

УДК 577.151.45

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МЕТОК СУ3 И СУ5 ДЛЯ ЗАЩИТЫ ЦЕПИ ДНК ОТ ДЕГРАДАЦИИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ $\lambda$ -ЭКЗОНУКЛЕАЗЫ

Н.В. Комарова\*, С.И. Глухов, М.С. Андрианова, А.Е. Кузнецов

*(Научно-производственный комплекс «Технологический центр»;**\*e-mail: nat.v.kom@gmail.com)*

Экзонуклеаза фага  $\lambda$  расщепляет 5'-фосфорилированную цепь двухцепочечной ДНК в направлении 5'-3'. В данной работе впервые изучена активность фермента по отношению к ДНК-субстратам, содержащим на 5'-концах флуоресцентные метки Су3 и Су5. С использованием методики флуоресцентного измерения активности экзонуклеазы показано, что двухцепочечная ДНК, оба 5'-конца которой содержат данные флуорофоры, не разрушается под действием экзонуклеазы фага  $\lambda$ . С помощью электрофоретического разделения ДНК в полиакриламидном геле изучен процесс получения одноцепочечной ДНК из двухцепочечных предшественников, содержащих различные метки на 5'-концах. Показано, что введение флуорофоров Су3 и Су5 на 5'-конец цепи ДНК защищает эту цепь от повреждения ферментом как в дуплексе, так и в одноцепочечной форме, и эти метки могут быть использованы для получения флуоресцентно-меченной одноцепочечной ДНК.

**Ключевые слова:** экзонуклеаза фага  $\lambda$ , флуоресцентная метка, получение одноцепочечной ДНК.

Фермент экзонуклеаза фага  $\lambda$  (КФ 3.1.11.3) селективно расщепляет 5'-фосфорилированную цепь двухцепочечной ДНК (дцДНК) в направлении 5'-3' [1]. Фермент применяется для получения одноцепочечной ДНК (оцДНК) из двухцепочечной. Для этого в качестве субстрата используют дцДНК, в которой цепь, требующая сохранения, имеет ОН-группу на 5'-конце, а удаляемая цепь содержит концевой 5'-фосфат. Получение оцДНК необходимо для целого ряда биохимических приложений, в особенности, для отбора аптамеров по протоколу SELEX [2, 3]. Кроме того, экзонуклеаза фага  $\lambda$  применяется для поиска специфических сайтов связывания белков в геномной ДНК [4], измерения активности полинуклеотидкиназы [5, 6], а также в различных биосенсорах [7, 8].

Аптамеры – короткие фрагменты одноцепочечной ДНК или РНК, способные к специфическому связыванию в комплекс с заданными молекулами. Они могут заменить антитела и в настоящее время активно используются в химическом анализе, а также имеют перспективы применения в медицине для проведения терапии и доставки лекарств [9]. Аптамеры к выбранной мишени могут быть отобраны из большой библиотеки оцДНК или РНК с использованием технологии SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) [10, 11]. Отбор аптамеров представляет собой циклический процесс, состоящий из четырех шагов

[9]. На первом этапе библиотеку случайных последовательностей инкубируют с мишенью. Во время инкубирования некоторые из цепей ДНК/РНК могут образовывать комплекс с молекулами мишени. Второй шаг процесса заключается в разделении цепей ДНК, связавшихся с мишенью, и свободных, не проявивших аффинности к мишени. Затем отобранные молекулы амплифицируют, и на последнем шаге из полученной дцДНК регенерируют библиотеку оцДНК, обогащенную (по сравнению с исходной библиотекой) аффинными к мишени последовательностями. Эта новая библиотека используется для следующего цикла отбора, который продолжается до тех пор, пока не прекратится обогащение библиотеки. Этап регенерации оцДНК имеет большое значение для успеха отбора аптамеров, поскольку качество и количество получаемой одноцепочечной ДНК влияет на успех эволюции последовательностей [12].

Для получения оцДНК из дцДНК используют четыре метода: разделение с использованием магнитных частиц и биотин-стрептавидинового взаимодействия, разделение по размерам прямой и обратной цепей ДНК с помощью денатурирующего электрофореза, асимметричную ПЦР и расщепление с помощью экзонуклеазы фага  $\lambda$  [12, 13]. Установлено, что самый эффективный метод (позволяющий получить максимальный выход оцДНК) – расщепление экзонуклеазой фага  $\lambda$  [14–

16]. Данный метод можно комбинировать с асимметричной ПЦР для дополнительного повышения выхода [12]. Этот подход проявил себя как самый быстрый и наименее трудоемкий.

Несмотря на высокую специфичность по отношению к фосфорилированной цепи, экзонуклеаза фага  $\lambda$  может также расщеплять нефосфорилированную цепь ДНК [1, 17, 18] и разрушать оцДНК, хотя и с гораздо меньшей эффективностью [18]. Эта побочная активность усложняет использование фермента на практике.

В настоящее время в протоколах отбора аптамеров широко применяются флуоресцентные метки, позволяющие легко контролировать количество ДНК в ходе эксперимента. Эти же метки могут быть использованы для анализа целевого соединения с использованием уже полученных аптамеров. Активность фермента по отношению к флуоресцентно-меченым цепям ДНК пока не изучена.

В работе с использованием специально разработанной методики изучена активность экзонуклеазы фага  $\lambda$  по отношению к ДНК-субстратам, содержащим на 5'-концах флуорофоры Cy3 и Cy5, а также проведен анализ процесса получения флуоресцентно-меченной ими оцДНК-библиотеки случайных последовательностей S4 [2, 3].

