

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ДЮДЕЕВА ЕВГЕНИЯ СЕРГЕЕВНА

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

**Исследование субстратных свойств частично или полностью
незаряженных фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов в
реакции обратной транскрипции**

Направление подготовки

04.06.01 Химические науки

Направленность

02.00.10 Биоорганическая химия

Аспирант _____ Е.С. Дюдеева

Научный руководитель _____ к.х.н. И. А. Пышная

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в лаборатории биомедицинской химии ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия.

Научный руководитель: **Пышная Инна Алексеевна**, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории биомедицинской химии Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. На сегодняшний день множество научно-исследовательских и прикладных задач задействуют олигонуклеотиды (ОН) – короткие синтетические нуклеиновые кислоты (НК). Современные подходы к синтезу позволяют вводить различные функциональные заместители в структуру ОН, за счёт чего возможно направленно влиять на физико-химические, структурные и субстратные свойства получаемых аналогов НК. Так, стабильность ОН по отношению к нуклеазам достигается при введении фосфотиоатных [1], 2'-ОМе и 2'-F нуклеотидных звеньев [2]. Для повышения сродства олигонуклеотида к комплементарной НК-мишени используют различные модификации углеводо-фосфатного остова (например, «замкнутые» нуклеотидные звенья [3]). Наличие пептидонуклеиновых остатков [4], морфолиновых нуклеотидов [5] или фосфорилгуанидиновых остатков [6, 7] в составе ОН приводит к эффективной гибридизации¹ с НК-мишенью в условиях растворов с низкой ионной силой. Введение различных ненуклеотидных вставок в состав ОН направленно изменяет их гибридизационные свойства [8]. Олигонуклеотиды, несущие остаток биотина [9], широко используют для получения поверхностей биосенсоров, биочипов и т.д. Следует заметить, что синтез производных ОН, содержащих сразу несколько различных модификаций, часто является нетривиальной задачей, поскольку условия введения некоторых модификаций могут быть несовместимы либо между собой, либо в целом с условиями автоматического фосфитамидного синтеза – наиболее распространённого метода химического синтеза нуклеотидных цепей. Ярким примером являются упомянутые выше пептидонуклеиновые кислоты (ПНК) – синтетический аналог НК, в которых отрицательно заряженный углеводо-фосфатный остов заменён на электронейтральный линейный полипептид на основе N-аминоэтил-глицина. Поскольку синтез полипептидной цепи задействует растворители и активаторы, принципиально отличающиеся от таковых в фосфитамидном методе синтеза ОН, получение химерных последовательностей – содержащих одновременно и ПНК звенья, и природные нуклеотидные звенья, – становится технически сложным.

Фосфорилгуанидиновые (ФГ) олигонуклеотиды, предложенные в 2014 году коллективом авторов [10], также являются незаряженным аналогом НК, однако их синтез возможно провести в рамках фосфитамидного метода синтеза ОН. Это позволяет комбинировать ФГ-модификацию с множеством других вариантов функционализации ОН, создавая различные химерные структуры с уникальными свойствами, подходящими для решения конкретной задачи. Получение таких функциональных производных ОН,

¹ Под термином «гибридизация» подразумевается образование правильного комплементарного комплекса между ОН и НК-мишенью

исследование особенностей их очистки, выделения, описание их физико-химических и субстратных свойств является важной задачей в контексте современного и эффективного производства молекулярно-биологического инструментария на основе нуклеиновых кислот – например, высокоспецифичных праймеров, адаптеров, зондов, используемых при разработке систем ПЦР-диагностики и для развития методов высокопроизводительного секвенирования нового поколения.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является получение химерных и функционализированных аналогов ON, содержащих фосфорилгуанидиновые остатки, а также исследование их субстратных свойств в реакции обратной транскрипции.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Синтез набора ON, содержащих различное число ФГ-групп; характеристика этих ON методами ОФХ, гель-электрофореза, масс-спектрометрии
2. Синтез фосфорилгуанидиновых ON, содержащих также ненуклеотидную вставку, несущую остаток биотина
3. Исследование субстратных свойств ФГ-содержащих ON в реакции обратной транскрипции с использованием ревертазы вируса лейкемии мышей (MMLV H⁻, СибЭнзим)

Научная новизна. Фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды, разработанные в ИХБФМ СО РАН в 2014 году, являются незаряженным аналогом НК. За всю историю развития методов синтеза и модификации олигонуклеотидов было предложено множество вариантов незаряженных аналогов [11, 12, 13], однако в большинстве случаев они не получали распространения в научно-исследовательских работах – либо из-за сложности синтетических схем, либо из-за неконкурентной эффективности связывания комплементарных мишеней. Наиболее известными и, как следствие, изученными незаряженными аналогами НК являются морфолиновые олигонуклеотиды и пептидонуклеиновые кислоты [14, 15], разработанные в конце XX века. Они обладают повышенным сродством к комплементарными НК, устойчивы к действию нуклеаз [16, 17, 18, 19]. В то же время, они не могут выступать в качестве субстрата для ферментов, процессирующих НК – полимераз, лигаз, киназ и др. – вероятно, из-за слишком разительного отличия остова от природного рибозо-фосфатного. В структуре же фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов рибозное звено не подвергалось каким-либо изменениям: модификация затрагивает только выбранные межнуклеотидные фосфатные группы. Благодаря этому ДНК комплексы, содержащие ФГ группы, практически не

отличаются по структуре от природной двойной спирали ДНК [20], и можно ожидать, что такие комплексы будут являться реакционно способным субстратом для НК процессирующих ферментов. Таким образом, фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды – это новая, гибкая платформа для создания множества функциональных инструментов, пригодных для исследования различных молекулярно-биологических процессов, в том числе, включающих ферментативные превращения НК.

Теоретическая и практическая значимость.

В данном исследовании был получен набор синтетических олигонуклеотидов, содержащих различное число ФГ-групп в заранее заданных позициях. Эти олигонуклеотиды были проанализированы стандартными методами ОФХ, гель-электрофореза и масс-спектрометрии. Были установлены особенности характеристики ФГ олигонуклеотидов, связанные с их электронейтральностью, а также предложен подход к анализу полностью незаряженных олигонуклеотидов методом гель-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия.

Был проведён синтез и анализ ФГ олигонуклеотидов, содержащих биотиновую нуклеотидную вставку на 3'-конце последовательности. Выявлена проблема деградации целевого функционализированного незаряженного олигонуклеотида.

Проведены эксперименты по ферментативному удлинению ФГ-содержащих праймеров в реакции обратной транскрипции (ОТ). Подобраны условия реакции для модельного короткого субстрата. Показано, что продукты удлинения образуются даже в случае полностью электронейтрального ФГ-праймера. Были проведены реакции ОТ с участием ФГ-праймеров и высокомолекулярной структурированной РНК-матрицы. Показано, что удлинение модифицированных и нативных праймеров происходит со сравнимой эффективностью.

Полученные сведения о ФГ олигонуклеотидах имеют теоретическую значимость как фундаментальное исследование относительного нового класса незаряженных аналогов ДНК. Полученные экспериментальные данные о физико-химических и субстратных свойствах ФГ олигонуклеотидов обладают практической значимостью в контексте поиска новых высокоэффективных зондов и праймеров на основе синтетических аналогов НК: способность ФГ производных образовывать комплексы с комплементарной НК-мишенью в среде с низкой ионной силой может позволить провести выхватывание НК, обладающей сложной внутренней структурой, – например, различных клеточных РНК. Способность же ФГ олигонуклеотидов выступать субстратом для НК-процессирующего фермента – обратной транскриптазы, – делает ФГ олигонуклеотиды потенциальной платформой для

создания, например, праймеров-адаптеров, необходимых в процессе ОТ-ПЦР – первом этапе создания кДНК библиотек в рамках РНК-секвенирования.

Апробация работы. Публикации. По результатам и проблематике настоящего исследования опубликовано 6 работ, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях рекомендованного перечня ВАК и 3 тезисов конференций:

1. Pavlova A.S., Dyudeeva E.S., Kupryushkin M.S., Amirkhanov N.V., Pyshnyi D.V., Pyshnaya I.A. // Electrophoresis. – 2018. – V.39. – N.4. – P. 670-674.
2. Dyudeeva E.S., Kupryushkin M.S., Lomzov A.A., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. – 2019. – V. 45. – P. 709-718.
3. Dyudeeva E.S., Pavlova A.S., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V., Pyshnaya I.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. – 2021. – V. 47. – P. 505-513.
4. Дюдеева Е.С., Павлова А.С. // Сборник тезисов IV международной конференции молодых учёных биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio-2017, С. 223-225.
5. Дюдеева Е.С., Павлова А.С. // Сборник тезисов Зимней молодёжной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии 2018 г., С. 109-110.
6. Дюдеева Е.С. // Сборник тезисов VII международной конференции молодых учёных вирусологов, биотехнологов, молекулярных биологов и биофизиков OpenBio-2020, С. 441-442.

Вклад автора. Основная часть работы была выполнена автором самостоятельно, в частности, синтез всех рассматриваемых нативных и ФГ олигодезоксирибонуклеотидов, их очистка и характеристика методами ОФХ, гель-электрофореза, проведение реакций обратной транскрипции и анализ полученных результатов.

Эксперименты по термической денатурации ДНК комплексов были выполнены к.ф.-м.н. Ломзовым А.А. (ЛБМХ ИХБФМ СО РАН). Регистрацию масс-спектров проводили сотрудники ЦКП ИХБФМ СО РАН. Синтез олигорибонуклеотидов, задействованных в качестве РНК-матриц в реакциях обратной транскрипции, проводили к.х.н. Мещанинова М.И. (ЛХРНК ИХБФМ СО РАН) и к.х.н. Довыденко И.С. (ЛСБ ИХБФМ СО РАН). Фрагмент 18S рибосомальной РНК человека любезно предоставлен д.х.н. Малыгиным А.А. (ЛСФР ИХБФМ СО РАН).

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, к.х.н. Пышной Инне Алексеевне, и заведующему ЛБМХ д.х.н. Пышному

Дмитрию Владимировичу за помощь на всех этапах выполнения работы, а также всем сотрудникам подразделений ЛБМХ и ЛСБ ИХБФМ СО РАН за всестороннюю поддержку.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. В работе были использованы реактивы «StainsAll», трис-(гидроксиметил)-аминометан (сокр. "Tris") (Aldrich Chem Co, США), ацетонитрил, триэтиламин (Fluka, Швейцария), агароза, аммиак, метиламин, мочеви́на, акриламид, перхлорат лития, ацетон, уксусная кислота, персульфат аммония (ДиаМ, Россия), N,N'-метиленбисакриламид, бромфеноловый синий, борная кислота, ЭДТА, N,N-диметилформамид, ксиленцианол, тетраметилэтилендиамин (Sigma, США), додецилсульфат натрия, бромистый этидий (Sigma, США). Реактивы и растворители квалификации х.ч. и ос.ч. отечественного и импортного производства. Абсолютизирование растворителей проводили стандартными методами с последующим выдерживанием их над молекулярными ситами или гидридом кальция.

Синтез олигонуклеотидов. Синтез нативных олигодезоксирибонуклеотидов и их ФГ-содержащих аналогов проводили в рамках фосфитамидного метода синтеза на автоматическом ДНК/РНК синтезаторе ASM-800 («Биоссет», Россия) с использованием коммерческих фосфитамидных мономеров и пористых полимерных носителей («GlenResearch», США; биотин-содержащий полимерный носитель – «PrimeTech», республика Беларусь). Для введения ФГ-групп использовали протокол, описанный в работе [10].

Удаление продуктов олигонуклеотидного синтеза с полимерного носителя и деблокирование щелочелабильных защитных групп проводили, выдерживая полимер в концентрированном водном растворе аммиака при 56 °С в течение 2 часов (если не указано иное). При наличии флуоресцентной метки в составе олигонуклеотида обработку полимерного носителя проводили 2 суток при комнатной температуре.

Удаление диметокситритильной защитной группы проводили, обрабатывая олигонуклеотиды 80% водным раствором уксусной кислоты при комнатной температуре в течение 10 минут. Кислоту удаляли путём двукратного переосаждения ON в 2% раствор перхлората лития в ацетоне с последующей промывкой осадка ацетоном.

Хроматография. Выделение целевого ON из реакционной смеси осуществляли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) на хроматографе «Agilent 1200 series» («Agilent», США), используя колонку (4.6 × 150 мм) с сорбентом «Eclipse XDB-C18» (5 мкм) («Agilent», США). Элюцию ON проводили в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0-90 %) в 0.02 М растворе триэтиламмоний ацетата за 30 минут, скорость потока 1.5 мл/мин.

Анализ индивидуальных ОН проводили методом ОФХ на хроматографе «Миличром А02» («Эконова», Россия) с использованием колонки (2 × 75 мм) с сорбентом «ProntoSIL-120-5-C18» («Эконова», Россия). Элюцию ОН проводили при 35 °С в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0-55 %) в 0.02 М водном растворе триэтиламмоний ацетата за 15 минут, скорость потока 150 мкл/мин. Выход хроматографических пиков детектировали по интенсивности оптического поглощения на длине волны 260 нм.

Гель-электрофорез. Электрофоретический анализ НК в денатурирующих условиях проводили в 15 % ПААГ (акриламид : N,N'-метиленабисакриламид (29:1), 8 М мочевины) в буфере TBE (89 мМ Tris-борат, рН 8.3, 2 мМ Na₂EDTA) при напряжении 50 В/см. Для нанесения олигонуклеотидных образцов в гель использовали раствор, содержащий 8 М мочевины, 0.025 % ксиленцианол и 0.025 % бромфеноловый синий. Результаты электрофоретического разделения визуализировали окрашиванием геля реактивом «StainsAll». При наличии флуорофора в составе олигонуклеотидов проводили сканирование флуоресценции при помощи системы гель-документирования VersaDoc MP 4000 Molecular Imager System («Bio-Rad», США).

Для анализа электронейтральных ФГ олигонуклеотидов использовали 15 % ПААГ, содержащий SDS (акриламид : N,N'-метиленабисакриламид (29:1), 5 М мочевины, 0.05% SDS) в буфере TBE-SDS (89 мМ Tris-борат, рН 8.3, 2 мМ Na₂EDTA, 0.05% SDS) при напряжении 50 В/см. Для нанесения олигонуклеотидных образцов в гель использовали раствор, содержащий 5 М мочевины, 0.025 % ксиленцианол и 0.025 % бромфеноловый синий, 0.05% SDS. Результаты электрофоретического разделения визуализировали, помещая гель на флуорофор-содержащую пластинку TLC Silica gel 60 F254 («Merck», США) и облучая УФ светом (265 нм). Олигонуклеотидный материал детектировали в виде «теней» на фоне флуоресцирующей подложки.

