БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 3, с. 327–340

УДК 577.11+004.942

МАТРИЧНАЯ СБОРКА ДНК-НАНОСТРУКТУР ИЗ РАЗВЕТВЛЕННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

© 2021 г. А. А. Фокина*, **, Ю. Е. Полетаева*, Е. А. Буракова*, **, А. Ю. Бакулина*, ****, Т. С. Зацепин*****, ******, Е. И. Рябчикова*, ***, Д. А. Стеценко*, **, #**

**ФГАОУВО "Новосибирский государственный университет", Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2*

***ФГБУН Федеральный исследовательский центр "Институт цитологии и генетики" СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 10*

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

*****ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, Россия, 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово*

******Сколковский институт науки и технологий, Россия, 121205, Московская обл., Инновационный центр "Сколково", Большой бульвар, 30, стр. 1*

*******Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3*

Поступила в редакцию 17.10.2020 г.
После доработки 26.11.2020 г.
Принята к публикации 20.12.2020 г.

Ранее нами был предложен способ построения трехмерных наноконструкций на основе нуклеиновых кислот, основанный на матричной сборке с использованием в качестве матрицы и строительных блоков разветвленных олигонуклеотидов, в состав которых включены линкеры ненуклеотидной природы, в частности точки разветвления, соединяющие две или три олигонуклеотидные цепи. В данной работе мы осуществили синтез разветвленных олигонуклеотидных матриц (для сборки ДНК-тетраэдра и ДНК-куба) и разветвленного олигонуклеотидного строительного блока, а также предприняли попытку матричной сборки ДНК-тетраэдра.

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, ДНК-нанотехнология, твердофазный синтез, фотолабильная защитная группа, клик-химия, реакция азид-алкинового [3+2]циклоприсоединения, промотируемая напряжением цикла (SPAAC)

DOI: 10.31857/S0132342321030064

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее динамично развивающихся направлений химии нуклеиновых кислот выступает ДНК-нанотехнология [1, 2], которая рассматривает молекулу ДНК как уникальный материал для конструирования разнообразных наноархитектур [3], что открывает возможность создания на основе ДНК динамических наноустройств [4], наномашин [5] и нанороботов [6, 7]. В основе данного применения лежит присущая полинуклеотидам способность к комплементарному уотсон-криковскому связыванию, а также к образованию структур более высокого порядка [3]. Предложенный в 2006 г. метод ДНК-оригами [8], состоящий в "укладке" (folding) протяженной одноцепочечной молекулы ДНК, например, кольцевого генома фага M13, с помощью сотен олигонуклеотидов-"скрепок", комплементарных уникальным участкам ДНК, за прошедшие полтора десятилетия развился в практическую технологию формирования двумерных и трехмерных ДНК-наноструктур с потенциалом применения в биомедицине для биоанализа [9], создания биосенсоров [10], биоимиджинга [11], доставки ле-

Сокращения: ОН – олигонуклеотид; РО – разветвленный олигонуклеотид; РОМ – разветвленная олигонуклеотидная матрица; РОСТ – разветвленный олигонуклеотидный строительный блок; РЭ – размыкаемый элемент; BCN – бицикло[6.1.0]нонин-4; ВР – краситель бромфеноловый синий; DMTr – 4,4'-диметокситритил; DTT – дитиотреит; EtBr – бромистый этидий; MMTr – 4-метокситритил; NPOM – 1-(2-нитропиперонил)этоксиметильная группа; SPAAC – реакция азид-алкинового [3+2]циклоприсоединения, промотируемая напряжением цикла; TEAA – ацетат триэтиламмония; THPTA – *трис*-гидроксипропилтриазолилметиламин; префиксы d и r в обозначениях олигодезокси- и 2'-*O*-метилрибонуклеотидов опущены.

Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-49-63; эл. почта: d.stetsenko@nsu.ru).

карств [12, 13] и иммунотерапии [14]. В основе большинства современных вариантов ДНК-оригами лежит сочетание компьютерных алгоритмов программируемой самосборки молекул ДНК [15, 16] с методами манипуляции протяженными ДНК из арсенала молекулярной биологии [17]. Однако использованию методов химической модификации участков нуклеиновых кислот при рациональном конструировании наноархитектур, на наш взгляд, все еще уделяется недостаточно внимания [18]. Это приводит к усложнению и увеличению размеров и массы ДНК-модулей для сборки наноархитектур, что может вызывать дополнительные проблемы при проникновении в клетку [19]. Представляется вероятным, что объемные ДНК-модули могут быть заменены относительно простыми синтетическими модифицированными олигонуклеотидами, в частности разветвленными олигонуклеотидами. Это позволило бы расширить интервал размеров получаемых ДНК-наноструктур в направлении нижней границы диапазона (~10 нм). Таким образом, дополнение метода ДНК-оригами приемами из арсенала твердофазного олигонуклеотидного синтеза и химической модификации нуклеиновых кислот с целью создания новых технологий конструирования трехмерных нанообъектов и функциональных наноустройств представляется актуальной задачей.

В ранее опубликованной работе мы предложили способ конструирования дискретных многогранников на основе нуклеиновых кислот ("энкаэдров") по принципу матричной сборки из разветвленных олигонуклеотидных блоков, формирующих вершины и ребра энкаэдра, с использованием в качестве матрицы (каркаса) разветвленного олигонуклеотида (РО), структура которого определяется формой целевого многогранника, например, тетраэдра, куба, октаэдра и т.п. [20]. Наиболее подходящим способом получения соответствующих РО представляется комбинация автоматизированного твердофазного синтеза (с использованием ненуклеозидных фосфитамидных реагентов различной функциональности) с постсинтетической конъюгацией в растворе, например, при помощи методов клик-химии [21].

Ранее нами был обоснован расчетами выбор последовательностей олигонуклеотидов для конструирования разветвленных олигонуклеотидных матриц (РОМ) для сборки ДНК-тетраэдра, ДНК-куба и ДНК-аналога фуллерена С24, а также разветвленного олигонуклеотидного строительного блока (РОСТ), общего для всех этих топологий [20]. Был определен набор необходимых ненуклеозидных разветвляющих и модифицирующих реагентов для получения матриц и разветвленного строительного блока.

Настоящая работа была сосредоточена на решении двух основных задач: 1) получение разветвленных олигонуклеотидов (РО), служащих для построения олигонуклеотидных матриц для сборки ДНК-тетраэдра и ДНК-куба, и разветвленного олигонуклеотидного строительного блока (РОСТ), общего для обоих многогранников; 2) практическая отработка подходов к конструированию конкретных энкаэдров (на примере ДНК-тетраэдра) на основе направленной самосборки разветвленных олигонуклеотидных блоков на каркасе разветвленной олигонуклеотидной матрицы (РОМ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Простейшей моделью для отработки условий матричной сборки энкаэдров служит ДНК-тетраэдр. Предложенная последовательность операций матричной сборки ДНК-тетраэдра изложена в работе Bakulina et al. [20]. В качестве "четырехвалентной" (т.е. формирующей четыре вершины будущего тетраэдра) разветвленной олигонуклеотидной матрицы (РОМ-1) для сборки ДНК-тетраэдра выступает димер разветвленного олигонуклеотида Y ("вилки"), формирующийся за счет самокомплементарного олиго-2'-*О*-метилрибонуклеотида ОН1 и содержащий четыре одноцепочечных олигодезоксирибонуклеотида ОН2 (рис. 1*а*). Первый шаг сборки – гибридизация матрицы РОМ-1 с разветвленным олигонуклеотидным строительным блоком – "звездочкой" РОСТ-1 (рис. 1*е*), формирующая четыре вершины тетраэдра, с образованием дуплексов ОН2:ОН3.

В результате гибридизации самокомплементарных олигодезоксирибонуклеотидов ОН4 из состава "звездочки" РОСТ-1 (рис. 1*е*) образуются ребра тетраэдра, при этом формируется пирамидальная супрамолекулярная двуцепочечная ДНК-конструкция в виде ДНК-тетраэдра, вершины которого соединены внутренним каркасом из матрицы РОМ-1. В качестве побочных продуктов возможно получение изомерных конструкций, имеющих отличную от тетраэдра топологию.

Для конструирования матрицы РОМ-1 был получен разветвленный олигонуклеотид Y (рис. 1*а*). Как следует из анализа электрофореграмм денатурирующего и нативного гель-электрофореза, матрица РОМ-1 образуется путем димеризации "вилки" Y за счет аутогибридизации самокомплементарного олиго-2'-*О*-метилрибонуклеотида ОН1 (рис. 2).