### Экспериментальная часть

**Получение двухцепочечной ДНК.** Для получения дцДНК, использованной в качестве субстрата для экзонуклеазы фага  $\lambda$ , проводили ПЦР-амплификацию библиотеки случайных последовательностей ДНК. В качестве матрицы использовали библиотеку случайных последовательностей S4 bank, которую применяли в протоколе SELEX для

получения аптамеров [2, 3]. Библиотека была синтезирована компанией «Microsynth» (Швейцария). Праймеры, использованные для амплификации, приведены в табл. 1. Все праймеры были синтезированы компанией «ДНК-Синтез» (Россия). Всего было получено 8 видов субстратов:

субстраты, содержащие ОН-группы на обоих 5'-концах;

субстраты, содержащие флуорофор Cy3 на обоих 5'-концах;

субстраты, содержащие флуорофор Cy5 на обоих 5'-концах;

субстраты, содержащие на одном из 5'-концов ОН-группу, а на другом – либо фосфат, либо флуорофор Cy3, либо флуорофор Cy5;

субстраты, содержащие на одном из концов 5'-фосфат, а на другом – либо флуорофор Cy3, либо флуорофор Cy5.

Амплификацию для каждого типа субстрата проводили в амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) в реакционной смеси объемом 100 мкл, содержащей 0,5 пмоль матричной ДНК, 200 мкМ каждого из четырех канонических dNTP, 2 мМ  $MgCl_2$  и 2,5 единицы *Taq* ДНК-полимеразы («Fermentas», Литва) в реакционном буфере (75 мМ Трис-НСl (рН 8,5); 20 мМ  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0,01% Tween 20). Условия амплификации: начальная денатурация в течение 5 мин при 95 °С, 10 циклов амплификации 30 с при 95 °С, 30 с при 53 °С, 30 с при 72 °С, достройка цепей в течение 2 мин при 72 °С после последнего цикла. ПЦР-продукты очищали с помощью набора для выделения ДНК «GeneJET PCR Purification Kit» («Fermentas», Литва) по протоколу производителя. Размер и чистоту ПЦР-продуктов контролировали с помощью гель-электрофореза в

Библиотека случайных последовательностей ДНК и праймеры для ее амплификации

Название	Последовательность
S4 bank	5'-ATACCAGCTTATTCAATT-N10-TGAGGCTCGATC-N40-GATAGTAAGTGCAATCT-3'
For	5'-ATACCAGCTTATTCAATT-3'
For_Cy3	5'-Cy3-ATACCAGCTTATTCAATT-3'
For_Cy5	5'-Cy5-ATACCAGCTTATTCAATT-3'
Rev	5'-AGATTGCACTTACTATCT-3'
Rev_P	5'-Phosphate-AGATTGCACTTACTATCT-3'
Rev_Cy3	5'-Cy3-AGATTGCACTTACTATCT-3'
Rev_Cy5	5'-Cy5-AGATTGCACTTACTATCT-3'

полиакриламидном геле с окрашиванием ДНК-красителем «Sybr Gold» («Invitrogen», США)

**Расщепление двухцепочечной ДНК экзонуклеазой фага  $\lambda$ .** Реакцию расщепления ДНК проводили в термомиксере «Thermomixer Comfort» («Eppendorf», Германия) при 37 °С. Для проведения каждой реакции использовали 250–1500 нг дцДНК и 2–10 Ед экзонуклеазы фага  $\lambda$  («Fermentas», Литва) в реакционном буфере (67 мМ Глицин-КОН (рН 9,4), 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub> и 0,01% (v/v) Triton X-100). Время реакции составляло от 2 мин до 2 ч.

Для анализа активности фермента по отношению к симметрично флуоресцентно-меченым субстратам флуоресцентным методом 550 нг дцДНК обрабатывали 1,1 Ед  $\lambda$ -экзонуклеазы в 55 мкл реакционной смеси. Реакционную смесь выдерживали в термостате при 37 °С в течение 1 ч. В выбранные временные точки (0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 мин) отбирали аликвоты реакции объемом 5 мкл. Аликвоты переносили в заранее подготовленные пробирки, содержавшие равные объемы смеси растворов SYBR Green I и ЭДТА. Добавление аликвот доводило разведение SYBR Green I до 1X, конечная концентрация ЭДТА составляла 0,03 М.

Для качественного анализа продуктов расщепления ДНК экзонуклеазой фага  $\lambda$  с помощью электрофореза в полиакриламидном геле использовали 250 нг дцДНК, полученной при амплификации библиотеки S4. Реакцию проводили в течение 2 ч и останавливали денатурацией при 80 °С в течение 10 мин. Аликвоты реакционной смеси объемом 10 мкл, что соответствовало 50 нг исходного количества ДНК, смешивали с 10 мкл 1 М Трис-НСl (рН 8,0), 5 мл буфера для внесения проб ДНК в гель Titrack («Fermentas», Литва) и 10 мкл деионизированной воды.

Для анализа расщепления ДНК экзонуклеазой фага  $\lambda$  во времени с помощью электрофоретического разделения в ПААГ использовали 500 нг дцДНК. Аликвоты реакционной смеси объемом 5 мкл (что соответствует 50 нг исходного субстрата) отбирали в ходе реакции и переносили в пробирки, содержавшие стоп-реагент (1 мкл 0,5 М ЭДТА; рН 8,0). Для нормализации рН к полученным пробам добавляли 5 мкл 1 М Трис-НСl (рН 8,0), 1 мкл буфера для внесения проб ДНК в гель Titrack и 5 мкл деионизированной воды.

