

## **Влияние локальной структуры ДНК на химическое расщепление неканонических пар.<sup>1</sup>**

*Логвина (Бакалдина) Наталия Александровна*

*студентка*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия*

*E-mail: BakaldinaNatalie@mail.ru*

В современной медицине все шире используется ДНК-диагностика для поиска генетических изменений, связанных с различными инфекционными, наследственными и онкологическими заболеваниями. Одним из типов генетических нарушений являются точечные мутации – замены, инсерции или делеции одной или нескольких пар нуклеотидов.

Наиболее перспективным методом определения точечных мутаций неизвестной локализации является химическое расщепление ассоциированных с ними неканонических пар нуклеотидов (мисмэтчей). В его основе лежит формирование гетеродуплексов из продуктов амплификации ДНК здоровой и раковой тканей, модификация гетероциклических оснований в точке мутации и последующее расщепление ДНК по модифицированным звеньям. В настоящей работе установлено влияние типа мисмэтча и его микроокружения на эффективность химической модификации, что позволяет оценить чувствительность метода и проконтролировать возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Для изучения эффективности реакций химической модификации была разработана модельная система, состоящая из 50-звенных несовершенных ДНК-дуплексов, содержащих все варианты неканонических пар в А·Т- или G·C- окружении. Отработаны оптимальные режимы модификации остатков тимина и цитозина перманганатом калия и гидроксиламином соответственно в условиях биотин-стрептавидиновой фиксации ДНК на магнитных шариках (температура, состав реакционных смесей, время обработки). Показано, что в отличие от гидроксилamina, не затрагивающего соседние остатки цитозина, перманганат калия атакует остатки тимина, фланкирующие мисмэтч. Найдена четкая корреляция между типом мисмэтча, его микроокружением и интенсивностью реакции.

В данной работе впервые продемонстрировано, что метод химической модификации позволяет однозначно выявить наличие любой неканонической пары, предположить ее тип и фланкирующие звенья, а также ее локализацию.

Используя 19-звенные ДНК дуплексы, содержащие один или два апуриновых нуклеотида напротив остатка тимина, был разработан экспресс-метод прямого спектрофотометрического выявления неспаренных тиминов. За ходом реакции  $\text{KMnO}_4$  с остатком тимина следили по увеличению поглощения при 420 нм, связанном с накоплением  $\text{MnO}_2$  в реакционной смеси. Была изучена кинетика химической модификации ДНК-дуплексов. Показано, что фоновое восстановление перманганата калия не влияет на результат. Этот подход, позволяющий не проводить последующее расщепление и электрофоретическое разделение фрагментов ДНК, был использован для анализа неканонических пар в 50-звенных ДНК-дуплексах.

---

<sup>1</sup> Тезисы основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта РФФИ (грант № 06-04-49204)