Для матричной сборки ДНК-куба требуется "восьмивалентная" разветвленная матрица РОМ-2, формирующая восемь вершин куба (например, рис. 1*д*). Попытка прямого твердофазного синтеза олигонуклеотида, соответствующего данной топологии матрицы, не увенчалась успехом из-за

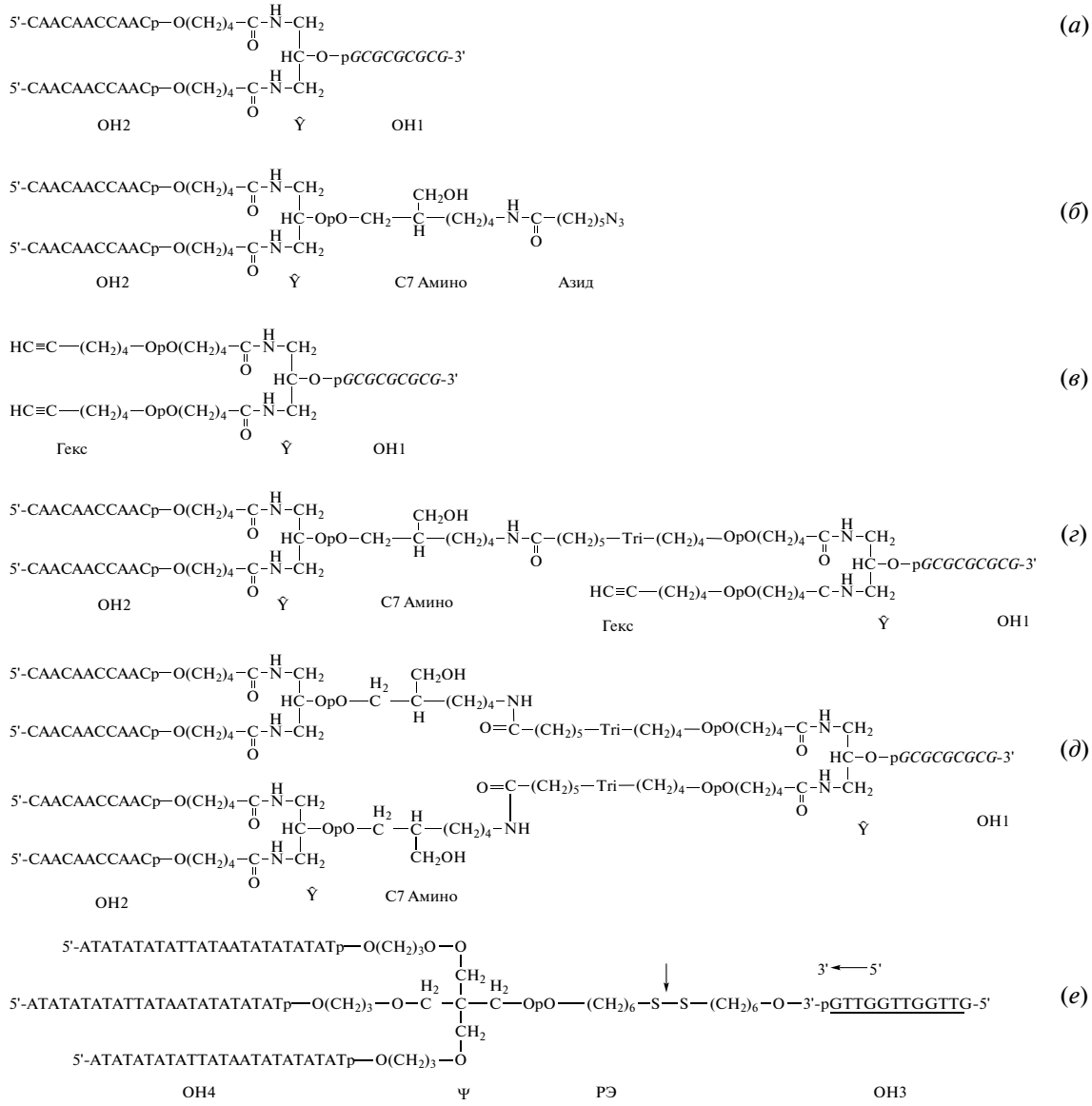

Рис. 1. Структуры и последовательности разветвленных олигонуклеотидов (РО), полученных на первом этапе работы: (*а*) – "вилка" Y – мономер для сборки "четырехвалентной" разветвленной олигонуклеотидной матрицы (РОМ-1); (*б*) – 5-азидогексаноильный и (*в*) – 1-гексинильный разветвленные олигонуклеотиды (РО-азид и РО-гекс соответственно); (*г*) – побочный продукт, образующийся в результате неполного протекания клик-реакции циклоприсоединения CuAAC лишь по одной из двух 1-гексинильных групп РО-гекс; (*д*) – мономер для сборки "восьмивалентной" разветвленной олигонуклеотидной матрицы РОМ-2; (*е*) – "звездочка" – разветвленный олигонуклеотидный строительный блок (РОСТ-1). Обозначения: Ŷ – остаток симметричного удвоителя (symmetric doubler); Ψ – остаток симметричного утроителя (trebler); p – фосфодиэфирная группа –P(=O)(–O–)–; OH – олигонуклеотид; РЭ – размыкаемый элемент, вертикальной стрелкой указана расщепляемая дисульфидная связь; Гекс – остаток 1-гексина; Азид – 6-азидогексаноильная группа; Tri – остаток 1,2,3-триазола с заместителями в положениях 1 и 5 (слева направо); горизонтальной стрелкой указано направление последовательности "обратного" олигодезоксирибонуклеотида OH3 – от 5'- к 3'-концу. Дезоксирибонуклеотиды обозначены прописными буквами, 2'-*O*-метилрибонуклеотиды – курсивом, последовательность OH3, собранная из "обратных" 5'-фосфитамидов в направлении 5'–3', подчеркнута; опущены префиксы d и r для обозначения олигодезоксирибонуклеотидов и олиго-2'-*O*-метилрибонуклеотидов соответственно.

низкого выхода полноразмерного продукта после проведения двух конденсаций симметричного удвоителя (Ŷ) подряд. Поэтому было принято решение конструировать матрицу РОМ-2 с помощью постсинтетической конъюгации в растворе с использованием одного из наиболее популярных подходов клик-химии [21], а именно реакции катализируемого Cu(I) [2+3] циклоприсоединения азидов и алкинов (CuAAC) [22, 23].

Для получения мономера матрицы РОМ-2 (рис. 1*д*) были синтезированы два разветвленных

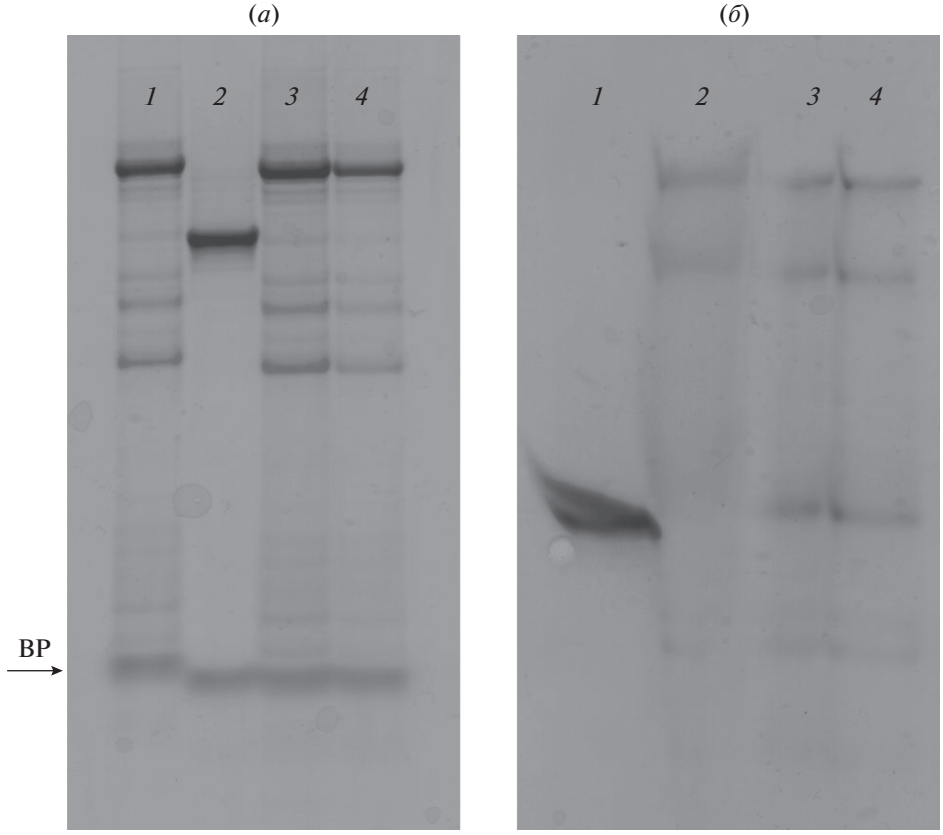

Рис. 2. (*а*) – Электрофоретический анализ олигонуклеотидов в 20%-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевину, с окрашиванием красителем Stains-All. Дорожки: *1* – "вилка" Y после 2 мин прогрева при 95°С и быстрого нанесения на гель под напряжением; *2* – маркер длины **D157** (одноцепочечный олигодезоксирибонуклеотид длиной 34 нт); *3* – "вилка" Y (0.1 о.е.); *4* – "вилка" Y (0.05 о.е.). ВР – краситель бромфеноловый синий; (*б*) – нативный электрофорез в 15%-ном ПААГ, окрашивание красителем Stains-All. Дорожки: *1* – **D157** после 2 мин прогрева при 95°С и быстрого нанесения на гель под напряжением; *2* – "вилка" Y в 1 М NaCl; *3* – "вилка" Y без 1 М NaCl; *4* – "вилка" Y без 1 М NaCl после 2 мин прогрева при 95°С с последующей инкубацией 10 мин при 0°С.