Для разделения относительно протяжённых НК – продуктов элонгации праймера в реакции ОТ – использовали 1.5 % агарозный гель в буфере TBE в горизонтальной ячейке («Bio-Rad», США). Для нанесения олигонуклеотидных образцов в гель использовали раствор, содержащий 10 мМ Tris-HCl (рН 7.6), 0.03% бромфеноловый синий, 0.03% ксиленцианол, 60 мМ ЭДТА, 60% глицерин (6X DNA Loading Dye, «ThermoScientific», Литва). Для оценки относительной электрофоретической подвижности образцов использовали двуцепочечный ДНК-маркер GeneRuler 100 bp DNA Ladder («ThermoScientific», Литва). Результаты электрофоретического разделения визуализировали, окрашивая гель бромистым этидием (0.0001 % водный раствор) и сканируя сигнал флуоресценции как описано выше.

Реакции обратной транскрипции. Ферментативное удлинение олигонуклеотидов в реакции ОТ проводили с использованием рекомбинантного фермента – обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей MMLV H- («СибЭнзим», Россия). В качестве буферного раствора рассматривали следующие составы:

- Стандартный («St»): 30 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 5 mM дитиотреит
- Низкосолевого («Low»): 30 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM дитиотреит

Соотношение компонентов реакционной смеси для ОТ приведено в таблице 1 (если не указано иное). Суммарный объём реакционной смеси составил 10 мкл.

Таблица 1 – состав реакционных смесей для обратной транскрипции в случае короткой синтетической РНК-матрицы (слева) и протяженного фрагмента рРНК (справа)

17-нт РНК-матрица		Фрагмент 18S рРНК	
Компонент	Количество	Компонент	Количество
ДНК	10 ⁻⁵ М	ДНК	10 ⁻⁶ М
РНК	10 ⁻⁵ М	РНК	10 ⁻⁶ М
MMLV H-	200 е.а.	MMLV H-	200 е.а.
dATP, dCTP, dGTP	300 мкМ	dATP, dCTP, dGTP, dTTP	300 мкМ
dUTP ^{FAM}	50 мкМ	dUTP ^{FAM}	-
Буферный р-р	1x St или Low	Буферный р-р	1x St или Low

Реакцию ОТ проводили при фиксированной температуре – 37 °С. Время реакции составило 1 час в случае 17-зв. РНК-матрицы и 3 часа в случае высокомолекулярной РНК-матрицы – фрагмента 18S рРНК человека. По окончании реакции фермент инактивировали термически, выдерживая реакционную смесь при температуре 95 °С в течение 5 минут, или гидролизовали РНК-матрицу, добавляя к реакционной смеси избыток концентрированного водного аммиака и выдерживая 2 часа при 56 °С. Аммиак удаляли, упаривая растворы в вакуумном концентраторе до исчезновения запаха.

Результаты и обсуждение

Основным предметом изучения в данной работе являются фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды - олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие модифицированные фосфатные группы, в которых по атому фосфора введен остаток N,N,N',N'-замещенного гуанидина (DMI на рис. 1). Модификация фосфодиэфирной группы происходит в ходе автоматического синтеза ДНК с использованием коммерческих мономеров и полимерных носителей. В рамках данной работы будут рассмотрены олигодезоксирибонуклеотиды, различные по длине (от 10 до 26 звеньев), наличию ФГ-групп (частично или полностью незаряженные), наличию нуклеотидных вставок (содержащие остатки биотина или флуоресцеина). Здесь и далее незаряженная ФГ-группа обозначена символом «*», а нативный фосфат – «O».

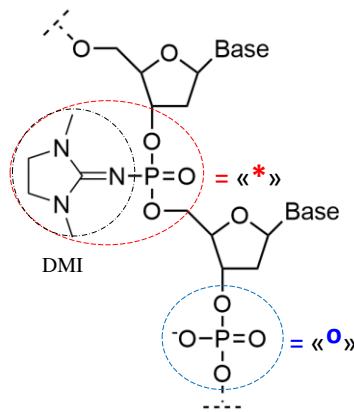


Рисунок 1 – структуры нативной межнуклеотидной фосфатной группы («O») и модифицированной фосфорилгуанидиновой группы («*»), содержащей остаток N,N,N',N'-замещенного гуанидина (DMI).

Работа условно разделена на три этапа:

- Исследование влияния ФГ-групп на физико-химические свойства ON – на примере ФГ-содержащих декануклеотидов.
- Исследование возможности синтеза функциональных конструкций на основе ФГ олигонуклеотидов – на примере 26-звенных биотинилированных ON.
- Исследование субстратных свойств ФГ олигонуклеотидов в реакции обратной транскрипции – на примере флуоресцентно меченых ON.

Исследование влияния ФГ-группы на физико-химические свойства олигодезоксирибонуклеотидов

На первом этапе работы будет рассмотрена серия декануклеотидов, идентичных в своей нуклеотидной последовательности, но различающихся по числу ФГ-групп и их взаимному расположению (см. таблицу 2).

Таблица 2 – последовательности исследуемых декануклеотидов, где n – число ФГ-групп, обозначенных «*»

Обозначение	Последовательность, 5'-3'	n
X	G ^o C ^o G ^o C ^o C ^o A ^o A ^o A ^o C ^o A	0
X _{1;4;7}	G [*] C ^o G ^o C [*] C ^o A ^o A [*] A ^o C ^o A	3
X _{1;5;9}	G [*] C ^o G ^o C ^o C [*] A ^o A ^o A ^o C [*] A	3
X _{2;4;6;8}	G ^o C [*] G ^o C [*] C ^o A [*] A ^o A [*] C ^o A	4
X _{1-2;5-6;9}	G [*] C [*] G ^o C ^o C [*] A [*] A ^o A ^o C [*] A	5
X _{1-2;5;8-9}	G [*] C [*] G ^o C ^o C [*] A ^o A ^o A [*] C [*] A	5
X _{1;3;5;7;9}	G [*] C ^o G [*] C ^o C [*] A ^o A [*] A ^o C [*] A	5
X _{1-3;7-9}	G [*] C [*] G [*] C ^o C ^o A ^o A [*] A [*] C [*] A	6
X _{2-3;5-6;8-9}	G ^o C [*] G [*] C ^o C [*] A [*] A ^o A [*] C [*] A	6
X ₁₋₉	G [*] C [*] G [*] C [*] C [*] A [*] A [*] A [*] C [*] A	9

В предложенных обозначениях "X" – общее название серии 10-звенных олигонуклеотидов, нижний индекс – порядковый номер (отсчитывая с 5'-конца) межнауклеотидных фосфатных групп, содержащих остаток ДМІ. Если декануклеотид содержит несколько ДМІ подряд, то через дефис указываются номера крайних модифицированных звеньев: таким образом, код X_{1-3;7-9} подразумевает под собой структуру декануклеотида, в которой остатки замещенного гуанидина введены с 1 по 3 и с 7 по 9 фосфодиэфирные группы, а фосфатные остатки с 4 по 8, соответственно, оставлены в нативном виде.

Все декануклеотиды были выделены, деблокированы и очищены унифицированным образом (см. раздел «материалы и методы»), после чего образцы индивидуальных ОН были исследованы методами аналитической ОФХ, денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле, масс-анализа.

На рисунке 2 приведены профили хроматограмм, полученных для некоторых ФГ декануклеотидов, содержащих от 3 до 9 ФГ-групп, а также профиль для нативного декануклеотида X того же нуклеотидного состава.

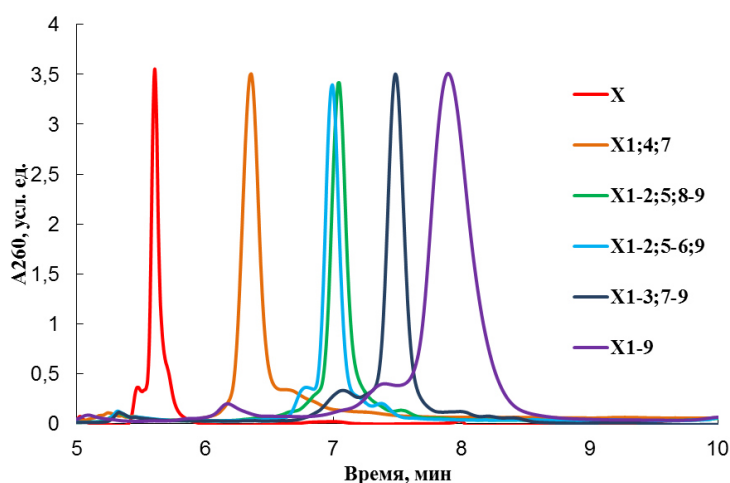


Рисунок 2 – профили аналитических ОФХ декануклеотидов X, X_{1;4;7}, X_{1-2;5;6;9}, X_{1-2;5;8-9}, X_{1-3;7-9}, X₁₋₉.

Видно, что наличие ФГ-групп увеличивает время удерживания олигонуклеотида на обращённой фазе C18, из чего следует, что ФГ олигонуклеотиды обладают большей гидрофобностью по сравнению с нативным аналогом. Также можно заметить, что с увеличением числа ФГ-групп наблюдается заметное уширение хроматографического пика. Поскольку в составе ФГ-группы атом фосфора является хиральным центром, каждый из них представлен в виде диастереомеров, гидрофобность которых может различаться. Это, вероятно, и приводит к уширению хроматографического пика в случае ФГ олигонуклеотидов, представленных в виде 2ⁿ стереомерных форм, где n – число ФГ групп. Следует отметить, что в случае декануклеотидов X_{1-2;5;6;9} и X_{1-2;5;8-9}, содержащих по 5 ФГ-групп каждый, время выхода пиков несколько различается – это свидетельствует о том, что, по-видимому, на общую гидрофобность модифицированного олигонуклеотида влияет не только число ФГ-групп, но и их расположение, то есть ближайшее нуклеотидное окружение.

Несмотря на тенденцию к повышению гидрофобных свойств, ФГ декануклеотиды в водном растворе (вплоть до миллимолярных концентраций) остаются растворимы и не показывают каких-либо признаков агрегации. Тем не менее, гидрофобные свойства модифицированных ОН, особенно более протяжённых, следует учитывать, поскольку гидрофобное взаимодействие – одно из самых распространённых типов взаимодействия биомолекул, и нельзя полностью исключать возможное образование тех или иных нековалентных комплексов ФГ олигонуклеотидов с другими биомолекулами.

Введение ФГ-групп уменьшает общий заряд ОН, и это не может не сказаться на их электрофоретической подвижности. Действительно, в результате разделения ФГ декануклеотидов в 15% денатурирующем ПААГ (рис. 3) наблюдается падение электрофоретической подвижности ОН при увеличении числа ФГ групп. Как следствие, полностью модифицированный декануклеотид X_{1-9} , являясь электронейтральным, практически теряет подвижность в стандартных условиях электрофореза (данные не приведены).

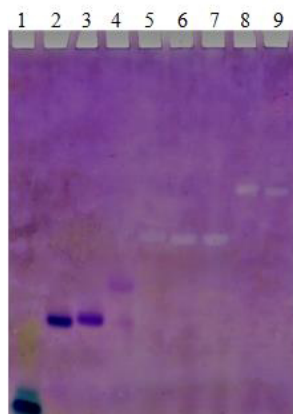


Рисунок 3 – сканированное изображение геля после электрофоретического разделения в денатурирующем 15% ПААГ олигонуклеотидов X (дор. 1), $X_{1,4;7}$ (дор. 2), $X_{1,5;9}$ (дор. 3), $X_{2,4;6;8}$ (дор. 4), $X_{1-2;5-6;9}$ (дор. 5), $X_{1-2;5;8-9}$ (дор. 6), $X_{1,3;5;7;9}$ (дор. 7), $X_{1-3;7-9}$ (дор. 8), $X_{2-3;5-6;8-9}$ (дор. 9). Для окрашивания геля был использован реактив «StainsAll».

Кроме того, видно, что в дорожках 5-9 олигонуклеотидный материал проявился в виде бесцветных пятен на фоне окрашенного геля. По-видимому, уменьшение общего заряда ОН приводит к нарушению взаимодействия «олигонуклеотид – краситель», вследствие чего окрашивания соответствующих участков геля не происходит. Таким образом, ФГ олигонуклеотиды требуют альтернативных способов проявления гелей – например, при помощи подсветки УФ-светом на фоне флуоресцирующей подложки, – а также использования каких-либо ионогенных агентов в том случае, если сам олигонуклеотид не имеет заряда.

Некоторые из исследуемых ФГ декануклеотидов были проанализированы также методом масс-спектрометрии с электроспреей ионизацией. Наличие ФГ-групп в составе ОН, как уже было отмечено ранее, уменьшает суммарный отрицательный заряд углеводо-фосфатного остова. Это накладывает некоторые ограничения на использование метода масс-анализа с электроспреей ионизацией в случае детекции полианионов, поскольку сокращается множество возможных значений отношения m/z , которые возможно обнаружить в масс-спектре. Действительно, масс-спектры декануклеотидов $X_{1,4;7}$ и $X_{2,4;6;8}$,

содержащих 3 и 4 ФГ-группы соответственно, содержат по три сигнала, отвечающих трём зарядовым формам целевого ОН (рис. 4А). Олигомер $X_{1-2;5;8-9}$, содержащий 5 ФГ-групп, теоретически не может обладать отрицательным зарядом большим, чем 4-, в связи с чем в его масс-спектре были обнаружены только 2 сигнала. Масс-спектр декануклеотида $X_{1-3;7-9}$ содержит единственный сигнал, соответствующий максимально возможному в данном случае отрицательному заряду 3-. Таким образом, увеличение числа ФГ-групп при фиксированной длине ОН ограничивает множество зарядовых форм, которые возможно обнаружить при детекции полианионов. В связи с этим полностью модифицированный олигомер X_{1-9} анализировали в режиме детекции поликатионов, полученных в результате обработки ОН муравьиной кислотой. Полученный масс-спектр содержал 3 сигнала, соответствующих трём положительно заряженным формам исходно электронейтрального декануклеотида X_{1-9} (рис. 4А). Значения масс ОН, вычисленные с помощью полученных спектров, близки к теоретическим (рис. 4Б).

