



УДК 547.963.32:577.113.4:577.113.6

## НОВЫЕ ДВУХКОМПОНЕНТНЫЕ ПИРЕНИЛЬНЫЕ ЗОНДЫ НА ОСНОВЕ ОЛИГО(2'-О-МЕТИЛРИБОНУКЛЕОТИДОВ) ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ микроРНК

© 2021 г. О. А. Семиколенова\*, \*\*, В. М. Голышев\*, Б. Х. Ким\*\*\*, А. Г. Веньямина\*, Д. С. Новопашина\*, \*\*, #

\*ФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины” СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

\*\*Новосибирский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 1

\*\*\*Пхоханский университет науки и технологии, 77 Cheongam-ro, Hyogok-dong, Nam-gu, Pohang-si, Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea

Поступила в редакцию 14.09.2020 г.

После доработки 26.09.2020 г.

Принята к публикации 29.09.2020 г.

Созданы новые двухкомпонентные флуоресцентные зонды для детекции микроРНК на основе олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов), формирующие в присутствии РНК-мишени 3WJ-структуру из трех олигонуклеотидных дуплексов (3WJ – three-way junction) со вставкой <sup>Py</sup>A-модифицированного аденинового кластера, представляющего собой пентааденозиновый фрагмент, содержащий в центре 8-(1-этинилпирен)-дезоксирибоаденозин. В качестве РНК-мишени выбрана микроРНК let-7a-3p, уровень которой в клетке коррелирует с возникновением и развитием онкологических заболеваний. Проведено сравнительное исследование термической стабильности и флуоресценции двухкомпонентных зондов на основе олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов), в составе которых имеется дезоксирибоаденозиновый (dAdA<sup>Py</sup>AdAdA) или (2'-О-метилрибо)аденозиновый фрагмент (A<sup>m</sup>A<sup>m</sup>PyAA<sup>m</sup>A<sup>m</sup>), содержащий в центре 8-(1-этинилпирен)-дезоксирибоаденозин, и аналогичного олигодезоксирибонуклеотидного зонда. Обнаруженное изменение спектров флуоресценции созданных зондов при гибридизации с РНК-мишенью потенциально может быть использовано при разработке систем детекции микроРНК.

**Ключевые слова:** олиго(2'-О-метилрибонуклеотиды), флуоресцентные зонды, детекция РНК, 3WJ-структура, <sup>Py</sup>A-модифицированный пентаадениновый кластер, 8-(1-этинилпирен)-дезоксирибоаденозин

DOI: 10.31857/S0132342321020238

### ВВЕДЕНИЕ

Детекция и визуализация биомолекул *in vitro* и *in vivo*, в частности клеточных и внеклеточных РНК, необходимы для решения целого ряда задач молекулярной биологии и биомедицины, биохимии и клеточной биологии. Актуальной проблемой является повышение чувствительности систем, используемых для детекции и визуализации биомолекул, а именно увеличение соотношения сигнал/шум, а также повышение предела обнаружения [1, 2]. Флуоресцентные зонды представляют собой перспективную основу для создания высокочувствительных систем детекции биомолекул. Для сиквенс-специфической детекции нуклеи-

новых кислот используют флуоресцентные гибридизационные зонды [3–5]. Интересным вариантом зондов являются тандемные флуоресцентные зонды, сигнал от которых возникает только при одновременной гибридизации компонентов зонда на НК-мишени за счет сближения пары флуорофоров. Флуоресцентные олигонуклеотидные зонды, содержащие остатки пирена в качестве флуорофора, являются перспективными инструментами для детекции нуклеиновых кислот благодаря высокой чувствительности флуоресценции пирена к окружению [6–9].

Одними из наиболее перспективных инструментов для детекции РНК являются флуоресцентные зонды на основе олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов). Олиго(2'-О-метилрибонуклеотиды) обладают определенными преимуществами перед стандартно используемыми для создания олигонуклеотидных зондов олигодезоксирибонуклеотидами, а именно большей термической стабильностью дуплексов с комплементарной РНК,

Сокращения: 3WJ – three-way junction – структура из трех олигонуклеотидных дуплексов; <sup>Py</sup>A – модифицированный адениновый кластер – пентааденозиновый фрагмент, содержащий в центре 8-(1-этинилпирен)-дезоксирибоаденозин; miR – микроРНК.

# Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-51-29; эл. почта: danov@niboch.nsc.ru).

способностью разворачивать структурированную РНК, а также большей устойчивостью к действию нуклеаз [10, 11].

Относительно недавно был предложен новый вариант эксимерных зондов для детекции микроРНК, представляющий собой двухкомпонентный олигодезоксирибонуклеотидный зонд, способный образовывать в присутствии РНК-мишени 3WJ-структуру (3WJ – three-way junction), содержащую в одном из стеблей так называемые  $P_{yA}$ -модифицированные адениновые кластеры в обеих цепях [12].

В данной работе мы провели дизайн, синтез и изучение свойств новых двухкомпонентных зондов на основе олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), формирующих в присутствии РНК-мишени 3WJ-структуру. Каждый из компонентов зонда содержит  $P_{yA}$ -модифицированный адениновый кластер, представляющий собой пентааденозиновый фрагмент, содержащий в центре 8-(1-этинилпирен)-дезоксирибоаденозин.

В качестве РНК-мишени нами была выбрана микроРНК let-7a-3p (miR let-7a-3p). Уровень этой микроРНК в клетке коррелирует с возникновением и развитием онкологических заболеваний, в связи с этим она рассматривается как диагностический биомаркер онкологических заболеваний и является объектом исследований при создании новых усовершенствованных систем детекции.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее были предложены и исследованы различные варианты пиренильных флуоресцентных зондов на основе олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) для детекции РНК, в том числе биспиренильные линейные зонды [13–16], биспиренильные “молекулярные маяки” [17, 18] и тандемные биспиренильные зонды [19, 20].

В данной работе для детекции miR let-7a-3p нами были сконструированы двухкомпонентные зонды, формирующие в присутствии РНК-мишени 3WJ-структуру из трех олигонуклеотидных дуплексов (рис. 1). Каждый из компонентов зонда содержит  $P_{yA}$ -модифицированный адениновый кластер, представляющий собой (2'-*O*-метилрибо)аденозиновый фрагмент ( $A^m A^m P_{yA} A^m A^m$ ) (**Lmf + Rmf**) или дезоксирибоаденозиновый фрагмент ( $dAdA^{P_{yA}} dAdA$ ) (**Lm + Rm**), содержащий в центре 8-(1-этинилпирен)-дезоксирибоаденозин.

