

კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაციის
თერმოდინამიკური საფუძვლები

დავით გვარჯალაძე

*სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის
საბუნებისმეტყველო მეცნიერებებისა და საინჟინრო ფაკულტეტზე ფიზიკის დოქტორის
აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნის შესაბამისად*

ფიზიკისა და ასტრონომიის სადოქტორო პროგრამა

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ბესიკ კანკია, დოქტორი

თანახელმძღვანელი: ნუნუ მეტრეველი, დოქტორი

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი

თბილისი, 2017

განაცხადი

როგორც წარდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის ავტორი , ვაცხადებ , რომ ნაშრომი წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად .

დავით გვარჯალაძე

20.02.2017

აბსტრაქტი

რეალური დროის პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (RT-PCR) ფართოდ გამოიყენება დნმ-ის ამპლიფიკაციისათვის, პათოგენური მიკროორგანიზმების და გენეტიკური დაავადებების დეტექციისათვის. თუმცა ტემპერატურული ციკლი და სპეციალიზებული ხელსაწყოების საჭიროება ზღუდავს მის ფართო გამოყენებას მოლეკულურ დიაგნოსტიკაში. დღეს გამოყენებული კლინიკური დიაგნოსტიკის მეთოდები, რომელთა უმრავლესობაც PCR-ის ბაზაზეა დაფუძნებული კვლავ რთული სისტემებია, გამოიყენება მხოლოდ ცენტრალურ კლინიკებში და ძვირადღირებულია. ნუკლეინის მჟავების ამპლიფიკაციის მოსახერხებელი სისტემები, რომლებშიც ინტეგრირებული იქნება ნიმუშის მომზადება და დეტექცია, ამასთან არ იქნება ძვირი, კვლავ გამოწვევად რჩება.

კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაცია (QPA) წარმოადგენს დნმ-ის ამპლიფიკაციის მეთოდს, ეფექტური და მარტივი დეტექციით. ეს მეთოდი დაფუძნებულია GGGTGGGTGGGTGGG (G3T) დნმ-კვადრუპლექსზე, რომელსაც სპეციფიკური კათიონების თანაობისას ახასიათებს მაღალი თერმული სტაბილურობა. QPA იყენებს პრაიმერს, რომელიც G3T-ის წაკვეთილი ვერსიაა და შეუძლია თავისთავად დაიკეცოს მონომოლეკულურ კვადრუპლექსად, დნმ-პოლიმერაზას მიერ ელონგაციის შემდეგ, ტემპერატურული ცვლილების გარეშე. კვადრუპლექსის დეტექციისათვის გამოყენებულ იქნა G3T კომბინირებული ფლურესცენციული მოლეკულით მეოთხე პოზიციაში, რომელიც იწყებს ფლურესცენციას კვადრუპლექსის ფორმირებისას, რაც საშუალებას იძლევა მარტივი და ეფექტური რაოდენობრივი განსაზღვრის, დამატებითი მოლეკულების გარეშე.

ამპლიფიკაციის სიჩქარე ძლიერ არის დამოკიდებული პრაიმერის და პრაიმერის დამაკავშირებელი უბნის კომპლექსის თერმულ სტაბილურობაზე. რომ გაგვეზარდა QPA-ის შესაძლებლობა, შევისწავლეთ ოპტიკური (UV/Vis სპექტროსკოპია, ფლურესცენციული სპექტროსკოპია, წრიული დიქროიზმი) და თერმოდინამიკური

თვისებები G3T თანმიმდევრობის და მისი ვარიანტების, რომლებიც შეიცავდნენ თანმიმდევრობის მოდიფიკაციებს და მიერთებებს 5'-ბოლოდან. წრიული დიქროიზმით კვლევამ აჩვენა, რომ თიმინის ცვლილება სხვა ნუკლეოტიდით, არ ცვლის G3T-ის პარალელური დაკეცვის სტრუქტურას. თერმული ლღობის ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ პურინი კომბინირებული მარყუჟის პოზიციაში და ორნუკლეოტიდიანი მიერთებები 5'-ბოლოდან იწვევენ G3T კვადრუპლექსის მნიშვნელოვან დესტაბილიზაციას, მაშინ როცა თიმინის ციტოზინით ცვლილებას აქვს უმნიშვნელო ეფექტი. კვლევების შედეგები აჩვენებს, რომ იზოთერმული QPA შესაძლებელია შესრულდეს ფართო ტემპერატურულ შუალედში.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: QPA, G3T, დნმ-კვადრუპლექსი, დნმ-ის ამპლიფიკაცია, RT-PCR, ფლურესცენცია, თერმოდინამიკა.

Abstract

Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) is commonly used for DNA amplification, and detection of pathogenic microorganisms and genetic diseases. Current systems for clinical diagnostic applications are mainly PCR-based, can only be used in hospitals, and are still relatively complex and expensive. However, low specificity, temperature cycling, and the need for specialized instruments restrict wide usage of RT-PCR in molecular diagnostics. Integrating sample preparation with nucleic acid amplification and detection in a cost-effective, robust, and user-friendly format remains challenging.

Quadruplex priming amplification (QPA) allows isothermal amplification of nucleic acids with improved yield and simplified detection. This assay is based on a DNA quadruplex, GGGTGGGTGGGTGGG (G3T), which in the presence of specific cations possesses unusually high thermal stability. QPA employs truncated G3T sequences as primers, which upon polymerase elongation, self-dissociate from the binding site and allow the next round of priming without thermal unfolding of amplicons. Fluorescent nucleotide analogs, when incorporated into these primers, emit light upon quadruplex formation and permit simple, specific, and sensitive quantification without the attachment of probe molecules.

The rate of amplification strongly depends on the thermal stability of the primer/primer binding site complex. To expand the capabilities of QPA, here we studied optical [UV/Vis spectroscopy, fluorescence and circular dichroism (CD)] and thermodynamic properties of the G3T sequence and variants containing sequence modifications or extensions at the 5'-end. Circular dichroism studies demonstrate that the substitution of thymidines by other nucleotides does not change the parallel fold of G3T. Thermal unfolding experiments revealed that purine bases incorporated at loop positions and 5'-end dinucleotide extension significantly destabilize the quadruplex, while loop pyrimidines have almost no effect. Overall, the results of these studies suggest that isothermal QPA can be performed over a wide temperature range.