олигонуклеотида: РО-азид, содержащий одну 6-азидогексаноильную группу, введенную по 3'-концу ОН2 через аминолинкер С7 (рис. 1*б*), и РО-гекс, содержащий два остатка 1-гексина, введенные посредством конденсации коммерческого 1-гексинильного фосфитамида вслед за симметричным удвоителем на 5'-конце ОН1 (рис. 1*в*).

Конъюгация РО-азид и РО-гекс (4 : 1) по реакции CuAAC была осуществлена по методике, разработанной ранее [24]. Однако по данным гель-электрофореза (данные не приведены) основным продуктом реакции выступал монозамещенный конъюгат РО-гекс с одной молекулой РО-азид (рис. 1*г*) наряду с множественными полосами, вероятно, соответствующими деградации олигонуклеотидов при воздействии солей меди(I) и (II) даже в присутствии лиганда THPTA (*трис*-гидроксипропилтриазолилметиламин).

Чтобы избежать деградации олигонуклеотида в присутствии солей меди, было решено использовать для синтеза нового варианта матрицы РОМ-2' реакцию "безмедного клика", а именно некаталитическую реакцию алкин-азидного циклоприсоединения, промотируемую напряжением в производном циклооктина (SPAAC) [25–28]. Для решения этой задачи был синтезирован новый набор разветвленных олигонуклеотидов (рис. 3). Получение бициклононинового (BCN) производного (рис. 3*г*) протекало с высоким выходом из соответствующего 3'-аминогексильного предшественника и коммерческого активированного карбоната бицикло[6.1.0]нонина-4. Однако с очисткой диазидного компонента от примеси соответствующего монопроизводного возникли трудности. Полученные реакционные смеси не удавалось эффективно разделить ни с помощью офВЭЖХ, ни с помощью электрофореза в ПААГ. После перебора нескольких вариантов синтеза наилучший результат показало *бис*-азидоацетильное производное РО-азид' (рис. 3*б*), полученное с помощью коммерческого аминолинкера с последующей обработкой *N*-гидроксисукцинимидным эфиром азидоуксусной кислоты, приготовленным *in situ*.

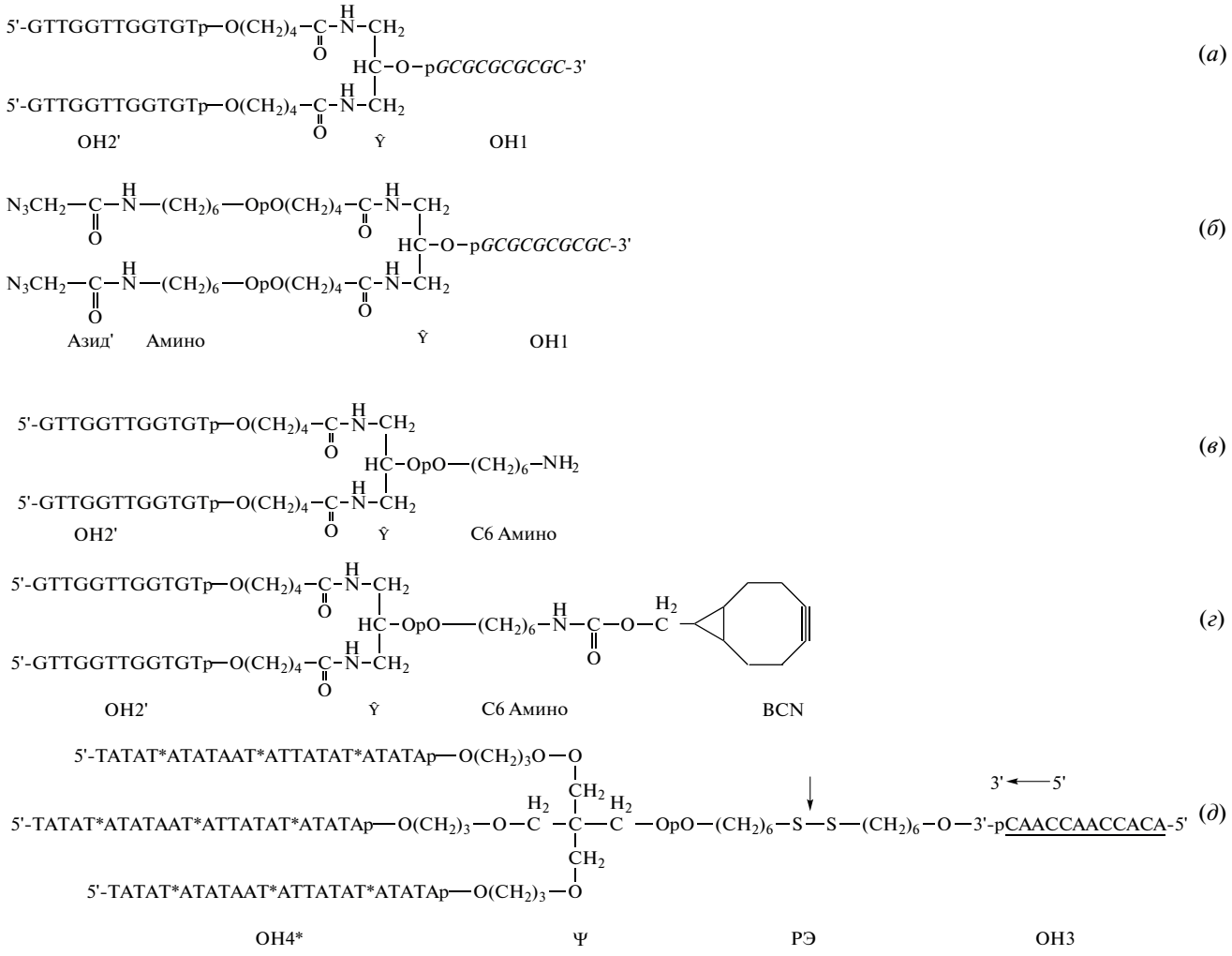

Рис. 3. Структуры и последовательности разветвленных олигонуклеотидов (РО), полученных на втором этапе работы: (*а*) – “вилки” Y – мономера для сборки “четырехвалентной” разветвленной олигонуклеотидной матрицы РОМ-1' для ДНК-тетраэдра; (*б*) – РО-азид' – азидного фрагмента “восьмивалентной” матрицы (РОМ-2') для сборки ДНК-куба; (*в*) – РО-С6-амино – исходного материала для синтеза бициклоциклононинового (BCN) фрагмента матрицы РОМ-2' (РО-BCN) (*г*); (*д*) – “звездочки” – разветвленного олигонуклеотидного строительного блока РОСТ-2'. Обозначения: Ŷ – остаток симметричного удвоителя (symmetric doubler); Ψ – остаток симметричного утроителя (trebler); p – фосфодиэфирная группа –P(=O)(–O–)–; OH – олигонуклеотид; РЭ – размыкаемый элемент, вертикальной стрелкой указана расщепляемая дисульфидная связь; C6 Амино – 6-аминогексильная группа; Амино – остаток аминолинкера; BCN – остаток бицикло[6.1.0]нонина-4; Азид' – азидоацетильная группа; T* – остаток тимидина с фотолабильной защитной группой (NPOM). Дезоксирибонуклеотиды обозначены прописными буквами, 2'-*O*-метилрибонуклеотиды – курсивом, последовательность OH3, собранная из “обратных” 5'-фосфитамидов в направлении 5'–3', подчеркнута, направление последовательности указано горизонтальной стрелкой; опущены префиксы d и r для обозначения олигодезоксирибонуклеотидов и олиго-2'-*O*-метилрибонуклеотидов соответственно.

Предпринятый синтез мономера матрицы РОМ-2' из РО-азид' и РО-BCN в соотношении 1 : 4 по реакции “безмедного клика” (SPAAC) (рис. 4) протекал значительно медленнее, чем каталитическая версия (CuAAC). В результате после 72 ч при 40°C, что значительно жестче условий, принятых в работе Jawalekar et al. [28] (комнатная температура, 12 ч), на электрофореграмме можно было зарегистрировать в основном образование монозамещенного продукта и лишь следовых количеств целевого дизамещенного олигонуклеотида (рис. 5). Таким образом, и этот путь конструирования “восьмивалентной матрицы” РОМ-2' не привел к успеху, и отработка условий для матричной сборки ДНК-куба требует дальнейших исследований.