* * *

В результате данного этапа работы были выявлены особенности «поведения» ФГ аналогов олигодезоксирибонуклеотидов в контексте стандартных методов характеристики ОН: ОФХ, гель-электрофореза и масс-спектрометрии. Установлено, что введение ФГ-групп в состав ОН приводит к увеличению времени его удерживания на обращённой фазе C18 – по-видимому, за счёт повышения гидрофобных свойств ОН. Также введение ФГ-групп позволяет снизить суммарный отрицательный заряд углеводо-фосфатного остова, что сказывается на электрофоретической подвижности ОН в денатурирующем полиакриламидном геле: с ростом числа ФГ-групп относительная подвижность ОН снижается. Кроме того, снижение отрицательного заряда остова накладывает ограничения на множество возможных значений отношения m/z , в связи с чем не всегда возможно провести масс-анализ ФГ ДНК в режиме детекции полианионов. Эти особенности ФГ производных важно учитывать при их синтезе, очистке и характеристике, а также при планировании экспериментов, задействующих олигонуклеотидный инструментарий.

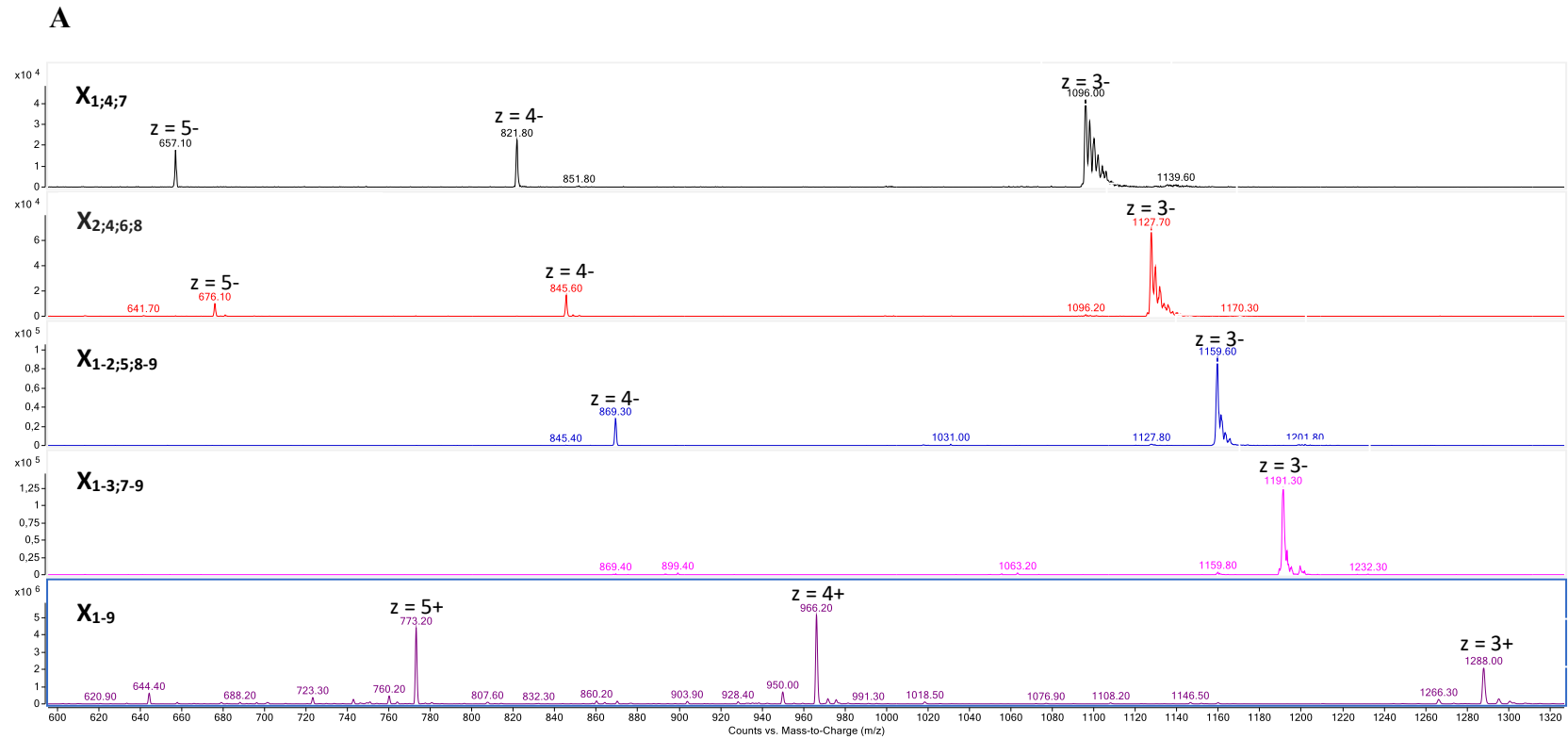


Рисунок 4 – А) масс-спектры, полученные для ФГ олимеров $X_{1;4;7}$, $X_{2;4;6;8}$, $X_{1-2;5;8-9}$, $X_{1-3;7-9}$ (в режиме детекции анионов) и X_{1-9} (в режиме детекции катионов); Б) полученные экспериментально значения масс олигомеров $X_{1;4;7}$, $X_{2;4;6;8}$, $X_{1-2;5;8-9}$, $X_{1-3;7-9}$ и X_{1-9}

Синтез ФГ олигонуклеотидов, содержащих остаток биотина

На следующем этапе работы были проведены синтез и выделение 26-звенных олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих на 3'-конце последовательности коммерчески доступную ненуклеотидную вставку, несущую остаток биотина (рисунок 5).

А

<i>N26⁰</i>	C ⁰ T ⁰ T ⁰ T ⁰ C ⁰ G ⁰ C ⁰ T ⁰ C ⁰ T ⁰ G ⁰ G ⁰ T ⁰ C ⁰ C ⁰ G ⁰ T ⁰ C ⁰ T ⁰ T ⁰ G ⁰ C ⁰ G ⁰ C ⁰ C ⁰ -[Bio]
<i>N26*</i>	C*T*T*T*C*G*C*T*C*T*G*G*T*C*C*G*T*C*T*T*G*C*G*C*C*-[Bio]
<i>N25*1⁰</i>	C*T*T*T*C*G*C*T*C*T*G*G*T*C*C*G*T*C*T*T*G*C*G*C*C ⁰ -[Bio]
<i>N20*6⁰</i>	C*T*T*T*C*G*C*T*C*T*G*G*T*C*C*G*T*C*T*T ⁰ G ⁰ C ⁰ G ⁰ C ⁰ C ⁰ -[Bio]

Б

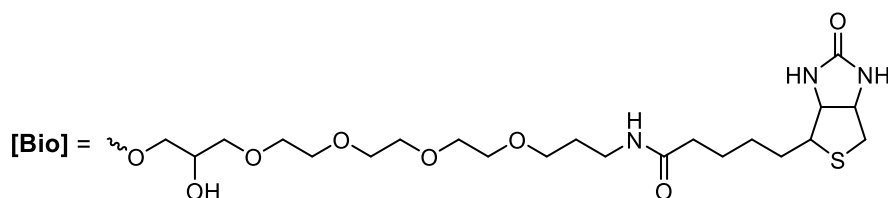


Рисунок 5 – А) структура биотинилированных 26-зв. нативного и ФГ олигонуклеотидов; Б) структура ненуклеотидной вставки **[Bio]** после деблокирования

Масс-анализ полученных продуктов синтеза показал, что ФГ аналог *N26** деградирует, теряя либо хотя бы один остаток DMI, либо биотиновое звено в целом (данные не приведены). Чтобы прояснить причину деградации целевого продукта, были синтезированы два биотиновых тритимидилата: T*T*T⁰-[Bio] и T⁰T⁰T*-[Bio]. Продукты их синтеза после деблокирования использованы для регистрации масс-спектров без выделения, в виде реакционных смесей.

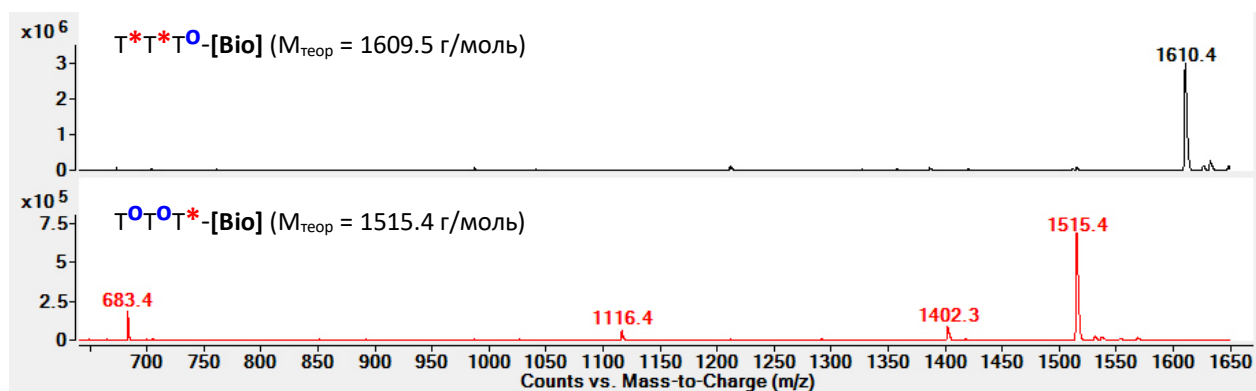


Рисунок 6 - результат масс-анализа биотиновых тритимидилатов T*T*T⁰-[Bio] (сверху) и T⁰T⁰T*-[Bio] (снизу)

Оба эти спектра (рис. 6) содержат пик с значением m/z , соответствующим целевому продукту синтеза, однако в случае $T^{\circ}T^{\circ}T^{\circ}$ -[Bio] обнаруживаются и несколько других пиков с меньшим значением m/z . Это свидетельствует о том, что, по-видимому, механизм деградации целевого продукта связан с непосредственной близостью ФГ-группы и ненуклеотидной вставки на 3'-конце последовательности. С учётом структуры линкеров, входящих в состав ненуклеотидной вставки (рис. 5Б), нами был предложен возможный механизм утери остатка DMI или ненуклеотидной вставки, основанный на внутримолекулярном «анхимерном» содействии гидроксигруппы в составе линкера биотинового звена (рис. 7).

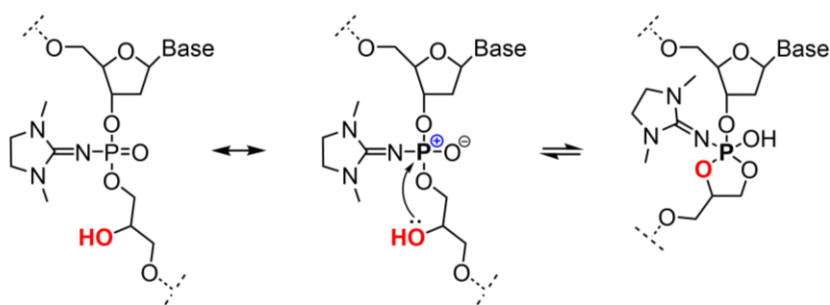


Рисунок 7 – схема внутримолекулярного образования циклического фосфорилгуанидина за счёт нуклеофильной атаки гидроксигруппы линкера по атому фосфора.

Согласно предложенной схеме, свободная гидроксигруппа линкера выступает в роли нуклеофила, атакуя атом фосфора в составе ФГ-группы. Образующийся циклический фосфорилгуанидин, по-видимому, будет гидролизироваться стохастически с разрывом одной из связей P–O или P–N, что и приведёт к утере либо остатка DMI, либо утере всей ненуклеотидной вставки в целом. Для подтверждения этой гипотезы, был выполнен повторный синтез 26-звенного биотинового ON, но 3'-концевой фосфат оставлен в нативном виде (рис. 5А, N25*1^o). Было проведено сравнение полученных продуктов синтеза с помощью SDS гель-электрофореза, адаптированного нами для анализа частично заряженного или полностью электронейтрального олигонуклеотидов (рис. 8).

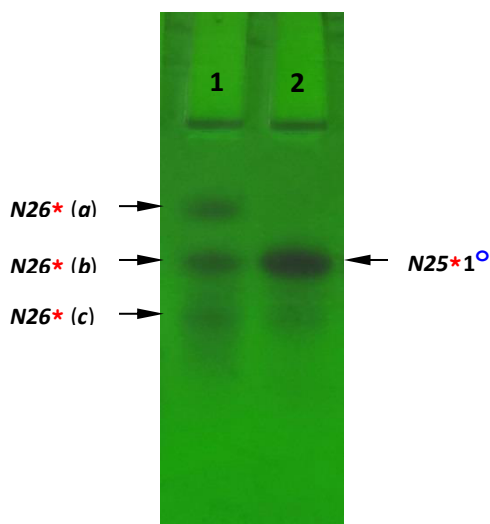


Рисунок 8 – результат электрофоретического анализа биотиновых производных ФГ-олигонуклеотидов в 15% денатурирующем ПААГ, содержащем SDS. Визуализацию ОН проводили, помещая гель на флуоресцирующую подложку и подсвечивая УФ-светом

В дорожке 1 (для полностью электронейтрального олигонуклеотида $N26^*$) наблюдаются три полосы. Первая, Ia , скорее всего соответствует утере биотинового звена из состава $N26^*$ с сохранением общей электронейтральности его нуклеотидного остова. Следующие две полосы, Ib и Ic , в таком случае соответствуют утере одной и двух ФГ-групп, с сохранением биотинового звена. Действительно, пятно Ib по подвижности полностью совпадает с основным продуктом синтеза $N25^*1^\circ$ (дор. 2), где одна ФГ-группа была заменена на нативный межнуклеотидный фосфат намеренно. Таким образом, полученные экспериментальные данные согласованно указывают на то, что именно непосредственная близость ФГ-группы и использованной ненуклеотидной вставки приводит к деградации целевого продукта синтеза. Для подтверждения механизма требуются дополнительные исследования, однако уже сейчас можно сделать заключение о том, что для получения полноразмерного ФГ производного, содержащего остаток биотина на 3'-конце, необходимо введение одной нативной фосфатной группы между биотин-содержащей ненуклеотидной вставкой и 3'-концевым нуклеозидом.

