

На правах рукописи

ВИНОГРАДОВА ОЛЬГА АЛЕКСАНДРОВНА

**ВЛИЯНИЕ НЕНУКЛЕОТИДНЫХ ВСТАВОК
НА СУБСТРАТНЫЕ И КОНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА
ДНК-ДУПЛЕКСОВ**

02.00.10 – биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2011

Работа выполнена в Институте химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН

Научный руководитель:

к.х.н., доцент Пышный Дмитрий Владимирович

Официальные оппоненты:

д.х.н. Долиная Нина Германовна

к.х.н. Кузнецов Никита Александрович

Ведущая организация:

Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН

Защита состоится «_____»_____2011 г. в _____ часов на
заседании диссертационного совета Д 003.045.01 при Институте
химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу:
630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «_____»_____2011 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Производные природных нуклеиновых кислот (НК) и их аналоги уже давно стали незаменимыми инструментами во многих исследовательских и практических молекулярно-биологических приложениях. Введение модифицированных остатков в регулярную структуру НК позволяет направленно изменять функциональные характеристики формируемых на их основе комплексов, такие как стабильность, субстратные и структурные свойства. Ранее в лаборатории химии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН были предложены мостиковые олигонуклеотиды, состоящие из нативных нуклеотидных блоков, соединенных ненуклеотидными вставками, не затрагивающими комплементарные взаимодействия между основаниями и не имеющими выраженного сродства к НК-компонентам. Были определены термодинамические параметры комплексообразования мостиковых олигонуклеотидов, описаны некоторые структурные характеристики комплексов на их основе, исследованы субстратные свойства в реакциях, катализируемых ДНК-зависимыми ферментами.

Представленная работа является продолжением серии работ по исследованию свойств мостиковых олигонуклеотидов и ДНК-комплексов на их основе и направлена на изучение структурных особенностей и субстратных свойств модифицированных ДНК-дуплексов в реакциях, катализируемых ДНК-зависимыми ферментами.

Целью настоящей работы было исследование характера возмущений, вносимых в структуру ДНК-дуплекса ненуклеотидной вставкой на основе фосфодиэфиров олигометилendiолов и олигоэтиленгликолей, с точки зрения изучения субстратных и конформационных свойств комплексов мостиковых олигонуклеотидов для их последующего использования в гибридационном анализе и для направленного изменения формы ДНК-структур.

В ходе исследования решали следующие задачи:

- изучение влияния ненуклеотидных вставок на конформационные особенности модифицированных ДНК-дуплексов и исследование зависимости величины локального возмущения, вносимого модифицированным остатком, от размера и структуры выпетленных вставок в цепях ДНК-комплекса;
- исследование возможности направленного изменения формы многокомпонентных ДНК-ассоциатов на основе модифицированных ДНК-дуплексов в качестве строительных блоков;
- изучение субстратных свойств модифицированных дуплексов ДНК в реакциях, катализируемых ДНК-зависимыми ферментами; определение кинетических параметров лигирования совершенных и содержащих одонуклеотидное несоответствие модифицированных ДНК-субстратов под действием ДНК-лигазы фага T4;
- разработка подхода повышения эффективности гибридационного анализа при использовании олигонуклеотидных мостиковых зондов и структурированного фрагмента в качестве ДНК-матрицы.

Научная новизна и практическая ценность работы. Представленная работа является детальным и систематическим исследованием конформационных и субстратных свойств ДНК-комплексов на основе мостиковых олигонуклеотидов. Впервые проведено исследование характера возмущений, вносимых в структуру ДНК-комплексов в результате введения нуклеотидной вставки. Показано, что любое нуклеотидное выпетливание в составе дцДНК приводит к изгибу основной оси модифицированного ДНК-фрагмента в месте введения вставки. Показано, что наличие изгибающих нуклеотидных вставок в составе ДНК-дуплексов, организуемых по принципу конкатемерных структур, способствует самоограничению роста цепи ДНК-конкатемера в результате формирования циклических дцДНК.

Проведено детальное исследование влияния нуклеотидных вставок в структуре ДНК-дуплексов на их субстратные свойства в реакциях ДНК-зависимых ферментов (ДНК-лигазы фага T4 и *Taq* ДНК-полимеразы). С целью выявления стадий ферментативной реакции, определяющих изменение эффективности процессирования модифицированных ДНК-субстратов, определены кинетические параметры реакций лигирования T4 ДНК-лигазой модифицированных совершенных и содержащих однонуклеотидные несоответствия ДНК-комплексов.

Показано использование мостиковых олигонуклеотидов как высокоселективных зондов в гибридизационном анализе. Предложено использование ограниченно фрагментированной дцДНК-матрицы в качестве анализируемого объекта с целью повышения чувствительности гибридизационного анализа.

Проведенные исследования свойств комплексов мостиковых олигонуклеотидов принципиальны для установления особенностей формирования модифицированных ДНК-дуплексов. Показанная возможность регулирования конформационных и субстратных свойств ДНК-комплексов необходима для расширения их практической значимости.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ. Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях, в том числе: Международная конференция «Физико-химическая биология», посвященная 80-летию академика Д.Г. Кноппе, Новосибирск, 2006; 15th International symposium «Nanostructures: physics and technology», Novosibirsk, 2007; II Международный Молодежный Медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения-2007» к 110-летию СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 2007; IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск, 2008; The sixth international conference on bioinformatics of genome regulation and structure, Novosibirsk, 2008; Первый и Второй международные форумы по нанотехнологиям, Москва, 2008, 2009; Международная конференция «Химическая биология – фундаментальные проблемы бионанотехнологии», Новосибирск, 2009.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 160 страницах, содержит 66 рисунков и 12 таблиц. Библиография включает 273 литературных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

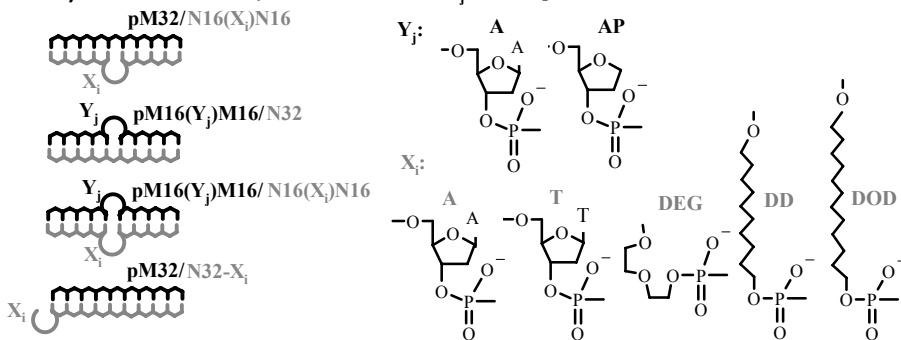
1. Конформационные особенности ДНК-дуплексов на основе мостиковых олигонуклеотидов

При исследовании структуры комплексов мостиковых олигонуклеотидов методом кругового дихроизма было установлено, что КД-спектры модифицированных комплексов характерны для двойной спирали ДНК В-формы [Pyshnyi D. V. et al 2006]. Детектируемые незначительные различия в спектрах комплексов нативных и модифицированных олигонуклеотидов свидетельствуют о локальном возмущении структуры дуплексов. Исследование конформационных особенностей модифицированных ДНК-дуплексов проводили на примере 32-звенных ДНК-дуплексов с одинаковой нуклеотидной последовательностью, различающихся наличием в центральной части одной или обеих цепей дополнительных модифицирующих звеньев. В центральную часть матричного олигонуклеотида **pM32** вводили звенья Y_j на основе остатков фосфодиэфира 3-гидрокси-2-гидрокси-метилтетрагидрофурана (AP_1) или триаденилата (A_3). В структуру олигонуклеотида **N32** вводили звенья X_i на основе: моно- и олигоаденилатов (A_i) и олиготимидилатов (T_i), или нуклеотидные вставки: остатки фосфодиэфиров диэтиленгликоля (DEG_i), 1,10-декандиола (DD_i) и 1,12-додекандиола (DOD_i). В качестве контрольных были исследованы модифицированные ДНК-дуплексы **pM32/N32- X_i** , содержащие дополнительные звенья X_i на 5'-конце олигонуклеотидной цепи **N32** (схема 1).