Далее был осуществлен синтез разветвленных олигонуклеотидных строительных блоков – “звездочек” РОСТ-1 и РОСТ-2 (рис. 1*е* и рис. 3*д* соответственно), которые, по нашим расчетам, могут использоваться для сборки как ДНК-тетраэдра, так и ДНК-куба [20]. Наибольшие пробле-

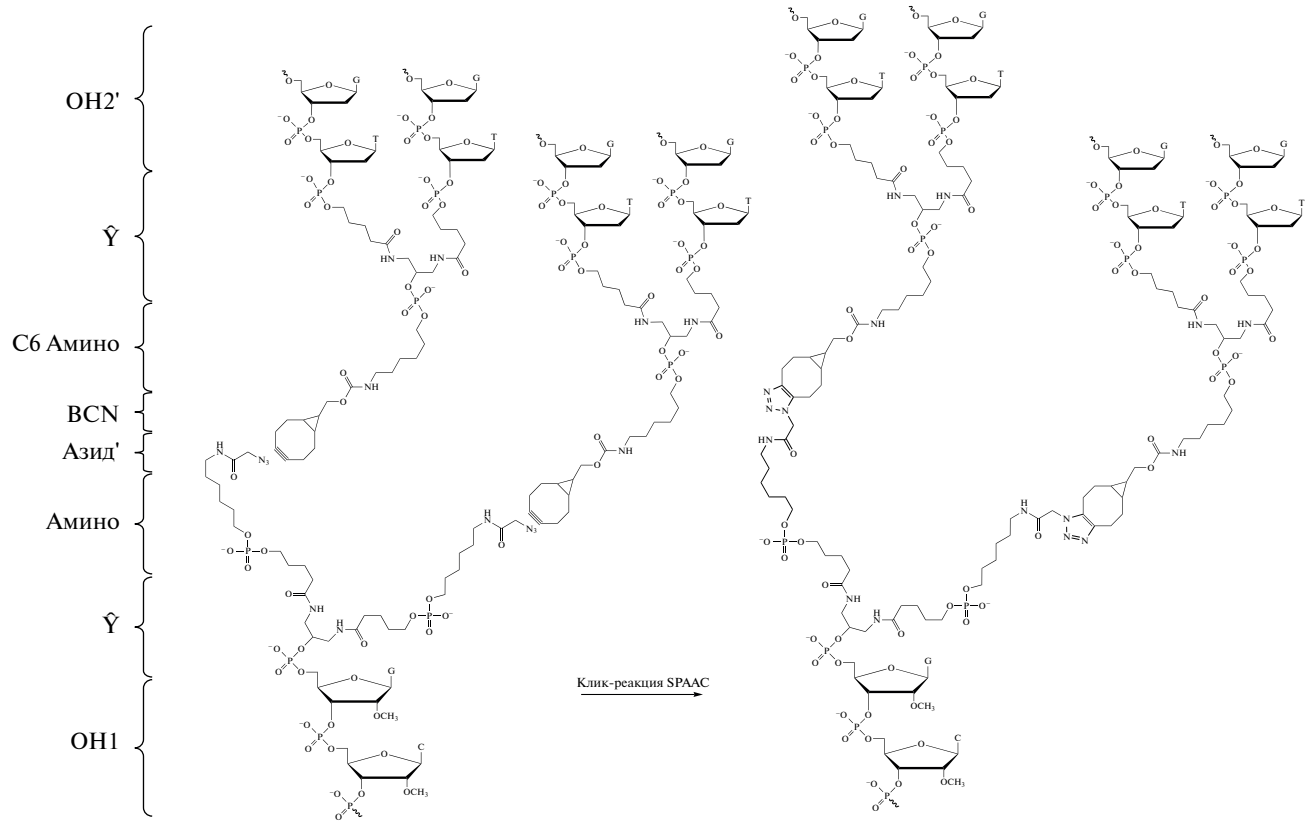

Рис. 4. Схема синтеза “восьмивалентной” матрицы РОМ-2' для ДНК-куба с помощью реакции “безмедного клика” (SPAAC) [14] между разветвленными олигонуклеотидами, содержащими азидоацетильные группы (Азид') и остатки бицикло[6.1.0]нонина-4 (BCN), между которыми происходит реакция [2+3]циклоприсоединения с образованием 1,4,5-тризамещенного 1,2,3-триазола. Обозначения у фигурных скобок слева соответствуют рис. 5.

мы вызвало введение размыкаемого элемента, а именно дисульфидной связи, с помощью коммерческого дисульфидного фосфитамида. Выход олигонуклеотида после 6 мин конденсации свежеприготовленного 0.15 М раствора дисульфидного фосфитамида в абсолютном ацетонитриле не превышал 40% по офВЭЖХ. Увеличение времени конденсации до 15 мин не привело к повышению выхода целевого компонента. При синтезе “звездочек” неудовлетворительная конденсация дисульфидного фосфитамида вызывала наибольшие потери продукта.

С использованием матрицы РОМ-1 и разветвленного олигонуклеотидного блока РОСТ-1 в соотношении 1 : 4 была предпринята матричная сборка ДНК-тетраэдра. Анализ реакционной смеси с помощью нативного гель-электрофореза в агарозе показал наличие продукта, соответствующего по молекулярной массе расчетной массе ДНК-тетраэдра (рис. 6). В то же время в смеси присутствовало значительное количество полимерных продуктов большой молекулярной массы, не обладающих подвижностью в геле. Образование высокомолекулярных продуктов можно объяснить неконтролируемой полимеризацией “звездочки” РОСТ-1 за счет гибридизации самокомплементарных олигонуклеотидов OH4 (рис. 1*e*).

С помощью просвечивающей электронной микроскопии было показано присутствие наряду с полимерными продуктами дискретных продуктов с линейными размерами <50 нм, которые могут соответствовать агрегатам “звездочки” РОСТ-1 (рис. 7).

Полученные результаты убедительно продемонстрировали необходимость использования защитной группы, которая препятствовала бы преждевременной аутогибридизации “звездочки”. В качестве защитной группы нами была использована фотолабильная 1-(2-нитропиперонил)-этоксиметильная группа (NPOM) в положении 3 остатка тимидина, предложенная ранее для сходных целей Deuters et al. [29–31]. Исследование скорости удаления NPOM-группы с остатка тимидина в составе модельного олигонуклеотида **D574** при облучении УФ-светом (λ = 365 нм) показало (табл. 1), что для >90%-ного отщепления в оптимизированных условиях требуется не менее 4 ч (рис. 8, дорожки *4* и *5*). Длина волны была подобрана с целью минимизации возможного образования фотодимера тимидина и других нежелательных

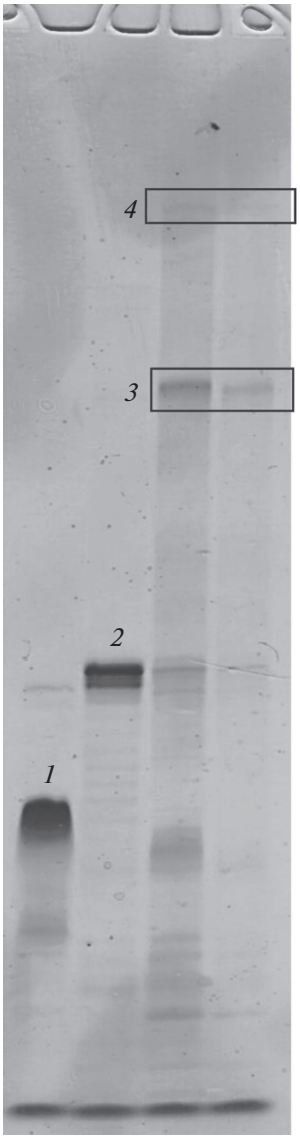

Рис. 5. Электрофореграмма реакции “безмедного” клика (SPAAC). Обозначения полос: *1* – Азид'; *2* – BCN; *3*, *4* – продукты циклоприсоединения моно- (основной) и *бис*- (следы) соответственно.

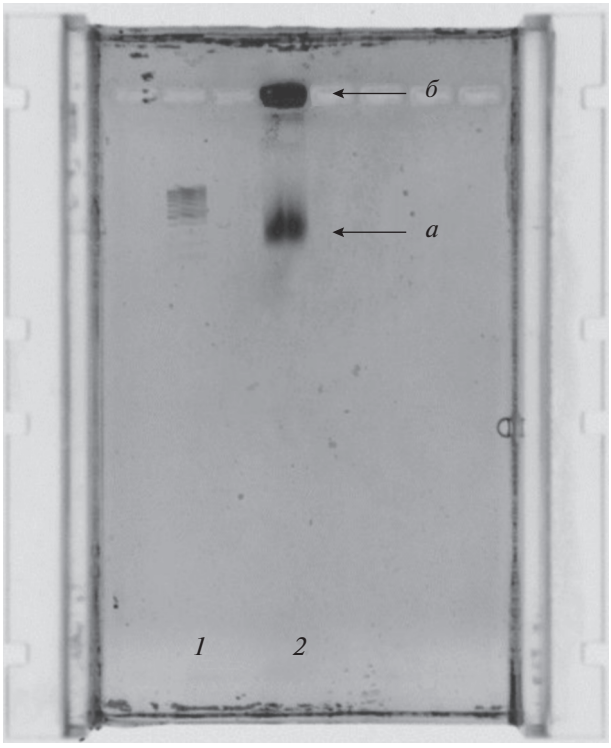

Рис. 6. Анализ продуктов матричной сборки ДНК-тетраэдра с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Дорожки: *1* – ДНК-маркеры 100–1000 нт; *2* – реакционная смесь после сборки ДНК-тетраэдра из POM-1 и POCT-1 (4 экв.); *а* – интенсивная полоса с размером между 200 и 400 нт; *б* – высокомолекулярные продукты, не вошедшие в гель (предположительно агрегаты конкатемерной природы).