**Измерение флуоресценции SYBR Green I.** Измерение флуоресценции SYBR Green I в пробах, полученных в ходе измерения активности экзонуклеазы фага  $\lambda$  по отношению к симметрично флуоресцентно-меченым субстратам дцДНК, проводили в микропланшетах для измерения флуорес-

ценции Flat White (Greiner) в планшетном спектрофлуориметре «Infinite M200Pro» («Tecan») при длинах волн возбуждения и детекции флуоресценции 490 и 520 нм соответственно. Приборное усиление флуоресцентного сигнала выставляли равным для субстратов с разными модификациями 5'-концов ДНК.

**Электрофоретический анализ ДНК в полиакриламидном геле.** Пробы ДНК анализировали в 12%-м неденатурирующем полиакриламидном геле в TBE-буфере (89 мМ Трис-Борат, 2 мМ ЭДТА; рН 8,3). После разделения образцов в вертикальной камере для электрофореза «Mini-PROTEAN Tetra cell» («Bio-Rad», США) гели окрашивали красителем SYBR Gold («Invitrogen», США). Фрагменты ДНК визуализировали в трансиллюминаторе «ECX-F15» («Vilber Lourmat», Франция). Программу ImageJ [19] использовали для количественного анализа интенсивности полос ДНК в геле. Обработку данных проводили в программном пакете Origin 8.5 («OriginLab», США).

### Результаты и их обсуждение

**Активность экзонуклеазы фага  $\lambda$  по отношению к субстратам, меченым флуорофором на обоих 5'-концах.** На первом этапе была изучена активность экзонуклеазы фага  $\lambda$  по отношению к ДНК-субстратам, меченым Су3 или Су5 флуорофорами на обоих 5'-концах молекул дцДНК, в сравнении с немодифицированными дцДНК-субстратами, содержащими 5'-концевые гидроксильные группы. Схематическое изображение использованных субстратов приведено на рис. 1, А. Матрицей для амплификации ДНК-субстратов для экзонуклеазы фага  $\lambda$  с разными метками на 5'-концах служила библиотека случайных последовательностей S4 bank. Эта библиотека содержит сайты связывания праймеров для амплификации, использованные в ряде работ по отбору аптамеров [2, 3, 20, 21]. Кроме того, данная библиотека имеет длину в 98 оснований, что облегчает очистку ПЦР-продукта после амплификации, так как эффективность набора реагентов для выделения ДНК после ПЦР снижается при длине ПЦР-продукта меньше 90 оснований.

Для измерения активности экзонуклеазы фага  $\lambda$  использовали флуоресцентный краситель SYBR Green I. Методика измерений основана на том, что флуоресцирует только краситель, интеркалированный в молекулу дцДНК. По мере разрушения одной из цепей ДНК-ферментом флуоресценция SYBR Green I ослабевает. Была проведена оценка вклада фонового флуоресцентного сигнала 5'-кон-

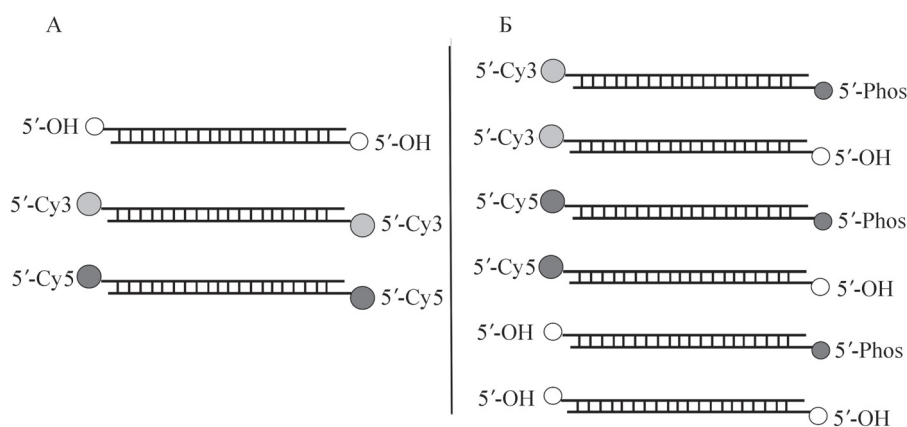


Рис. 1. Схематическое изображение использованных дцДНК-субстратов: А – симметрично меченные субстраты; Б – асимметрично меченные субстраты

цевых флуорофоров Cy3 или Cy5 в общий флуоресцентный сигнал от 5'-концевых флуорофоров и красителя SYBR Green I, интеркалировавшего в участки дцДНК. Существенного влияния их собственной флуоресценции при выбранных условиях возбуждения и детекции сигнала выявлено не было. Спектр поглощения и испускания флуорофора Cy5 ( $\lambda_{\text{макс. возб.}} = 650 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{макс. исп.}} = 670 \text{ нм}$ ) не имеет перекрытия со спектром поглощения и испускания красителя SYBR Green I, интеркалированного в дцДНК ( $\lambda_{\text{макс. возб.}} = 497 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{макс. исп.}} = 520 \text{ нм}$ ), а для флуорофора Cy3 ( $\lambda_{\text{макс. возб.}} = 550 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{макс. исп.}} = 570 \text{ нм}$ ) спектр поглощения лишь немного перекрывается со спектром испускания SYBR Green I. Изучение зависимости интенсивности флуоресценции SYBR Green I от концентрации дцДНК показало, что флуоресцентный сигнал линейно зависит от концентрации дцДНК в диапазоне от 0 до 70 нг.