Исследование термической стабильности ФГ-содержащих ДНК дуплексов

Была исследована термическая стабильность комплементарных ДНК-ДНК комплексов, образованных с их участием ФГ олигонуклеотида, в растворах с различной ионной силой. Для этого ДНК-комплексы, образованные с участием 26-звенной НК-матрицы и одного из биотинилированных ОН ($N26^\circ$, $N20^*6^\circ$ или $N25^*1^\circ$), подвергали

термической денатурации в двух буферных растворах: 1М NaCl в 10 мМ какодилате натрия (обозн. CасNa) или же 10 мМ какодилат натрия. Первый раствор обладает высокой ионной силой и является «стандартным» для определения термической стабильности НК-дуплексов. Второй раствор обладает крайне низкой ионной силой, что должно приводить к дестабилизации нативных НК-комплексов. Кривые плавления получали с помощью оптической регистрации сигнала на приборе Cary 300 Biomelt ("Varian", Австралия). Полученные данные приведены на рисунке 9.

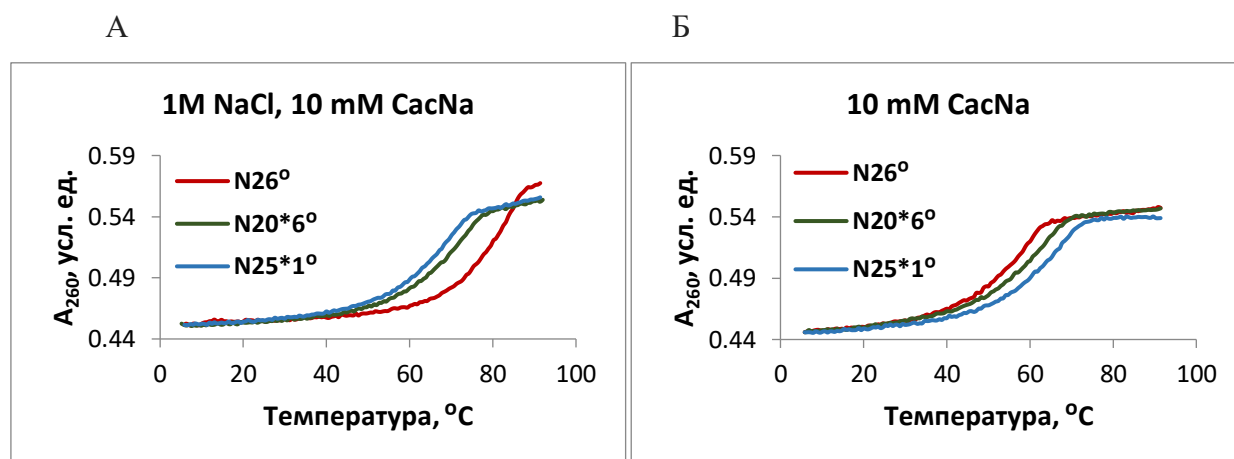


Рисунок 9 – результат термической денатурации ДНК комплексов с участием биотинилированных 26-звенных ON в буфере с высокой (А) и низкой (Б) ионной силой. Здесь «CасNa» - какодилат натрия.

Видно, что в буфере, содержащем 1М NaCl, нативный $N26^{\circ}$ образует комплекс с наибольшей термической стабильностью (рис. 9А). Появление ФГ модификаций в структуре комплекса приводит к постепенному понижению стабильности, что, вероятно, связано с нарушением сольватации дуплекса. В случае буферного раствора с низкой ионной силой (рис. 9Б) наблюдается обратное: нативный $N26^{\circ}$ образует комплекс с наименьшей температурой плавления по сравнению с ФГ олигонуклеотидами $N20*6^{\circ}$ и $N25*1^{\circ}$. Также важно отметить, что комплексы, образованные каждым из ФГ олигонуклеотидов, обладают схожей термической стабильностью в двух рассматриваемых буферных растворах (различие в температуре плавления $\sim 8^{\circ}\text{C}$ для $N20*6^{\circ}$ и $\sim 2^{\circ}\text{C}$ для $N25*1^{\circ}$ при смене буферного раствора), в то время как в случае нативного комплекса $N26^{\circ}$ понижение ионной силы привело к падению температуры плавления более чем на 20°C (рис. 9 А и Б, красная кривая). Индифферентность ФГ олигонуклеотидов к ионной силе среды является интересным и перспективным в контексте практического применения ФГ-олигонуклеотидов свойством. Возможность образования комплементарного комплекса в условиях низкой ионной силы (например, в б/д воде) может обеспечить захват заранее

заданной комплементарной НК-мишени или, наоборот, удаление из смеси мажорных незначимых НК.

* * *

На данном этапе работы были получены частично модифицированные ФГ олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие функциональный заместитель – остаток биотина – в составе терминальной нуклеотидной вставки. Выявлена проблема деградации биотинилированного ФГ производного в том случае, если ФГ-группа находится вблизи нуклеотидной вставки. Предположительно, ФГ-группа является более чувствительной к воздействию нуклеофильных агентов, и наличие свободной гидроксигруппы в составе нуклеотидной вставки может привести к гидролизу целевого продукта на этапе деблокирования ОН.

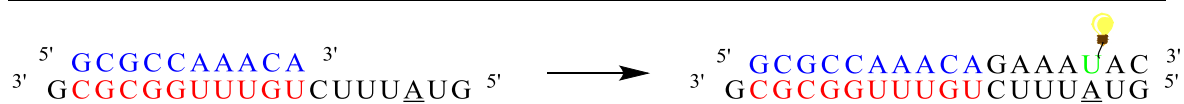
Исследована термическая стабильность комплементарных ДНК-ДНК комплексов, образованных с их участием ФГ олигонуклеотида, в растворах с различной ионной силой. Показано, что ФГ аналоги, в отличие от нативных ДНК, значительно менее восприимчивы к изменению ионной силы среды: температура плавления комплексов с участием ФГ ДНК практически не меняется при удалении солей из буферного раствора. Данное свойство незаряженных фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов, возможно, позволит более эффективно осуществлять выхватывание протяжённых высокоструктурированных НК-мишеней за счёт дестабилизации их внутренней структуры.

Исследование субстратных свойств ФГ олигонуклеотидов в реакции обратной транскрипции (ОТ)

Для сравнения возможности удлинения в различных солевых условиях нативного или ФГ-содержащего праймеров в реакции обратной транскрипции (ОТ) были сконструирован НК/НК субстрат, состоящий из 18-звенной РНК-матрицы rM и нативного N10^o или ФГ-содержащего N10* праймера (таблица 3). В последовательности РНК-матрицы rM присутствовал участок (выделен **красным** цветом), комплементарный последовательности праймера.

Таблица 3 – компоненты модельных субстратов для реакции ОТ

Код	Последовательность, 5'-3'
rM	GU <u>A</u> UUUCUGUUUGGCGCG
N10 ^o	G ^o C ^o G ^o C ^o C ^o A ^o A ^o A ^o C ^o A
N10*	G*C*G*C*C*A*A*A*C*A



Субстрат был сконструирован таким образом, что в нуклеотидной последовательности матрицы предусмотрена только одна позиция A, напротив которой возможно встраивание ферментом флуоресцентно-меченого трифосфата – dUTP^{FAM} – в состав праймера.

Первоначально был осуществлен поиск оптимальных условий реакции ОТ на примере нативного НК/НК субстрата N10^o/rM.

С использованием такого модельного субстрата была проведена серия экспериментов, в которых варьировали следующие параметры: (1) температура реакции, (2) количество фермента, (3) концентрация трифосфатов и (4) субстратного ДНК/РНК комплекса. Ниже на рисунке 10 приведены сканированные изображения одного и того же денатурирующего 15% полиакриламидного геля (ПААГ) после разделения реакционных смесей и окрашивания реактивом «StainsAll» (рис. 10А) или сканирования сигнала флуоресценции (рис. 10Б). Следует отметить, что в первом случае (рис. 10А) возможно контролировать материальный баланс каждой реакции, поскольку краситель «StainsAll» позволяет проявить все продукты удлинения, а также исходные матрицу и праймер. Во втором случае – по сканированному сигналу флуоресценции – будет выявлено только накопление тех продуктов реакции ОТ, длина которых не менее 15 нуклеотидов.

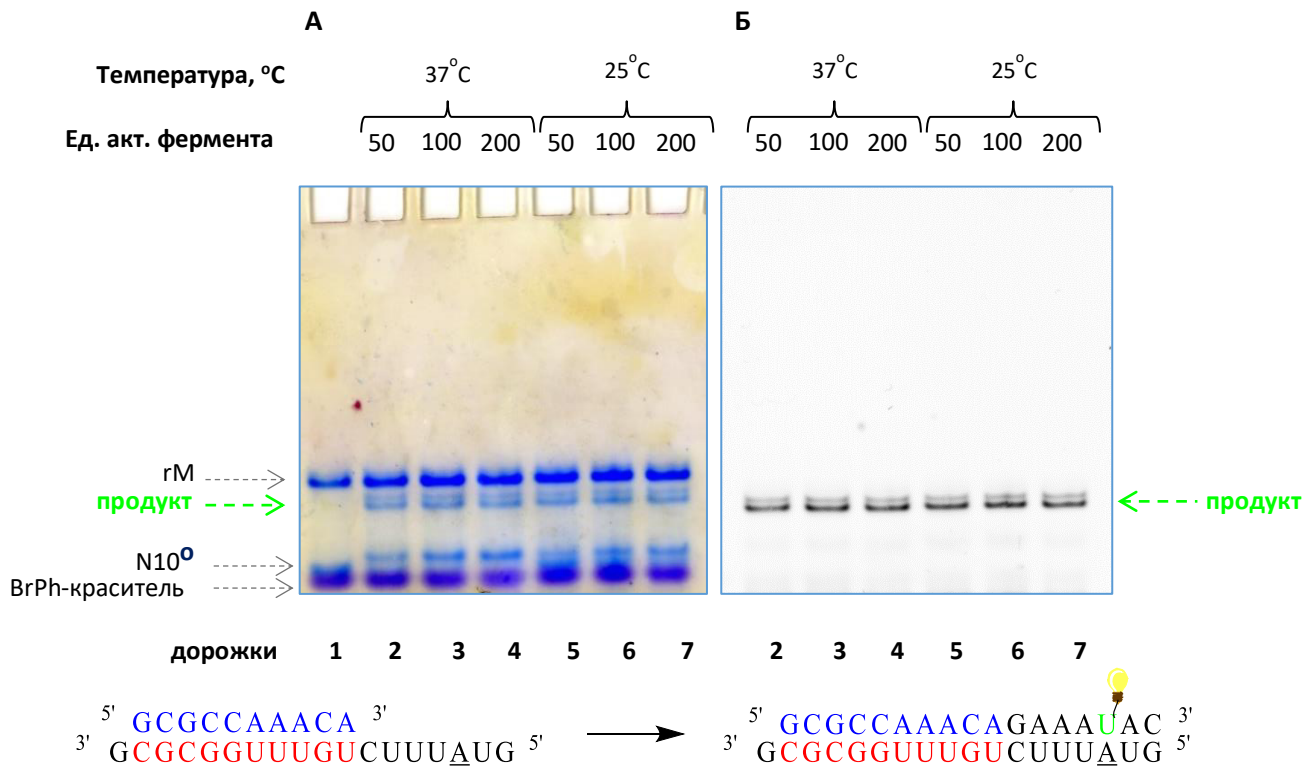


Рисунок 10 - результат электрофоретического разделения продуктов реакций ОТ при температурах 37 и 25 °С и разным количестве фермента (от 50 до 200 ед. акт) в денатурирующем 15% ПААГ после окрашивания реактивом «StainsAll» (А) и сканирования сигнала флуоресценции (Б). Концентрация субстрата (N10^o/гМ) 10⁻⁵ М, время реакции 1 час. Стрелками показаны положения некоторых компонентов реакционной смеси, продукта реакции ОТ и красителя бромфеноловый синий (BrPh).

Видно, что накопление флуоресцентно меченого продукта удлинения праймера N10^o происходит во всех рассматриваемых условиях, эффективность реакции близка (рис. 10Б). В то же время материальный баланс нуклеотидных компонентов (рис. 10А) свидетельствует о том, что степень конверсии ДНК-праймера в полноразмерный продукт неполная, т.к. происходит накопление относительно коротких (абортивных) продуктов удлинения, которые не были обнаружены нами на сканированном изображении сигнала флуоресценции (рис. 10Б). В связи с этим следующим шагом была варьирована концентрация субстрата и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Для удобства из состава буфера для нанесения образцов в гель был исключен краситель бромфеноловый синий (BrPh-краситель на рис. 10), поскольку его скорость миграции в геле почти совпадала с таковой для исходного праймера N10^o.

Избыток меченного трифосфата $dUTP^{FAM}$ в реакционной смеси при постоянной концентрации немеченых трифосфатов не приводил к увеличению выхода полноразмерного продукта (рис. 11Б, дор. 2 и 3). В обратной ситуации – при увеличении концентрации немеченых dNTP при постоянной концентрации $dUTP^{FAM}$ (рис. 11Б, дор. 3, 4 и 5) – наблюдалось таковое. Сравнивая дорожки 2 и 6, отличающиеся концентрацией субстрата, мы остановились на концентрации 10^{-5} М. Видно, что максимальный выход полноразмерного продукта реакции (согласно сигналу флуоресценции на рис. 11Б) при минимальном количестве abortивных продуктов элонгации наблюдается в дорожке 5.