фотопродуктов. Как видно из электрофореграммы на рис. 8 (дорожки *1*–*3*), облучение “звездочки” POCT-2 (олигонуклеотид **D570**), содержащей по три остатка NPOM-T(T*) на ветвь (рис. 3*д*), в Трис-ацетатном буфере (TAE, pH 7.6) УФ-светом ($\lambda = 365$ нм) в течение 5 ч и последующая обработка 100 мМ дитиотреитом (DTT) в течение 1 ч для разрыва дисульфидной связи, как и ожидалось, приводили к снижению электрофоретической подвижности олигонуклеотида.

Сборку ДНК-тетраэдра на основе матрицы POM-1' и “звездочки” POCT-2 (рис. 3*а* и 3*д* соответственно) проводили поэтапно в следующей последовательности: отжиг – инкубация – УФ-облучение ($\lambda = 365$ нм) – восстановление DTT. Наличие продукта проверяли при помощи электрофореза в нативных условиях: в 8%-ном ПААГ или 0.75%-ном агарозном геле (условия – см. “Эксперим. часть”) (рис. 9). В указанных условиях не удалось достоверно зарегистрировать образование целевой наноструктуры. Однако, как видно из рис. 9*а*, матрица POM-1' присутствует в виде димера, что согласуется с концепцией сборки.

На заключительном этапе работы было решено провести сборку комплекса при соотношении POM-1' и POCT-2 (олигонуклеотиды **D544** и **D570** соответственно) 1 : 8 и повышенной до 1 мкМ концентрации матрицы. В данных условиях нам удалось зафиксировать образование комплекса матрицы и “звездочки” до облучения (рис. 10*б* и 10*г*). Однако после облучения УФ-светом нам не удалось достоверно зарегистрировать образование наноструктур в нативном 8%-ном ПААГ. При попытке зафиксировать образование наноструктур в 0.75%-ном агарозном геле с целью увеличения стабильности комплексов в буфер для электрофореза добавляли $MgCl_2$ до концентрации 10 мМ. Как видно из рис. 9*в*, это привело к

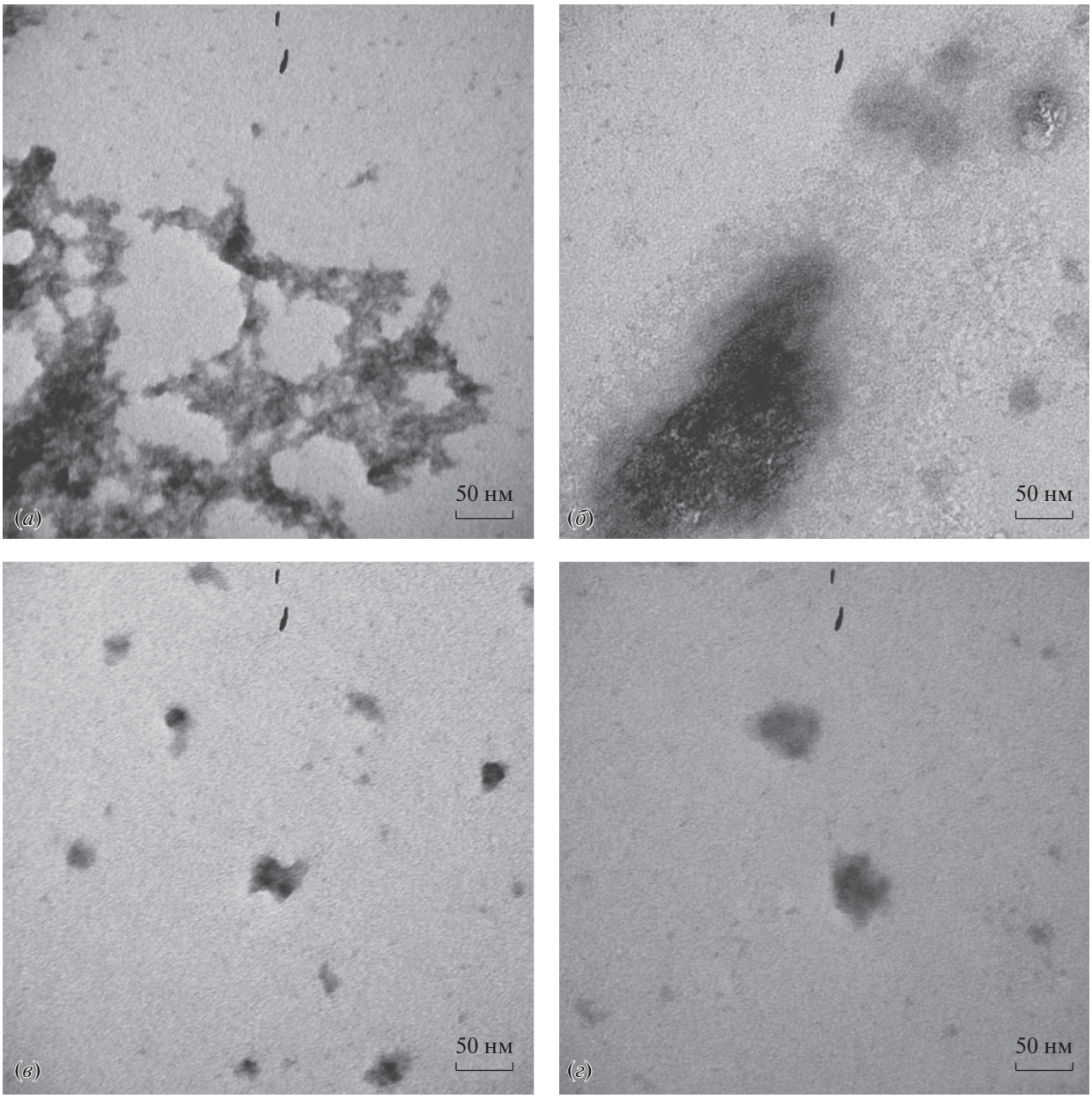

Рис. 7. Микрофотографии образцов олигонуклеотидов, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии: (*а*) – РОМ-1; (*б*) – РОСТ; (*в*) и (*г*) – продукты матричной сборки ДНК-тетраэдра из РОМ-1 и РОСТ-1 в соотношении 1 : 4; [РОСТ-1] = 0.3 мкМ. Негативное контрастирование ацетатом уранила.

ухудшению разрешения полос ДНК в геле. Тем не менее можно отметить, что интенсивность полос при окрашивании бромистым этидием (EtBr), который преимущественно связывается с двуцепочечной ДНК, в случае облученных комплексов **D544**–**D570** значительно выше по сравнению с полосами необлученных образцов при одинаковом количестве нанесенных образцов (рис. 9*в*). Это свидетельствует в пользу образования ДНК-наноструктур, содержащих большое число двуцепочечных участков, что соответствует концепции сборки.

Препараты, полученные на финальной стадии сборки ДНК-тетраэдра и очищенные в агарозном геле, содержали дискретные нанообъекты размерами 10–12 нм, что хорошо согласуется с результатами компьютерного моделирования, опубликованными нами ранее [20] (рис. 10). Эти нанообъекты могут представлять собой искомые ДНК-тетраэдры. Визуализацию олигонуклеотидных структур в просвечивающем электронном микроскопе осуществляли с использованием иона уранила UO_2^{2+}, который специфически свя-

Таблица 1. Удаление фотолабильной 1-(2-нитропиперонил)-этоксиметильной группы NPOM с модельного олигонуклеотида 5'-TGTTT*GGCGC-3' (**D574**) при УФ-облучении (λ = 365 нм)

Время облучения, ч	Степень удаления,%**
1	38
3	76
4	88
4***	91

* Положение остатка 3-NPOM-тимидина.
** По данным офВЭЖХ (см. "Эксперим. часть").
*** В УФ-прозрачной пластиковой пробирке для ПЦР объемом 200 мкл.

зывается с фосфатными группами ДНК в соотношении 1 : 2 [32, 33]. В качестве контрастирующего реагента для визуализации ДНК-наноструктур предпочтительнее использовать формиат уранила

Рис. 8. Электрофореграмма олигонуклеотидов: **D570** ("звездочка" POCT-2, рис. 5*д*) до (дорожка *1*) и после (дорожка *2*) облучения УФ-светом (λ = 365 нм) и после обработки DTT (дорожка *3*); **D574** до (дорожка *4*) и после (дорожка *5*) облучения УФ-светом (λ = 365 нм). Условия: 15%-ный ПААГ, 8 М мочевина, 1× TBE, pH 8.3, окрашено красителем Stains-All. BP – краситель бромфеноловый синий.