Зависимость флуоресценции красителя SYBR Green I, интеркалированного в дцДНК, от времени воздействия экзонуклеазы  $\lambda$  на дцДНК-субстраты с гидроксильрованными или мечеными флуорофорами 5'-концами приведена на рис. 2, где показано, что в выбранных условиях обработки дцДНК экзонуклеазой флуоресцентный сигнал SYBR Green I ослабевает по мере протекания реакции для дцДНК-субстрата, 5'-концы которого содержат ОН-группы, что свидетельствует о разрушении дуплекса ДНК несмотря на низкую каталитическую активность  $\lambda$ -экзонуклеазы в отношении нефосфорилированных дцДНК-субстратов [1]. Для обоих субстратов, 5'-концы которых содержали флуорофоры Cy3 и Cy5, падение флуоресцентного сигнала, соответствующего дцДНК, практически не наблюдалось (находилось в пределах по-

грешности измерений). Таким образом, экспериментально установлено, что флуоресцентные метки Cy3 и Cy5 на 5'-концах защищают ДНК от разрушения экзонуклеазой фага  $\lambda$ .

**Получение флуоресцентно-меченной оцДНК с использованием экзонуклеазы фага  $\lambda$ .** Защитные свойства флуорофоров Cy3 и Cy5 в отношении экзонуклеазы фага  $\lambda$  были использованы для получения флуоресцентно-меченных библиотек оцДНК. Было проведено сравнение процесса расщепления экзонуклеазой фага  $\lambda$  нескольких дцДНК-субстратов, полученных на основе библиотеки случайных последовательностей ДНК S4 bank, которые отличались друг от друга метками на 5'-концах смысловой и обратной цепей. Всего было использовано 6 субстратов, смысловая цепь которых содержала на 5'-конце либо ОН-группу, либо флуорофор Cy3 или Cy5, а обратная – либо 5'-фосфат, либо 5'-ОН-группу.

Таким образом, были получены следующие дцДНК субстраты (рис 1, Б):

- с 5'-Cy3-меткой на смысловой цепи и 5'-фосфатом на обратной цепи;
- с 5'-Cy3-меткой на смысловой цепи и 5'-ОН на обратной цепи;
- с 5'-Cy5-меткой на смысловой цепи и 5'-фосфатом на обратной цепи;
- с 5'-Cy5-меткой на смысловой цепи и 5'-ОН на обратной цепи;
- с 5'-ОН на смысловой цепи и 5'-фосфатом на обратной цепи;
- с 5'-ОН на обеих цепях.

Все полученные дцДНК-субстраты были очищены, чистоту препаратов и размер продукта контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Каждый из субстратов в

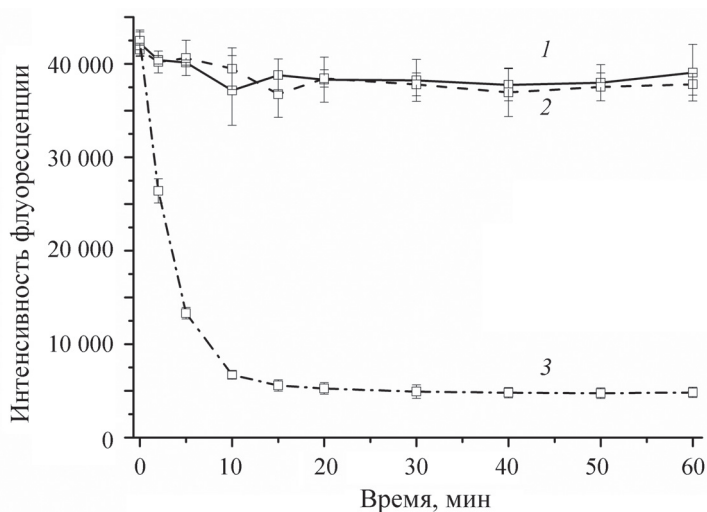


Рис. 2. Анализ расщепления дцДНК экзонуклеазой фага  $\lambda$  во времени в зависимости от модификации 5'-концов ДНК: 1 – 5'-Cy3/5'-Cy3; 2 – 5'-Cy5/5'-Cy5; 3 – 5'-OH/5'-OH

количестве 250 нг инкубировали с экзонуклеазой фага  $\lambda$  в течение 2 ч. Результат электрофореза проб приведен на рис. 3.

Для детального анализа процесса получения оцДНК с помощью экзонуклеазы фага  $\lambda$  была изучена кинетика расщепления этих субстратов. Аликвоты реакционной смеси отбирали через определенные промежутки времени и анализировали с помощью электрофореза в ПААГ, результат представлен на рис. 4. Интенсивности полос ДНК количественно оценивали с помощью программы ImageJ (рис. 5).

Исходная ДНК, которой на электрофореграмме (рис. 3) должна соответствовать полоса длиной около 100 пар оснований, не наблюдалась ни в одной из проб. Следовательно, в течение 2 ч фермент гидролизует как фосфорилированные, так и нефосфорилированные цепи, что подтверждает способность фермента расщеплять нефосфорилированную ДНК [1, 17, 18]. Из рис. 4, 5 видно, что дцДНК разрушается быстро. Для субстратов с флуоресцентными метками в случае, если обратная цепь субстрата фосфорилирована, полоса дцДНК исчезает в течение 10 мин при инкубировании 500 нг субстрата с 10 Ед фермента. (рис. 4, А, В; 5, А, В). Если обратная цепь нефосфорилирована, обратная цепь исчезает медленнее, что согласуется с данными о субстратной специфичности экзонуклеазы фага  $\lambda$ , и полоса, соответствующая дцДНК, перестает детектироваться в геле спустя 50 мин после начала реакции (рис. 4, Б, Г; 5 Б, Г). Расщепление субстратов как с 5'-ОН, так и с 5'-фосфатом протекает по одинаковому процессивному механизму, но нефосфо-