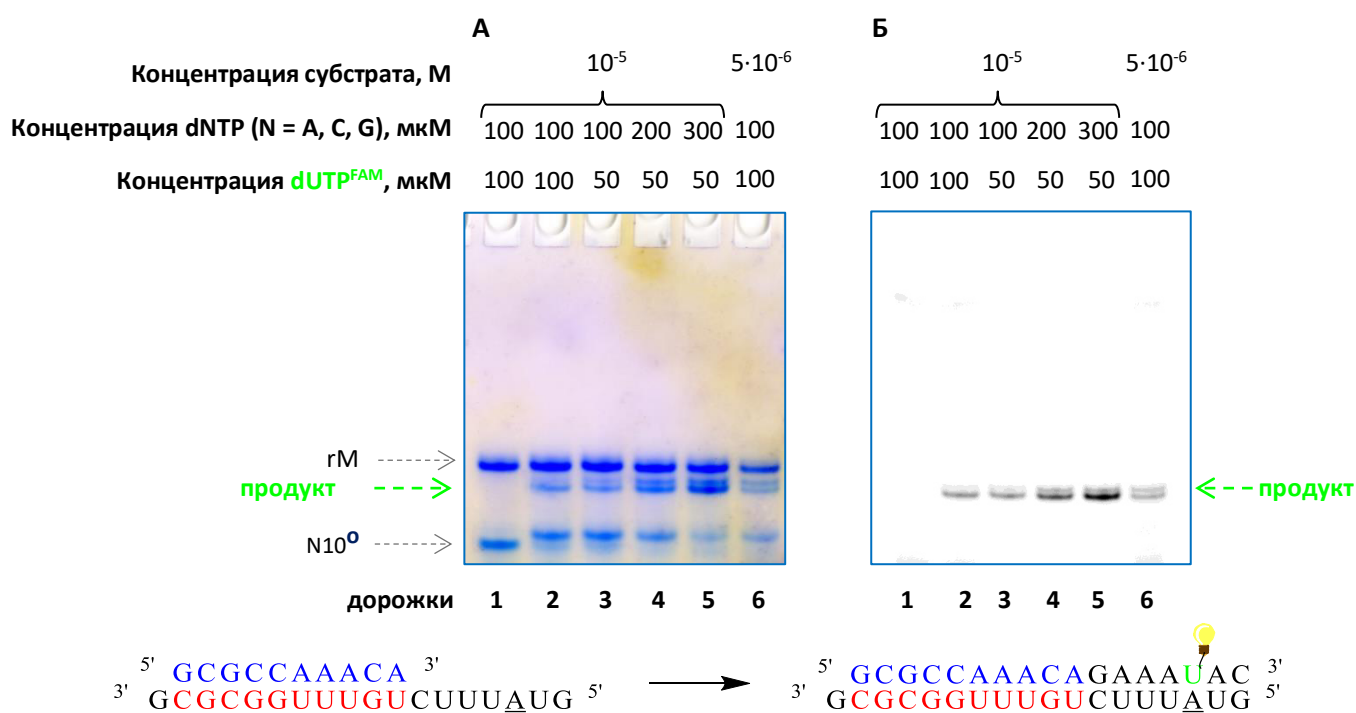


Рисунок 11 - результат электрофоретического разделения продуктов реакций ОТ при 37 °С и 200 ед. акт. фермента с различной концентрацией трифосфатов и ДНК/РНК субстрата (указано на рисунке) в денатурирующем 15% ПААГ после окрашивания реактивом «StainsAll» (А) и сканирования сигнала флуоресценции (Б).

В результате проведенных поисковых экспериментов для проведения реакции ОТ была выбрана следующая схема постановки эксперимента: ДНК-праймер и РНК-матрицу смешивали эквимольно в концентрации 10^{-5} М, к полученному субстрату добавляли реакционную смесь, содержащую 200 ед. акт. ревертазы MMLV H- (СибЭнзим), 300 мкМ dATP, dGTP, dCTP и 50 мкМ $dUTP^{FAM}$, а также буферный раствор следующего состава: 30 мМ Tris-HCl, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 5 мМ DTT. Реакцию проводили в течение 1 часа при температуре 37 °С, затем инактивировали фермент термически, выдерживая реакционную смесь 5 минут при температуре 95 °С.

На данном этапе был использован «стандартный» (рекомендованный производителем фермента) для реакции ОТ буферный раствор, содержащий хлориды калия и магния. Поскольку ФГ олигонуклеотиды, как было показано ранее, обладают способностью образовывать комплементарный комплекс в растворах с низкой ионной силой, представляется интересным сравнить протекание реакции ОТ для нативного и ФГ праймеров в буферных растворах с различающейся ионной силой. Для этого из состава «стандартного» буферного раствора была полностью удалена одновалентная соль, а концентрация хлорида магния понижена с 5 мМ до 2 мМ (см. раздел «Материалы и методы», буферный раствор «Low»). Результаты электрофоретического анализа продуктов реакции ОТ для праймеров N10^o и N10* в буферных растворах с высокой («St») и пониженной («L») ионной силой приведены на рисунке 12.

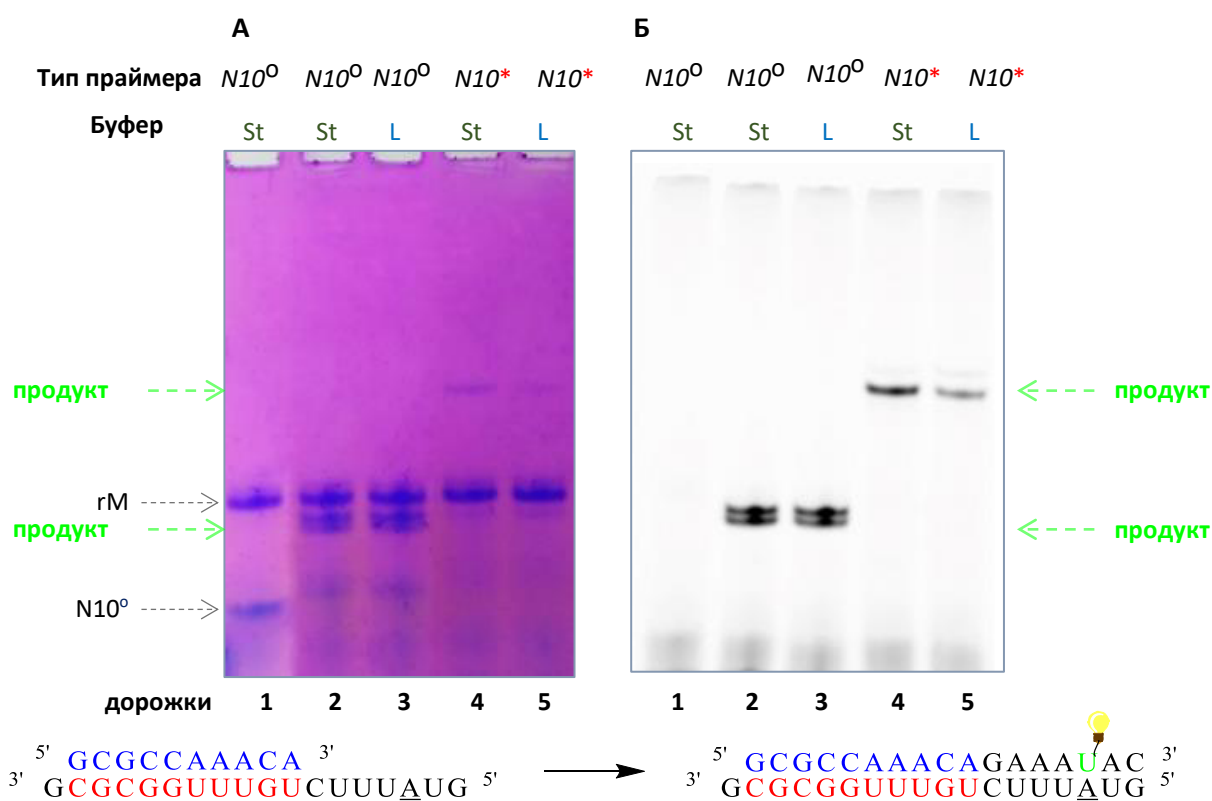


Рисунок 12 – результат электрофоретического разделения продуктов реакции ОТ, полученных в результате удлинения нативного N10^o и фосфорилгуанидинового N10* праймеров при различной ионной силе буферного раствора

Видно, что флуоресцирующий продукт элонгации накапливается во всех случаях. Эффективность реакции ОТ в случае полностью электронейтрального ФГ праймера N10* лишь несколько ниже таковой для нативного N10^o (рис. 12Б, дор. 2, 4). Проанализировать

степень конверсии исходного праймера N10* в данном случае не представляется возможным, поскольку данный ОН, являясь полностью незаряженным, не способен мигрировать в геле и окрашиваться реактивом «StainsAll». Тем не менее, наличие флуоресцирующего продукта в дорожках 4, 5 уже позволяет утверждать, что ФГ олигонуклеотиды, даже являясь полностью электронейтральными, способны удлиняться РНК-зависимой ДНК-полимеразой MMLV Н-. Для более полного анализа эффективности элонгации ФГ праймеров в следующих экспериментах будут использованы модифицированные ОН, содержащие на 5'-конце терминальную нуклеотидную вставку, несущую остаток флуоресцеина (таблица 4).

Таблица 4 – флуоресцеин-содержащие праймеры для реакции ОТ с участием высокомолекулярной РНК-матрицы

Код	Последовательность, 5'-3'
J1.o	[Flu] ^o A ^o T ^o C ^o G ^o T ^o T ^o T ^o A ^o T ^o G ^o G ^o T ^o C ^o G ^o G ^o A ^o A ^o C ^o T ^o A
J1.6	[Flu] ^o A* ^o T* ^o C* ^o G* ^o T* ^o T* ^o T* ^o A* ^o T* ^o G* ^o G* ^o T* ^o C* ^o G ^o G ^o A ^o A ^o C ^o T ^o A
J1.3	[Flu] ^o A* ^o T* ^o C* ^o G* ^o T* ^o T* ^o T* ^o A* ^o T* ^o G* ^o G* ^o T* ^o C* ^o G* ^o G* ^o A* ^o A ^o C ^o T ^o A
J1.x	[Flu] ^o A* ^o T* ^o C* ^o G* ^o T* ^o T* ^o T* ^o A* ^o T* ^o G* ^o G* ^o T* ^o C* ^o G* ^o G* ^o A* ^o A* ^o C* ^o T* ^o A
J2.o	[Flu] ^o C ^o C ^o C ^o T ^o C ^o T ^o T ^o A ^o A ^o T ^o C ^o A ^o T ^o G ^o G ^o C ^o C ^o T ^o C ^o A ^o G ^o T
J2.6	[Flu] ^o C* ^o C* ^o C* ^o T* ^o C* ^o T* ^o T* ^o A* ^o A* ^o T* ^o C* ^o A* ^o T* ^o G* ^o G* ^o C* ^o C* ^o T* ^o C* ^o A* ^o G* ^o T
J2.3	[Flu] ^o C* ^o C* ^o C* ^o T* ^o C* ^o T* ^o T* ^o A* ^o A* ^o T* ^o C* ^o A* ^o T* ^o G* ^o G* ^o C* ^o C* ^o T* ^o C* ^o A* ^o G* ^o T
J2.x	[Flu] ^o C* ^o C* ^o C* ^o T* ^o C* ^o T* ^o T* ^o A* ^o A* ^o T* ^o C* ^o A* ^o T* ^o G* ^o G* ^o C* ^o C* ^o T* ^o C* ^o A* ^o G* ^o T

Нуклеотидные последовательности данных праймеров комплементарны участкам фрагмента 18S рРНК человека. Предполагаемая вторичная структура РНК-матрицы – фрагмента 18S рРНК человека протяженностью 558 нукл., – построенная при помощи онлайн-сервиса «RNAfold web server», представлена ниже (рис. 13).

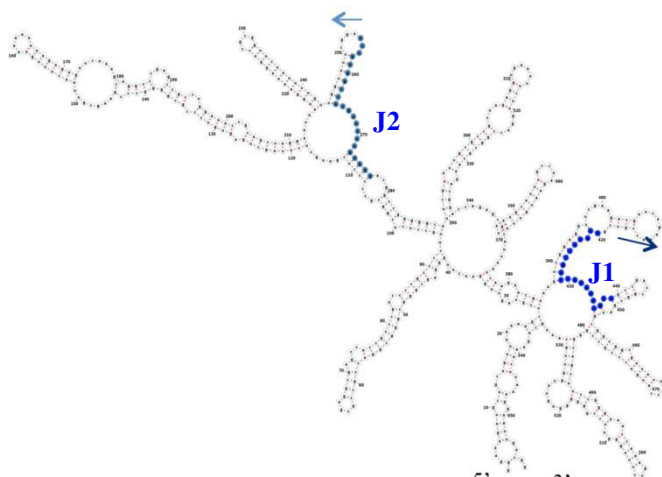


Рисунок 13 – возможная вторичная структура фрагмента 18S рРНК человека. J1 и J2 – сайты, выбранные для гибридизации праймеров. Стрелочкой указано направление элонгации праймеров.

Первый из двух выбранных участков для гибридизации – J1 на рисунке 13 – расположен ближе к 3'-концевой области фрагмента рРНК. В процессе обратной транскрипции с данного сайта возможно получить продукты, длина которых не превосходит 439 нуклеотидов. Второй сайт – J2 – расположен ближе к середине используемого фрагмента рРНК, теоретическая длина продуктов элонгации праймера для этого сайта – 276 нуклеотидов.

Выбор «модифицированности» углеводо-фосфатного остова ФГ-праймеров базировался на литературных данных о структуре активного центра фермента и взаимодействиях, стабилизирующих фермент-субстратный комплекс. Так, например, согласно [21], в основном с аминокислотами в активном центре взаимодействуют первые шесть звеньев ДНК-цепи (отсчитывая от её 3'-конца). В частности, образуются электростатические взаимодействия между положительно заряженными остатками аминокислот (аргинина) и углеводо-фосфатным остовом ДНК. Основываясь на этих данных, для дальнейшей работы были получены нативные праймеры (J1.0 и J2.0), их незаряженные ФГ-аналоги (J1.x и J2.x) и химерные блочные конструкции со «свободными» от модификации 6 или 3 звеньями со стороны 3'-конца последовательности (J1.6 и J2.6, J1.3 и J2.3 соответственно). Все олигонуклеотиды содержали флуоресцентную метку на 5'-конце (таблица 4).

Поскольку в данной системе РНК-матрица обладает выраженной вторичной структурой, необходимо было оптимизировать схему проведения реакции ОТ, а именно добавить стадию «отжига»: акта кратковременного нагрева смеси ДНК и РНК в воде (95 °С, 5 минут) с последующим плавным охлаждением (37 °С, 30 минут). Кроме этого была понижена концентрация РНК и ДНК в реакционной смеси до 10^{-6} М, так как в случае флуоресцентно меченых праймеров большие концентрации привели бы к избыточному сигналу флуоресценции при сканировании.

Таким образом, в случае высокомолекулярной матрицы использовали следующую схему постановки реакции ОТ:

- Смесь ДНК-праймера и РНК-матрицы (10^{-6} М) в воде выдерживали 5 минут при 95 °С, затем охлаждали при 37 °С в течение полчаса.
- Добавляли реакционную смесь, содержащую буферный раствор («St» или «L», как и в предыдущем эксперименте), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (300 мкМ

каждого), фермент (200 е.а. MMLV H-, SibEnzyme). Выдерживали 3 часа при температуре 37 °С.