Схема 1.

*, * - положения нуклеотидных вставок Y_j и X_i в **pM32** и **N32** соответственно



При исследовании электрофоретической подвижности комплексов **pM32/N16(X_i)N16**, **pM16(Y_j)M16/N32**, **pM16(Y_j)M16/N16(X_i)N16** было установлено, что введение любой вставки приводит к снижению электрофоретической подвижности в неденатурирующих условиях ДНК-дуплексов относительно ДНК-дуплекса без выпетливания **pM32/N32** или дуплексов **pM32/N32-X_i**, несущих соответствующую модификацию на конце дцДНК (рис. 1). Более протяженное выпетливание в случае большинства исследуемых дуплексов приводит к более выраженному снижению их электрофоретической подвижности.

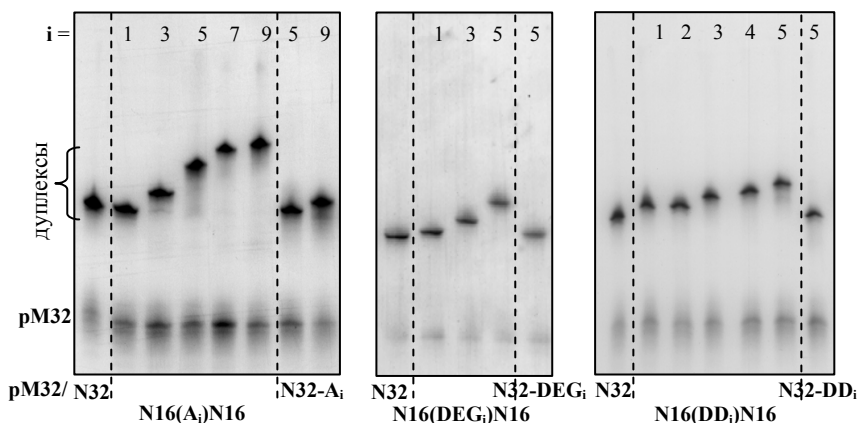


Рис. 1. Электрофоретический анализ ДНК-дуплексов **pM32/N16(X_i)N16** в 18% ПА-АГ в неденатурирующих условиях при 10°C. Условия гибридизации: 45 мМ трис-борат (pH 8.3), 5 мМ MgCl₂, [³²pM32] = 7.5 мкМ, [N32], [N16(X_i)N16] = 5 мкМ, 25°C, 30 мин.

Наблюдаемое снижение электрофоретической подвижности ДНК-дуплексов с внутренними петлями обусловлено изгибом дцДНК в сайте модификации [Thompson J.F., Landy A. 1988; Rice J.A., Crothers D.M. 1985]. Локальное нарушение структуры согласуется с данными КД-спектров. С помощью выражения: $\alpha = 2 \cdot \arccos(\mu_{\text{внутр}}/\mu_{\text{конц}})$ [Thompson J.F., Landy A. 1988], где $\mu_{\text{внутр}}$ и $\mu_{\text{конц}}$ – электрофоретические подвижности комплексов, несущих одинаковые модификации в центральной части дуплекса и на его конце соответственно, были определены величины углов изгиба дуплексных структур ДНК (табл. 1).

Установлено, что степень влияния различных нуклеотидных и ненуклеотидных выпетливаний на изменение конформации модифицированных дуплексов определяется не только протяженностью петли, но природой модифицированных звеньев. Так, при одинаковом числе остатков (i), нуклеотидные вставки в большей степени изгибают остов дцДНК, чем любые ненуклеотидные, несмотря на большую контурную длину последних. В случае олигоденилатного фрагмента это связано с сохранением стэкинг-

Таблица 1. Величина изгиба основной оси спирали (угол α) ДНК-комплексов **pM32/N16(X_i)N16, pM16(Y_j)M16/N32, pM16(Y_j)M16/N16(X_i)N16.**

Y _j	X _i	0	1	2	3	4	5	7	9
-	A	-	21°	-	50°	-	74°	82°	83°
-	T	-	-	-	-	-	70°	-	-
-	DEG	-	20°	-	41°	-	61°	-	-
-	DD	-	32°	35°	45°	53°	59°	-	-
-	DOD	-	27°	19°	39°	38°	44°	-	-
AP ₁	A	16°	0°	-	39°	-	69°	83°	82°
A ₃	A	46°	31°	-	0°	-	16°	49°	63°

Примечание. Ошибку определения угла изгиба рассчитывали как стандартное отклонение величины при анализе данных, полученных в серии из не менее трех независимых экспериментов. Величина ошибки не превышает $\pm 5^\circ$.

взаимодействий в одноцепочечном участке [Rosen M.A. et al. 1992]. Напротив, каждый из ДНК-дуплексов **pM32/N16(DOD_i)N16** ($i = 2-5$) характеризуется значительно меньшим изгибом спирали относительно любого из рассмотренных ДНК-дуплексов **pM32/N16(X_i)N16** ($i = 2-5$) с соответствующим количеством последовательно введенных модифицированных остатков X_i, хотя контурная длина **DOD_i**-остатков наибольшая. Данный факт мы связываем с гидрофобной природой подобных нуклеотидных вставок, стремящихся минимизировать площадь контакта их алифатических цепей с растворителем, что приводит к компактизации вставки и в результате к снижению степени изгиба модифицированного ДНК-дуплекса.

Кроме того, практически во всех рассмотренных случаях увеличение числа последовательно расположенных вставок одного типа вызывает повышение величины изгиба спирали ДНК. Исключение составляют ДНК-дуплексы с модификациями на основе гидрофобных фосфодиэфиров декандиола и додекандиола. Введение второго подобного остатка не влияет на структуру ДНК-дуплекса или приводит к уменьшению изгиба (табл. 1).

При исследовании серии комплексов с двумя внутренними выпетливаниями **pM16(Y_j)M16/N16(X_i)N16** в матричной и олигонуклеотидной цепях показано, что наличие невзаимодействующих нуклеотидных последовательностей способствует некоторой компенсации суммарного изгиба ДНК-дуплекса (табл. 1).

Влияние электростатических взаимодействий дополнительных фосфатных остатков, сводимых на стыке дуплексных фрагментов при введении нуклеотидной вставки, исследовали на модельных тандемных дуплексах **pM32/N16₁+N16₂** и **pM16(Y_j)M16/N16₁+N16₂** с одноцепочечным разрывом в центральной части олигонуклеотида **N32**, содержащим моноэфирные фосфатные остатки или нет. Наличие одноцепочечного разрыва в отсутствии фосфатного остатка на стыке дуплексных структур (**pM32/N16₁+N16₂**) приводит к незначительному изгибу дцДНК ($\alpha = 5^\circ$) (рис. 2). Наличие в точке кооперативного контакта 5'- или 3'-концевого

фосфатного остатка или сближение пары фосфатов приводит к достоверно детектируемому возмущению дуплекса, а достигает 19° и 42° соответственно. Разнесение фосфатных остатков в брешь-содержащих комплексах $pM16(A_3)M16/N16_1p+pN16_2$ вызывает релаксацию ДНК до $\alpha = 12^\circ$ в случае упорядоченного за счет стэкинг-взаимодействий триаденيلاتного перехода. В случае $pM16(AP_1)M16/N16_1p+pN16_2$, напротив, детектируется увеличение изгиба до 54° (рис. 2).