$UO_2(HCOO)_2$, дающий более тонкое "зерно" [34–36]. В данной работе для выявления ДНК-наноструктур мы использовали ацетат уранила $UO_2(CH_3COO)_2$ [37], поскольку формиат уранила производится только в США, и его экспорт запрещен. В результате оказалось невозможным однозначно подтвердить с помощью просвечивающей электронной микроскопии, что топология полученных нанообъектов соответствует ДНК-тетраэдру. Для этого требуются дополнительные исследования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для офВЭЖХ использовали ацетонитрил UHPLC grade Supergradient (Panreac, Испания). Раствор ацетата триэтиламмония (TEAA, 2 M, pH 7.0) был приготовлен из триэтиламина ACS grade (Panreac, Испания) и ледяной уксусной кислоты (о.с.ч., Реахим, Россия). Дихлоруксусная кислота, иод, 0.25 M раствор 4,5-дицианимидазола (DCI) в безводном ацетонитриле, красители Stains-All, ксиленцианол FF и бромфеноловый синий (BP) были приобретены у компании Sigma-Aldrich (США), перхлорат натрия – у фирмы Acros Organics (США), дихлорметан, тетрагидрофуран, пиридин и триэтиламин – у фирмы Panreac (Испания). Формамид, акриламид, *N*,*N*'-метилен-*бис*-акриламид, мочевина, *трис*(гидроксиметил)-аминометан (Трис), борная кислота, динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Na_2ЭДТА) были приобретены у компании Диаэм (Россия). Концентрированный водный раствор аммиака (о.с.ч.), уксусная кислота (о.с.ч.) и ацетон (о.с.ч.) были производства Реахим (Россия). Все реактивы были наивысшей степени чистоты, доступной у соответствующих коммерческих поставщиков. Ацетонитрил (UHPLC grade Supergradient, Panreac, Испания) для синтеза олигонуклеотидов кипятили 6 ч над CaH_2 в атмосфере аргона, затем перегоняли в атмосфере аргона и хранили под аргоном над молекулярными ситами 3 Å. Бидистиллированную воду подготавливали непосредственно в лаборатории.

Для центрифугирования небольших объемов растворов использовали микроцентрифугу Mini-Spin Plus (Eppendorf, ФРГ). Химические реакции проводили с использованием термошейкера Thermomixer Compact (Eppendorf, ФРГ). Растворы встряхивали с помощью вортекса BioVortexV1 (Biosan, Эстония). Гель-электрофорез проводили с использованием установки для электрофореза компании Bio-Rad (США). Небольшие объемы растворов олигонуклеотидов (до 1.5 мл) концентрировали с помощью вакуумного концентратора Savant SpeedVac DNA120OP (Thermo Fisher Scientific, США).

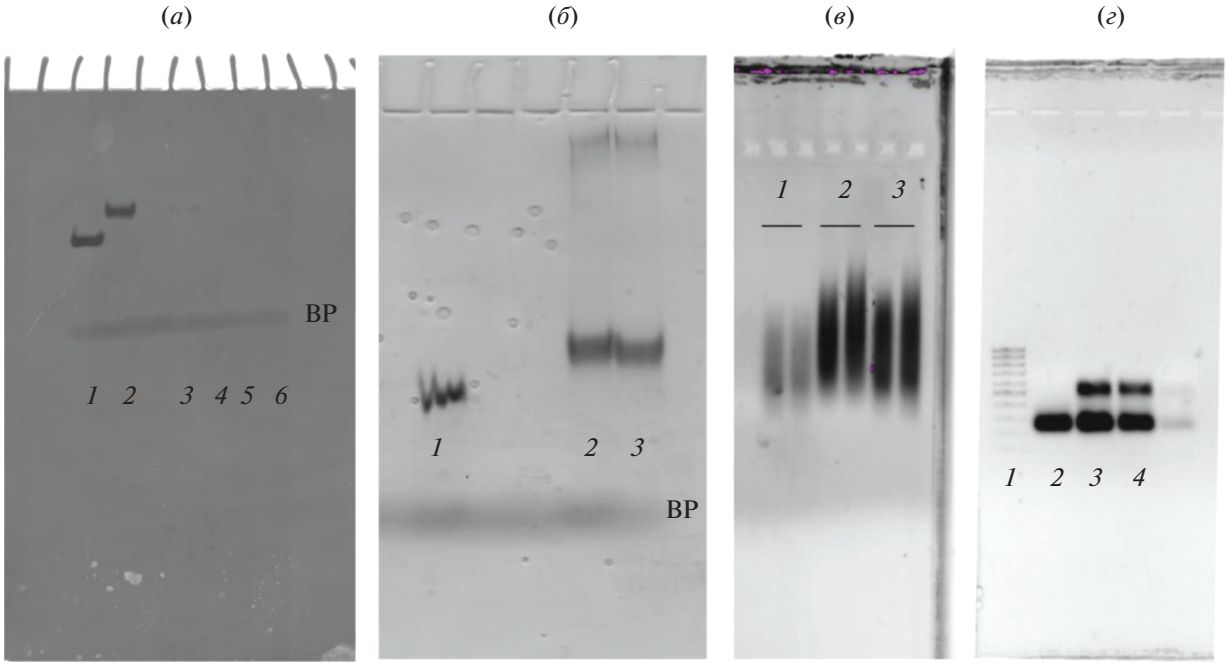

Рис. 9. Электрофореграммы процесса матричной сборки ДНК-тетраэдра: (*а*) – 8%-ный нативный ПААГ, 1× TAE, pH 7.6, 10 мМ $MgCl_2$, окрашено Stains-All; дорожки: *1* – **D544** (0.05 о.е.); *2* – **D570** (0.05 о.е.); *3* – **D570** (800 нМ); *4–6* – **D544** : **D570** 1 : 2, 1 : 4 и 1 : 8 соответственно; [**D544**] = 100 нМ; (*б*) – 8%-ный нативный ПААГ, 1× TAE, pH 7.6, окрашено Stains-All; дорожки: *1* – **D544** (0.05 о.е.); *2*, *3* – **D544** : **D570** 1 : 8, 12.5 или 20 мМ $MgCl_2$ соответственно; [**D544**] = 1 мкМ; (*в*) – 0.75%-ный агарозный гель, 1× TAE, pH 7.6, 10 мМ $MgCl_2$, окрашено EtBr, **D544** : **D570** 1 : 8, [**D544**] = 1 мкМ, 12.5 мМ $MgCl_2$ и 20 мМ $MgCl_2$, *1* – без облучения при 365 нм, *2* – 5.5 ч облучения при 365 нм, *3* – 5.5 ч облучения и обработка 100 мМ DTT в течение 1 ч; (*г*) – 0.75%-ный агарозный гель, 1× TAE, pH 7.6, окрашено EtBr; дорожки: *1* – ДНК-маркеры 100–1000 нт; *2* – **D570**; *3* – **D544** : **D570** 1 : 8, 12.5 мМ $MgCl_2$; *4* – **D544** : **D570** 1 : 8, 20 мМ $MgCl_2$; [**D544**] = 1 мкМ. ВР – краситель бромфеноловый синий.

Олигонуклеотиды были получены с помощью автоматического ДНК/РНК-синтезатора ASM-800 (Биоссет, Новосибирск, Россия) согласно модифицированным протоколам фосфитамидного синтеза в стандартных реакторах объемом 25–50 мкл в масштабе 0.2–0.4 мкМ из соответствующих 5'-DMTr-3'-β-цианэтил-*N*,*N*-диизопропилфосфитамидов 2'-дезокси- и 2'-*O*-метилрибонуклеозидов (Sigma-Aldrich, США), а также 3'-DMTr-5'-β-цианэтил-*N*,*N*-диизопропилфосфитамидов 2'-дезоксирибонуклеозидов ("обратных" фосфитамидов, ChemGenes, США) и соответствующих полимерных носителей на основе пористого стекла с размером пор 1000 Å с привитыми 2'-дезокси- (Sigma-Aldrich, США) или 2'-*O*-метилрибонуклеозидами (Link Technologies, Великобритания). Для введения узлов разветвления были использованы коммерчески доступные ненуклеозидные разветвляющие β-цианэтил-*N*,*N*-диизопропилфосфитамиды: симметричный удвоитель (symmetric doubler) (Glen Research, США, кат. № 10-1920) и симметричный утроитель (trebler) (GlenResearch, США, кат. № 10-1922). Для введения размыкаемого элемента (РЭ) в РОСТ использовали дисульфидный фосфитамид С6 (C6 S-S modifier) (GlenResearch, США, кат. № 10-1936). Для введения алкинильной группы по 5'-концам разветвленного олигонуклеотида ("вилки") использовали β-цианэтил-*N*,*N*-диизопропиламидофосфит 5-гексин-1-ола (GlenResearch, США, кат. № 10-1908). Для постсинтетического введения 6-азидогексаноильной группы по 3'-концевой аминогруппе разветвленного олигонуклеотида использовали полимерный носитель 3'-Amino-Modifier C7 CPG 1000 (Link Technologies, Великобритания). Для введения 6-аминогексильной группы по 5'-концам разветвленного олигонуклеотида применяли β-цианэтил-*N*,*N*-диизопропиламидофосфит 6-*N*-монометокситритил-(MMTr)-аминогексанола (Sigma-Aldrich, США). Все фосфитамиды растворяли в сухом ацетонитриле до концентрации 0.1 или 0.15 М (для doubler, trebler и C6 S-S modifier). Время конденсации варьировало от 0.5 мин для 3'-фосфитамидов дезоксирибонуклеозидов, 6 мин для 5'-фосфитамидов дезоксирибонуклеозидов ("обратных"), фосфитамидов 2'-*O*-метилрибонуклеозидов, аминолинкерного и дисульфидного фосфитамидов и фосфитамида 5-гексин-1-ола, и до 30 мин в случае удвоителя и утроителя. При введении обоих типов разветвителей время конденсации увеличивали до 30 мин, а масштаб синтеза поднимали с 200 до 400 нМ.