Keywords: QPA, G3T, DNA quadruplexes; DNA amplification, RT-PCR, fluorescence; thermodynamics.

მადლობა

მადლობას ვუხდით ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის ბიოფიზიკის ინსტიტუტის და ოპიოს სახელმწიფო უნივერსიტეტის (აშშ) ქიმიისა და ბიოქიმიის დეპარტამენტის თანამშრომლებს თანადგომისათვის; მადლობა ჩემს სამეცნიერო ხელმძღვანელს პროფ. ბესიკ კანკიას და თანახელმძღვანელს პროფ. ნუნუ მეტრეველს გაწეული დახმარებისათვის; მადლობა „Bill & Melinda Gates Foundation“-ს (გრანტი „The Grand Challenges in Global Health“) და ასევე შოთა რუსთაველის ეროვნულ სამეცნიერო ფონდს (გრანტის DI/23/7-230/12), რომელთა დაფინანსებით სადოქტორო ნაშრომის ნაწილი შესრულდა ოპიოს სახელმწიფო უნივერსიტეტის ქიმიისა და ბიოქიმიის დეპარტამენტში.

სარჩევი

სარჩევი	VII
ცხრილების ჩამონათვალი	IX
გრაფიკების ჩამონათვალი	X
ილუსტრაციების ჩამონათვალი	XI
აბრევიატურის ჩამონათვალი	XII
შესავალი	13
სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა	17
თავი 1. კვადრუპლექსი	17
თავი 2. პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია	21
თავი 3. ნუკლეინის მჟავების ტესტირების მეთოდები	25
მეთოდოლოგია	29
თავი 1. გაზომვის მეთოდები	29
1.1. ულტრაიისფერ-ხილული სპექტროსკოპია	29
1.2. ფლურესცენციული სპექტროსკოპია	34
1.3. წრიული დიქროიზმის სპექტროსკოპია	35
1.4. Stopped-flow ტექნიკა	37
თავი 2. გამოყენებული მასალები	39

შედეგები	40
თავი 1. კვადრუპლექსის ლღობა	40
თავი 2. გაზომვები წრიული დიქროიზმის სპექტრომეტრით	45
თავი 3. გაზომვები Stopped-flow ტექნიკით	46
თავი 4. კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაცია	
Quadruplex Priming Amplification (QPA))	50
შედეგების ინტერპრეტაცია / დისკუსია	59
დასკვნები და რეკომენდაციები	61
ბიბლიოგრაფია	63

ცხრილების ჩამონათვალი

ცხრილი 1: მარტივი დიაგნოსტიკური (POC) დანადგარები	25
ცხრილი 2: იზოთერმული ამპლიფიკაციის მეთოდები	27
ცხრილი 3: გავრცელებული ქრომოფორები	32
ცხრილი 4: ნუკლეოტიდების შთანთქმის ტალღის სიგრძეები	33
ცხრილი 5: კვლევაში გამოყენებული ოლიგონუკლეოტიდები	39
ცხრილი 6. G3T ლღობის ტემპერატურა	42
ცხრილი 7. G3T-ის ვარიაციების ვანტ ჰოფის ენტალპიის ცვლილება ლღობისას	43
ცხრილი 8. G3T-MTT კვადრუპლექსის ნახევარწარმოქმნის დრო	49
ცხრილი 9. ლღობის ტემპერატურა (T_m) და QPA-ის ოპტიმალური ტემპერატურა (T_{QPA}) პრაიმერ-სამიზნე კომპლექსებისთვის მოცემული მე-12 გრაფიკზე	54
ცხრილი 10. ლღობის ტემპერატურა (T_m) და QPA-ის ოპტიმალური ტემპერატურა (T_{QPA}) პრაიმერ-სამიზნე კომპლექსებისთვის. ($A=2AP$)	56

გრაფიკების ჩამონათვალი

გრაფიკი 1: დუბლექსების ლღობის წარმოებული (dA/dt)	15
გრაფიკი 2: G3T-CCT (5 μ M) კვადრუპლექსის ლღობა სხვადასხვა კათიონით	40
გრაფიკი 3: G3T კვადრუპლექსის შთანთქმა	41
გრაფიკი 4: G3T კვადრუპლექსის ლღობა	42
გრაფიკი 5: G3T-CCT კვადრუპლექსის ლღობა სხვადასხვა კონცენტრაციაზე	44
გრაფიკი 6: წრიული დიქროიზმის გაზომვები	45
გრაფიკი 7: Stopped-flow ექსპერიმენტი 20 mM SrCl ₂ -ით	46
გრაფიკი 8: Stopped-flow ექსპერიმენტი 1 mM SrCl ₂ -ით	47
გრაფიკი 9: Stopped-flow გაზომვები G3T-MTT-ის სხვადასხვა კონცენტრაციაზე	48
გრაფიკი 10: UV-Vis სპექტრომეტრით ლღობის წარმოებული	53
გრაფიკი 11: QPA-ის ნიმუში 3MI-ის გამოყენებით 54 °C-ზე	54
გრაფიკი 12: QPA-ის სიჩქარის დამოკიდებულება ტემპერატურაზე	55
გრაფიკი 13: QPA-ის ნიმუში 3MI-ის გამოყენებით 40 °C-ზე	57
გრაფიკი 14: QPA-ის სიჩქარის დამოკიდებულება ტემპერატურაზე	58

ილუსტრაციების ჩამონათვალი

ილუსტრაცია 1: კვადრუპლექსები	17
ილუსტრაცია 2: სქემატურად კვადრუპლექსის სტრუქტურები	18
ილუსტრაცია 3: დნმ-კვადრუპლექსი ტელომერულ თანმიმდევრობაში	19
ილუსტრაცია 4: კვადრუპლექსი გენის ექსპრესიის რეგულაციაში	20
ილუსტრაცია 5: პოლიმერაზული ჯაჭვური რაქცია	22
ილუსტრაცია 6: ელექტრომაგნიტური გამოსხივება	29
ილუსტრაცია 7: იაბლონსკის დიაგრამა	30
ილუსტრაცია 8: ელექტრონების გადასვლები	31
ილუსტრაცია 9: ფლურესცენცია	34
ილუსტრაცია 10: წრიული დიქროიზმი	36
ილუსტრაცია 11: Stopped-flow ტექნიკა	38
ილუსტრაცია 12: კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაცია (QPA)	50
ილუსტრაცია 13: ფლურესცენციული მოლეკულები	51

აბრევიატურის ჩამონათვალი

QPA, კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაცია (Quadruplex Priming Amplification).