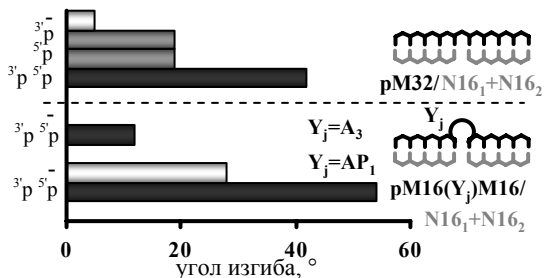


Рис. 2. Величины изгиба α тандемных комплексов $pM32/N16_1+N16_2$, $pM16(AP_1)M16/N16_1+N16_2$, $pM16(A_3)M16/N16_1+N16_2$ в зависимости от наличия фосфатных остатков в сайте одноцепочечного разрыва.

Термическая стабильность комплексов с выпетливаниями. Методом термической денатурации с оптической регистрацией были определены температуры плавления комплексов серий $pM32/N16(X_i)N16$ и $pM16(Y_j)M16/N16(X_i)N16$. Показано, что наличие внутренних петель во всех случаях дестабилизирует ДНК-дуплексы. Степень дестабилизации возрастает с увеличением длины выпетливания (рис. 3). Выявлена корреляция между стабильностью возмущенного комплекса и величиной отклонения формы его спирали от линейной (рис. 3).

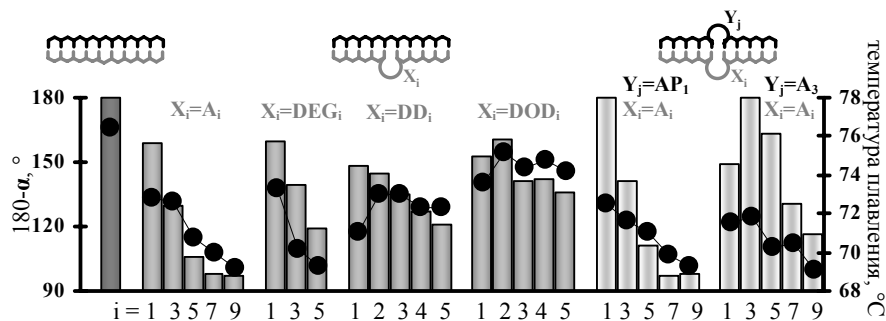


Рис. 3. Корреляция между стабильностью комплексов с выпетливаниями $pM32/N16(X_i)N16$, $pM16(Y_j)M16/N32$, $pM16(Y_j)M16/N16(X_i)N16$ и уровнем их изгибной деформации. Величина изгиба $180^\circ - \alpha$ (столбцы) и температуры плавления (точки) нативного и модифицированных ДНК-комплексов. Условия термической денатурации: 10 мМ какодилат натрия (pH 7.2), 35 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, концентрация олигонуклеотидов 1 мкМ.

Таким образом, наличие нуклеотидных звеньев в составе комплексов мостиковых олигонуклеотидов приводит к изгибу дцДНК-спирали на участке нарушения регулярности структуры и обуславливает их дестабилизацию. Масштаб дестабилизации и величина изгиба модифицированной дцДНК определяется структурой вводимой вставки.

2. Многокомпонентные ассоциаты на основе модифицированных ДНК-дуплексов

ДНК-дуплексы на основе мостиковых олигонуклеотидов были рассмотрены в качестве строительных блоков для получения многокомпонентных ДНК-объектов нетривиальной формы. Были исследованы особенности строения конкатемерных структур на основе модифицированных ДНК-дуплексов. Рассмотрены две серии ДНК-конкатемеров (схема 2). ДНК-конкатемеры **29В-34В** формировали на основе блоков, образованных 5'-³²P-меченной матрицей и модифицированным вставками на основе пяти остатков фосфодиэфиров диэтиленгликолей (**DEG₅**) олигонуклеотидным компонентом. ДНК-конкатемер **40В** был образован 40-звенной 5'-³²P-меченной матрицей и олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную вставку из четырех остатков фосфодиэфиров декандиолов (**DD₄**). В качестве контрольных исследовали ДНК-конкатемеры **32L** и **40L**, сформированные на основе нативных ДНК-дуплексов.

Схема 2.



* - положение **DEG₅** и **DD₄** в ДНК-дуплексах **29В-34В** и **40В** соответственно

Формирование конкатемерных структур проводили при медленном охлаждении эквимольной смеси олигонуклеотидных компонентов мономерных дуплексов с 95°C до 25°C в буферных условиях, пригодных для дейст-

вия Т4 ДНК-лигазы. При добавлении ДНК-лигазы происходило частичное лигирование мономерных дуплексов, образующих конкатемер. При анализе ДНК-конкатемеров методом гель-электрофореза в неденатурирующих условиях установлено, что в случае ДНК-конкатемера **32L** формируется набор полимерных структур. В случае модифицированных ДНК-конкатемеров **29В-34В** также образуется набор продуктов, однако в дорожках можно выделить несколько явно выраженных дискретных полос (рис. 4), что свидетельствует о предпочтительном образовании ДНК-структур определенной формы. Формирование ДНК-конкатемера **40В** происходит по аналогичному принципу.

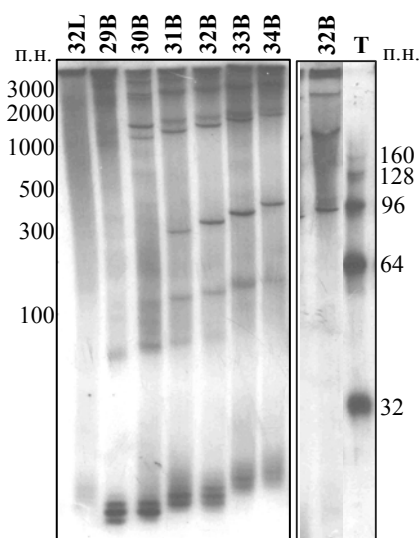


Рис. 4. Результат электрофоретического разделения в 10% неденатурирующем ПААГ нативного **32L** и модифицированных **29В-34В** ДНК-конкатемеров. **Т** – модифицированный маркер длины, полученный тупоконечным лигированием ДНК-дуплекса **pM32/N16(DEG₅)N16** (последовательность см. схема 1).

Условия гибридизации ДНК-конкатемеров: 10 мМ MgCl₂, 10 мМ DTT, 20 мМ трис-НСl (рН 7.5), 0.1 М NaCl, 1 мМ АТФ, 20 ед. акт. Т4 ДНК-лигазы, [каждой цепи] = 10 мкМ, 25°C, 30 мин.

Условия тупоконечного лигирования: 10 мМ MgCl₂, 10 мМ DTT, 20 мМ трис-НСl (рН 7.5), 0.1 М NaCl, 25% ПЭГ 6000, 1 мМ АТФ, 100 ед. акт. Т4 ДНК-лигазы, [pM32/N16(DEG₅)N16] = 10 мкМ, 15°C, 12 часов.

Эффективность образования детектируемых самоограниченных продуктов для ДНК-конкатемеров **29В-34В** зависит от длины мономерного дуплекса. Выход подобных структур максимален в случае 32-33-мерных блоков (ДНК-конкатемеры **32В** и **33В**) (рис. 4). Это было соотнесено с тем, что удлинение дуплексного фрагмента между соседними нуклеотидными звеньями, также как и детектируемый изгиб ДНК-дуплекса в месте введения вставки, приводит к изменению относительной ориентации фрагментов ДНК-конкатемера, соединенных модифицированными остатками. Очевидно, что наиболее эффективное формирование самоограниченных структур наблюдается в том случае, когда оси отдельных немодифицированных фрагментов ДНК-конкатемера будут расположены в одной плоскости.

Сопоставляя электрофоретические подвижности структур, детектируемых в конкатемере **32В**, с модифицированным маркером длины, содержа-

шим аналогичную ненуклеотидную вставку DEG_5 (рис. 4), установлено, что регистрируемые на электрофореграмме полосы с большей подвижностью соответствуют продуктам ассоциации 3 и 6 ДНК-блоков.