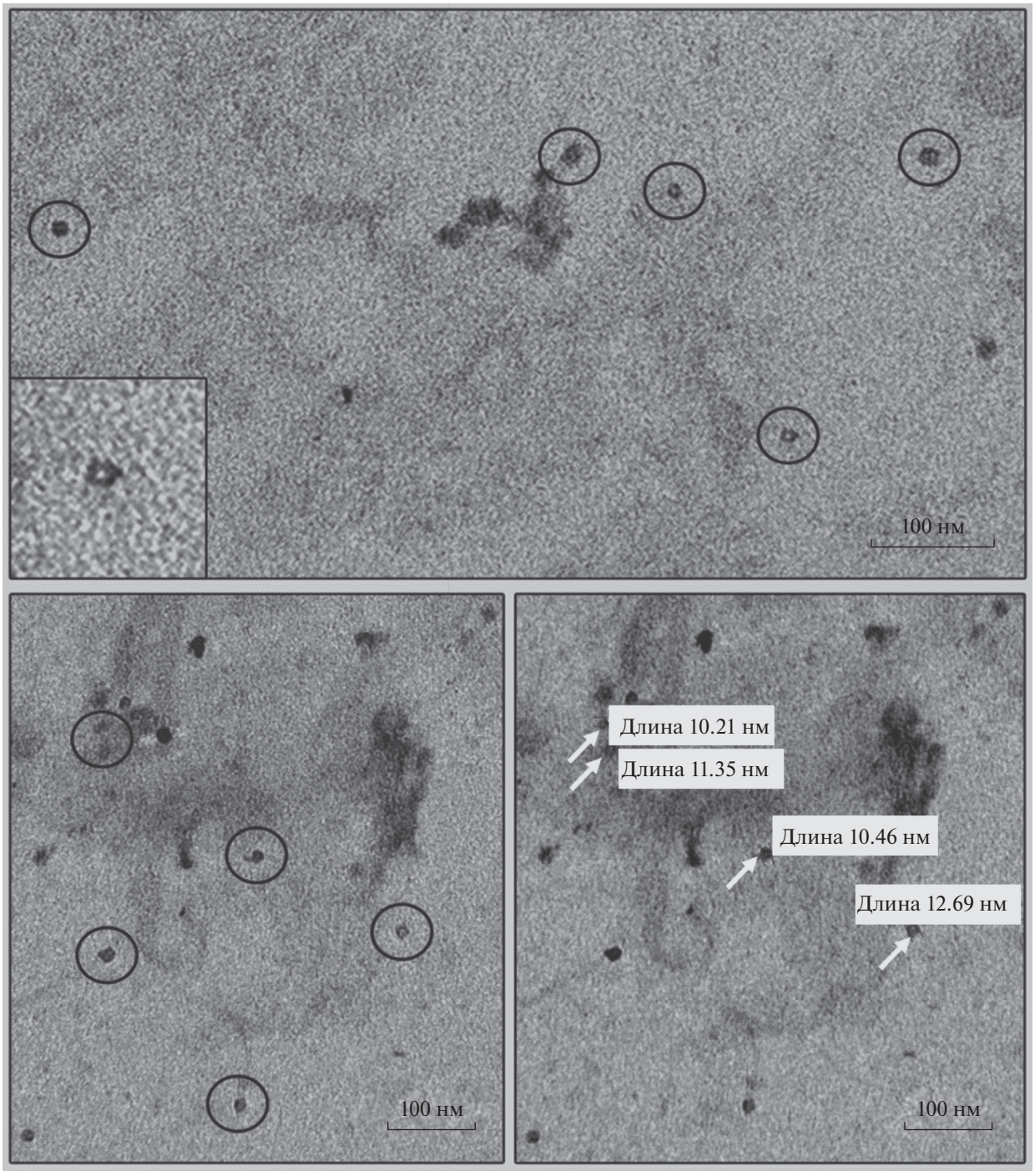

Рис. 10. Фотографии просвечивающей электронной микроскопии дискретных нанообъектов, полученных в процессе сборки ДНК-тетраэдра (обведены кружками). Для отдельных нанообъектов (указаны стрелками) указан размер. На врезке – увеличенное изображение нанообъекта. Негативное контрастирование ацетатом уранила.

Для аналитической ВЭЖХ использовали хроматограф Agilent 1220 (Agilent Technologies, США) с УФ-детекцией при длине волны 260 нм, колонкой ZORBAX Eclipse XDB-C18 5 мкм 4.6 × 150 мм (Agilent Technologies, США). Элюцию осуществляли в градиенте ацетонитрила 0–60% в 20 мМ TEAA, pH 7.0, за 30 мин и скорости потока 1 мл/мин. Выделение олигонуклеотидов проводили с помощью хроматографа Waters 600E (Waters Corp., США) с УФ-детекцией при длинах волн 190, 260 и 280 нм и колонкой ZORBAX Eclipse Prep HT XDB-C18 7 мкм 21.2 × 150 мм

(Agilent Technologies, США) в градиенте ацетонитрила 0–60% в 20 мМ TEAA, pH 7.0, за 30 мин при скорости потока 21 мл/мин.

Олигонуклеотиды были синтезированы в режиме без сохранения 5'-DMTr-группы ("DMTr OFF") с выделением с помощью препаративного гель-электрофореза в 20%-ном ПААГ толщиной 2–3 мм в денатурирующих условиях и обессоливанием на колонке NAP-25 с сорбентом Sephadex G-25 (GE Healthcare, Великобритания) в виде натриевой соли. Для контроля качества олигонуклеотидов проводили аналитический электрофорез в 20%-ном ПААГ толщиной 0.4 мм в аналогичных условиях: акриламид – *N*,*N*'-метилен-*бис*-акриламид (30 : 1), 8 М мочевина, 90 мМ Трис-борат, pH 8.3, 2 мМ Na_2ЭДТА при напряжении 50 В/см. Олигонуклеотиды наносили в растворе, содержащем 8 М мочевину, 0.05% ксиленцианола FF и 0.05% бромфенолового синего. Визуализацию полос проводили окрашиванием геля раствором красителя Stains-All (500 мг/л) в формамиде с последующей отмывкой дистиллированной водой.

Концентрацию олигонуклеотидов определяли по оптической плотности раствора с помощью УФ-спектрофотометра NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, США).

Молекулярные массы олигонуклеотидов определяли с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF на приборе Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия). Масс-спектры олигонуклеотидов получали в линейном режиме отрицательных ионов прибора и в диапазоне m/z от 500 Да до 16 кДа. Параметры измерения включали также частоту импульсов 25 Гц, ускоряющее напряжение 25.0 кВ и время задержки экстракции ионов 120 нс. Образцы олигонуклеотидов растворяли в водном буфере до концентрации 0.1 мМ, содержащем 20 мМ TEAA и 60% ацетонитрила. Объем анализируемого образца составлял 10 мкл. Смешивали 0.7 мкл образца на подложке (Ground Steel или Anchor Chip) с 0.7 мкл раствора матрицы, приготовленного согласно базовому протоколу производителя (Bruker Daltonics, Германия). Матрицей для ионизации олигонуклеотидов в отрицательном режиме служил 2,6-дигидроксиацетофенон (2,6-DHAP) с добавлением дигидроцитрата аммония. Итоговый масс-спектр получали суммированием 8–20 одиночных спектров по 100 импульсов лазера на точку. Калибровку прибора проводили с использованием калибровочных стандартов фирмы Bruker Daltonics (Германия), а также набора олигодезоксирибонуклеотидов с известными массами. Молекулярные массы олигонуклеотидов рассчитывали, используя наборы экспериментальных значений m/z, определенные для каждого анализируемого образца.

Сборку ДНК-тетраэдра регистрировали при помощи электрофореза в нативных условиях (8%-ный ПААГ, акриламид : метилен-*бис*-акриламид 30 : 1, или 0.75%-ный агарозный гель) (рис. 10). Сборку осуществляли поэтапно следующим образом. Проводили отжиг олигонуклеотидов **D544** (матрица POM-1') и **D570** ("звездочка" POCT-2) в 1× TAE, 10 мМ $MgCl_2$ при 95°C в течение 8 мин с последующим охлаждением до комнатной температуры и дальнейшей инкубацией в течение суток. Полученный комплекс облучали УФ-светом с длиной волны 365 нм в течение 5 ч и оставляли на сутки при комнатной температуре. На последнем этапе обрабатывали комплекс 100 мМ DTT в течение 1 ч. Концентрация матрицы **D544** составляла 100 нМ, концентрация олигонуклеотида **D570** – 200, 400 или 800 нМ (рис. 9*а*).