Для синтеза компонентов олигонуклеотидных зондов использовали специально полученный фосфитамид аденозина, содержащего пирен в 8-м положении гетероциклического основания. Для его введения автоматический твердофазный фосфитамидный синтез прерывали и проводили цикл присоединения модифицированного фосфитамидного звена в “ручном” варианте с использова-

нием 5-этилтиотетразола в качестве активатора. Время конденсации увеличивали до 30 мин. Проводили остальные стадии цикла в “ручном” варианте и продолжали синтез в автоматическом режиме.

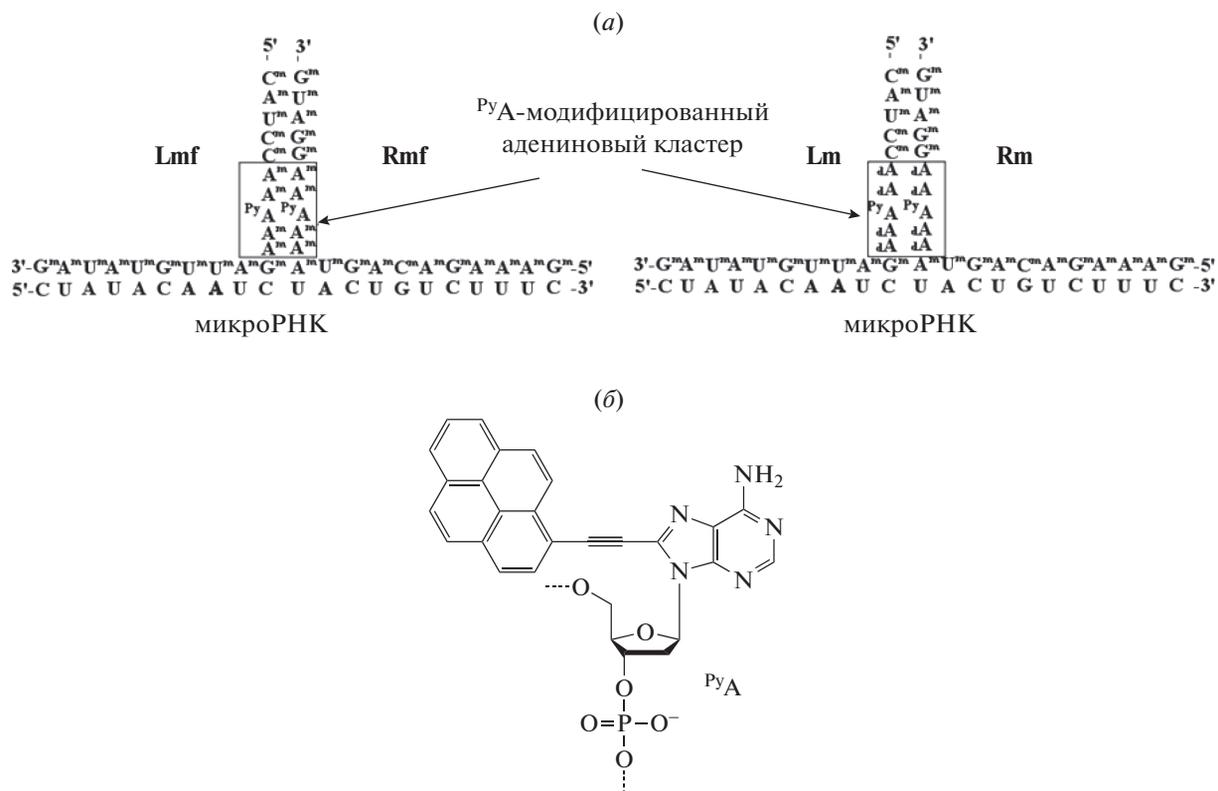
По окончании синтеза удаляли 5'-*O*-диметокситритильную группу и проводили деблокирование олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих  $P_{yA}$ , в стандартных условиях. Модифицированные олигонуклеотиды выделяли методом препаративного гель-электрофореза. Строение конъюгатов подтверждали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Таким образом были получены  $P_{yA}$ -содержащие компоненты олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидных) зондов (**Lmf + Rmf**) и (**Lm + Rm**), отличающиеся природой аденозинов в составе кластера, а также их олигодезоксирибонуклеотидные аналоги (**L + R**) (табл. 1). Для исследования влияния  $P_{yA}$  на время удерживания при офВЭЖХ и термическую стабильность комплексов с РНК-мишенью были также синтезированы контрольные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) (**Lmc и Rmc**), не содержащие  $P_{yA}$ .

Гомогенность выделенных  $P_{yA}$ -модифицированных олигонуклеотидов подтверждали методами офВЭЖХ (рис. 2) и электрофореза в денатурирующем 15%-ном ПААГ.

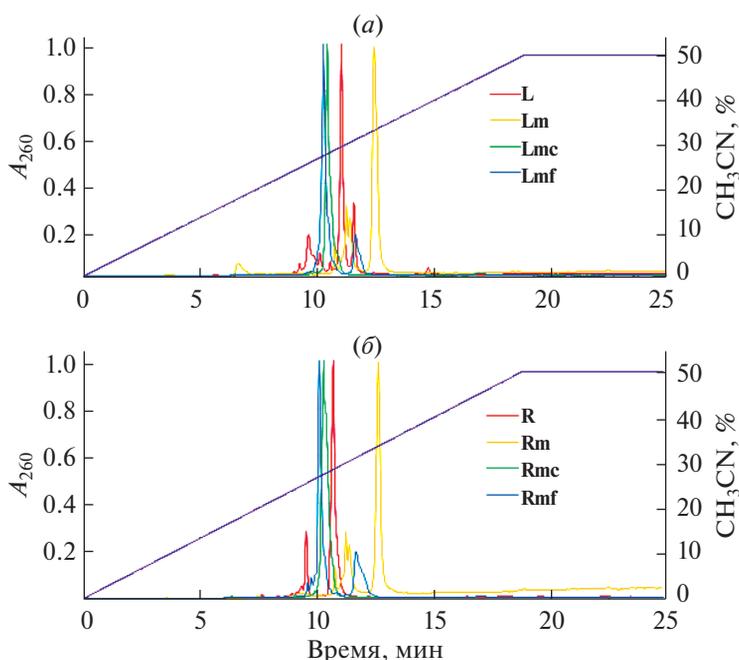
Введение модифицированного  $P_{yA}$  в полностью 2'-*O*-метилированные олигорибонуклеотиды приводило к незначительному (0.3 мин) уменьшению времени удерживания при офВЭЖХ (**Lmf и Rmf**). Время удерживания модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов **L** и **R**, содержащих  $P_{yA}$ , было незначительно больше (0.6–0.8 мин) времени удерживания их 2'-*O*-метилированных аналогов **Lmf** и **Rmf**. Дополнительная замена в **Lmf** и **Rmf** двух нуклеотидов с 3'- и 5'-стороны от  $P_{yA}$  на дезоксирибоаденозины (**Lm** и **Rm**) приводила к увеличению времени удерживания (1.8–2.6 мин) при офВЭЖХ. Таким образом, химерные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) (**Lm** и **Rm**), содержащие пентадесоксирибоаденозиновый фрагмент, являются наиболее гидрофобными.