RT-PCR, რეალური დროის პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (Real-time Polymerase chain reaction).

UV/Vis, UV-Vis, ულტრაიისფერ-ხილული (Ultraviolet-visible).

NAT, ნუკლეინის მჟავების ტესტირება ინფექციური დაავადებებისათვის (Nucleic acid testing).

POC, მარტივი დიაგნოსტიკური დანადგარი (Point of care).

DNA, დნმ, დეზოქსირიბონუკლეინის მჟავა (Deoxyribonucleic acid).

FRET, ფიორსტერის რეზონანსული ენერგიის გადატანა (Förster resonance energy transfer).

QY, კვანტური სარგებელი (Quantum Yield).

Ex, Em, აგზნება, გამოსხივება (Excitation, Emission).

bp, ნუკლეოტიდურ ფუძეთა წყვილი (base pair).

pH, წყალბადური პოტენციალი (pondus Hydrogenii).

შესავალი

დნმ კვადრუპლექსები ფორმირდებიან G-კვარტეტების შრეებისგან, რომლებიც ერთმანეთთან დაკავშირებული არიან ერთჯაჭვიანი მარყუქებით. G-კვარტეტები შედგებიან ოთხი გუანინისაგან, რომლებიც დაკავშირებული არიან კვადრატული ბრტყელი კონფიგურაციით, სადაც თითოეული გუანინი ურთიერთქმედებს თავის ორ მეზობელთან წყალბადური ბმებით. კვადრუპლექსის ფორმირება საჭიროებს კათიონების არსებობას (როგორც არის K^+), რომლებიც სპეციფიკურად უკავშირდებიან გუანინის O6 კარბონილ ჯგუფებს G-კვარტეტების სიბრტყეებს შორის. კათიონების G-კვარტეტების ცენტრში კოორდინირებისა და სტეკინგ-ურთიერთქმედებების გამო, მონომოლეკულური კვადრუპლექსები საკმაოდ სტაბილურ და კარგად დაკეცილ სტრუქტურებს წარმოადგენენ. კვადრუპლექსები წარმატებით იქნა გამოყენებული დნმ-ის ამპლიფიკაციისათვის ახალი მეთოდის კონსტრუირებაში დნმ-ის სიგნალის გაძლიერებით (24).

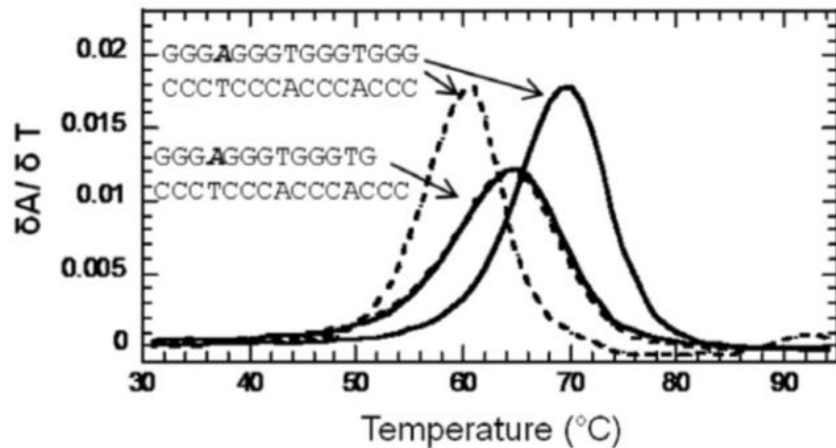
დღესდღეობით პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია (PCR) ფართოდ გამოიყენება დნმ-ის ამპლიფიკაციისათვის (რაოდენობრივი გამრავლება) და გენეტიკური დაავადებებისა და პათოგენური მიკროორგანიზმების აღმოსაჩენად (46). PCR ემყარება განმეორებად ციკლებს, რომელიც შედგება ტემპერატურული ცვლილებისაგან, რის საფუძველზეც დნმ-ის მოლეკულა შეიძლება გაიშალოს, დაუკავშირდეს პრაიმერი (ანილირება) და მოხდეს ენზიმური ელონგაცია დნმ-ნიმუშზე. ძირითადი იდეა, რამაც PCR გახადა გამოყენებადი მრავალი პრობლემის გადასაჭრელად, არის თერმოსტაბილური დნმ-პოლიმერაზები (მაღალი ტემპერატურის პირობებში დენატურაციის თავიდან ასაცილებლად) რათა *in vitro* პირობებში, ცალკეულ სინჯარაში, რეპლიკაციის გზით მოახდინოს დნმ-ის მონაკვეთის ამპლიფიკაცია. PCR-ის მეორე ძირითადი კომპონენტი არის პრაიმერები, იგივე მოკლე დნმ-ფრაგმენტები, რომლებიც არიან დნმ-ნიმუშის სამიზნე რეგიონის კომპლემენტარულ თანმიმდევრობები. პროდუქტი-დნმ შეიძლება გამოვიყენოთ როგორც

სარეპლიკაციო ნიმუში, ქმნის რა ჯაჭვური რეაქციის ექსპონენციალური ამპლიფიკაციის მოდელს.

ერთ-ერთი ყველაზე მნიშვნელოვანი განმსაზღვრელი ფაქტორი ამპლიკონების რაოდენობაზე არის "შეჯიბრი" ამპლიკონების და პრაიმერის დაკავშირებასა და პროდუქტი მოლეკულების ერთმანეთთან დაკავშირებას (self-annealing) შორის. PCR -ის საწყის საფეხურზე ამპლიკონების მოლეკულები არიან საკმაოდ დაბალი კონცენტრაციებით და ერთმანეთთან დაკავშირება არ ხდება და ამპლიფიკაციის პროცესი გრძელდება ჯაჭვური რეაქციით. თუმცა, ამპლიკონების აკუმულაციით ერთმანეთთან დაკავშირება ხდება დომინანტი, PCR ნელდება, და საბოლოოდ დნმ-ამპლიფიკაცია წყდება. ამგვარად, საამპლიფიკაციო სისტემა რომელიც აღკვეთს ამპლიკონების ერთმანეთთან დაკავშირებას (self-annealing) საკმაოდ გააუმჯობესებს PCR-ს პროდუქტიულობას. ტემპერატურის ცვლილება არის PCR-ის კიდევ ერთი უარყოფითი ფაქტორი, რადგანაც იგი საჭიროებს ძვირადღირებულ აღჭურვილობას თერმოციკლებისთვის და ართულებს პათოგენების სწრაფ დეტექციას, ამიტომ ნაკლებად ხელსაყრელია. ამასთან, სწრაფი ტემპერატურული ცვლილება აადვილებს პროდუქტს დნმ-ის შეცდომით დაკავშირებას პრაიმერთან და ზემოქმედებას ახდენს პოლიმერაზების სტაბილურობაზე. ამჟამინდელი რეალური დროის PCR იყენებს FRET-ზე დამყარებულ დამატებით მოლეკულებს, რომელიც მოითხოვს ძვირადღირებულ სინთეზსა და მნიშვნელოვან ძალისხმევას, რათა კონსტრუირდეს სენსიტიური ნიმუშები. რაოდენობის განსაზღვრის მექანიზმი შიდა ფლუორესცირებადი პრაიმერით, დამატებითი მოლეკულების გარეშე, საგრძნობლად გაამარტივებს დაფიქსირების პროცესს.