- Для остановки реакции добавляли избыток концентрированного аммиака, выдерживали 2 часа при 56 °С, чтобы гидролизовать РНК-матрицу. Аммиак удаляли, упаривая раствор до исчезновения резкого запаха.

Затем анализировали продукты реакции методом гель-электрофореза в 1.5% агарозном геле, детектируя продукты элонгации праймера по сигналу флуоресценции и с помощью окрашивания бромистым этидием.

Результат электрофоретического разделения продуктов реакции ОТ в буферных растворах со «стандартной» и пониженной ионной силой для праймеров серии J1 приведен на рисунке 14.

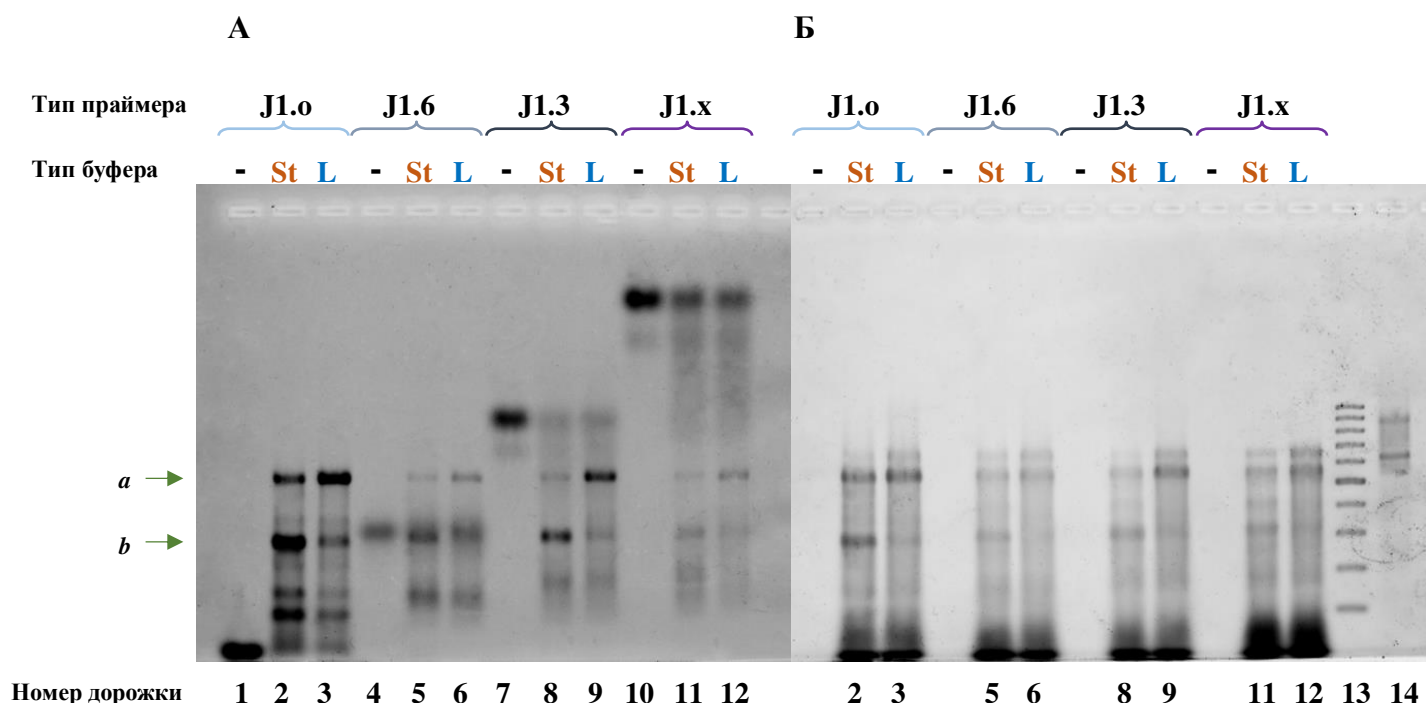


Рисунок 14 – результат сканирования сигнала флуоресценции FAM (А) и бромистого этидия (Б) после разделения в 1.5% агарозном геле:

- индивидуальных ДНК-праймеров J1.0 (дор. 1), J1.6 (дор. 4), J1.3 (дор. 7), J1.x (дор. 10), которые видны только при сканировании флуоресценции FAM;
- продуктов реакции ОТ праймеров J1.0 (дор. 2), J1.6 (дор. 5), J1.3 (дор. 8), J1.x (дор. 11) в «стандартных» буферных условиях («St»);
- продуктов реакции ОТ праймеров J1.0 (дор. 3), J1.6 (дор. 6), J1.3 (дор. 9), J1.x (дор. 12) в буфере с пониженной ионной силой («L»);
- ДНК-маркера 100-1000 п.о. (дор. 13), который виден только при сканировании флуоресценции бромистого этидия;
- РНК-матрицы (дор. 14), которая видна только при сканировании флуоресценции бромистого этидия.

Видно, что введение ФГ-групп в состав праймера приводит к ожидаемому понижению его электрофоретической подвижности за счет уменьшения суммарного заряда

молекулы (рис. 14А, дор. 1, 4, 7, 10). Ферментативная элонгация праймера наблюдается во всех случаях, даже для J1.x, обладающего полностью электронейтральным углеводо-фосфатным остовом (рис. 14А, дор. 11, 12).

На примере нативного праймера J1.o рассмотрим общий вид реакционной смеси, полученной в результате ОТ (рис. 14, дор. 1-3). Исходный праймер (дор. 1) практически отсутствует среди продуктов реакции ОТ, что свидетельствует о том, что реакция протекает достаточно эффективно. Тем не менее, продукты элонгации праймера достаточно разнородны по своей электрофоретической подвижности и, как следствие, длине: наблюдается достаточно большое количество abortивных продуктов элонгации. Вероятно, это также связано с высокой степенью структурированности РНК-матрицы, поскольку ревертаза, не обладая геликазной активностью, не способна преодолеть шпильки РНК или другие вторичные структуры, что может привести к диссоциации фермента и ДНК-РНК субстрата. Как следствие, снижается процессивность реакции ОТ. В рассматриваемых реакционных смесях (дор. 2 и 3) можно выделить два превалирующих продукта (рис. 14А, *a* и *b*). Электрофоретическая подвижность продукта *a* сопоставима с таковой исходной РНК-матрицы (дор. 14), длина которой 558 нукл, и с подвижностью полос в двуцепочечном ДНК-маркере (дор. 13), соответствующим длинам 500 и 600 пар оснований. Можно предполагать, что данный продукт по своей длине приближен к полноразмерному, то есть может достигать длины порядка 3-4 сотен нуклеотидов. Продукт *b* обладает меньшей электрофоретической подвижностью, приблизительно соответствующей подвижности 300 п.о. в ДНК-маркере. Вероятно, в данной области длина продуктов реакции ОТ – около 1-2 сотен нуклеотидов.

Интересно, что электрофоретическая подвижность исходных праймеров J1.6, J1.3 и J1.x (рис. 14А, дор. 4, 7, 10) ниже, чем у продуктов их удлинения в реакции ОТ (дор. 5-6, 8-9 и 11-12). По всей видимости, на начальных этапах реакции включение очередного dNTP в растущую цепь модифицированного ДНК-праймера влечёт за собой увеличение скорости миграции олигонуклеотида в геле за счёт более заметного изменения заряда; размер молекулы при этом ещё не изменился настолько значительно, чтобы вызвать задержку в порах агарозного геля. Однако при достижении некой критической длины, на более поздних этапах реакции, размер молекул оказывает большее влияние на скорость миграции в геле, нежели чем увеличение заряда при включении очередного dNTP. Таким образом, длинные продукты реакции ОТ демонстрируют «классическое» поведение в геле, замедляясь при увеличении размера молекулы. Вклад небольшого числа ФГ-групп в этом случае становится незначителен. Благодаря этому, вероятно, электрофоретическая подвижность

наиболее представленных продуктов реакции ОТ (*a* и *b*) практически не зависит от модификаций в исходном ДНК-праймере.

Понижение ионной силы реакционного буфера (дор. 3, 6, 9, 12) приводит к накоплению более длинных продуктов реакции по сравнению со стандартными реакционными условиями (дор. 2, 5, 8, 11) вне зависимости от наличия модификаций в составе праймера. На рисунке 15 приведены доли продуктов *a* и *b* в реакционных смесях, вычисленные как соотношение сигнала флуоресценции FAM рассматриваемого пятна к общему сигналу в соответствующей дорожке геля.

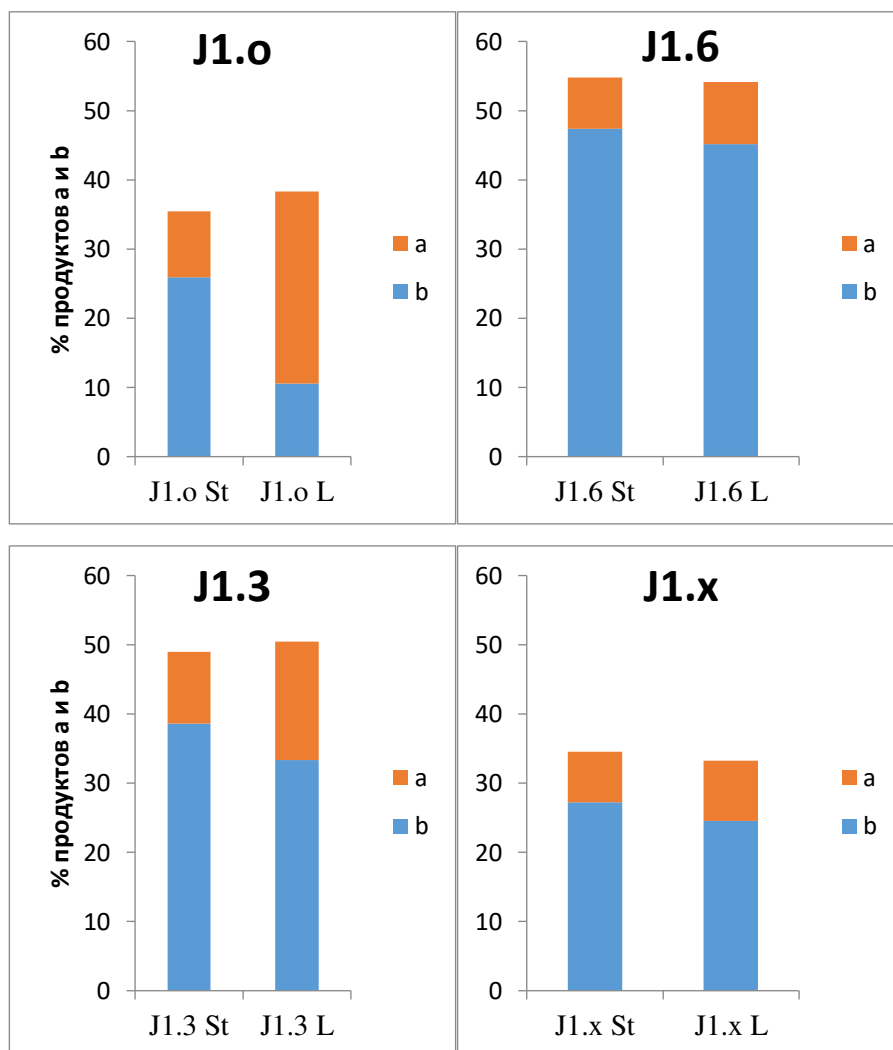


Рисунок 15 – относительное содержание основных продуктов элонгации праймеров серии J1 – *a* и *b*, – образующихся в результате реакции ОТ в растворе со «стандартной» («St») и пониженной («L») ионной силой.

Наиболее выражено изменение ионной силы повлияло на соотношение продуктов элонгации нативного праймера J1.0: относительное содержание наиболее протяженного продукта *a* выросло втрое (с 9 до 27%), в то время как содержание abortивного продукта *b* уменьшилось (с 26 до 10%) при понижении ионной силы буферного раствора. Вероятно,

удаление части солей из состава буфера позволило дестабилизировать внутреннюю структуру РНК, но не оказало значительного влияния на формирование тройного комплекса «ДНК-РНК-белок». Для модифицированных праймеров перераспределение продуктов элонгации при смене буферного раствора также наблюдалось, но на уровне нескольких процентов.

Аналогичные результаты были получены для праймеров серии J2 (рис. 16).