В электронных спектрах поглощения всех конъюгатов, содержащих  $P_{yA}$ , наблюдали максимум поглощения на длине волны 260 нм и два пика поглощения в области 360–430 нм. На рис. 3 приведены примеры спектров поглощения  $P_{yA}$ -содержащих олигонуклеотидов. Два пика с максимумами на 380 и 420 нм соответствуют поглощению этинилпирена, введенного в аденин [12].

В спектрах флуоресценции компонентов олигодезоксирибонуклеотидных (**L** и **R**) и олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидных) (**Lmf, Rmf, Lm** и **Rm**) зондов наблюдали флуоресценцию в диапазоне 440–460 нм, характерном для флуоресценции этинилпирена (рис. 4а–4в).



**Рис. 1.** (а) – Структуры 3WJ-комплексов, образующихся при гибридизации двухкомпонентных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидных) зондов (**Lmf + Rmf** и **Lm + Rm**) с РНК-мишенью. Py<sup>A</sup>-модифицированный адениновый кластер – (2'-*O*-метилрибо)аденозинный фрагмент (A<sup>m</sup>A<sup>m</sup>Py<sup>A</sup>AA<sup>m</sup>A<sup>m</sup>) (**Lmf + Rmf**) или дезоксирибоаденозинный фрагмент (dAdA<sup>Py</sup>AdAdA) (**Lm + Rm**), содержащий в центре 8-(1-этилпирен)-дезоксирибоаденозин. N<sup>m</sup> – 2'-*O*-метилрибонуклеозид, dA – дезоксирибоаденозин. Обозначения компонентов зондов см. в табл. 1; (б) – структура 8-(1-этилпирен)-дезоксирибоаденозина (Py<sup>A</sup>).



**Рис. 2.** Нормализованные профили аналитической офВЭЖХ при анализе Py<sup>A</sup>-содержащих и контрольных (не содержащих Py<sup>A</sup>) олигонуклеотидов. (а) – **L, Lm, Lmc, Lmf**; (б) – **R, Rm, Rmc, Rmf**. Последовательности олигонуклеотидов см. в табл. 1. Условия: градиент концентрации 0–50% (20 мин) и 50% (5 мин) CH<sub>3</sub>CN в буфере, содержащем 0.02 М ТЕААс, рН 7.0, скорость потока – 100 мкл/мин.

Таблица 1. Последовательности и характеристики компонентов зондов, содержащих P<sub>γ</sub>A, и контрольных олиго(2'-O-метилрибонуклеотидов)

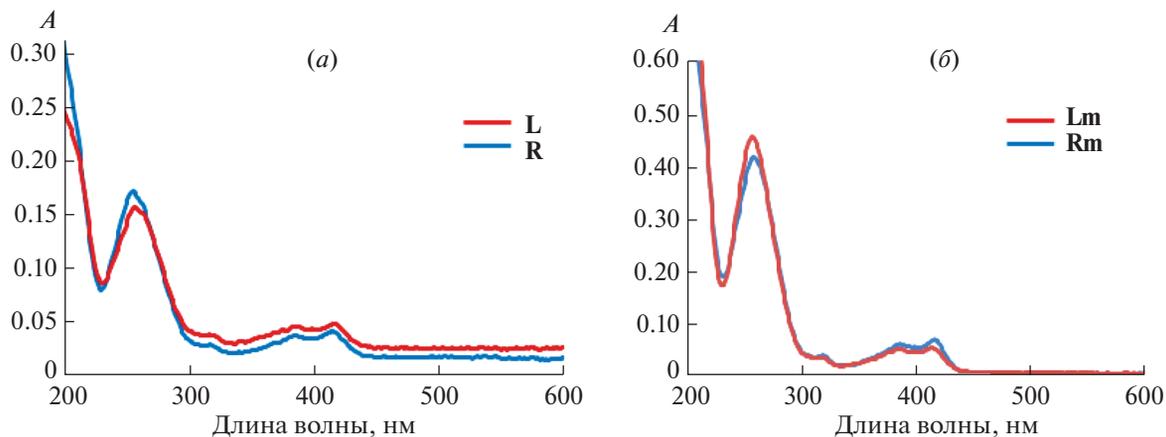
Шифр	Последовательность (5' → 3')	Время удерживания*, мин	Молекулярная масса	
			рассчитанная	полученная**
<b>Lmf</b>	C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> P <sub>γ</sub> AA <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup>	10.2	6858.7	6865.9
<b>Rmf</b>	G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> P <sub>γ</sub> AA <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup>	10.1	7367.0	7375.7
<b>Lm</b>	C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> C <sup>m</sup> C <sup>m</sup> dAdA <sup>m</sup> P <sub>γ</sub> AdAdAG <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup>	12.4	6738.6	6746.1
<b>Rm</b>	G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> dAdA <sup>m</sup> P <sub>γ</sub> AdAdAG <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup>	12.7	7247.0	7255.7
<b>L</b>	d(CATCCAA <sup>m</sup> AAAAGATTGTATAG)	11.0	6334.3	6357.3***
<b>R</b>	d(GAAAAGACAGTAAA <sup>m</sup> AAAAGGATG)	10.7	6770.6	6794.3***
<b>Lmc</b>	C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup>	10.5	6663.4	6668.6
<b>Rmc</b>	G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> U <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> A <sup>m</sup> G <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup>	10.4	7171.8	7178.6

\* По данным офВЭЖХ, условия см. в "Эксперим. части".