ახლახანს აღმოჩენილი იქნა, რომ კვადრუპლექს d(GGGTGGGTGGGTGGG)-ის (G3T) თავისუფალი ენერგია შეიძლება გამოვიყენოთ დნმ-ის იზოთერმული კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაციისთვის, Quadruplex Priming Amplification (QPA) (ავტორი ბესიკ კანკია (24)). G3T თანმიმდევრობა არის ბაზისური დნმ-ის აპტამერისათვის, რომელიც შეიქმნა HIV-1 ინტეგრაზის წინააღმდეგ (20). QPA-ის ძირითადი ფაქტორი არის ის, რომ K^+ -ის თანაობისას G3T თანმიმდევრობას შეუძლია წარმოქმნას კვადრუპლექსი, მნიშვნელოვნად უფრო ხელსაყრელი თერმოდინამიკით ვიდრე შესაბამისი დნმ-

დუპლექსი. პრაიმერს, რომელიც G3T-ის წაკვეთილი ვერსიაა (5'-GGGTGGGTGGGTGGG-3' გამოკლებული 1,2 ან 3 გუანინი 3'-ბოლოდან), შეუძლია თავისთავად დაიკეცოს მონომოლეკულურ კვადრუპლექსად, პოლიმერაზას მიერ ელონგაციის შემდეგ ტემპერატურული ცვლილების გარეშე (24).



გრაფიკი 1. დუპლექსების ლღობის წარმოებული (dA/dT). წყვეტილი ხაზი: K^+ -ით (25 mM KCl, 25 mM CsCl, 2 mM $MgCl_2$); მთლიანი ხაზი K^+ -ის გარეშე (50 mM CsCl, 2 mM $MgCl_2$). ($A=2AP$).

ჩატარებულმა კვლევამ G3T-ATT/CCCACCCACCCCTCCCC დუპლექსზე აჩვენა საინტერესო ლღობის მრუდები (გრაფიკი 1) : K^+ იონების არ არსებობის შემთხვევაში დუპლექსი იშლება 70 °C-ზე როგორც იყო მოსალოდნელი მსგავსი ანალიზებიდან (62). თუმცა K^+ იონების თანაობისას დუპლექსი ღვება გაცილებით დაბალ ტემპერატურაზე, 60 °C. ასე, რომ K^+ იონების არ არსებობის დროს დუპლექსი არის მნიშვნელოვნად სტაბილური. როდესაც G3T მოცილებული აქვს ორი გუანინი კვადრუპლექსს ვერ წარმოქმნის, ამიტომ წარმოქმნილი დუპლექსის ლღობის მრუდები ერთნაირია K^+ იონების თანაობისას და მათ გარეშე $T_M = 65$ °C. როგორც მოსალოდნელი იყო, Cs^+ იონების თანაობისას, 15 bp სიგრძის დუპლექსი უფრო სტაბილურია ვიდრე 13 bp სიგრძის დუპლექსი. თუმცა K^+ იონების თანაობისას საპირისპიროა: უფრო მოკლე დუპლექსი 5 °C-ით უფრო სტაბილურია ვიდრე უფრო გრძელი დუპლექსი. ეს უჩვეულო შედეგი წარმოადგენს იზოთერმული QPA-ის შესაძლებლობას. დამატებით, კვადრუპლექსის დეტექციისათვის გამოყენებულ იქნა

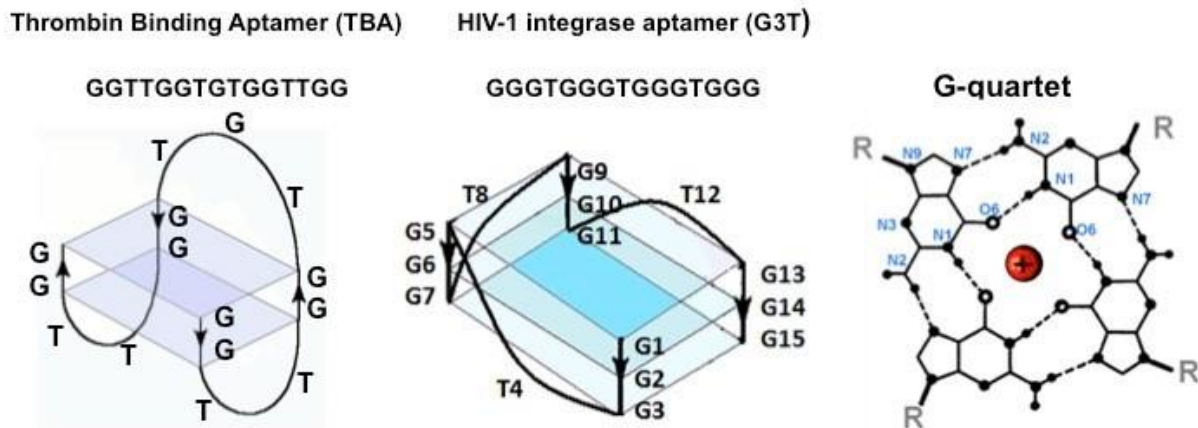
პრაიმერი კომბინირებული ფლურესცენციული მოლეკულით (2AP ან 3MI) მეოთხე პოზიციაში, რომელიც აჩვენებს თითქმის 100-ჯერ გაზრდილ ფლურესცენციას კვადრუპლექსის ფორმირებისას, რაც მარტივი და ეფექტური რაოდენობრივი განსაზღვრის საშუალებას იძლევა, დამატებითი მოლეკულების გარეშე (24).