рированный субстрат разрушается медленнее, поскольку образующийся в этом случае фермент-субстратный комплекс более инертен [17]. Однако, если ферменту удастся отщепить первый нефосфорилированный нуклеозид, дальше процесс разрушения цепи ДНК протекает с такой же скоростью, как и для фосфорилированного субстрата [18]. Таким образом, в процессе получения с помощью экзонуклеазы фага  $\lambda$  одноцепочечной ДНК из субстрата, смысловая цепь которого имеет ОН-

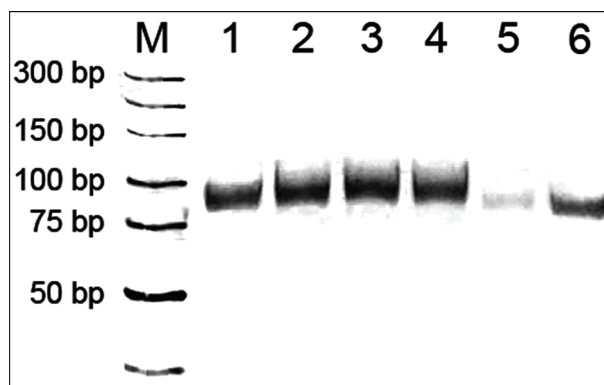


Рис. 3. Анализ проб после 2 ч инкубирования с экзонуклеазой фага  $\lambda$  с помощью неденатурирующего электрофореза в ПААГ: А – дцДНК-субстрат, содержащий 5'-Cy3 метку на смысловой цепи и 5'-фосфат на обратной цепи; Б – дцДНК-субстрат, содержащий 5'-Cy3 метку на смысловой цепи и 5'-ОН на обратной цепи; В – дцДНК-субстрат, содержащий 5'-Cy5 метку на смысловой цепи и 5'-фосфат на обратной цепи; Г – дцДНК-субстрат, содержащий 5'-Cy5 метку на смысловой цепи и 5'-ОН на обратной цепи; Д – дцДНК-субстрат, содержащий 5'-ОН на смысловой цепи и 5'-фосфат на обратной цепи; Е – дцДНК-субстрат, оба 5'-конца которого гидроксильрованы; М – маркер длины дцДНК

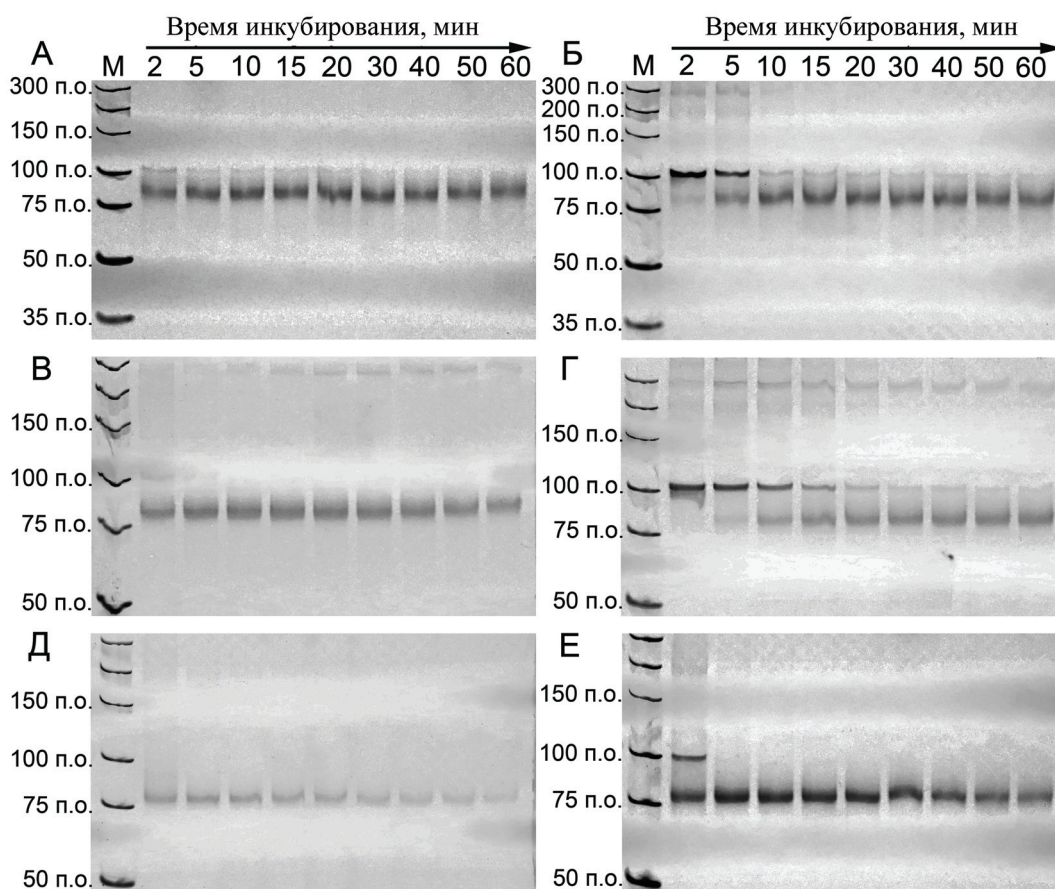


Рис. 4. Результаты нативного электрофореза в ПААГ различных проб ДНК в ходе расщепления экзонуклеазой фага  $\lambda$ : А – дцДНК-субстрат, содержащий 5'-Cy3 метку на смысловой цепи и 5'-фосфат на обратной цепи; Б – дцДНК-субстрат, содержащий 5'-Cy3 метку на смысловой цепи и 5'-ОН на обратной цепи; В – дцДНК-субстрат, содержащий 5'-Cy5 метку на смысловой цепи и 5'-фосфат на обратной цепи; Г – дцДНК-субстрат, содержащий 5'-Cy5 метку на смысловой цепи и 5'-ОН на обратной цепи; Д – дцДНК-субстрат, содержащий 5'-ОН на смысловой цепи и 5'-фосфат на обратной цепи; Е – дцДНК-субстрат, оба 5'-конца которого гидроксильрованы; М – маркер длины дцДНК

группу на 5'-конце, нельзя избежать частичного повреждения этой цепи.