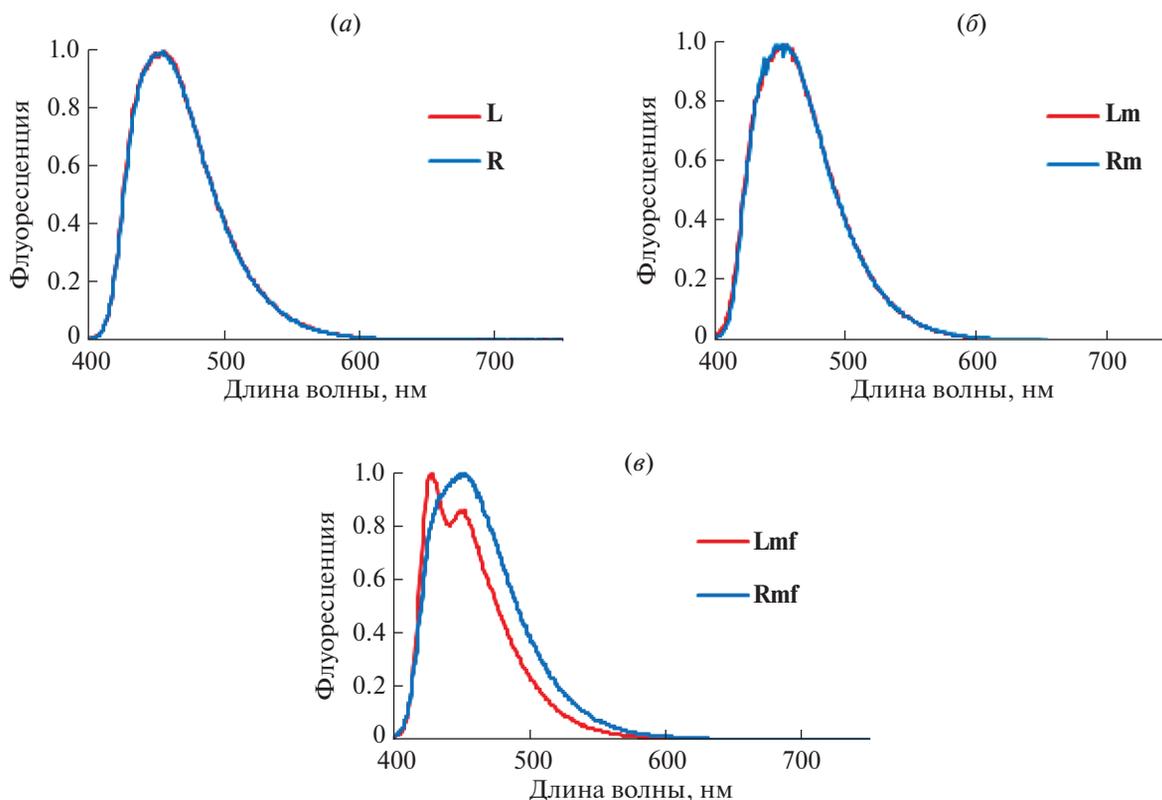
\*\* По данным MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

\*\*\* Содержит дополнительно ион Na<sup>+</sup>.

N<sup>m</sup> – 2'-O-метилрибонуклеозид; d – олигодезоксирибонуклеотид; dA – дезоксирибоаденозин в составе олиго(2'-O-метилрибонуклеотида); P<sub>γ</sub>A – 8-(1-этилпирен)-дезоксирибоаденозин.



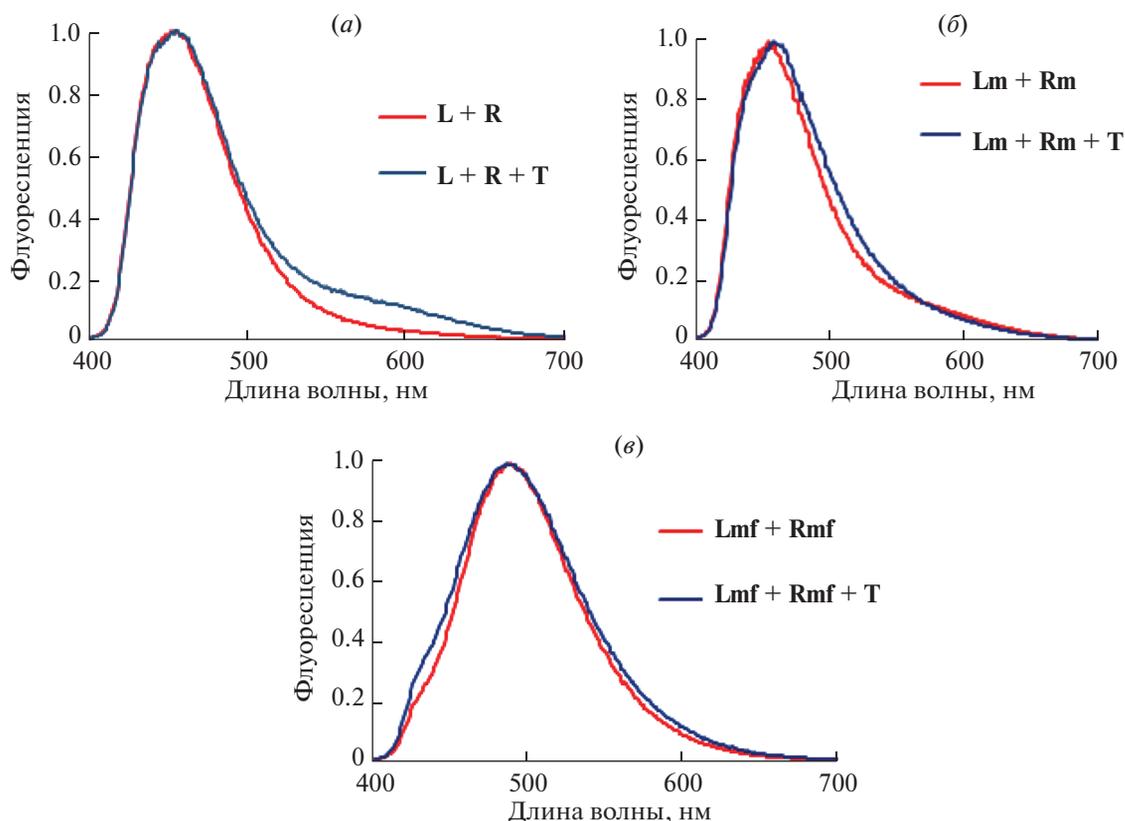
**Рис. 3.** Спектры поглощения водных растворов  $^{PyA}$ -модифицированных олигонуклеотидов: (а) – олигодезоксирибонуклеотидов (**L** и **R**), (б) – олиго-(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (**Lm** и **Rm**). Концентрация олигонуклеотидов 10 мкМ, температура 25°C.