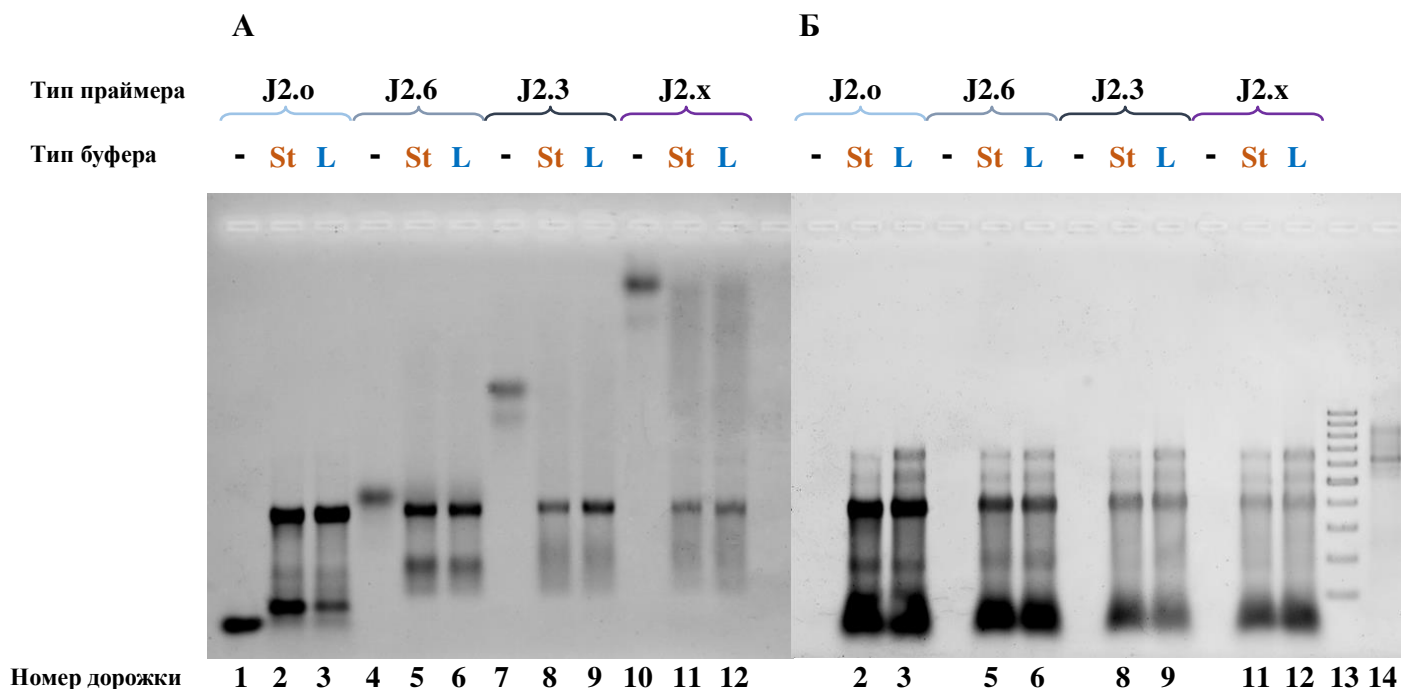


Рисунок 16 – результат сканирования сигнала флуоресценции FAM (А) и бромистого этидия (Б) после разделения продуктов реакции ОТ в 1.5% агарозном геле:

- (i) индивидуальных ДНК-праймеров J2.0 (дор. 1), J2.6 (дор. 4), J2.3 (дор. 7), J2.x (дор. 10), которые видны только при сканировании флуоресценции FAM;
- (ii) продуктов реакции ОТ праймеров J2.0 (дор. 2), J2.6 (дор. 5), J2.3 (дор. 8), J2.x (дор. 11) в «стандартных» буферных условиях («St»);
- (iii) продуктов реакции ОТ праймеров J2.0 (дор. 3), J2.6 (дор. 6), J2.3 (дор. 9), J2.x (дор. 12) в буфере с пониженной ионной силой («L»);
- (iv) ДНК-маркера 100-1000 п.о. (дор. 13), который виден только при сканировании флуоресценции бромистого этидия;
- (v) РНК-матрицы (дор. 14), которая видна только при сканировании флуоресценции бромистого этидия.

В данном случае среди продуктов элонгации праймера наблюдается меньшее количество abortивных продуктов. Вероятнее всего, это связано с тем, что теоретическая максимальная длина продуктов элонгации меньше, чем в случае сайта J1, и в ходе элонгации преодолевается меньшее количество шпилек или других структурных элементов РНК-матрицы, из-за чего процессивность работы фермента выше. Основной продукт элонгации праймеров серии J2 обладает электрофоретической подвижностью, сопоставимой с двуцепочечным ДНК-маркером длиной 400 пар оснований. Предположительно, данный

продукт близок по длине к полноразмерному (276 нукл. для данного праймера). Его относительное содержание в реакционных смесях представлена на рисунке 17.

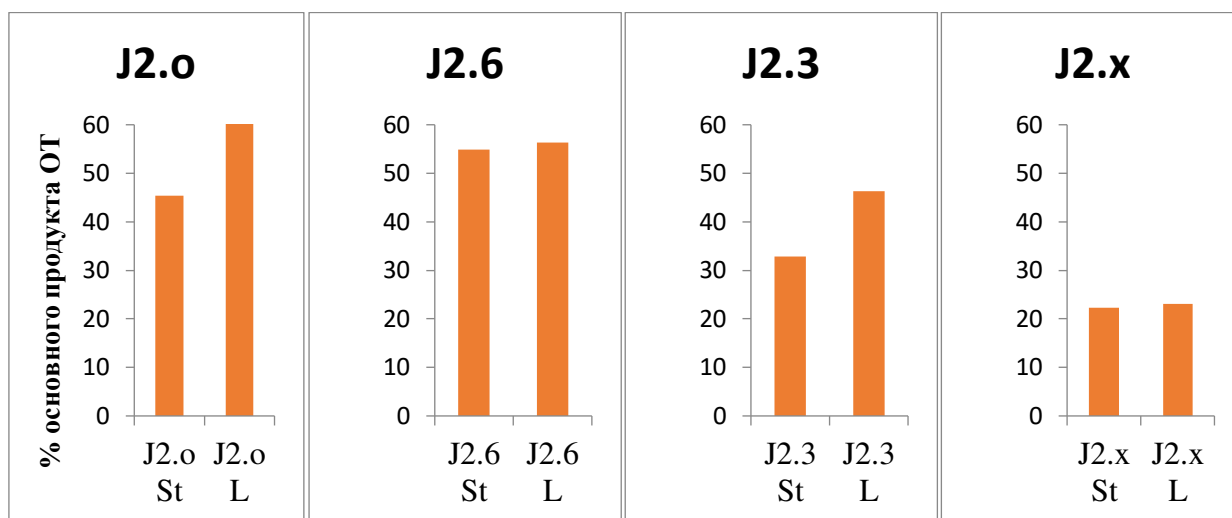


Рисунок 17 - относительное содержание основного продукта элонгации праймеров серии J2, образующегося в результате реакции ОТ в растворе со «стандартной» («St») и пониженной («L») ионной силой.

В данном случае также наблюдается более эффективное накопление целевого продукта в буферном растворе с пониженной ионной силой («L») для нативного праймера J2.o (увеличение доли основного продукта с 45 до 61%) и для ФГ-праймера J2.3 (с 33 до 46%). Интересно, что другие ФГ праймеры оказались практически индифферентны к изменению ионной силы. Возможно, расположение ФГ-групп в активном центре фермента оказывает влияние на конформацию фермент-субстратного комплекса и, как следствие, на его чувствительность к ионному составу среды и сольватации.

* * *

Данный этап работы был посвящен исследованию субстратных свойств ФГ олигонуклеотидов в реакции обратной транскрипции. Эффективность элонгации зависит от нуклеотидной последовательности праймера и от расположения ФГ-групп. Показано, что понижение ионной силы буферного раствора может способствовать накоплению наиболее протяженных продуктов реакции. Для установления влияния ФГ-групп на конформацию фермент-субстратного комплекса требуются дополнительные исследования. Показано, что ФГ ДНК, в том числе полностью электронейтральные, удлиняются в ходе реакции ОТ, то есть являются реакционно способным субстратом для РНК-зависимой ДНК-полимеразы. Данных о ферментативном удлинении незаряженных аналогов НК в литературе обнаружено не было.

Выводы

1. Исследованы физико-химические свойства фосфорилгуанидиновых олигодезоксирибонуклеотидов (ФГО), отличающиеся числом и взаимным расположением фосфорилгуанидиновых групп (ФГ-групп), по сравнению с нативными олигодезоксирибонуклеотидами:
 - показано, что увеличение числа ФГ-групп в составе ФГО приводит к повышению его гидрофобности; уменьшению суммарного заряда ФГО и снижению электрофоретической подвижности; уменьшению числа детектируемых заряженных форм при проведении масс-анализа в режиме детектирования полианионов;
 - продемонстрировано, что полностью электронейтральный ФГО образует комплементарный ДНК/ДНК комплекс, термическая стабильность которого практически не меняется при удалении солей из раствора.
2. Установлено, что происходит деградация целевого продукта синтеза ФГО при наличии в 3'-концевой позиции одновременно ФГ-группы и нуклеотидной вставки, входящей в состав полимерного носителя «Biotin CPG» (PrimeTech, республика Беларусь). Предложен механизм деградации, основанный на внутримолекулярном «анхимерном» содействии гидроксигруппы, входящей в состав нуклеотидной вставки.
3. Изучено ферментативное удлинение ФГО в реакции обратной транскрипции (ОТ) с использованием ревертазы вируса лейкемии мышей (MMLV H-), в том числе в присутствии протяжённой РНК-матрицы, обладающей вторичной структурой:
 - впервые показана возможность ферментативного удлинения полностью электронейтрального олигонуклеотида с эффективностью, сравнимой с таковой для нативного олигонуклеотида;
 - установлено, что эффективность реакции ОТ зависит от нуклеотидной последовательности использованного ФГО праймера и наличия и/или расположения ФГ-групп вблизи его 3'-конца;
 - продемонстрировано, что понижение ионной силы реакционного буфера приводит к накоплению более протяженных продуктов реакции ОТ.

Список использованной литературы

1. Eckstein F. // *Nucleic Acid Ther.* 2014. V. 24. P. 374–387
2. Rettig G.R., Behlke M.A. // *Mol. Ther.* 2012. V. 20. P. 483–512
3. Braasch D.A., Corey D.R. // *Chem. Biol.* 2001. V. 8. P. 1–7
4. Nielsen P.E. // *Chem. Biodivers.* 2010. V. 7. P. 786–804
5. Du L., Gatti R.A. // *J. Immunol. Methods.* 2011. V. 365. P. 1–7
6. Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A. // *Acta Naturae.* 2014. V. 6. P. 116–118.
7. Dyudeeva E.S., Kupryushkin M.S., Lomzov A.A., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 709–718
8. Pyshnaya I.A., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 677–683
9. Kor K., Turner A., Zarei K., Atabati M., Beni V., Mak W.C. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. V. 408. P. 1475–1485
10. Stetsenko D.A., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V. // WO2016028187A1. Priority from 22.06.2014
11. Fettes K.J., Howard N., Hickman D.T., Adah S.A., Player M.R., Torrence P.F., Micklefield // *J. Chem. Commun.* 2000. P. 765-766
12. De Mesmaeker A., Häner R., Martin P., Moser H. E. // *Acc. Chem. Res.* 1995. V. 28. P. 366–374
13. De Mesmaeker A., Altmann K.–H., Waldner A., Wendeborn S. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1995. V. 5. P. 343–355
14. Egholm M., Buchardt O., Nielsen P.E., Berg R.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 1992 V. 114. P. 1895–1897
15. Summerton J. E. // *Methods Mol. Biol.* 2017. V. 1565. P. 1–15
16. Summerton, J. E. // *Lett. Pept. Sci.* 2003. V. 10. P. 215–236
17. Komiyama, M., Ye, S., Liang, X., Yamamoto, Y., Tomita, T., Zhou, J. M., Aburatani, H. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. P. 3758–3762
18. Summerton, J., Weller, D. // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1997. V. 7. P. 187–195

19. Gurav, B., Srinivasan, G. // *Curr. Sci.* 2017. V. 112. P. 490–498.
20. Lomzov A.A., Kupryushkin M.S., Shernyukov A.V., Nekrasov M.D., Dovydenko I.S., Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. V. 513. P. 807–811
21. Nowak E., Potrzebowski W., Konarev P., Rausch J. W., Bona M., Svergun D. I., Bujnicki J. M., Le Grice S. F. J., Nowotny M. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. N. 6. P. 3874-3887

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Дюдеева Евгения Сергеевна

Проверяющий: Гапонова Светлана Константиновна (sveta-mira@yandex.ru / ID: 4540715)

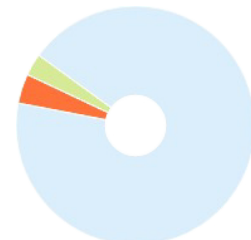
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://users.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 4
 Начало загрузки: 31.08.2021 10:56:01
 Длительность загрузки: 00:00:46
 Имя исходного файла: Дюдеева_EC_.pdf
 Название документа: Дюдеева_EC_
 Языки текста документа: русский, английский
 Размер текста: 1 кБ
 Символов в тексте: 57271
 Слов в тексте: 6992
 Число предложений: 408
 Method of text extraction: OCR

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
 Начало проверки: 31.08.2021 10:56:48
 Длительность проверки: 00:01:31
 Комментарии: не указано
 Поиск с учетом редактирования: да
 Модули поиска: ИПС Адилет, Библиография, Сводная коллекция ЭБС, Интернет Плюс, Сводная коллекция РГБ, Цитирование, Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KkRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KyRu), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования по Интернету (KkRu), Переводные заимствования по Интернету (KyRu), Переводные заимствования (KkEn), Переводные заимствования (KyEn), Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn), eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ, Интернет, Медицина, Диссертации НББ, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Перефразирования по Интернету, Патенты СССР, РФ, СНГ, СМИ России и СНГ, Шаблонные фразы, Кольцо вузов, Издательство Wiley, Переводные заимствования



ЗАИМСТВОВАНИЯ

4,17%

САМОЦИТИРОВАНИЯ

0%

ЦИТИРОВАНИЯ

2,88%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

92,95%

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
 Самоцитирования — доля фрагментов текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа, по отношению к общему объему документа.
 Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
 Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
 Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
 Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
 Заимствования, самоцитирования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.
 Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Доля в тексте	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте	Комментарии
[01]	1,48%	1,73%	ГИБРИДИЗАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ. III. СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, НЕСУЩИХ БИФУНКЦИОНАЛЬНУЮ НЕНУКЛЕОТИДНУЮ ВСТАВКУ. http://elibrary.ru	05 Сен 2012	Перефразирования по eLIBRARY.RU	3	3	
[02]	1,58%	1,58%	не указано	раньше 2011	Библиография	1	1	
[03]	1,26%	1,26%	Бобрикова Е.Н. диплом на антиплагиат	31 Мая 2020	Кольцо вузов	2	2	
[04]	0,74%	0,97%	не указано	раньше 2011	Шаблонные фразы	13	16	
[05]	0%	0,89%	PDF https://mcb.nsc.ru	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	5	
[06]	0%	0,82%	ГИБРИДИЗАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ. III. СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, НЕСУЩИХ БИФУНКЦИОНАЛЬНУЮ НЕНУКЛЕОТИДНУЮ ВСТАВКУ. http://elibrary.ru	05 Сен 2012	eLIBRARY.RU	0	10	
[07]	0%	0,76%	http://applied.photonics.pstu.ru/_engine/get_file.php?f=4357&d=_res/fs/&p=file.pdf&n=%C2%FB%E1%F3%F1%EA%20%E1%EE%EB%ED%E1%F2%FC%FE http://applied.photonics.pstu.ru	14 Сен 2018	Интернет Плюс	0	4	