აღნიშნული ნაშრომი ეძღვნება: ა) კვადრუპლექს d(GGGTGGGTGGGTGGG) (G3T)-ის და მისი ვარიაციების სტაბილურობის შესწავლას ულტრაიისფერ-ხილული სპექტროსკოპიის და წრიული დიქროიზმის მეთოდების გამოყენებით; ბ) კვადრუპლექს G3T-ის კინეტიკის კვლევას Stopped-flow ტექნიკის გამოყენებით; გ) G3T-ზე დაფუძნებული კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაციის შემუშავებას ფართო ტემპერატურულ შუალედში.

სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა

თავი 1. კვადრუპლექსი

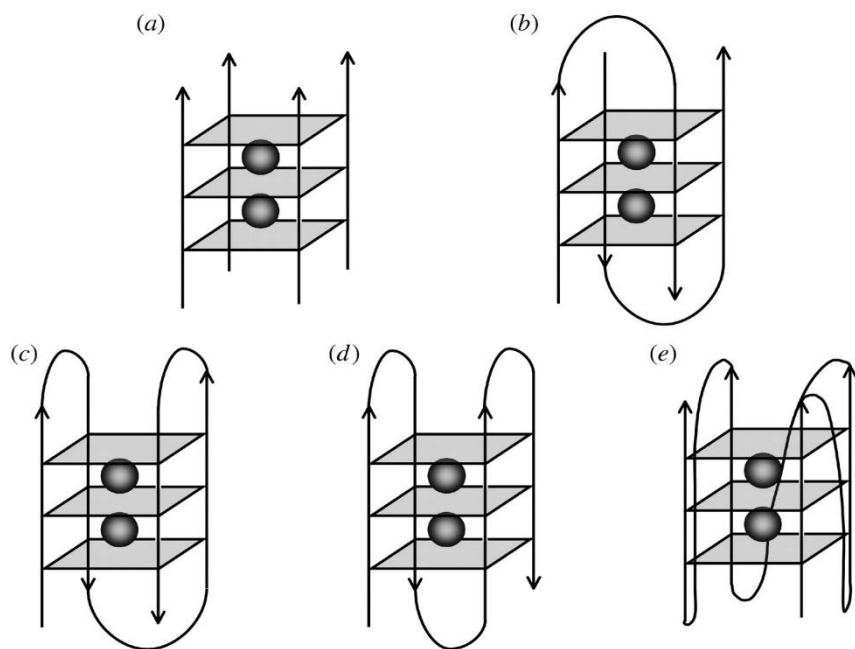
დნმ-ის კვადრუპლექსები დაკავშირებული არიან გენის ექსპრესიის რეგულაციასთან (30) და ტელომერებთან – ქრომოსემების ბოლოებზე არსებულ უბნებთან (8,14,33,48). კვადრუპლექსები ასევე ნაწილობრივ დნმ-აპტამერებში (2,21,44,50).



ილუსტრაცია 1. კვადრუპლექსები: TBA (მარცხნივ) , G3T (ცენტრში) და G-კვარტეტი (მარჯვნივ).

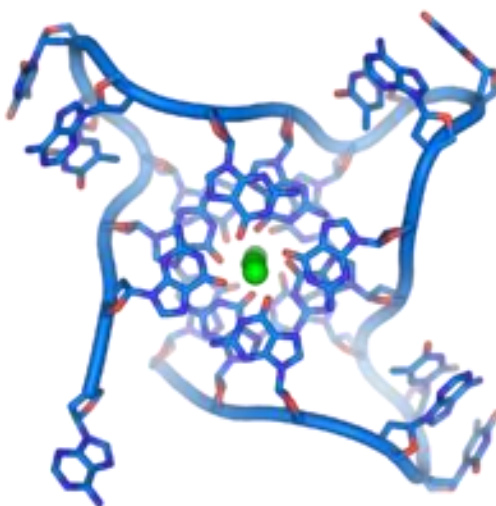
მონომოლეკულური კვადრუპლექსები ფორმირდებიან G-კვარტეტების შრეებისგან, რომლებიც ერთმანეთთან დაკავშირებული არიან ერთჯაჭვიანი მარყუჟებით. G-კვარტეტები შედგებიან ოთხი გუანინისაგან, რომლებიც დაკავშირებული არიან კვადრატული ბრტყელი კონფიგურაციით, სადაც თითოეული გუანინი ურთიერთქმედებს თავის ორ მეზობელთან წყალბადური ბმებით (8 თითოეულ კვარტეტზე) (ილუსტრაცია 1, მარჯვნივ). კვადრუპლექსის ფორმირება საჭიროებს კათიონების არსებობას (როგორც არის K^+), რომლებიც სპეციფიკურად უკავშირდებიან

გუანინის O6 კარბონილ ჯგუფებს G-კვარტეტების სიბრტყეებს შორის. კათიონების G-კვარტეტების ცენტრში კოორდინირებისა და სტეკინგ-ურთიერთქმედებების გამო, მონომოლეკულური კვადრუპლექსები საკმაოდ სტაბილურ და კარგად დაკეცილ სტრუქტურებს წარმოადგენენ. კვადრუპლექსებს გააჩნიათ უნიკალური ოპტიკური თვისებები გრძელტალღოვანი ულტრაიისფერი დიაპაზონის უბანში 295 ნმ (23,36,43). თავისი სტრუქტურის მიხედვით გხვდება პარალელური და ანტიპარალელური კვადრუპლექსი. ანტიპარალელურ კვადრუპლექსში გუანინების მიმართულება ანტიპარალელურია, ხოლო პარალელურში შესაბამისად პარალელური. მაგალითად პირველ ილუსტრაციაზე მარცხნივ გამოსახულია მონომოლეკულური ანტიპარალელური კვადრუპლექსი TBA, ხოლო ცენტრში მონომოლეკულური პარალელური G3T.