**Рис. 4.** Нормализованные спектры флуоресценции зондов: (а) – олигодезоксирибонуклеотидных (**L** и **R**); (б) – олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидных) (**Lm** и **Rm**); (в) – олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидных) (**Lmf** и **Rmf**). Условия: 2 мкМ олигонуклеотиды; длина оптического пути 4 мм; 0.1 М NaCl, 50 мМ Трис-НСl буфер (рН 7.5), 10 мМ  $MgCl_2$ ; длина волны возбуждения 385 нм; температура 25°C.

Во флуоресцентном спектре олигонуклеотида **Lmf** – компонента полностью 2'-*O*-метилированного зонда – регистрировали дополнительный пик на меньшей длине волны (рис. 4в). Проанализировав вероятность образования внутри- и

межмолекулярных комплексов для этой последовательности, мы выяснили, что этот олигонуклеотид способен образовывать самокомплементарные комплексы, в которых остатки  $^{PyA}$  в составе разных цепей будут расположены на различном



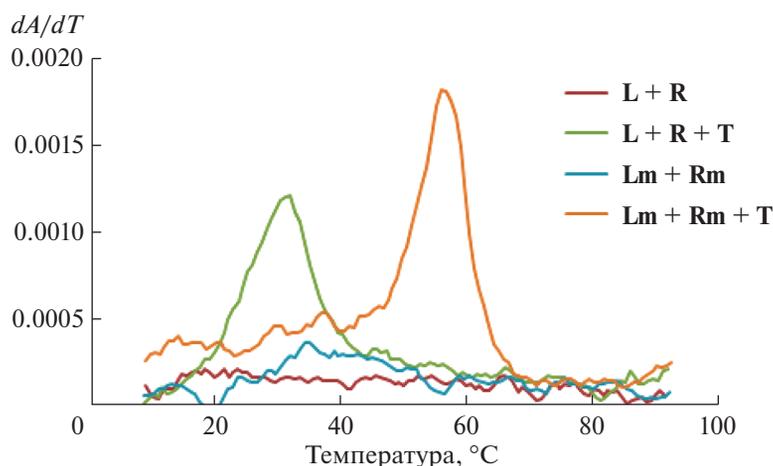
**Рис. 5.** Нормализованные спектры флуоресценции двухкомпонентных зондов и их комплексов с РНК-мишенью. (а) – Олигодезоксирибонуклеотидный зонд (**L + R**) и его комплекс с РНК-мишенью (**L + R + T**); (б) – олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидный) зонд (**Lm + Rm**) и его комплекс с РНК-мишенью (**Lm + Rm + T**); (в) – олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидный) зонд (**Lmf + Rmf**) и его комплекс с РНК-мишенью (**Lmf + Rmf + T**). **T** – РНК-мишень miR let-7a-3p. Условия: 2 мкМ олигонуклеотиды и РНК-мишень; длина оптического пути 4 мм; 50 мМ Трис-НСl буфер (рН 7.5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1 М NaCl; длина волны возбуждения 385 нм; температура 25°C.

расстоянии друг от друга в составе комплекса, что и может быть причиной возникновения второго пика флуоресценции. Аналогичный эффект наблюдали в работе Cummins et al. [10] при исследовании различных типов комплексов с <sup>Py</sup>A-модифицированными адениновыми кластерами.

Ранее было продемонстрировано, что двухкомпонентные олигодезоксирибонуклеотидные зонды, формирующие 3WJ-комплексы с РНК-мишенью и содержащие <sup>Py</sup>A-модифицированные адениновые кластеры в обеих цепях, обладают уникальными флуоресцентными свойствами [12]. При гибридизации с РНК пирен-модифицированные аденины (<sup>Py</sup>A) в составе <sup>Py</sup>A-модифицированных адениновых кластеров взаимодействуют между собой с образованием структуры с отличными от исходных олигонуклеотидных компонентов флуоресцентными свойствами, что позволяет проводить детекцию РНК-мишеней.

Нами были получены спектры флуоресценции двухкомпонентных зондов и их комплексов с РНК-мишенью (рис. 5). Анализируя спектры флуоресценции двухкомпонентных зондов в отсутствие

РНК-мишени и при добавлении РНК-мишени, можно заключить, что в случае олигодезоксирибонуклеотидного зонда (**L + R**) в присутствии РНК-мишени в спектрах увеличивается интенсивность излучения флуоресценции в более длинноволновой области относительно флуоресценции исходных компонентов зонда (рис. 5а). Аналогичные изменения спектра наблюдали и в работах [12, 21, 22]. В случае зонда (**Lm + Rm**) в спектрах флуоресценции с РНК-мишенью таких изменений не регистрировали, но при этом максимум основного пика несколько сдвигался в более длинноволновую область (с 453 до 460 нм) (рис. 5б). В случае зонда (**Lmf + Rmf**) в спектрах флуоресценции как в отсутствие, так и в присутствии РНК-мишени максимум флуоресценции регистрировали в еще более длинноволновой области при 495 нм, при этом в спектрах флуоресценции зонда в присутствии РНК-мишени регистрировали относительное увеличение интенсивности флуоресценции в области 420–440 нм (рис. 5в). Появление отличий в спектрах флуоресценции при гибридизации двухкомпонентных зондов с РНК-мишенью позволяет го-



**Рис. 6.** Дифференциальные кривые термической денатурации компонентов тандемных зондов (**L + R**, **Lm + Rm**) и их комплексов с РНК-мишенью (**L + R + T**, **Lmf + Rmf + T**). Условия термической денатурации: буфер (25 мМ Трис-НСI (pH 7.2), 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>), концентрации олигонуклеотидных компонентов 1 мкМ. Т – РНК-мишень miR let-7a-3p.

ворить о потенциальной возможности разработки систем детекции РНК с использованием этих зондов.

Методом термической денатурации была исследована стабильность комплексов двухкомпонентных зондов, содержащих <sup>Py</sup>A-модифицированный адениновый кластер, с РНК-мишенью. Для зондов в отсутствие мишени не наблюдали значительных изменений в оптической плотности растворов при изменении температуры, что, вероятно, свидетельствует об отсутствии взаимодействия между компонентами зонда (рис. 6).