Устойчивость нативного и модифицированного ДНК-конкатемеров по отношению к действию экзонуклеаз. Была исследована стабильность ДНК-конкатемеров **32L** и **32B** в присутствии экзонуклеаз III и λ и фосфодиэстеразы змеиного яда (ФДЗЯ). Линейный конкатемер **32L** проявил стабильность только к действию ФДЗЯ. В случае обработки экзонуклеазами III и λ наблюдали деградацию конкатемера. Полученные результаты согласуются со структурой линейного конкатемера, который, согласно схеме ассоциации мономерных ДНК-дуплексов, содержит 3'-дуплексные фрагменты и 5'-одноцепочечные нависания. Стабильность образующихся в случае модифицированного конкатемера **32B** самоограниченных структур проявляется по отношению к ФДЗЯ и экзонуклеазе λ . Одной из причин устойчивости ДНК-конкатемера **32B** в присутствии экзонуклеазы λ может быть недоступность 5'-одноцепочечных концов, что реализуется в случае замыкания ДНК-конкатемера в цикл.

Эффективность гибридизации конкатемерных комплексов ДНК с олигонуклеотидом-стоппером, комплементарным одному из липких концов ДНК-блока, была исследована для нативного **32L** и модифицированного **32B** конкатемеров. Показана гибридизация олигонуклеотида-стоппера в случае линейного конкатемера **32L**. Формирование комплексов между олигонуклеотидом и самоограниченными структурами модифицированного ДНК-конкатемера **32B** зарегистрировать не удавалось.

Таким образом, самоограниченные структуры, регистрируемые в случае модифицированного ДНК-конкатемера при его исследовании с помощью гель-электрофореза, сформированы таким образом, что 5'-одноцепочечные участки недоступны для гибридизации с комплементарным олигонуклеотидом, что говорит в пользу того, что данные структуры являются замкнутыми.

Особенности строения нативных и модифицированных ДНК-конкатемеров были исследованы **методом атомно-силовой микроскопии (АСМ)***. Из типичных топографических АСМ-изображений поверхности слюды с ДНК-конкатемерами видно, что во всех модельных системах преобладают полимерные молекулы с линейной формой (рис. 5). Формирование ДНК-объектов нетипичной формы (разветвленных и циклических) также детектируется во всех системах. По данным статистического анализа полученных АСМ-изображений можно выделить общую тенденцию увели-

* – АСМ-исследования проведены в ЦКП «Наноструктуры» (Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН).

чения количества циклических структур, когда их сборка происходит на основе модифицированных блоков. Доля циклических объектов в случае конкатемеров **32В** и **40В** составляет 10%. Однако нами было отмечено, что данные о распределении конкатемерных структур по длине, определенные методом АСМ и с помощью гель-электрофореза, различаются. АСМ-данные свидетельствуют о высоком содержании коротких ассоциатов, что может быть объяснено частичной диссоциацией дцДНК в процессе пробоподготовки образцов для АСМ-исследований.

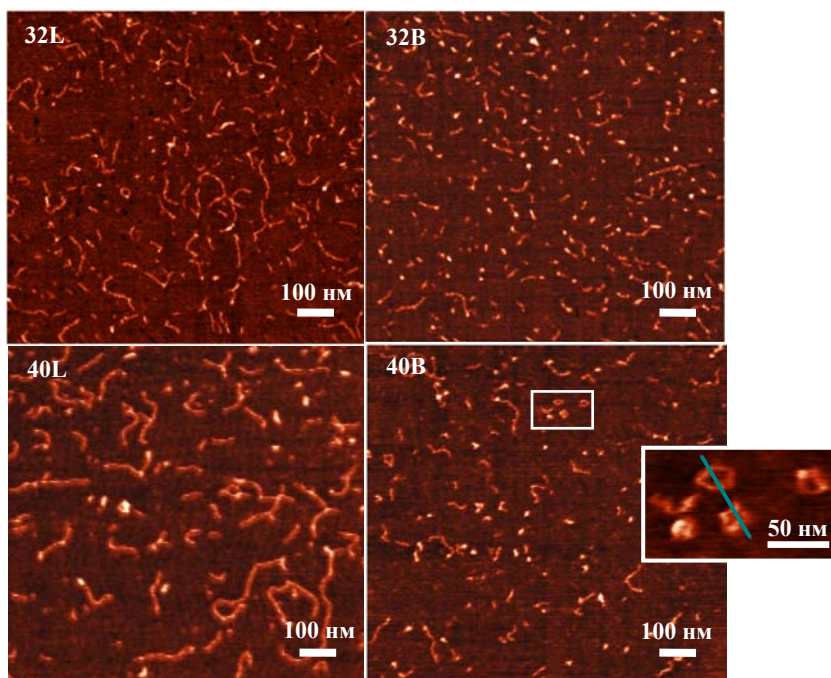


Рис. 5. Изображения атомно-силовой микроскопии поверхности слюды с нанесенными ДНК-конкатемерами.

Были подобраны условия нанесения образцов ДНК, оптимальные для анализа подобных объектов. Показано, что нанесение образцов ДНК-конкатемеров на поверхность слюды, предварительно обработанную раствором 10 мМ $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, приводит к повышению средней длины линейных структур в случае немодифицированных конкатемеров и увеличению доли циклических структур в случае модифицированных ДНК-конкатемеров (рис. 6). Согласно полученным АСМ-изображениям выход циклических ДНК-структур в случае модифицированных ДНК-блоков составляет 35% от общего числа детектируемых объектов. Длина окружности дцДНК-циклов для конкатемера **32В** равна 23-121 нм (~3-12 мономерных ДНК-дуплексов),

для **40В** – 30-200 нм (~2-14 мономерных ДНК-дуплексов). Полученные данные согласуются с АСМ-анализом образцов ДНК-конкатемеров, проведенными Д.В. Клиновым в ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова с использованием альтернативной подложки – пиролитического графита.

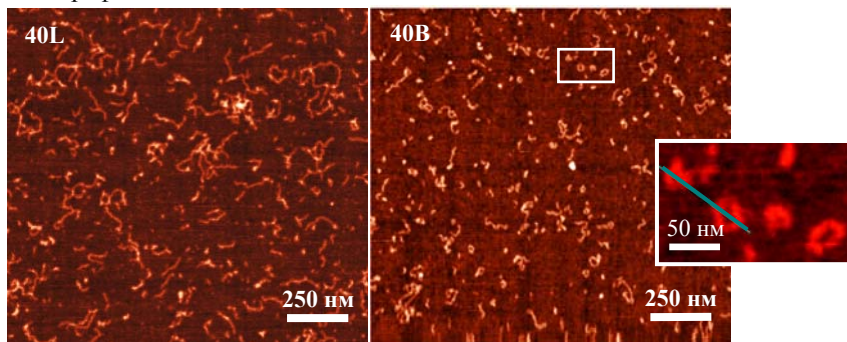


Рис. 6. Изображения атомно-силовой микроскопии предварительно обработанной 10 мМ Ni(NO₃)₂ поверхности слюды с нанесенными ДНК-конкатемерами.

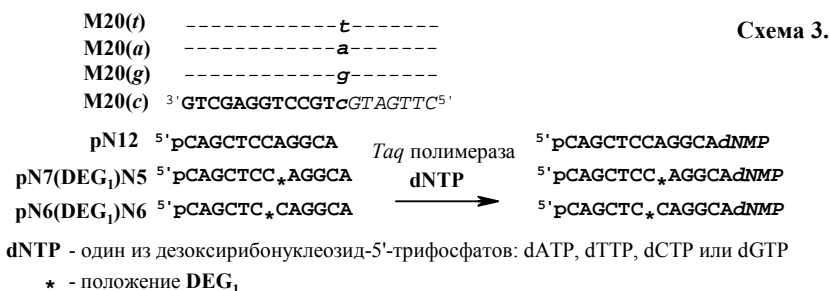
Таким образом, наличие нуклеотидной вставки в структуре мономерных ДНК-дуплексов изменяет характер их ассоциации. Получение ДНК-конкатемеров с использованием модифицированных ДНК-блоков приводит к самоограничению роста цепи формируемых структур, в том числе за счет образования циклических объектов. Полученные результаты не только подтверждают, что введение выпетленных нуклеотидных вставок приводит к изгибу спирали ДНК-дуплексов, но и говорят в пользу перспективности использования мостиковых олигонуклеотидов для построения структур нетипичной формы.