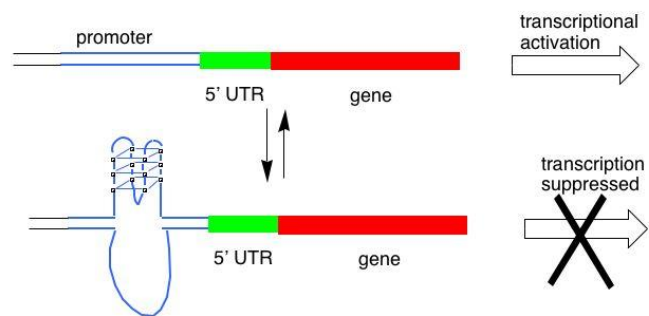
ილუსტრაცია 2. სქემატურად კვადრუპლექსის სტრუქტურები: a) ტეტრამოლეკულური პარალელური; b) ბიმოლეკულური ანტიპარალელური; c) მონომოლეკულური ანტიპარალელური; d) მონომოლეკულური ანტიპარალელური; e) მონომოლეკულური პარალელური (19).

ხაზოვანი ქრომოსომების ბოლოებზე მდებარეობს დნმ-ის სპეციალიზირებული სტრუქტურები — ტელომერები. ამ უბნების ძირითადი ფუნქცია ქრომოსომათა ბოლოების მთლიანობის ხელშეწყობაა(15). ტელომერები აგრეთვე იცავენ დნმ-ის ბოლოებს ეგზონუკლეაზებისგან, დეგრადაციისგან და ხელს უშლიან რეპარაციის სისტემის აქტივაციას(38) ადამიანის უჯრედებში ტელომერები ხშირად წარმოდგენილია ერთჯაჭვიანი დნმ-ის სახით და შედგება TTAGGG თანმიმდევრობის მქონე რამდენიმე ათასი გამეორებადი ერთეულისგან(60) გუანინის დიდი შემცველობის მქონე ეს თანმიმდევრობები წარმოქმნიან კვადრუპლექსს კალიუმის იონების კოორდინირებით(5).



ილუსტრაცია 3. დნმ-კვადრუპლექსი ფორმირებული ტელომერული თანმიმდევრობის მიერ ადამიანის ქრომოსომაში. ცენტრში კოორდინირებული მეტალის იონები (51).

მიუხედავდ იმისა რომ, კვადრუპლექსები ნანახია ქრომოსომის ტელომერულ უბნებში და აგრეთვე მონაწილეობენ გენის ექსპრესიის რეგულაციაში (ილუსტრაცია 4), დღეისათვის მაინც არ არის ბოლომდე შესწავლილი კვადრუპლექსის როლი. ამიტომ ინტენსიურად მიმდინარეობს კვლევები ამ მიმართულებით.



ილუსტრაცია 4. ერთ-ერთი მოდელი, თუ როგორ მონაწილეობს კვადრუპლექსი გენის ექსპრესიის რეგულაციაში: პრომოტორ უბანში კვადრუპლექსის ფორმირებას შეუძლია შეაჩეროს გენის ექსპრესია (4).

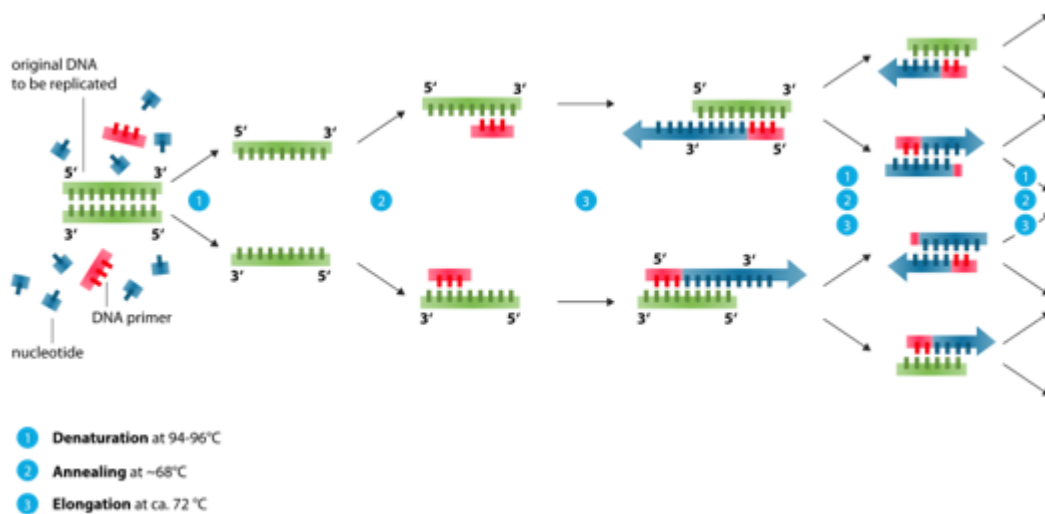
თავი 2. პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (Polymerase chain reaction (PCR)) 1983 წელს შეიმუშავა კერი მულისმა(1) მისი თეორიის თანახმად, შესაძლებელი იყო დნმ-ის საკვლევი უბნის ამპლიფიკაცია მისი მრავალჯერადი გაორმაგებით დნმ-პოლიმერაზას მიერ. ამ აღმოჩენისათვის, 1993 წელს კერი მულისს ნობელის პრემია მიენიჭა. პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის მეთოდი დაფუძნებულია დნმ-ს კონკრეტული უბნის მრავალჯერად კოპირებაზე პოლიმერაზას საშუალებით. ამ შემთხვევაში კოპირება ხდება დნმ-ს კონკრეტული, წინასწარ შერჩეული უბნიდან, საკვლევ ნიმუშში მისი არსებობის შემთხვევაში. ცოცხალ ორგანიზმში მიმდინარე რეპლიკაციისგან განსხვავებით, PCR-ს საშუალებით ამპლიფიცირდება დნმ-ს მოკლე მონაკვეთები, 100 *bp*- დან 10000 *bp*-მდე, თუმცა ზოგიერთი ტექნოლოგიით შესაძლებელია 40000 *bp*-მდე დნმ-ის მონაკვეთის ამპლიფიცირდება(6).

PCR-ის ჩატარებისთვის საჭიროა (47) შემდეგი კომპონენტების არსებობა:

1. დნმ-ნიმუში, რომელიც შეიცავს ამპლიფიკაციისათვის სამიზნე რეგიონს.
2. ფერმენტი: *Taq*-პოლიმერაზა, სითბოს მიმართ რეზისტენტული დნმ-პოლიმერაზა გამოყოფილი ბაქტერიიდან *Thermus aquaticus*, რომელიც გვხვდება გეიზერებში, 60 °C-ზე მაღალი ტემპერატურის პირობებში. ამგვარად ის რჩება დაუზიანებელი დნმ-ის დენატურაციის დროს.
3. ორი პრაიმერი: ხელოვნურად სინთეზირებული ოლიგონუკლეოტიდები, რომელთა ზომები, როგორც წესი, არ არემატება 30 ფუძეთა წყვილს. (საშუალოდ 18-24 *bp*)(27) ისინი წარმოადგენენ სამიზნე რეგიონის კომპლემენტარულ თანმიმდევრობას და ებმებიან დნმ-ნიმუშის ორივე ჯაჭვს 3' ბოლოდან.