Из рис. 4, 5 видно, что в случае, если на основной цепи дцДНК отсутствует флуоресцентная метка, полоса дцДНК исчезает быстрее, чем для флуоресцентно меченного субстрата. Субстрат с ОН-группами на обоих концах исчез спустя 5 мин после начала реакции (рис. 4, Е; 5, Е). Таким образом, флуоресцентные метки защищают меченную ими цепь ДНК от расщепления экзонуклеазой фага  $\lambda$ , в результате гидролизуеться только обратная цепь вне зависимости от того, была она фосфорилирована или нет.

Экзонуклеаза фага  $\lambda$  имеет способность расщеплять и одноцепочечную ДНК, хотя и по другому, дистрибутивному механизму [18] и с более низкой эффективностью [22]. Из рис. 3 видно, что интенсивность полос оцДНК, цепи которых не содержали флуоресцентных меток на 5'-концах, заметно ниже по сравнению с интенсивностью полос ДНК

с флуоресцентными метками Cy3 и Cy5, хотя исходные количества дцДНК и объемы проб, вносимых в гель, были одинаковы. Результаты электрофореза проб, отобранных в ходе протекания реакции, также показывают, что фермент расщепляет оцДНК, 5'-концы которой не защищены флуоресцентными метками (рис. 4, Д, Е и 5, Д, Е). Анализ интенсивности полос ДНК с помощью программы ImageJ показал, что оцДНК без флуорофоров разрушается при обработке экзонуклеазой фага  $\lambda$ , особенно в случае, если обратная цепь дцДНК-субстрата была фосфорилирована. После 60-минутного воздействия фермента сохраняется всего 20% оцДНК, по сравнению с тем количеством, которое присутствует в реакционной смеси на второй минуте (рис. 5, Д). Для всех субстратов, смысловая цепь которых содержала флуорофоры Cy3 и Cy5, наблюдалось длительное сохранение полосы оцДНК. Следовательно, присутствие флуорофоров Cy3 и Cy5 на 5'-концах позволяет защи-