Для электронно-микроскопического исследования образцы сорбировали на медные сетки, покрытые формваровой пленкой, в течение 2 мин. После отбора излишков жидкости фильтровальной бумагой образцы контрастировали 0.5%-ным водным раствором уранилацетата (EMS, США) в течение 10–15 с. Образцы изучали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Япония), цифровые изображения получали с помощью камеры бокового ввода Veleta (EMSIS, Германия).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Осуществлен синтез серии разветвленных олигонуклеотидов для использования в качестве матриц и строительных блоков при матричной сборке ДНК-тетраэдра и ДНК-куба. Был проведен процесс матричной сборки ДНК-тетраэдра, в результате которой были получены дискретные нанообъекты, соответствующие по линейным размерам предполагаемому ДНК-тетраэдру. Размер полученных нанообъектов хорошо согласуется с предсказанным ранее с помощью метода компьютерного моделирования [20].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 16-03-01055_а, 18-29-08062_мк) и Министерства образования и науки Российской Федерации (проект Новосибирского государственного университета FSUS-2020-0035).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных кем-либо из авторов данной статьи экспериментов с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Seeman N., Sleiman H.* // Nat. Rev. Mater. 2018. V. 3. P. 17068. https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.68
2. *Seeman N.C.* // Nano Lett. 2020. V. 20. P. 1477–1478. https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c00325
3. Templated DNA Nanotechnology: Functional DNA Nanoarchitectonics // Ed. Govindaraju T. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., 2019. ISBN: 978-0-429-42866-1 (eBook).
4. *Rajwar A., Kharbanda S., Chandrasekaran A.R., Gupta S., Bhatia D.* // ACS Appl. Bio Mater. 2020. V. 3. P. 7265–7277. https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00916
5. *Angell C., Kai M., Xie S., Dong X., Chen Y.* // Advanced Healthcare Materials. 2018. V. 7. P. 1701189. https://doi.org/10.1002/adhm.201701189
6. *Li S., Jiang Q., Liu S., Zhang Y., Tian Y., Song C., Wang J., Zou Y., Anderson G.J., Han J.-Y., Chang Y., Liu Y., Zhang C., Chen L., Zhou G., Nie G., Yan H., Ding B., Zhao Y.* // Nat. Biotechnol. 2018. V. 36. P. 258–264. https://doi.org/10.1038/nbt.4071
7. *Ma W., Zhan Y., Zhang Y., Shao X., Xie X., Mao C., Cui W., Li Q., Shi J., Li J., Fan C., Lin Y.* // Nano Lett. 2019. V. 19. P. 4505–4517. https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b01320
8. *Rothemund P.W.K.* // Nature. 2006. V. 440. P. 297–302. https://doi.org/10.1038/nature04586
9. DNA Nanotechnology for Bioanalysis: from Hybrid DNA Nanostructures to Functional Devices // Eds. Arrabito G., Wang L. World Scientific Publishing Europe Ltd., 2018. ISBN: 9781786343796
10. *Yu S., Chen T., Zhang Q., Zhoua M., Zhu X.* // Analyst. 2020. V. 145. P. 3481–3489. https://doi.org/10.1039/D0AN00159G
11. *Muhammad M., Baig F.A., Lai W.-F., Akhtar M.F., Saleem A., Ahmed S.A., Xia X.-H.* // Nano-Structures & Nano-Objects. 2020. V. 23. P. 100523. https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2020.100523
12. *Hu Q., Li H., Wang L., Gu H., Fan C.* // Chem. Rev. 2019. V. 119. P. 6459–6506. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00663
13. *Xu F., Xia Q., Wang P.* // Front. Chem. 2020. V. 8. P. 751. https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00751
14. *Chi Q., Yang Z., Xu K., Wang C., Liang H.* // Front Pharmacol. 2019. V. 10. P. 1585. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01585
15. *Tapio K., Bald I.* // Multifunct. Mater. 2020. V. 3. P. 032001. https://doi.org/10.1088/2399-7532/ab80d5
16. *Loretan M., Domljanovic I., Lakatos M., Rüegg C., Acuna G.P.* // Materials. 2020. V. 13. P. 2185. https://doi.org/10.3390/ma13092185
17. *Bush J., Singh S., Vargas M., Oktay E., Hu C.-H., Veneziano R.* // Molecules. 2020. V. 25. P. 3386. https://doi.org/10.3390/molecules25153386
18. *Madsen M., Gothelf K.V.* // Chem. Rev. 2019. V. 119. P. 6384–6458. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00570
19. *Balakrishnan D., Wilkens G.D., Heddle J.D.* // Nanomedicine (Lond.). 2019. V. 14. P. 911–925. https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0440
20. *Bakulina A.Yu., Rad'kova Z.V., Burakova E.A., Benassi E., Zatsepin T.S., Fokina A.A., Stetsenko D.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 608–618. https://doi.org/10.1134/S1068162019060062
21. *Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2001. V. 40. P. 2004–2021. https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5
22. *Tornøe C.W., Christensen C., Meldal M.* // J. Org. Chem. 2002. V. 67. P. 3057–3064. https://doi.org/10.1021/jo011148j
23. *Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2002. V. 41. P. 2596–2599. https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4
24. *Васильева С.В., Буракова Е.А., Жданова Л.Г., Анисименко М.С., Стеценко Д.А.* // Биоорг. химия. 2017. Т. 43. С. 51–58. [*Vasilyeva S.V., Burakova E.A., Zhdanova L.G., Anisimenko M.S., Stetsenko D.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2017. V. 43. P. 43–49.] https://doi.org/10.1134/S1068162017010113
25. *Jayaprakash K.N., Geng Peng C., Butler D., Varghese J.P., Maier M.A., Rajeev K.G., Manoharan M.* // Org. Lett. 2010. V. 12. P. 5410–5413. https://doi.org/10.1021/ol102205j
26. *Van Delft P., Meeuwenoord N.J., Hoogendoorn S., Dinkelaar J., Overkleeft H.S., van der Marel G.A., Filippov D.V.* // Org. Lett. 2010. V. 12. P. 5486–5489. https://doi.org/10.1021/ol102357u
27. *Marks I.S., Sung Kang J., Jones B.T., Landmark K.J., Cleland A.J., Taton T.A.* // Bioconjug. Chem. 2011. V. 22. P. 1259–1263. https://doi.org/10.1021/bc1003668
28. *Jawalekar A.M., Malik S., Verkade J.M.M., Gibson B., Barta N.S., Hodges J.C., Rowan A., van Delft F.L.* // Molecules. 2013. V. 18. P. 7346–7363. https://doi.org/10.3390/molecules18077346
29. *Young D.D., Deiters A.* // Org. Biomol. Chem. 2007. V. 5. P. 999–1005. https://doi.org/10.1039/B616410M
30. *Lusic H., Young D.D., Lively M.O., Deiters A.* // Org. Lett. 2007. V. 9. P. 1903–1906. https://doi.org/10.1021/ol070455u
31. *Deiters A.* // Curr. Opin. Chem. Biol. 2009. V. 13. P. 678–686. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.09.026
32. *Zobel R.C., Beer M.* // J. Biophys. Biochem. Cytol. 1961. V. 10. P. 335–346. https://doi.org/10.1083/jcb.10.3.335
33. *Beer M., Zobel C.R.* // J. Mol. Biol. 1961. V. 3. P. 717–726. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80076-4

34. *Ketterer Ph., Willner E.M., Dietz H.* // Sci. Adv. 2016. V. 2. e1501209. https://doi.org/10.1126/sciadv.1501209

35. *Nickels Ph.C., Hoiberg H.C., Simmel S.S., Holzmeister Ph., Tinnefeld Ph., Liedl T.* // ChemBioChem. 2016. V. 17. P. 1093–1096. https://doi.org/10.1002/cbic.201600059

36. *Wang W., Chen S., An B., Huang K., Bai T., Xu M., Bellot G., Ke Y., Xiang Y., Wei B.* // Nat. Commun. 2019. V. 10. P. 1067. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08647-7.10:1067

37. *Smith D.M., Schüller V., Forthmann C., Schreiber R., Tinnefeld Ph., Liedl T.* // J. Nucleic Acids. 2011. Article ID 360954. https://doi.org/10.4061/2011/360954

Template-Assisted Assembly of DNA Nanostructures from Branched Oligonucleotides

A. A. Fokina*, **, Yu. E. Poletaeva*, E. A. Burakova*, **, A. Yu. Bakulina*, ****, T. S. Zatsepin*****, ******, E. I. Ryabchikova*, ***, and D. A. Stetsenko*, **, #**

#Phone: +7 (383) 363-49-63; e-mail: d.stetsenko@nsu.ru

**Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia*

***Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Ak. Lavrentieva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

****Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Ak. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

*****State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia*

******Skolkovo Institute of Science and Technology, Innovation Centre SKOLKOVO, Bolshoi bulv. 30, str. 1, Moscow Region, 121205 Russia*

*******Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, str. 3, Moscow, 119991 Russia*

Previously, we proposed a template-assisted assembly method for three-dimensional nucleic acid nanostructures. The method involves a branched oligonucleotide as a template and a building block, which incorporates non-nucleotidic linkers, in particular, branching points connecting two or three oligonucleotide chains. In this paper, we have attempted the synthesis of branched oligonucleotide templates for the assembly of a DNA tetrahedron and a DNA cube, a branched oligonucleotide building block ("starlet"), and studied the assembly of a DNA tetrahedron.

Keywords: nucleic acids, DNA nanotechnology, solid-phase synthesis, photolabile protecting group, click chemistry, strain-promoted azide-alkyne cycloaddition