3. Мостиковые олигонуклеотиды в качестве компонентов субстратных комплексов в реакциях с участием ДНК-зависимых ферментов (*Taq* ДНК-полимеразы и T4 ДНК-лигазы)

Ранее было показано использование мостиковых олигонуклеотидов в качестве превращаемых компонентов субстратных комплексов в реакциях ДНК-зависимых ферментов [Пышный Д.В. и др. Патент РФ №2259402 от 27.08.2005]. В представленной работе проведен дополнительный анализ субстратных свойств комплексов мостиковых олигонуклеотидов в реакциях с участием *Taq* ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы фага T4.

Точность включения dNTP в состав нативных и мостиковых олигонуклеотидов при их ограниченном удлинении *Taq* ДНК-полимеразой оценивали по эффективности удлинения 12-звенных ³²P-меченных нативно-го pN12 и мостиковых pN7(DEG₁)N5, pN6(DEG₁)N6 олигонуклеотидов на

матрицах **M20(m)** в присутствии каждого из четырех дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов (dNTP), взятых по отдельности (схема 3).



Эффективное удлинение нативного зонда **pN12** наблюдали практически во всех случаях, вне зависимости от комплементарного соответствия между добавляемым и соответствующим матричным нуклеотидами (рис. 7). Эффективность встраивания некомплементарного нуклеотида в некоторых системах достигала 70-80%. В тех же условиях эффективное удлинение каждого из рассмотренных мостиковых зондов наблюдалось только при реализации полного соответствия между включаемым нуклеотидом и соответствующим звеном в ДНК-матрице (рис. 7).

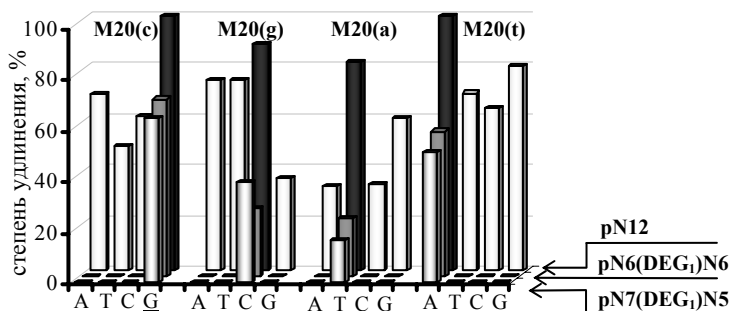


Рис. 7. Степень удлинения нативного **pN12** и модифицированных **pN6(DEG₁)N6** и **pN7(DEG₁)N5** олигонуклеотидов на матрицах **M20(m)** в присутствии отдельно взятых dNTP. Условия удлинения: 67 мМ трис-HCl (pH 8.85), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 1.5 мМ MgCl₂, 0.085 мг/мл БСА, 0.01% Tween-20, 5 мМ ДТТ, 1 ед. акт. *Taq* полимеразы, [³²pN12], [³²pN6(DEG₁)N6], [³²pN7(DEG₁)N5] = 1 мкМ, [M20(m)] = 10 мкМ, [dNTP] = 0.2 мМ, 50°C, 30 мин.

Для количественной оценки точности удлинения зондов на матрице **M20(t)** были рассчитаны соотношения скоростей встраивания нуклеотидов: комплементарного (dATP) и некомплементарного (dTTP) первому нуклеотиду матричной цепи. Рассчитанная подобным образом точность ограниченного удлинения мостиковых олигонуклеотидов в 1.6 раз выше относительно точности превращения нативного зонда.

Дискриминация однонуклеотидных несоответствий в составе субстратных комплексов, содержащих ненуклеотидную вставку в структуре Р-компонента, в реакциях лигирования Т4 ДНК-лигазой была исследована на модельных дуплексах, образованных 20-звенной матрицей **T20±m**, нативным **pN12** или модифицированным **pN8(DEG₁)N4** 12-звенными Р-компонентами и 8-звенным ³²P-меченным ОН-компонентом **pN8** (рис. 8а). Однонуклеотидные замены (мисматчи) в матрицах находились в участках, взаимодействующих с Р- или ОН-компонентами (матрицы **T20+m** или **T20-m** соответственно).

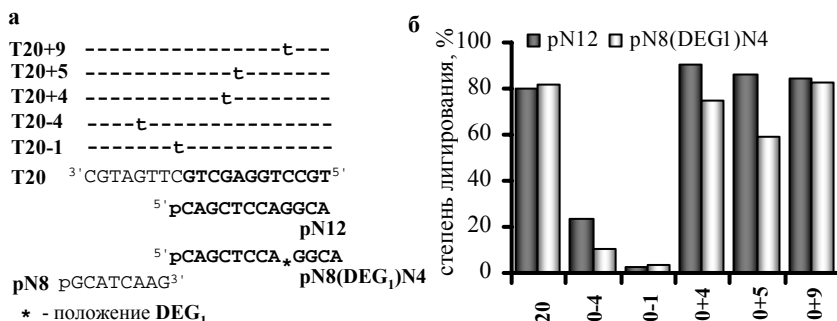


Рис. 8. Лигирование нативного **T20±m/pN12+pN8** и модифицированного **T20±m/pN8(DEG₁)N4+pN8** ДНК-комплексов Т4 ДНК-лигазой. Модельные тандемные комплексы (а) и степень лигирования (б). Условия лигирования: 20 мМ трис-НСl (рН 7.5), 0.1 М NaCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ ДТТ, 1 мМ АТФ, 40 ед. акт. Т4 ДНК-лигазы, [T20±m] = 10 мкМ, [³²pN8] = 5 мкМ, [pN12], [pN8(DEG₁)N4] = 10 мкМ, 25°C, 30 мин.

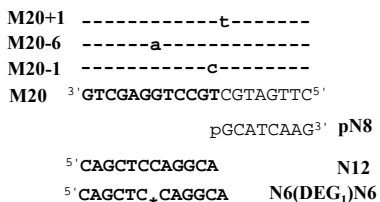
Было показано снижение степени лигирования комплексов **T20+m/pN8(DEG₁)N4+pN8** (m= 4, 5). При лигировании тандема нативных олигонуклеотидов эти точечные замены дискриминируются менее эффективно. Кроме того, детектировали повышение эффективности дискриминации одиночных мисматчей в дуплексной части ОН-составляющей (матрицы **T20-1**, **T20-4**) (рис. 8б).

Определение кинетических параметров реакций лигирования нативных и модифицированных ДНК-субстратов, проводимых с помощью Т4 ДНК-лигазы в стационарном и предстационарном режимах. Для установления влияния ненуклеотидной вставки на стадии ферментативной реакции были определены кинетические параметры превращения нативных и модифицированных ДНК-субстратов на примере реакции лигирования с помощью ДНК-лигазы фага Т4. Модельные дуплексы формировали с помощью 20-звенных матриц **M20**, 5'-³²P-меченного октамера **pN8** в качестве фосфат-содержащего компонента и нативного **N12** или мостикового **N6(DEG₁)N6** додекануклеотидов в роли ОН-составляющей субстратного

комплекса. Влияние мисматчей на протекание реакции лигирования исследовали на примере матриц, содержащих однонуклеотидные несоответствия в -6 положении связывания ОН-компонента (**M20-6**), а также в +1 позиции связывания Р-компонента (**M20+1**) (схема 4).