Температура плавления комплекса зонда, состоящего из олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) (**Lm + Rm**), с РНК-мишенью составила 57.3°C и была выше температуры аналогичного комплекса зонда, состоящего из олигодезоксирибонуклеотидов (**L + R**), с РНК-мишенью, которая составила 39.1°C, что согласуется с литературными данными [23]. Видимо, изменение максимума флуоресценции зонда (**Lm + Rm**) при гибридизации с РНК, по сравнению с зондом (**L + R**) (рис. 5а, 5б), может быть частично объяснено более высокой стабильностью комплекса. Другим объяснением отличий в спектрах флуоресценции может быть другая конформация химерного 2'-*O*-метил-РНК/ДНК-дуплекса (скорее всего, промежуточная форма между А- и В-формами двойной спирали), содержащего <sup>Py</sup>A-модифицированный адениновый кластер, по сравнению с аналогичным ДНК-дуплексом (близкая к В-форме двойной спирали).

Таким образом, нами продемонстрирована способность двухкомпонентных зондов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих <sup>Py</sup>A-модифицированный адениновый кластер, формировать

более стабильные 3WJ-комплексы с РНК-мишенью, чем аналогичные олигодезоксирибонуклеотидные зонды.

Предложенные в данной работе новые двухкомпонентные флуоресцентные зонды на основе олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), формирующие с РНК-мишенью 3WJ-структуру, изменяют свои флуоресцентные свойства при формировании комплекса с РНК-мишенью и в перспективе могут быть использованы в качестве зондов для детекции РНК-мишеней, в том числе микроРНК. Требуется дополнительное исследование влияния структуры зондов, а именно положения <sup>Py</sup>A в составе кластера и протяженности самого кластера, на их свойства для улучшения специфичности флуоресцентного сигнала и увеличения чувствительности к РНК-мишени.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы и оборудование.** В работе были использованы следующие реактивы: перхлорат натрия, дисукцинимидилкарботат, пиренметиламин, *N*-метилимидазол (Acros Organics, США); 4,4'-диметокситритилхлорид (Alfa Aesar, США); 5-этилтио-1*H*-тетразол (Biosset, Россия); 2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфитамид, полимеры с присоединенным первым нуклеозидным звеном – 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-третбутилдиметилсиллил-*N*2-ацетилгуанозин-CPG, 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-третбутилдиметилсиллил-уридин-CPG, фосфитамиды *N*-ацетилзащищенных 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-метилрибонуклеозидов, *N*-ацетилзащищенных 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-третбутилдиметилсиллил-рибонуклеозидов, *N*-ацетилзащищенных 5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-*O*-дезоксирибонуклеоти-

дов (ChemGenes, США); краситель “Stains-all”, персульфат аммония, дихлоруксусная кислота, акриламид, *N,N'*-метиленисакриламид, 2,6-лутидин, Трис-гидрокси метиламинометан (Fluka, Швейцария); мочевины, 40%-ный водный раствор метиламина (Merck, Германия); молекулярные сита “Trap-Pac™ Molecular Sieve Bag” 3 Å (Millipore, США); пиридин, ацетон, тетрагидрофуран, 15%-ный раствор уксусного ангидрида в тетрагидрофуране (PanReac, Испания); ксиленианол FF, бромфеноловый синий, *N,N,N',N'*-этилендиаминтетрауксусная кислота (Serva, Германия); триэтиламин, триэтиламинтригидрофторид, гексаметилендиамин, этокситриметилсилан (Sigma-Aldrich, США); хлористый метилен, йод кристаллический, ацетонитрил (Криохром, Россия).

*N*6-бензоил-5'-*O*-[бис(4-метоксифенил)фенилметил]-8-(1-этинилпиренил)-2'-деоксиаденозин был синтезирован и выделен в лаборатории профессора Б.Х. Кима (В.Н. Kim, Пхоханский университет науки и технологии, Пхохан, Южная Корея) по методике Hwang et al. [24].

Олигонуклеотиды были получены на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (Биосет, Россия) твердофазным фосфитамидным методом в условиях, оптимизированных нами для этого прибора. Все водные растворы были приготовлены с использованием деионизованной воды, полученной с помощью прибора Millipore Simplicity System (Millipore, США).

Строение полученных олигонуклеотидов и конъюгатов подтверждали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометра REFLEX III (Bruker Daltonics, Германия) (Центр коллективного пользования Центр масс-спектрометрического анализа Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН).

Для анализа возможности образования внутри- и межмолекулярных комплексов олигонуклеотидов использовали программное обеспечение OligoAnalyzer 3.1. (Integrated DNA Technologies, США).

**Расчет коэффициентов молярного поглощения.** Оптическую плотность растворов олигонуклеотидов измеряли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США). Молярные коэффициенты поглощения немодифицированных олигонуклеотидов при 260 нм рассчитывали по данным работы Marti et al. [19]. Значения молярных коэффициентов поглощения для 2'-*O*-метилрибонуклеотидов принимали равными соответствующим молярным коэффициентам поглощения для рибонуклеотидов. При расчете коэффициентов молярного поглощения олигонуклеотидов, содержащих <sup>32</sup>P, влияние пирена не учитывали.

**Регистрация спектров флуоресценции.** Флуоресценцию <sup>32</sup>P-содержащих олиго(2'-*O*-метилрибону-

клеотидов) и олигодезоксирибонуклеотидов регистрировали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian Inc., США) в кварцевых кюветках (длина оптического пути 4 мм) при комнатной температуре в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мкМ NaCl или в буфере, содержащем 10 мМ какодилат натрия (рН 7.4), 0.1 М NaCl, 1 мМ трилон Б, при концентрации олигонуклеотидных компонентов 2 мкМ.

**Регистрация спектров поглощения.** Поглощение <sup>32</sup>P-содержащих олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) и олигодезоксирибонуклеотидов регистрировали на спектрофотометре BioSpectrometer (Eppendorf, Германия) в кварцевых кюветках (длина оптического пути 1 мм) при комнатной температуре при концентрации олигонуклеотидных компонентов 10 мкМ в воде.

**Аналитическая обращенно-фазовая хроматография.** Аналитическую оФВЭЖХ проводили на жидкостном микроколоночном хроматографе Милихром А-02 (ЭкоНова, Россия) с использованием колонки ProntoSil (75 × 2 мм) в градиенте концентрации 0–50% (20 мин) и 50% (5 мин) CH<sub>3</sub>CN в буфере, содержащем 0.02 М ТЕААс, рН 7.0, скорость потока 100 мкл/мин. Измерения проводили на трех длинах волн 260, 300 и 346 нм спектрофотометрического детектора хроматографа (Альфахром, Россия) при 40°C. Полученные данные обрабатывали в программе Мультихром ОС (ЭкоНова, Россия) и в Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США).