4. დეზოქსირიბონუკლეოტიდების ნარევი (dATP, dGTP, dCTP და dTTP). ეს ნივთიერებები შეადგენენ სამშენებლო მასალას ახლად სინთეზირებული დნმ-ის ფრაგმენტებისთვის.
5. ბუფერი, რომელიც ქმნის PCR რეაქციის მიმდინარეობისათვის ხელსაყრელ პირობებს (pH, იონურ ძალა, დეტერგენტები).
6. ორვალენტური კათიონები, როგორიცაა Mg^{+2} -ის იონები, რომელიც საჭიროა ნებისმიერი ფერმენტის, მათ შორის *Taq*-პოლიმერაზას მუშაობისთვის.
7. მონოვალენტური კათიონები - კალიუმის იონები.



ილუსტრაცია 5. პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია სქემატურად (58).

ჩვეულებრივ PCR შედგება 20-40 ტემპერატურული ცვლილებებისაგან, რომელსაც ციკლს უწოდებენ. ციკლი მოიცავს სამ საფეხურს. განვიხილოთ PCR-ის ციკლის თითოეული საფეხური:

1. დენატურაცია. ციკლის ამ ეტაპზე ხდება სარეაქციო არეში არსებული დნმ-ის ორმაგი ჯაჭვის დაცალკეება. ამ პროცესისათვის საჭიროა მაღალი ტემპერატურა – 94-96°C. აღნიშნულ ტემპერატურაზე სარეაქციო ნიმუშის ინკუბირების შედეგად მიიღება დნმ-ის

ორი ერთჯაჭვიანი მოლეკულა. ეტაპის ხანგრძლივობა შეადგენს 20-30 წამს. რიგ შემთხვევებში, ციკლის დაწყებას წინ უსწრებს სარეაქციო ნარევის წინასწარი გაცხელება 95-96°C-ზე 2-5 წუთის განმავლობაში, დნმ-ს მოლეკულისა და პრაიმერების სრული დენატურაციის მიზნით. ამ მოვლენას ეწოდება „ცხელი სტარტი“ (49) და ხელს უშლის არასპეციფიკური პროდუქტების წარმოქმნას.

2. ანელინგი. ანელინგის სტადიაზე ხდება დენატურაციის შედეგად მიღებული დნმ-ის ერთმაგ ჯაჭვებთან პრაიმერების დაკავშირება. ერთი პრაიმერი უკავშირდება დენატურირებული დნმ-ის ერთჯაჭვს, ხოლო მეორე პრაიმერი ასევე უკავშირდება მეორე ჯაჭვს. ამგვარად პრაიმერები შემოსაზღვრავენ დნმ-ის ამპლიფიცირებად მინაკვეთს. დაკავშირება ხდება კომპლემენტარულად, ჩარგაფის წესის მიხედვით, რაც ნიშნავს, რომ ორმაგჯაჭვიან დნმ-ში ადენინის საპირისპიროდ აუცილებლად არის თიმინი, ხოლო გუანინი მუდამ უწყვილდება ციტოზინს. თუ აღნიშნული პირობები არ იქნება დაცული, მაშინ ანელინგი არ განხორციელდება. ტემპერატურა დამოკიდებულია პრაიმერის შემადგენლობაზე და თითქმის უტოლდება პრაიმერის ლლობის ტემპერატურას (T_m). პრაიმერის შერჩევისას, თუ მისი სიგრძე და ნუკლეოტიდების შემცველობა ან ტემპერატურული რეჟიმი არასწორადაა გათვლილი, რეაქციისას შესაძლებელია არასპეციფიკური კომპლემენტარული კომპლექსების წარმოქმნა დნმ-ნიმუშის სხვა მონაკვეთებთან, ეს კი გამოიწვევს არასპეციფიკური პროდუქტების წარმოქმნას. ლლობის ტემპერატურის ზედა ზღვარი შეზღუდულია პოლიმერაზას ტემპერატურული ოპტიმუმით, მისი აქტივობა ეცემა, თუ ტემპერატურა გადააჭარბებს 80°C-ს (7). პრაიმერების შერჩევისას გათვალისწინებული უნდა იქნას შემდეგი კრიტერიუმები: GC შემცველობა უნდა იყოს დაახლოებით 60%; პრაიმერების ლლობის ტემპერატურათა შორის სხვაობა არ უნდა აღემატებოდეს 5°C-ს; ხსნარი არ უნდა შეიცავდეს არასპეციფიკურ მეორად სტრუქტურებს. სასურველია, რომ პრაიმერები ბოლოზე შეიცავდეს გუანინს ან ციტოზინს, რადგანაც ისინი წარმოქმნიან სამ წყალბადურ კავშირს დნმ-ნიმუშის მოლეკულასთან, რაც ჰიბრიდიზაციას უფრო სტაბილურს ხდის. ტემპერატურული რეჟიმი, პრაიმერების შემცველობიდან გამომდინარე, მერყეობს 50 – 68°C შორის, დრო – 20 წამიდან 1 წუთამდე (61).

3. PCR-ის მესამე ეტაპია **ელონგაცია**, მიერთებული პრაიმერებიდან დაწყებული, დნმ-ს ჯაჭვის კომპლემენტარული დაგრძელება, რომელიც მიმდინარეობს 5' ბოლოდან 3' ბოლოს მიმართულებით. სამშენებლო მასალას ახალი დნმ-ს ჯაჭვების სინთეზისათვის წარმოადგენს საინკუბაციო არეში დამატებული დეზოქსირიბონუკლეოტიდები. სინთეზს აკატალიზებს ფერმენტი *Taq*-პოლიმერაზა 72°C ტემპერატურაზე. ეტაპის ხანგრძლივობა დამოკიდებულია სამიზნე რეგიონის ზომაზე. ამპლიფიკაციის პირველი ციკლის შემდეგ წარმოქმნილი დნმ-ის ახალი ჯაჭვები ემსახურებიან ამპლიფიკაციის მეორე ციკლს, როგორც დნმ- ნიმუშები. აღსანიშნავია, რომ ამპლიკონების დაგროვება გეომეტრიული პროგრესიით მიმდინარეობს დროის გარკვეულ მონაკვეთში, რომლის შემდეგაც იგი ძალზე მცირდება ამპლიკონების ერთმანეთთან დაკავშირების გამო (self-annealing). ამ ეფექტს ეწოდება „პლატოს ეფექტი“.