Изначально в стационарном режиме в рамках стандартной схемы Михаэлиса-Ментен были определены константа Михаэлиса K_m и каталитическая константа k_{cat} (табл. 2).

Схема 4.



* - положение DEG₁

Таблица. 2. Кинетические параметры лигирования совершенных и несовершенных комплексов нативных и мостиковых олигонуклеотидов Т4 ДНК-лигазой.

ДНК-субстрат	K_m , мкМ	k_{cat} , мин ⁻¹	k_{cat}/K_m , мкМ ⁻¹ мин ⁻¹	$\frac{(k_{cat}/K_m)_{КОМПЛЕМЕНТ}}{(k_{cat}/K_m)_{МИСМАТЧ}}$
M20/N12	0.65 ± 0.02	78.3 ± 11.7	120 ± 22	-
M20-6/N12	0.34 ± 0.03	18.1 ± 0.4	53 ± 6	2.3 ± 0.7
M20+1/N12	1.47 ± 0.14	1.7 ± 0.1	1.2 ± 0.2	100 ± 34
M20/N6(DEG₁)N6	0.15 ± 0.02	14.4 ± 0.1	96 ± 14	-
M20-6/N6(DEG₁)N6	6.15 ± 0.01	14.9 ± 0.1	2.40 ± 0.02	40 ± 6
M20+1/N6(DEG₁)N6	2.0 ± 0.3	2.8 ± 0.3	1.4 ± 0.4	69 ± 27

Условия лигирования: 66 мМ трис-НСl (рН 7.5), 1 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl₂, 0.1 М NaCl, 50 мкМ АТФ, 6 мкг/мл БСА, 0.02-0.1 ед. акт. Т4 ДНК-лигазы, [pN12], [pN6(DEG₁)N6] = 5 мкМ, [³²pN8] = 0.2-1 мкМ, [M20±m] = 5 мкМ, 25°C, 1-35 мин.

При сравнении параметра K_m видно, что мисматч в первом положении участка связывания Р-компонента приводит к повышению в 2-3 раза значения константы для нативного и модифицированного субстратов. Мисматч или нуклеотидная вставка в структуре ОН-компонента (комплексы **M20-6/N12+pN8** и **M20/N6(DEG₁)N6+pN8**), приводят к снижению величины K_m в 1.8 и 4 раза соответственно. Наличие одновременно на расстоянии 6 нуклеотидов от одноцепочечного разрыва мисматча и модифицированного остатка (**M20-6/N6(DEG₁)N6+pN8**) приводит к более значительному относительно других ДНК-субстратов изменению K_m , которая увеличивается в 9.5 раза. Мисматч вблизи одноцепочечного разрыва **M20-1/N12+pN8**, **M20-1/N6(DEG₁)N6+pN8** приводит к снижению параметра k_{cat} в 28-46 раз. Любое нарушение регулярности структуры в -6 положении ДНК-комплексов **M20-6/N12+pN8**, **M20/N6(DEG₁)N6+pN8**, также как и двойное возмущение **M20-6/N6(DEG₁)N6+pN8**, приводят к снижению k_{cat} в 4-5 раз.

Таким образом, мисматч или модифицированный остаток приводят к изменению кинетических параметров реакции лигирования подобных субстратов относительно совершенного.

С помощью выражения $(k_{cat}/K_m)_{\text{комплемент}}/(k_{cat}/K_m)_{\text{мисматч}}$ был рассчитан параметр селективности фермента по отношению к паре совершенный/несовершенный олигонуклеотидный комплекс (табл. 2). Показано, что использование мостиковых олигонуклеотидов в качестве превращаемых компонентов субстратных комплексов приводит к повышению селективности дискриминации удаленных мисматчей. В рассмотренной системе эффективности дискриминации мисматча, удаленного на 6 нуклеотидов от сайта лигирования, увеличивается в 17.4 ± 7.6 раза.

С использованием метода остановленной струи с регистрацией изменений интенсивности флуоресценции остатков триптофанов в молекуле фермента были определены кинетические параметры ферментативного превращения модифицированных субстратов под действием T4 ДНК-лигазы в предстационарном режиме. Характер полученных кинетических кривых, характеризующих конформационные перестройки ДНК-лигазы при взаимодействии с ДНК-субстратами, демонстрирует, что реакция протекает, по крайней мере, в четыре регистрируемые по изменению интенсивности флуоресценции стадии (рис. 9).

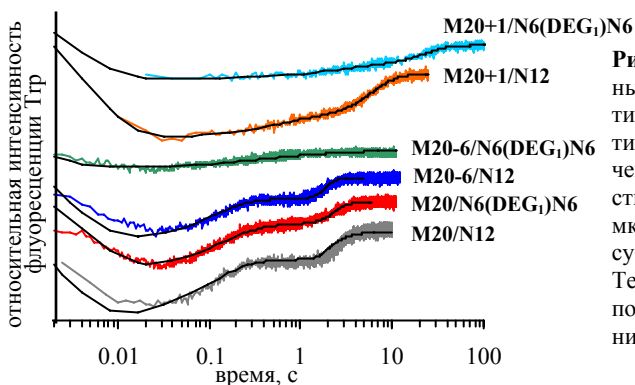


Рис. 9. Экспериментальные (цветные) и теоретические (черные) кинетические кривые, полученные при взаимодействии T4 ДНК-лигазы (1 мкМ) с разными ДНК-субстратами (2 мкМ). Теоретические кривые получены с использованием данных табл. 3.

Падение интенсивности флуоресценции на первом участке мы связываем с конформационными изменениями в молекуле фермента на стадии узнавания и специфического связывания с одноцепочечным разрывом в структуре ДНК-дуплекса. Второй стадией является аденилирование ДНК-субстрата. На третьей стадии происходит непосредственно образование фосфодиэфирной связи. Завершает процесс лигирования диссоциация фермента от ДНК-продукта, что сопровождается ростом интенсивности флуоресценции. Исходя из предполагаемой четырехстадийной схемы реакции, был произведен расчет констант элементарных стадий ферментативного лигирования (табл. 3).

Таблица 3. Константы скоростей элементарных стадий лигирования Т4 ДНК-лигазой нативных и модифицированных ДНК-субстратов.



константы	M20/ N12	M20/ N6(DEG ₁)N6	M20-6/ N12	M20-6/ N6(DEG ₁)N6	M20+1/ N12	M20+1/ N6(DEG ₁)N6
$k_1, M^{-1} \cdot c^{-1} \cdot 10^6$	225 ± 9	225 ± 2	114 ± 2	141 ± 3	270 ± 4	46.8 ± 1.3
k_{-1}, c^{-1}	1.1 ± 0.4	46.5 ± 0.3	15.2 ± 0.3	314 ± 30	24.6 ± 0.2	29.8 ± 0.3
k_2, c^{-1}	0.80 ± 0.01	2.03 ± 0.02	1.16 ± 0.03	1.37 ± 0.09	0.56 ± 0.05	0.21 ± 0.02
k_3, c^{-1}	6.20 ± 0.01	3.99 ± 0.03	3.93 ± 0.01	0.92 ± 0.03	2.02 ± 0.12	0.63 ± 0.03
k_4, c^{-1}	5.6 ± 0.2	2.04 ± 0.01	3.53 ± 0.03	5.64 ± 0.05	1.20 ± 0.08	3.12 ± 0.06
$k_{-4}, M^{-1} \cdot c^{-1} \cdot 10^6$	1.9 ± 0.2	4.04 ± 0.01	1.01 ± 0.01	0.44 ± 0.05	4.61 ± 0.02	1.94 ± 0.03
$K_{св}, M^{-1} \cdot 10^6$	203 ± 26	4.84 ± 0.07	7.5 ± 0.3	0.45 ± 0.05	10.9 ± 0.2	1.57 ± 0.06
$K_{дисс}, M \cdot 10^{-6}$	3.0 ± 0.04	0.50 ± 0.03	3.50 ± 0.06	12.8 ± 1.6	0.26 ± 0.02	1.6 ± 0.1

Условия лигирования: 66 мМ трис-НСl (рН 7.6), 1 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl₂, 50 мкМ АТФ, [Т4 ДНК-лигаза] = 1 мкМ, [ДНК-субстрат] = 0.5-4 мкМ, 20°C.