**Термическая денатурация дуплексов.** Дифференциальные кривые термической денатурации дуплексов были получены на установке с терморегулируемой оптической кюветкой на базе спектрофотометра Cary 300 BioMelt (Varian Inc., Австралия). Изменение температуры проводили со скоростью 0.5°C/мин. Детекцию поглощения осуществляли на двух длинах волн (260 и 270 нм). Обработку кривых термической денатурации и ренатурации проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Office 2010 (Microsoft Corporation, США). Температуры плавления были определены как максимумы первых производных кривых плавления.

**Синтез *N*6-бензоил-5'-*O*-[бис(4-метоксифенил)фенилметил]-8-(1-этинилпиренил)-3'-{бис[1-(метилэтил)фосфорамидил]цианоэтил}-2'-деоксиаденозина (<sup>32</sup>P).** Синтез проводили по аналогии с работой Ji et al. [25] с небольшими изменениями. К раствору 200 мг (0.23 ммоль) соединения (*N*6-бензоил-5'-*O*-[бис(4-метоксифенил)фенилметил]-8-(1-этинилпиренил)-2'-деоксиаденозина) в 0.7 мл хлористого метилена добавляли 69 мкл (0.40 ммоль) *N,N*-диизопропилэтиламина и раствор, содержащий 44.9 мг (0.35 ммоль) 5-этилтиотетразола в 0.28 мл CH<sub>3</sub>CN<sub>абс</sub>. Затем добавляли 144 мкл (0.45 ммоль) 2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилфосфитамида. За про-

хождением реакции следили с помощью ТСХ (система гексан : этилацетат, 1 : 2). По окончании реакции реакционную смесь растворяли в EtOAc (3–4 мл), отделяли раствор от осадка, образовавшегося в результате реакции, и переносили в пробирку на 50 мл, промывали осадок этилацетатом (6 мл × 4) и экстрагировали объединенный раствор насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub>. Водный слой трижды промывали этилацетатом, объединенные органические слои сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали досуха. Продукт выделяли из реакционной смеси методом колоночной хроматографии на силикагеле (230–400 меш, 60 Å) (Sigma, США). Смесь, растворенную в 2 мл 50%-ного раствора этилацетата в гексане, наносили на колонку. Проводили элюцию в градиенте концентрации этилацетата в гексане (50–60%) и упаривали соответствующие фракции. R<sub>f</sub> 0.76, система ТСХ гексан : этилацетат, 1 : 2. Выход фосфитамида <sup>32</sup>P составил 56%.

**Получение <sup>32</sup>P-модифицированных олигонуклеотидов (L, R, Lm, Rm, Lmf, Rmf) в “ручном” варианте твердофазного фосфитамидного синтеза.** Полимер-связанный 3'-концевой фрагмент олигонуклеотида, полученный автоматическим твердофазным фосфитамидным методом, переносили из реактора в пробирку на 1.5 мл и добавляли раствор, содержащий 22 мг фосфитамида <sup>32</sup>P в смеси 100 мкл хлористого метилена и 100 мкл CH<sub>3</sub>CN<sub>абс</sub> (0.1 М). Затем добавляли 200 мкл 0.25 М раствора активатора 5-этилтиотетразола в CH<sub>3</sub>CN<sub>абс</sub>, перемешивали 30 мин при 37°C, раствор отбирали. Полимерный носитель промывали CH<sub>3</sub>CN<sub>абс</sub> (200 мкл × 3) и абсолютным тетрагидрофураном (200 мкл × 2).

К полимер-связанному олигонуклеотиду добавляли 100 мкл CrA (10%-ный уксусный ангидрид, 10%-ный 2,6-лутидин в THF), затем 100 мкл CrB (16%-ный N-метилимидазол в THF), перемешивали 5 мин при 37°C, раствор отбирали. Повторяли процедуру еще раз. Полимерный носитель промывали тетрагидрофураном (200 мкл × 2). Затем добавляли 200 мкл раствора окислителя (0.02 М I<sub>2</sub> в THF : Py : H<sub>2</sub>O, 45 : 0.5 : 4.5 (v/v/v)), перемешивали 5 мин при 37°C, раствор отбирали. Полимерный носитель промывали тетрагидрофураном (200 мкл × 3) и хлористым метиленом (200 мкл × 2).

Для удаления 5'-O-диметокситритильной группы добавляли 300 мкл деблокирующего агента (3%-ный раствор дихлоруксусной кислоты в хлористом метилена), перемешивали 1 мин, раствор отбирали. Повторяли процедуру еще 2 раза. Полимер промывали хлористым метиленом (200 мкл × 2) и ацетоном (200 мкл × 2). Полимер высушивали, помещали в реактор и продолжали автоматический твердофазный фосфитамидный синтез. Конъюгаты деблокировали в стандартных условиях. Выделение конъюгатов проводили в 15%-ном ПААГ (акриламид : N,N'-метиленбисакрила-

мид, 29 : 1) в денатурирующих условиях (8 М мочевины, 50 мМ Трис-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH 8.3, 0.1 М трилон Б). Последовательности и характеристики конъюгатов приведены в табл. 1.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Ха Юнг Ли (Ha Jung Lee) (Пхоханский университет науки и технологии, Пхохан, Южная Корея) за синтез и выделение N<sup>6</sup>-бензоил-5'-O-[*бис*(4-метоксифенил)фенилметил]-8-(1-этинилпиренил)-2'-деоксиаденозина) и к.х.н. А.А. Черноносову (Центр масс-спектрометрического анализа Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) за регистрацию масс-спектров олигонуклеотидов и их конъюгатов.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта базового бюджетного финансирования Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы № АААА-А17-117020210021-7.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания проведенных кем-либо из авторов данной статьи экспериментов с привлечением людей или использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bao G., Rhee W.J., Tsourkas A. // Annu. Rev. Biomed. Eng. 2009. V. 11. P. 25–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-061008-124920>
2. Guo J., Ju J., Turro N.J. // Anal. Bioanal. Chem. 2012. V. 402. P. 3115–3125. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5526-x>
3. Hwang G.T. // Molecules. 2018. V. 23. P. 124. <https://doi.org/10.3390/molecules23010124>
4. Boutorine A.S., Novopashina D.S., Krasheninina O.A., Nozeret K., Venyaminova A.G. // Molecules. 2013. V. 18. P. 15357–15397. <https://doi.org/10.3390/molecules181215357>
5. Wang K., Huang J., Yang X., He X., Liu J. // Analyst. 2013. V. 138. P. 62–71. <https://doi.org/10.1039/c2an35254k>
6. Birks J.B., Dyson D.J., Munro I.H. // Proc. R. Soc. A. Math. Phys. Eng. Sci. 1963. V. 275. P. 575–588. <https://doi.org/10.1098/rspa.1963.0187>
7. Krasheninina O.A., Novopashina D.S., Apartsin E.K., Venyaminova A.G. // Molecules. 2017. V. 22. P. 2108. <https://doi.org/10.3390/molecules22122108>