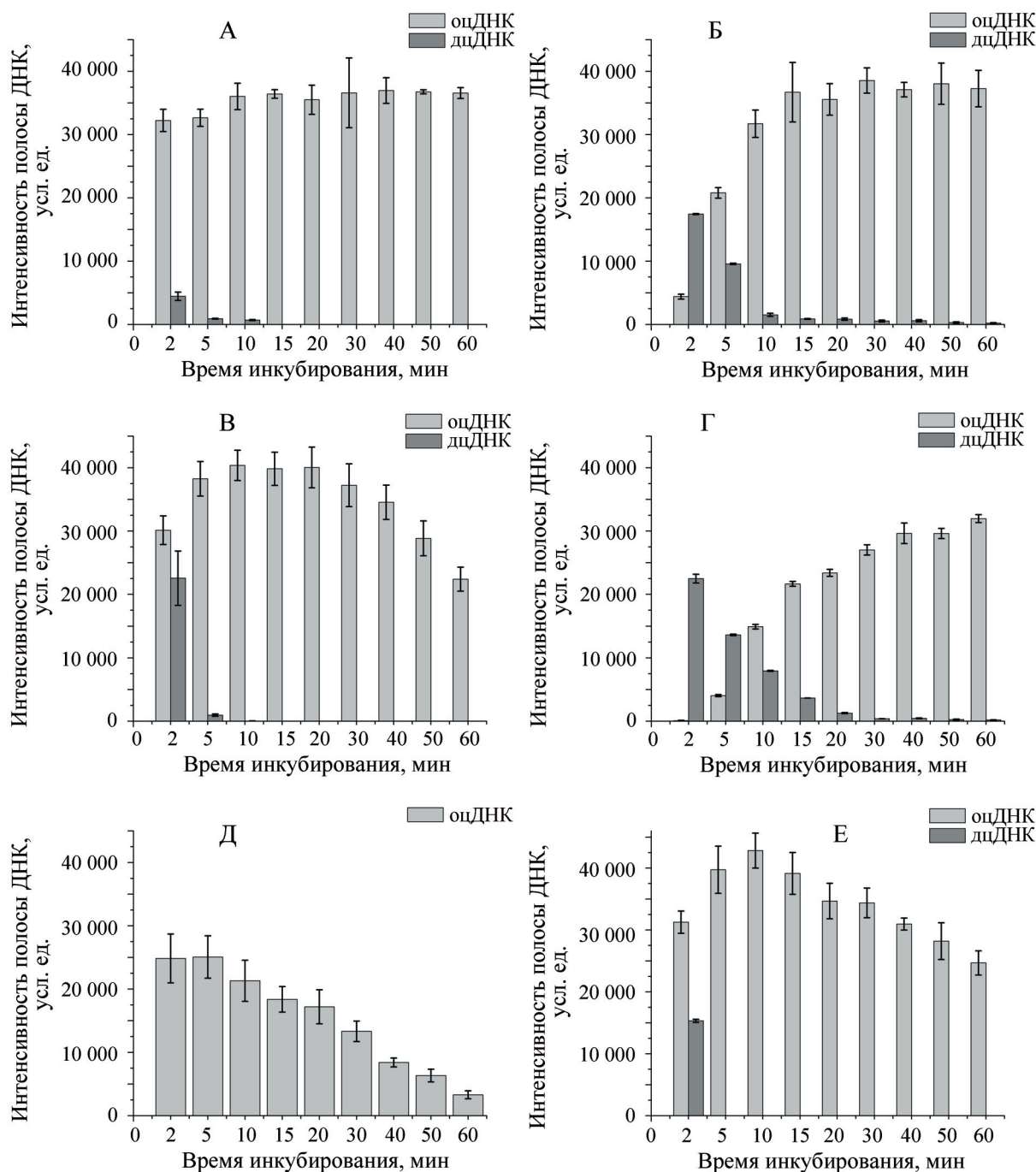


Рис. 5. Результаты анализа электрофореза проб ДНК в ходе расщепления экзонуклеазой фага  $\lambda$  с помощью программы ImageJ: А – дцДНК-субстрат, содержащий метку 5'-Су3 на смысловой цепи и 5'-фосфат на обратной цепи; Б – дцДНК-субстрат, содержащий 5'-Су3 метку на смысловой цепи и 5'-ОН на обратной цепи; В – дцДНК-субстрат, содержащий 5'-Су5 метку на смысловой цепи и 5'-фосфат на обратной цепи; Г – дцДНК-субстрат, содержащий 5'-Су5 метку на смысловой цепи и 5'-ОН на обратной цепи; Д – дцДНК-субстрат, содержащий 5'-ОН на смысловой цепи и 5'-фосфат на обратной цепи; Е – дцДНК-субстрат, оба 5'-конца которого гидроксильированы; М – маркер длины дцДНК

титель от разрушения ферментом не только дцДНК, но и оцДНК.

Вероятно, эффект защиты как дцДНК, так и оцДНК флуоресцентными метками Су3 и Су5 объясняется стерической блокировкой активного центра фермента. Экзонуклеаза фага  $\lambda$  имеет в своей

структуре канал, в который может войти дцДНК, а выйти может только оцДНК [18, 23]. Известно, что объемные молекулы интеркалирующих флуоресцентных красителей ингибируют работу фермента, поскольку диаметр данного канала ограничен [24]. Также известно, что липкий 5'-конец длиной

в 10 оснований также защищает ДНК от расщепления экзонуклеазой фага  $\lambda$ , так как фермент связывается с такими субстратами в инертный комплекс [17]. Следовательно, стерические препятствия для работы экзонуклеазы фага  $\lambda$  могут возникать либо из-за большого размера молекулы красителей  $Cy3$  и  $Cy5$ , что препятствует вхождению меченой ДНК в канал активного центра фермента, либо из-за формирования инертного фермент-субстратного комплекса.

**Практические аспекты применения меток  $Cy3$  и  $Cy5$  для получения библиотек случайных последовательностей флуоресцентно-меченой оцДНК для процедуры SELEX.** Основные ограничения для использования экзонуклеазы фага  $\lambda$  при получении оцДНК заключаются в накоплении нежелательного побочного продукта ПЦР на этапе амплификации и неполном расщеплении дцДНК. Количество побочного продукта можно минимизировать, тщательно оптимизировав количество циклов амплификации с использованием асимметрической ПЦР [15, 16]. Проблема неполного расщепления ДНК возникает в основном из-за того, что на практике сложно разделить оцДНК и дцДНК, которая может оставаться после реакции вследствие слишком короткого времени инкубирования с экзонуклеазой фага  $\lambda$ , неполного удаления защиты с 5'-фосфата при синтезе олигонуклеотидов [15, 16] и неполного фосфорилирования 5'-конца праймера при синтезе [12, 13, 15, 16]. Поэтому время инкубирования с ферментом требует тщательной оптимизации при использовании обычного ДНК-субстрата для получения оцДНК: при недостаточном времени инкубирования остается дцДНК, при избыточном – расщепляется оцДНК. Эти ограничения могут сниматься в случае использования меток  $Cy3$  и  $Cy5$  для защиты 5'-конца смысловой цепи. Время воздействия фермента при этом можно существенно увеличить для

полного удаления обратной цепи даже в случае низкого процента фосфорилирования, не опасаясь при этом повредить оцДНК.

Для оценки времени, необходимого для получения библиотеки оцДНК, меченой флуорофорами  $Cy3$  и  $Cy5$  на 5'-конце, в ходе SELEX, нами была изучена зависимость времени, необходимого для расщепления второй цепи, от начальной концентрации субстрата. В качестве субстрата была использована дцДНК, у которой смысловая цепь содержала  $Cy3$  или  $Cy5$  на 5'-конце, а обратная цепь была фосфорилирована по 5'-концу. Разные количества ДНК (от 0,5 до 1,5 мкг) подвергали воздействию экзонуклеазы фага  $\lambda$  (10 Ед). Эксперимент показал, что для расщепления каждых 500 нг дцДНК требуется около 6 мин вне зависимости от типа флуоресцентной метки.

На основании проведенных экспериментов можно отметить два основных преимущества использования меток  $Cy3$  и  $Cy5$  в ходе SELEX. Во-первых, наличие флуоресцентных меток может быть использовано для оценки количества ДНК и отслеживания прогресса отбора аптамеров в случае использования протоколов Flu-Mag или Capture SELEX [2, 3, 25]. Во-вторых, флуорофоры  $Cy3$  и  $Cy5$  на 5'-концах смысловой цепи ДНК упрощают использование экзонуклеазы фага  $\lambda$  для простого и быстрого получения оцДНК, благодаря нивелированию активности фермента на 5'-гидроксильном конце дцДНК или оцДНК, независимо от концентрации фермента и практически независимо от времени протекания реакции в пределах 1 ч.

