2001
80. E.A.Kubareva, O.V.Petrauskene, A.S.Karyagina, V.N.Tashlitsky, I.I.Nikolskaya, E.S.Gromova. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4533 (1992)
81. A.Hess, N.Metzler-Nolte. *Chem. Commun.*, 885 (1999)
82. J.C.Verheijen, G.A.van der Marel, J.H.van Boom, N.Metzler-Nolte. *Bioconjugate Chem.*, **11**, 741 (2000)
83. M.Egholm, C.Behrens, L.Christesen, R.H.Berg, P.E.Nielsen, O.Buchardt. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 800 (1993)
84. J.Wang, E.Palecek, P.E.Nielsen, G.Rivas, X.Cai, H.Shiraishi, N.Dontha, D.Luo, P.A.M.Farias. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 7667 (1996)
85. E.Palecek. *Nature (London)*, **188**, 656 (1960)
86. E.Palecek. *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*, **18**, 151 (1976)
87. E.Palecek, M.Fojta. *Anal. Chem.*, **73**, 74A (2001)
88. M.Fojta, R.P.Bowater, V.Stankova, L.Havran, D.M.J.Lilley, E.Palecek. *Biochemistry*, **37**, 4853 (1998)
89. E.Palecek. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **28**, 71 (1992)
90. M.T.Carter, A.J.Bard. *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 7528 (1987)
91. X.-H.Xu, A.J.Bard. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2627 (1995)
92. K.B.Jacobson, H.F.Arlinghaus. *Anal. Chem.*, **64**, 315A (1992)

93. M.D.Morris. *Electroanal. Chem.*, **7**, 80 (1974)
94. A.Anne, A.Bouchardon, J.Moiroux. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1112 (2003)
95. R.D.Wells. *J. Chromatogr.*, **336**, 3 (1984)
96. L.W.McLaughlin, R.Bischoff. *J. Chromatogr.*, **418**, 51 (1987)
97. S.A.Brazill, P.H.Kim, W.G.Kuhr. *Anal. Chem.*, **73**, 4882 (2001)
98. *PCR Technology*. (Ed. H.A.Erlich). Stockton Press, New York, 1989
99. C.Heller. *Electrophoresis*, **22**, 629 (2001)
100. A.von Brocke, G.Nicholson, E.Bayer. *Electrophoresis*, **22**, 1251 (2001)
101. N.A.Lacher, K.E.Garrison, R.S.Martin, S.M.Lunte. *Electrophoresis*, **22**, 2526 (2001)
102. S.A.Brazill, P.Singhal, W.G.Kuhr. *Anal. Chem.*, **72**, 5542 (2000)
103. J.Janata. *Principles of Chemical Sensors*. Plenum, New York, 1989
104. M.I.Pivdori, A.Merkoci, S.Alegret. *Biosens. Bioelectron.*, **15**, 291 (2000)
105. R.M.Umek, S.W.Lin, J.Vielmetter, R.H.Terbrueggen, B.Irvine, C.J.Yu, J.F.Kayyem, H.Yowanto, G.F.Blackburn, D.H.Farkas, Y.P.Chen. *J. Mol. Diagn.*, **3**, 74 (2001)
106. S.Creager, C.J.Yu, C.Bamdad, S.O'Connor, T.MacLean, E.Lam, Y.Chong, G.T.Olsen, J.Luo, M.Gozin, J.F.Kayyem. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1059 (1999)
107. R.M.Umek, S.W.Lin, Y.P.Chen, J.Vielmetter, B.Irvine, G.Paulluconi, V.Chan, R.H.Terbrueggen, C.J.Yu, J.F.Kayyem, H.Yowanto, G.F.Blackburn, D.H.Farkas. *Mol. Diagn.*, **5**, 321 (2000)
108. Пат. 6063573 США (2000)
109. Пат. 6071699 США (2000)
110. R.C.McGlennen. *Clin. Chem.*, **47**, 393 (2001)
111. D.H.Farkas. *Clin. Chem.*, **47**, 1871 (2001)
112. A.Pike, B.Horrocks, B.Connolly, A.Houlton. *Aust. J. Chem.*, **55**, 191 (2002)
113. A.R.Pike, L.H.Lie, R.A.Eagling, L.C.Ryder, S.N.Patole, B.A.Connolly, B.R.Horrocks, A.Houlton. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **41**, 615 (2002)
114. X.Fang, X.Liu, S.Shuster, W.Tan. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 2921 (1999)
115. G.Bonnet, S.Tyagi, A.Libchaber, F.R.Kramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6171 (1999)
116. B.Dubertret, M.Calame, A.J.Libchaber. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 365 (2001)
117. J.Wang, X.Cai, C.Jonsson, M.Balakrishnam. *Electroanalysis*, **8**, 20 (1996)
118. P.T.Radford, S.E.Creager. *Anal. Chim. Acta*, **449**, 199 (2001)
119. E.T.Kool. *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 191 (2002)
120. S.E.Lee, A.Sidorov, T.Gourlain, N.Mignet, S.J.Thorpe, J.A.Brazier, M.J.Dickman, D.P.Hornby, J.A.Grasby, D.M.Williams. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1565 (2001)
121. J.W.Brandis. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1912 (1999)

#### NUCLEIC ACIDS CONTAINING THE FERROCENE RESIDUE: SYNTHESIS AND ELECTROCHEMISTRY

**T.S.Zatsepin, S.Yu.Andreev, T.S.Oretskaya, T.Hianik**

*Department of Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University*

*Leninskie Gory, 119992 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)939–3181*

*Comenius University*

*Mlynska Dolina F1, 84248 Bratislava, Slovak Republic, Fax +42(126)542–6774*

Methods for the synthesis of nucleic acids fragments containing the ferrocene residue are reviewed. The methods were systematically studied, their advantages and drawbacks are considered. The application of nucleoside, nucleotide and oligonucleotide conjugates with ferrocene for the development of systems for electrochemical detection of nucleic acids is discussed.

Bibliography — 121 references.

*Received 20th December 2002*