Введение любого из рассмотренных возмущений структуры ДНК-субстрата (мисматча и/или нуклеотидной вставки) приводит к изменению эффективности протекания каждой стадии ферментативного процесса. Согласно полученным результатам значительное влияние нерегулярности структуры ДНК-дуплекса сказывается на этапе образования комплекса ДНК-субстрат/Т4 ДНК-лигаза. Равновесная константа связывания $K_{св}$ для любого из подобных ДНК-субстратов уменьшается относительно нативного комплекса в 18-451 раз. При этом наибольшее уменьшение $K_{св}$ детектируется в случае ДНК-субстрата с двойным возмущением **M20-6/N6(DEG₁)N6+pN8** и **M20+1/N6(DEG₁)N6+pN8**. Уменьшение константы скорости стадии образования фосфодиэфирной связи k_3 также наблюдается для каждого из ДНК-субстратов с возмущениями, изменение данной величины происходит в 1.6-9.8 раз. Наиболее значительно падение скорости реакции третьей стадии также в случае ДНК-субстратов с двойным возмущением.

Полученные данные дополнили модель взаимодействия Т4 ДНК-лигазы с модифицированными совершенными и мисматч-содержащими ДНК-субстратами. Нуклеотидная вставка на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля оказывает влияние на все регистрируемые стадии реакции лигирования. Введение модифицированного остатка в структуру ДНК-субстрата с некомплементарной парой приводит к наиболее значительному снижению равновесной константы связывания с ДНК-субстратом и константы скорости реакции образования фосфодиэфирной связи.

4. Мостиговые олигонуклеотиды в качестве зондов при выявлении комплементарной последовательности в дцПЦР-фрагменте

Ранее был создан подход по выявлению определенных последовательностей НК на основе метода молекулярной гибридизации с использованием в качестве зондов набора иммобилизованных мостиговых олигонуклеотидов [Пышина И.А. 2006]. Одна из проблем использования мостиговых олигонуклеотидов в подобных практических приложениях связана с их пониженными гибридизационными свойствами, что может уменьшать чувствительность анализа, особенно в случае структурированного фрагмента ДНК. В представленной работе разработаны методики снижения вероятности структурирования анализируемой НК за счет ее ограниченной фрагментации. Подобраны простые и воспроизводимые протоколы фрагментации ДНК, основанные на формировании в ДНК апуриновых/апиримидиновых сайтов с их последующей деградацией при термической обработке (см. подписи к рис. 10). Исследования проводили, используя в качестве матрицы продукт ПЦР, соответствующий участку 5'-нетранслируемой области РНК вируса гепатита С (5'-НТО РНК ВГС) подтипа 2а.

Кислотно-зависимую фрагментацию осуществляли в кислых условиях с образованием сайтов апуринизации с дальнейшей деградацией ДНК при термической обработке. Из радиоавтографа видно (рис. 10), что в выбранных условиях ^{32}P -меченный ДНК-фрагмент достаточно быстро деградирует. При увеличении времени инкубации ДНК в кислых условиях наблюдается образование более коротких фрагментов.

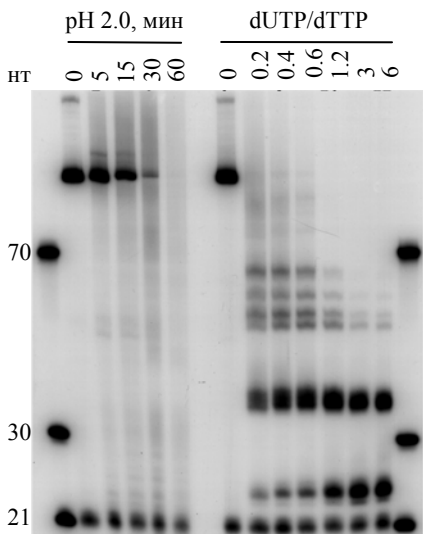


Рис. 10. Результаты электрофоретического анализа в 10% денатурирующем ПААГ продуктов фрагментации 5'- ^{32}P -меченной дцДНК после кислотного и ферментативного гидролиза.

Условия кислотного гидролиза: к ПЦР-образцу добавляли 1/5 объема 0.4 М HCl до pH 2, 37°C, 5-60 минут. Затем pH доводили до значения 7, добавляя 1/10 объема 1 М трис-ОН, 95°C, 10 мин.

Условия ферментативной фрагментации: 60 mM трис-HCl (pH 7.6), 1 mM ЭДТА, 2 ед. акт. UDG, 5 мкл ПЦР-смеси, полученной после реамплификации ДНК-фрагмента в присутствии dUTP, 37°C, 30 мин; 95°C, 15 мин.

dUTP/dTTP – соотношение соответствующих dNTP при проведении ПЦР.

Ферментативная фрагментация основана на использовании дезоксиуридин-содержащей ДНК и фермента урацил-ДНК-гликозилазы (UDG), обеспечивающего формирование апиримидиновых сайтов в структуре НК. Степень фрагментации ДНК после обработки UDG определяется содержанием в ней dUMP-остатков и контролируется изменением соотношения dTTP и dUTP при проведении ПЦР (рис. 10).

Эффективность превращения мостиковых олигонуклеотидов на фрагментированных ДНК-матрицах с помощью Taq ДНК-полимеразы. Полученные химической и ферментативной фрагментацией ДНК-образцы без дополнительной очистки использовали в качестве анализируемого материала (рис. 11). Гибридизационный анализ проводили путем ограниченного удлинения Taq полимеразой иммобилизованных зондов со встраиванием биотиновой метки в составе дезоксиуридин-трифосфата. Полимер, содержащий биотинилированный продукт, проявляли с помощью конъюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза и хромогенных субстратов.

При гибридизационном анализе в присутствии нефрагментированного ПЦР-продукта наблюдали слабое окрашивание полимера. Использование фрагментированных матриц приводило к увеличению интенсивности сигнала гибридизации. При UDG-зависимой фрагментации эффективность анализа возрастала в 8 раз, а при кислотной в 4 раза по сравнению с использованием необработанного фрагмента ДНК (рис. 11).

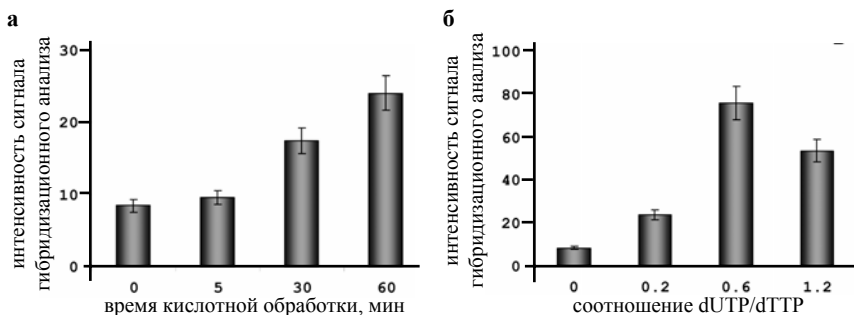


Рис. 11. Эффективность гибридизационного анализа в присутствии нативной анализируемой дцДНК или фрагментированной в результате кислотной (**а**) или ферментативной обработки (**б**). Условия гибридизации: 10 мМ трис-HCl (pH 8.9), 50 мМ KCl, 0.1% Tween-20, 1.8 мМ MgCl₂, 1.5 ед. акт. Taq полимеразы, 10 мкМ dUTP-Bio, 50 мкМ dATP, полимер с иммобилизованным зондом **P*2a** (0.5 мг), в качестве матрицы использовали разбавленную в 20 раз ПЦР-смесь, содержащую нативный или фрагментированный ДНК-ампликон (не менее 0.04 мкМ). 20 циклов: 80°C, 30 с; 40°C, 3 мин; 50°C, 1 мин. Зонд **P*2a** САТС*ТАТГС*СССГСС, * – **DEG**₁.