[08]	0,27%	0,74%	http://applied.photonics.pstu.ru/_engine/get_file.php?f=4357&d=_res/fs/&p=file.pdf&n=%C2%FB%E%F3%F1%EA%20%E%F%EE%EB%ED%E%F1%F2%FC%FE http://applied.photonics.pstu.ru	14 Сен 2018	Интернет	1	1
[09]	0%	0,72%	Пономарев, Константин Юрьевич Синтез ди- и триазаадамантанов, содержащих монотерпеновые фрагменты : автореферат дис. ... кандидата химических наук : 02.00.03 Новосибирск 2017 http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2017	Сводная коллекция РГБ	0	3
[10]	0%	0,72%	Десятая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей - Документ https://refdb.ru	24 Мая 2020	Интернет Плюс	0	4
[11]	0,12%	0,71%	КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ, ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК-ЛИГАЗ ТЕРМОФИЛЬНЫХ АРХЕЕВ <i>Pyrococcus abyssi</i> И <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>. http://elibrary.ru	29 Авг 2011	eLIBRARY.RU	3	6
[12]	0%	0,69%	ЛАКТАПТИН БЕЛОК ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО МОЛОКА, ИНДУЦИРУЮЩИЙ АПОПТОЗ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ MCF-7. http://elibrary.ru	29 Авг 2008	eLIBRARY.RU	0	4
[13]	0%	0,69%	Артериальная гипертония у лиц призывного возраста: особенности клинического течения, диагностической и лечебно-профилактической помощи в амбулаторной практике http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	3
[14]	0%	0,69%	file_595465345d1c5мжпфи290617	29 Июнь 2017	Кольцо вузов	0	3
[15]	0,45%	0,66%	Сидоренко, Дарья Сергеевна Молекулярная и цитогенетическая организация четвертой хромосомы <i>Drosophila melanogaster</i> : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 03.01.07 Новосибирск 2019 http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2019	Сводная коллекция РГБ	2	2
[16]	0%	0,65%	Полный текст диссертации (3/4) http://chem.msu.ru	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	1
[17]	0%	0,63%	ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА HLA-G, ВНУТРИМАТОЧНОЙ ИНФЕКЦИИ И НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ У ЖЕНЩИН – тема научной статьи по фундаментальной медицине читайте бесплатно текст научно-исследовательской работы в электронной библиотеке КиберЛенинка https://cyberleninka.ru	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	3
[18]	0%	0,62%	Молекулярно импринтированные полимеры для биомедицинских и биотехнологических применений. http://elibrary.ru	05 Авг 2016	eLIBRARY.RU	0	4
[19]	0%	0,6%	ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТКАНЕЙ НА ИМПЛАНТАЦИЮ БИОПЛАСТИЧЕСКИХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ ФИЗИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ - Диссертация http://konf.x-pdf.ru	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	3
[20]	0%	0,59%	Лаборатория биомедицинской химии [Институт химической биологии и фундаментальной медицины] http://niboch.nsc.ru	19 Апр 2021	Интернет Плюс	0	4
[21]	0%	0,59%	Download https://fundamental-research.ru	18 Июль 2017	Интернет Плюс	0	3
[22]	0%	0,59%	Синтез функционализированных олигонуклеотидов с использованием амидофосфитных нуклеотидных мономеров унифицированного строения http://dslib.net	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	3
[23]	0%	0,59%	Флавоноиды и фталаты <i>Equisetum silvaticum</i> L., <i>Equisetum arvense</i> L. и <i>Pseudosiphora alopecuroides</i> L. http://dslib.net	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	3
[24]	0%	0,58%	Порываева_диплом	11 Июнь 2016	Кольцо вузов	0	2
[25]	0%	0,58%	Можайцев_диплом	11 Июнь 2016	Кольцо вузов	0	2
[26]	0%	0,58%	ДИПЛОМ_Булгакова_А.Е.	24 Мая 2021	Кольцо вузов	0	2

[27]	0%	0,58%	МахаловаКИ Антиплагиат	31 Мая 2021	Кольцо вузов	0	2
[28]	0%	0,57%	Кондратьева, Лия Германовна Роль регуляторных мастер генов в развитии рака поджелудочной железы : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 03.01.03 Москва 2020 http://dlib.rsl.ru	11 Июн 2020	Сводная коллекция РГБ	0	2
[29]	0,03%	0,57%	Механизмы подавления прогрессии экспериментальных опухолей под действием дендритных клеток и природных нуклеаз http://niboch.nsc.ru	02 Окт 2018	Интернет Плюс	1	3
[30]	0,56%	0,56%	Решение Арбитражного суда Новосибирской области от 12 декабря 2014 г. по делу N А45-21656/2014 (ключевые темы: договор поставки - порядок уплаты государственной пошлины - аванс - бюджетные учреждения - срок поставки) http://arbitr.garant.ru	29 Дек 2016	СПС ГАРАНТ	3	3
[31]	0%	0,56%	19 вузов России получили право присуждать ученые степени http://ug.ru	16 Янв 2019	СМИ России и СНГ	0	3
[32]	0%	0,54%	Новые правила защиты диссертаций. http://elibrary.ru	11 Мар 2020	eLIBRARY.RU	0	3
[33]	0%	0,54%	Определен перечень вузов и научных организаций, получивших право самостоятельно присуждать ученые степени http://magadan.yodda.ru	10 Янв 2019	СМИ России и СНГ	0	3
[34]	0%	0,48%	Синтетическая биология. http://elibrary.ru	03 Мая 2016	eLIBRARY.RU	0	5
[35]	0,03%	0,44%	Молекулярная биология. 2017. Т. 51, № 1 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	1	2
[36]	0%	0,42%	Ультразвуковая и функциональная диагностика. 2017. № 3 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	2
[37]	0%	0,41%	Молекулярная биология. 2017. Т. 51, № 4 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	2
[38]	0%	0,41%	Молекулярная биология. 2017. Т. 51, № 5 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	2
[39]	0%	0,41%	Download https://fundamental-research.ru	18 Июл 2017	Интернет	0	2
[40]	0%	0,41%	Всероссийская научно-практическая конференция "Молекулярно-генетические и иммуногенетические методы диагностики в практике врача гематолога", Санкт-Петербург, 25-26 апреля 2013 г. http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	2
[41]	0%	0,41%	Т. XCIV, № 4, июль-август http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	2
[42]	0,39%	0,39%	диплом-2020-06-07	07 Июн 2020	Кольцо вузов	1	1
[43]	0%	0,39%	диплом_Жуков	11 Июн 2020	Кольцо вузов	0	1
[44]	0,01%	0,39%	не указано http://nsu.ru	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	1
[45]	0,09%	0,31%	Фомин, Александр Сергеевич Апоптоз раковых клеток человека, индуцируемый рекомбинантным аналогом лактапина : диссертация ... кандидата химических наук : 03.01.04 Новосибирск 2012 http://dlib.rsl.ru	15 Сен 2015	Сводная коллекция РГБ	1	1
[46]	0%	0,31%	Епанчинцева, Анна Валерьевна Взаимодействие олигонуклеотидов и сферических наночастиц золота в составе нековалентных ассоциатов : диссертация ... кандидата химических наук : 02.00.10 Новосибирск 2020 http://dlib.rsl.ru	12 Янв 2021	Сводная коллекция РГБ	0	1
[47]	0%	0,31%	Ермаков, Евгений Александрович Природные каталитические иммуноглобулины класса G при шизофрении : диссертация ... кандидата биологических наук : 03.01.04 Новосибирск 2020 http://dlib.rsl.ru	16 Июн 2021	Сводная коллекция РГБ	0	1
[48]	0%	0,29%	ПРОТОТИП ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО МИКРОЧИПА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАТОГЕНОВ I ГРУППЫ, ОТНОСЯЩИХСЯ	14 Мар 2015	eLIBRARY.RU	0	3

К СЕМЕЙСТВАМ ARENA- И FILOVIRIDAE.
<http://elibrary.ru>

[49]	0%	0,29%	Отзыв официального оппонента 1 http://ugatu.ac.ru	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	1	
[50]	0%	0,29%	ASSA http://assa.bionet.nsc.ru	19 Мая 2021	Интернет Плюс	0	2	
[51]	0,03%	0,28%	Летальный фактор из <i>Bacillus anthracis</i> + " - скачать бесплатно автореферат диссертации по " + биологии + ", специальность " + Молекулярная биология (4/4) http://earthpapers.net	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	1	
[52]	0%	0,27%	PDF https://mcb.nsc.ru	11 Дек 2016	Интернет Плюс	0	1	
[53]	0%	0,27%	Митряева, Наталья Сергеевна Влияние совместной системы немодифицированных многостенных углеродных нанотрубок и технического углерода на физико-механические и электрофизические свойства резины на основе синтетического цис-изопренового каучука : авторефер... http://dlib.rsl.ru	12 Янв 2021	Сводная коллекция РГБ	0	1	
[54]	0%	0,27%	PDF https://mcb.nsc.ru	11 Дек 2016	Интернет	0	1	
[55]	0%	0,27%	Т. 2 http://emll.ru	08 Июл 2017	Медицина	0	1	
[56]	0%	0,27%	Способ очистки вируса осповакцины или его рекомбинантных вариантов. Патент РФ 2537000 http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	
[57]	0%	0,27%	Средство для нейтрализации вируса натуральной оспы. Патент РФ 2515905 http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	
[58]	0%	0,27%	Способ получения наноразмерной системы доставки нуклеозидтрифосфатов в клетки млекопитающих. Патент РФ 2527681 http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	
[59]	0%	0,23%	Синтетическая биология https://elementy.ru	09 Фев 2019	Интернет Плюс	0	2	
[60]	0%	0,23%	Синтетическая биология https://elementy.ru	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	2	
[61]	0%	0,19%	Определение уровня экспрессии генов ERBB2, GAPDH, CYP19A1, CYP17A1 и CYP11B1 методом полимеразной цепной реакции http://dep.nlb.by	20 Дек 2016	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	0%	0,19%	Синтез фрагментов ДНК, содержащих β-дикетогруппу, для аффинной модификации белков. http://elibrary.ru	30 Янв 2019	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0%	0,19%	Противоопухолевое средство тритерпеновой природы, полученное путем модификации глицирретовой кислоты. Патент РФ 2401273 http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	0%	0,18%	Синтез модельного фосфодиэфирного «узла связи» между РНК и белком ВПг пикорнавирусов, получение и характеристика антител к модельному соединению. http://elibrary.ru	01 Янв 2006	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	0%	0,17%	ASSA http://assa.bionet.nsc.ru	19 Сен 2019	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0%	0,17%	2018 год http://vector.nsc.ru	04 Окт 2020	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0%	0,16%	Постановление Администрации рабочего поселка Кольцово Новосибирской области от 20 января 2015 г. N 41 "Об утверждении муниципальной программы "Поддержка инновационной деятельности и субъектов малого и среднего предпринимательства рабочего поселка Кольцо... http://ivo.garant.ru	21 Фев 2019	СПС ГАРАНТ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0%	0,16%	Генетическое разнообразие и филогеография печеночных сосальщиков <i>opisthorchis felineus</i> и <i>opisthorchis sinensis</i> (trematoda, opisthorchiidae) на территории россии и стран восточной азии http://h.120-bal.ru	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[69]	<input type="text" value="0%"/>	0,16%	Флуорометрический анализ селективности гибридизации олигонуклеотидных зондов методом термической денатурации. http://elibrary.ru	30 Авг 2014	eLIBRARY.RU	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[70]	<input type="text" value="0%"/>	0,15%	http://www.chelsma.ru/files/misc/avtoref/erat.pdf http://chelsma.ru	23 Мар 2019	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[71]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	Алгебраическая теория пар Белого http://dslib.net	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[72]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	Отзыв научного руководителя по научно-квалификационной работе (диссертации) аспиранта _ (Ф. И. О. полностью) кафедры _ (полностью) на тему _ и подготовленном научном докладе об основных результатах выполненной научно-квалификационной работы (диссертация... https://pandia.ru	22 Июн 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[73]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	Аспирантура https://1spbgmu.ru	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[74]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	АСПИРАНТЫ ВОРОНЕЖСКОГО ГАУ ПОЛУЧИЛИ ЗАВЕТНЫЕ ДИПЛОМЫ http://voronej.bezformata.com	17 Авг 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[75]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	Определение микотоксинов в пищевых продуктах методом ВЭЖХ - Контроль безопасности и качества продуктов питания и товаров детского ассортимента: практическое руководство https://ozlib.com	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[76]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	Научные подразделения https://igm.nsc.ru	05 Окт 2020	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[77]	<input type="text" value="0%"/>	0,13%	Генетический полиморфизм и эффект антимуtagens в радиочувствительных клетках человека + " - скачать бесплатно автореферат диссертации по " + биологии + ", специальность " + Радиобиология http://earthpapers.net	10 Мар 2018	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[78]	<input type="text" value="0%"/>	0,13%	Линейные и гендерные различия в биохимических показателях и показателях обеспеченности жирорастворимыми витаминами у крыс на in vivo модели метаболического синдрома https://yandex.ru	07 Ноя 2018	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[79]	<input type="text" value="0%"/>	0,13%	Физико-химические свойства механокомпозиции бетиулина и его диацилов с водорастворимыми полимерами - скачать бесплатно автореферат на тему Физическая химия. Заказать доставку диссертации по химии, 02.00.04 ВАК РФ http://fizmathim.com	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[80]	<input type="text" value="0%"/>	0,12%	Contents: Electrophoresis 4'18 https://doi.org	28 Фев 2018	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[81]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	Кудряшов Сергей Владимирович ПРЕВРАЩЕНИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ В БАРЬЕРНОМ РАЗРЯДЕ Нефтехимия - PDF Free Download https://docplayer.ru	03 Мая 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[82]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	ТРАВЯНЫЕ МЕЛКОЛИСТВЕННЫЕ ЛЕСА КУЗНЕЦКОЙ КОТЛОВИНЫ: СИНТАКСОНОМИЯ, ЭКОЛОГИЯ, ГЕОГРАФИЯ - Диссертация http://konf.x-pdf.ru	31 Авг 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[83]	<input type="text" value="0%"/>	0,1%	Патофизиологическое обоснование методов неинвазивного контроля показателей системной гемодинамики. http://elibrary.ru	19 Дек 2015	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчет о проверке текста научно-квалификационной работы на
объем заимствования

Дюдеева Евгения Сергеевна

«Исследование субстратных свойств частично или полностью незаряженных
фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов в реакции обратной
транскрипции»

Оригинальность работы составляет ___92.95___ %, что соответствует
требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к
защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в
аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.б.н. С.К. Гапонова