8. *Astakhova I.V., Korshun V.A., Wengel J.* // Chem. Eur. J. 2008. V. 14. P. 11010–11026.  
<https://doi.org/10.1002/chem.200801077>
9. *Astakhova I.K., Lindegaard D., Korshun V.A., Wengel J.* // Chem. Commun. 2010. V. 46. P. 8362–8364.  
<https://doi.org/10.1039/c0cc03026k>
10. *Cummins L.L., Owens S.R., Risen L.M., Lesnik E.A., Freier S.M., McGee D., Guinosso C.J., Cook P.D.* // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 2019–2024.  
<https://doi.org/10.1093/nar/23.11.2019>
11. *Boutorine A.S., Venyaminova A.G., Repkova M.N., Sergueyeva Z.A., Pyshnyĭ D.V.* // Biochimie. 1994. V. 76. P. 23–32.  
[https://doi.org/10.1016/0300-9084\(94\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0300-9084(94)90059-0)
12. *Kim K.T., Heo W., Joo T., Kim B.H.* // Org. Biomol. Chem. 2015. V. 13. P. 8470–8478.  
<https://doi.org/10.1039/C5OB01159K>
13. *Sakamoto T., Kobori A., Murakami A.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. P. 2590–2593.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.03.040>
14. *Waki R., Yamayoshi A., Kobori A., Murakami A.* // Chem. Commun. 2011. V. 47. P. 4204–4206.  
<https://doi.org/10.1039/c0cc04639f>
15. *Новопашина Д.С., Тоцкая О.С., Холодарь С.А., Мещанинова М.И., Веньяминова А.Г.* // Биоорг. химия. 2008. Т. 34. С. 671–682. [*Novopashina D.S., Totskaya O.S., Kholodar S.A., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2008. V. 34. P. 602–612.]  
<https://doi.org/10.1134/S1068162008050105>
16. *Krasheninina O.A., Novopashina D.S., Lomzov A.A., Venyaminova A.G.* // Chembiochem. 2014. V. 15. P. 1939–1946.  
<https://doi.org/10.1002/cbic.201402105>
17. *Крашенинина О.А., Фишман В.С., Новопашина Д.С., Веньяминова А.Г.* // Биоорг. химия. 2017. Т. 43. С. 261–272. [*Krasheninina O.A., Fishman V.S., Novopashina D.S., Venyaminova A.G.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2017. V. 43. P. 259–269.]  
<https://doi.org/10.1134/S1068162017030086>
18. *Pasternak A., Kierzek E., Pasternak K., Fratzczak A., Turner D.H., Kierzek R.* // Biochemistry. 2008. V. 47. P. 1249–1258.  
<https://doi.org/10.1021/bi701758z>
19. *Marti A.A., Li X., Jockusch S., Li Z., Raveendra B., Kalachikov S.* // Nucl. Acids Res. 2006. V. 34. P. 3161–3168.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl406>
20. *Krasheninina O.A., Lomzov A.A., Fishman V.S., Novopashina D.S., Venyaminova A.G.* // Bioorg. Med. Chem. 2017. V. 25. P. 2244–2250.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.042>
21. *Ro J.J., Lee H.J., Kim B.H.* // Chem. Commun. 2018. V. 54. P. 7471–7474.  
<https://doi.org/10.1039/C8CC03982H>
22. *Seo Y.J., Ryu J.H., Kim B.H.* // Org. Lett. 2005. V. 7. P. 4931–4933.  
<https://doi.org/10.1021/ol0518582>
23. *Inoue H., Hayase Y., Imura A., Iwai S., Miura K., Ohtsuka E.* // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. P. 6131–6148.  
<https://doi.org/10.1093/nar/15.15.6131>
24. *Hwang G.T., Seo Y.J., Kim B.H.* // Tetrahedron Lett. 2005. V. 46. P. 1475–1477.  
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.01.015>
25. *Ji Y., Yang J., Wu L., Yu L., Tang X.* // Angew. Chemie Int. Ed. 2016. V. 55. P. 2152–2156.  
<https://doi.org/10.1002/anie.201510921>

## New Two-Component Pyrene Probes on the Basis of Oligo(2'-O-Methylribonucleotides) for microRNA Detection

**O. A. Semikolenova\*<sup>\*,\*\*</sup>, V. M. Golyshev\*,  
B. H. Kim\*\*\*, A. G. Venyaminova\*, and D. S. Novopashina\*<sup>\*,\*\*</sup>,**

<sup>#</sup>Phone: +7 (383) 363-51-29; e-mail: danov@niboch.nsc.ru

<sup>\*</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, prosp. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>\*\*</sup>Novosibirsk State University, ul. Pirogova 1, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>\*\*\*</sup>Pohang University of Science and Technology (POSTECH),

77 Cheongam-ro, Hyogok-dong, Nam-gu, Pohang-si, Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea

New two-component pyrene probes on the basis of oligo(2'-O-methylribonucleotides) for microRNA detection were obtained. They can form a three-way junction structure (3WJ) with RNA-target and contain the <sup>Py</sup>A-modified adenine clusters with 8-(1-ethynylpyrene)-deoxyriboadenosine in the center of both components. We have chosen microRNA let-7a-3p as RNA-target because correlation of its concentration in cells with cancer's appearance and progression. Comparative study of thermal stability and fluorescence properties of probes on the basis of oligo(2'-O-methylribonucleotides) contain deoxyriboadenosine (dAdA<sup>Py</sup>AdAdA) or (2'-O-methylribo)adenosine (A<sup>m</sup>A<sup>m</sup>PyAA<sup>m</sup>A<sup>m</sup>) fragment with 8-(1-ethynylpyrene)-deoxyriboadenosine in the center, and of similar probe on the basis of oligodeoxyribonucleotide have been carried out. The changes of fluorescence spectra of two-component probes upon hybridization with RNA-target have been demonstrated and can be potentially used for design of new microRNA detection system.

**Keywords:** oligo(2'-O-methylribonucleotides), fluorescent properties, RNA detection, 3WJ-structure, <sup>Py</sup>A-modified adenine cluster, 8-(1-ethynylpyrene)-deoxyriboadenosine