Была исследована специфичность сигнала гибридизации при параллельном выявлении фрагментированной ДНК с использованием набора зондов на основе мостиковых олигонуклеотидов, последовательности которых соответствует разным генотип-специфичным вариантам анализируемого участка 5'-НТО РНК ВГС (**P*1**, **P*2a**, **P*2b**, **P*3a**, **P*3b**) [Bukh J. et al. 1992]. Показано, что удлинение модифицированных зондов происходит высокоселективно: в присутствии матрицы, соответствующей генотипу 2a, происходит удлинение только комплементарного зонда **P*2a** (рис. 12)

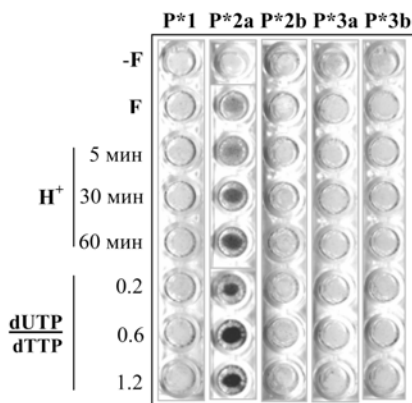


Рис. 12. Сканированное изображение полимеров с иммобилизованными зондами: **P*1**, **P*2a**, **P*2b**, **P*3a**, **P*3b** – после проведения гибридизационного анализа в присутствии нативной **F** и фрагментированной ДНК-пробы (генотип ВГС 2a). Условия гибридизации см. в подписи к рис. 11.

Зонды:

P*1 CGCTC*AATGC*CTGGAG

P*2a CACTC*TATGC*CCGGCC

P*2b CACTC*TATGT*CCGGTC

P*3a CGCTC*AATAC*CCAGAA

P*3b CGCTC*AATGC*CCGGAA

* – DEG_1 .

Таким образом, фрагментация ДНК повышает чувствительность гетерофазного гибридизационного анализа, и позволяет привлекать конструкции на основе мостиковых олигонуклеотидов, обладающих пониженными комплексообразующими свойствами, в качестве высокоселективных зондов, а следовательно, повышать точность анализа.

ВЫВОДЫ

1. Исследованы конформационные свойства ДНК-дуплексов, содержащих выпетливания.

- Показано, что выпетливания на основе нуклеотидных вставок (фосфодиэфиров диэтиленгликоля, 1,10-декандиола, 1,12-додекандиола, 3-гидрокси-2-гидроксиметилтетрагидрофурана), как и на основе нуклеотидных звеньев (аденилатов и тимидилатов), приводят к изгибу линейной структуры дуплекса. Величина изгиба в случае нуклеотидных выпетливаний варьирует в пределах 20° - 61° .

- Установлено, что величину изгиба и степень термической дестабилизации дцДНК можно задавать, варьируя размер и тип нуклеотидных вставок в составе цепей ДНК-дуплекса.

2. Продемонстрировано формирование ДНК-объектов нетривиальной формы с использованием ДНК-дуплексов с нуклеотидными вставками на основе фосфодиэфиров диэтиленгликоля и 1,10-декандиола.

- Выявлено, что наличие нуклеотидных вставок в составе мономерных ДНК-дуплексов, формирующих конкатемерные структуры, способствует самоограничению роста цепи ДНК-конкатемера и образованию циклических дцДНК.

- Подобраны условия для анализа ДНК-конкатемеров методом атомно-силовой микроскопии. На основе анализа АСМ-изображений установлено, что доля циклических ДНК-конкатемеров на основе модифицированных ДНК-дуплексов составляет 35%.

3. Исследованы субстратные свойства ДНК-комплексов, сформированных на основе мостиковых олигонуклеотидов, содержащих нуклеотидные вставки, в реакциях ДНК-зависимых ферментов (ДНК-лигазы фага T4 и *Taq* ДНК-полимеразы).

- Показано, что в условиях минисеквенирования точность удлинения *Taq* полимеразой мостикового олигомера, рассчитанная как соотношение скоростей включения соответствующего и некомплементарного нуклеотидов, в 1.6 раза выше относительно точности элонгации нативного зонда.

- Установлено, что нуклеотидная вставка в структуре Р-компонента лигируемого тандемного комплекса ДНК приводит к повышению эффективности дискриминации однонуклеотидных несоответствий в дуплексной части Р- и ОН-компонентов.

- Определены кинетические параметры ферментативного превращения под действием T4 ДНК-лигазы совершенных и несовершенных ДНК-субстратов, сформированных на основе мостиковых олигонуклеотидов, в стационарном и предстационарном режимах. Показано, что:

- введение нуклеотидной вставки в структуру совершенного ДНК-субстрата приводит к замедлению всех регистрируемых этапов ферментативного лигирования относительно нативного субстрата;

- дискриминация мисматчей при лигировании модифицированных несовершенных ДНК-субстратов происходит как на стадии формирования комплекса фермент/ДНК-субстрат, так и на стадии лигирования.

4. Предложены способы повышения эффективности гибридизационного анализа ДНК, проводимого с участием мостиковых олигонуклеотидов в качестве зондов.

- Разработаны способы снижения вероятности структурирования дцДНК путем ее ограниченной фрагментации с помощью кислотной (выдерживание при pH 2) и ферментативной (обработка урацил-ДНК-гликозилазой) деградации ДНК.

- Показано, что использование фрагментированной ДНК повышает интенсивность сигнала гибридизационного анализа в случае ферментативной фрагментации в 8 раз, а при кислотной в 4 раза по сравнению с использованием нативного фрагмента ДНК, использование мостиковых зондов обеспечивает селективное распознавание анализируемой фрагментированной ДНК.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. Виноградова О.А., Пышная И.А., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Пышный Д.В. Повышение эффективности гибридизационного анализа путём ограниченной фрагментации ДНК-пробы // Молекуляр. биология. – 2007. – Т. 41. – С. 163–172.
2. Виноградова О.А., Еремеева Е.В., Ломзов А.А., Пышная И.А., Пышный Д.В. Конструирование изогнутых дцДНК с заданными геометрическими характеристиками на основе комплексов мостиковых олигонуклеотидов // Биоорган. химия. – 2009. – Т. 35. – С. 384–396.
3. Пышная И.А., Виноградова О.А., Кабилов М.Р., Иванова Е.М., Пышный Д.В. Мостиковые олигонуклеотиды – молекулярные зонды для исследования фермент-субстратного взаимодействия и аллельспецифичного анализа ДНК // Биохимия. – 2009. – Т. 74. – С. 1238–1251.
4. Виноградова О.А., Пышный Д.В. Селективность ферментативного превращения олигонуклеотидных зондов при анализе нуклеотидных полиморфизмов ДНК // Acta Naturae. – 2010. – Т. 2. – С. 40–58.
5. Виноградова О.А., Щеглов Д.В., Латышев А.В., Пышный Д.В. Изучение структурной организации конкатемерных комплексов на основе нативных и модифицированных дцДНК-блоков // Вестник НГУ. Серия: биология, клиническая медицины. – 2011. – Т. 9. – С. 109–117.
6. Виноградова О.А., Пышная И.А., Пышный Д.В. Точность действия ДНК-полимеразы на субстратных комплексах ДНК с возмущенной структурой // Труды 3-го Международного форума «Актуальные проблемы современной науки». Ч. 29: Биология. Из-во СГТУ. – 2007. – С. 15–19.