Таким образом, способность флуоресцентных меток  $Cy3$  и  $Cy5$  блокировать нежелательную активность экзонуклеазы фага  $\lambda$  является дополнительным преимуществом при их использовании в процессе SELEX для получения оцДНК.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект №16-19-10697).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Little J.W. // J. Biol. Chem. 1967. Vol. 242. N 4. P. 679.
2. Stoltenburg R., Reinemann C., Strehlitz B. // Anal. Bioanal. Chem. 2005. Vol. 383. N 1. P. 83.
3. Stoltenburg R., Nikolaus N., Strehlitz B. // J. Anal. Methods Chem. 2012. Vol. 2012. P. 415697.
4. Rhee H.S., Pugh B.F. // Cell. 2011. Vol. 147. N 6. P. 1408.
5. Song C., Zhao M. // Anal. Chem. 2009. Vol. 81. N 4. P. 1383.
6. Zhang H., Zhao Z., Lei Z., Wang Z. // Anal. Chem. 2016. Vol. 88. N 23. P. 11358.
7. Shi X.-M., Fan G.-C., Shen Q., Zhu J.-J. // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2016. Vol. 8. N 51. P. 35091.
8. Xu H., Wang L., Ye H., Yu L., Zhu X., Lin Z., Wu G., Li X., Liu X., Chen G. // Chem. Commun. 2012. Vol. 48. N 51. P. 6390.
9. Szeitner Z., András J., Gyurcsányi R.E., Mészáros T. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2014. Vol. 101. P. 58.
10. Ellington A.D., Szostak J.W. // Nature. 1990. Vol. 346. N 6287. P. 818.
11. Robertson D.L., Joyce G.F. // Nature. 1990. Vol. 344. N 6265. P. 467.



12. Svobodová M., Pinto A., Nadal P., O' Sullivan C.K. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. Vol. 404. N 3. P. 835.
13. Marimuthu C., Tang T.-H., Tominaga J., Tan S.-C., Gopinath S.C.B. // *Analyst.* 2012. Vol. 137. N 6. P. 1307.
14. Null A.P., Hannis J.C., Muddiman D.C. // *Analyst.* 2000. Vol. 125. N 4. P. 619.
15. Citartan M., Tang T.-H., Tan S.-C., Gopinath S.C.B. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 27. N 5. P. 1167.
16. Avci-Adali M., Paul A., Wilhelm N., Ziemer G., Wendel H.P. // *Molecules.* 2009. Vol. 15. N 1. P. 1.
17. Mitsis P.G., Kwagh J.G. // *Nucleic Acids Res.* 1999. Vol. 27. N 15. P. 3057.
18. Subramanian K., Rutvisuttinunt W., Scott W., Myers R.S. // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31. N 6. P. 1585.
19. Schindelin J., Rueden C.T., Hiner M.C., Eliceiri K.W. // *Mol. Reprod. Dev.* Vol. 82. N 7–8. P. 518.
20. Kim Y.S., Hyun C.J., Kim I.A., Gu M.B. // *Bioorg. Med. Chem.* 2010. Vol. 18. N 10. P. 3467.
21. Priyanka S., Shorie M., Bhalla V., Pathania P., Suri C.R. // *Chem. Commun. (Camb.).* 2014. Vol. 50. N 9. P. 1080.
22. Sriprakash K.S., Lundh N., Huh M.M.-O., Radding C.M. // *J. Biol. Chem.* 1975. Vol. 250. N 14. 5438.
23. Zhang J., McCabe K.A., Bell C.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011. Vol. 108. N 29. P. 11872.
24. Tolun G., Myers R.S. // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31. N 18. P. e111.
25. Paniel N., Istamboulié G., Triki A., Lozano C., Barthelmebs L., Noguer T. // *Talanta.* 2017. Vol. 162. P. 232.

Поступила в редакцию 24.11.17

## USAGE OF FLUORESCENT LABELS CY3 AND CY5 FOR PROTECTION OF THE DNA STRAND AGAINST DEREGADATION UNDER $\lambda$ EXONUCLEASE TREATMENT

N.V. Komarova\*, S.I. Glukhov, M.S. Andrianova, A.E. Kuznetsov

*(Research and production complex "Technology center"; \*e-mail: nat.v.kom@gmail.com)*

**The enzyme  $\lambda$  exonuclease hydrolyses 5'-phosphorylated strands of double stranded DNA in 5' to 3' direction. In the research  $\lambda$  exonuclease activity towards DNA substrates containing Cy3 and Cy5 fluorescent labels at the 5'-ends is studied. Using fluorescent method of the enzyme activity measurement it is shown that dsDNA with both 5'-ends labeled with these fluorophores doesn't degrade under  $\lambda$  exonuclease treatment. The process of ssDNA production from dsDNA precursors with differently labeled 5'-ends is studied using electrophoretic separation of DNA in PAGE. Cy3 and Cy5 fluorophores at 5'-end of the DNA strand are shown to protect the strand from the enzyme cleavage both in duplex and in the single-stranded form. These labels can be used for production of fluorescently labeled single stranded DNA.**

**Key words:**  $\lambda$  exonuclease, fluorescent label, preparation of single stranded DNA.

**Сведения об авторах:** Комарова Наталья Владимировна – ст. науч. сотрудник НПК «Технологический центр», канд. хим. наук (nat.v.kom@gmail.com); Глухов Сергей Игоревич – науч. сотр. НПК «Технологический центр», канд. биол. наук (serglukhovmb@gmail.com); Андрианова Мария Сергеевна – науч. сотр. НПК «Технологический центр», канд. хим. наук (smatika1987@gmail.com); Кузнецов Александр Евгеньевич – начальник лаборатории интегральных биохимических наносенсоров НПК «Технологический центр», канд. хим. наук (kae@tscen.ru).