რეალური დროის PCR (Real-time PCR). რეალური დროის პოლიმერაზული ჯაჭვური რექციის პრინციპული სხვაობა ჩვეულებრივ PCR -სგან არის ის, რომ ამ შემთხვევაში შესაძლებელია ამპლიფიკაციის პროდუქტის რაოდენობრივი განსაზღვრა ამპლიფიკაციის მიმდინარეობის დროს. ამჟამინდელი რეალური დროის PCR იყენებს FRET-ზე დამყარებულ დამატებით მოლეკულებს, რომლებიც მას შემდეგ რაც ჩაებმებიან ამპლიკონებს, იწყებენ ფლურესცირებას. ამგვარად შესაძლებელია საკვლევი დნმ-სა და რნმ-ის რაოდენობრივი განსაზღვრა. რაოდენობრივი ინფორმაცია განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ვირუსული და სხვა ინფექციური დაავადებების მკურნალობისას.

თავი 3. ნუკლეინის მჟავების ტესტირების მეთოდები

ნუკლეინის მჟავების ტესტირება (Nucleic acid testing (NAT)) ინფექციური დაავადებებისათვის თითქმის ექსკლუზიურად სრულდება ცენტრალურ ლაბორატორიებში, სადაც მაღალი ხარისხის ხელსაწყოებს გამოიყენებს გამოცდილი სამედიცინო პერსონალი. თუმცა Point of care (POC) ნუკლეინის მჟავების ტესტირება, რომელიც სრულდება პაციენტთან უშუალო სიახლოვეს, შეიძლება გაკეთდეს ამბულატორიაში ან სახლში და წარმოადგენს უპირატესობას როდესაც სწრაფი პასუხი მნიშვნელოვანია ან როდესაც ცენტრალური ლაბორატორიები მიუწვდომელია (39).

მარტივი დიაგნოსტიკური (POC) ტესტირება იყენებს სამ ძირითად საფეხურს: ნიმუშის მომზადება, ამპლიფიკაცია და დეტექცია. ცხრილ 1-ში მოყვანილია თუ როგორ არის ინტეგრირებული ეს სამი საფეხური ჩამოთვლილ POC ტესტირებებში.

Platform	Manufacturer	Sample prep included?	Amplification	Detection
GeneXpert	Cepheid	Y	PCR	RTF
Liat Analyzer	IQuum	Y	PCR	RTF
MDx	Biocartis	Y	PCR	RTF
FL/ML	Enigma	Y	PCR	RTF
FilmArray	Idaho technologies	Y	PCR	RTF
Razor	Idaho technologies	N	PCR	RTF
R.A.P.I.D.	Idaho technologies	N	PCR	RTF
LA-200	Eiken	N	Isothermal (LAMP)	RTT
Twista	TwistDX	N	Isothermal (RPA)	RTF
BART	Lumora	N	Isothermal (LAMP)	RTB
Genie II	Optigene	N	Isothermal (LAMP)	RTF
SAMBA	Diagnostics for the Real World	N	Isothermal (similar to NASBA)	NALF
BES ^a Cassette ^b	BioHelix/ Ustar Biotech	N	Not included, but typically isothermal	NALF

ცხრილი 1. მარტივი დიაგნოსტიკური (POC) დანადგარები.

ნიმუშის მომზადება - წარმოადგენს სირთულეს POC ტესტირებებში, რადგან ის მოითხოვს რთულ პროცედურებს, რომლებიც ზოგჯერ ხელით იმართება. კლინიკურ ლაბორატორიებში ნიმუშის მომზადება ავტომატიზირებულია დიდი ხელსაწყოებით. ხოლო POC ტესტირებებში, ნიმუშის მომზადება ინტეგრირებულია ამპლიფიკაციასთან და დეტექციასთან მინიატურულ ჩაკეტილ სისტემაში. ნიმუშის მომზადების ერთ-ერთ მნიშვნელოვან მეთოდს წარმოადგენს პათოგენის ლიზისი. ბევრი პათოგენის ლიზისი შესაძლებელია ქიმიურად ან ენზიმების მეშვეობით, მაგრამ ისეთი მიკროორგანიზმის ლიზისი როგორიცაა *Mycobacterium tuberculosis* ძნელია. ამიტომ ზოგიერთი POC ტესტირება იყენებს მექანიკურ მეთოდს უჯრედის გასახლეჩად. ამასთან ნიმუშის მომზადების დროს მინიშვნელოვანია რომ მოხდეს ნუკლეინის მჟავების გასუფთავება-გამოყოფა, რადგან POC ტესტირებები გამოიყენებს დნმ-პოლიმერაზას, რომელიც შეიძლება ინჰიბიტორდეს სხვა ქიმიური ნაერთებით. ზოგიერთი POC მეთოდი იყენებს სილიკონით დაფარულ მაგნიტურ მძივებს, რომლებიც მას შემდეგ რაც მათ მიეწებება დნმ, შეუძლიათ მოძრაობა თხევადი პარაფინის ფენებს შორის. ასეთი მეთოდების გამოყენებით შესაძლებელია თავიდან ავიცილოთ პოლიმერაზის მოქმედების შეჩერება.

ამპლიფიკაცია. ნუკლეინის მჟავების ტესტირება საჭიროებს რომ უმცირესი ლიმიტი პათოგენის დეტექციისა იყოს დაახლოებით 100 მოლეკულა მილილიტრში. დღეისათვის ეს მიიღწევა მხოლოდ პოლიმერაზაზე დაფუძნებული ამპლიფიკაციით. PCR გამოიყენებს თერმოციკლს დნმ-ის ლღობისათვის, პრაიმერის დაკავშირებისათვის და ელონგაციისთვის. იზოთერმული დნმ ამპლიფიკაციის მეთოდები კი საჭიროებს მხოლოდ ერთ განსაზღვრულ ტემპერატურას, რაც ნიშნავს უფრო იაფ და მარტივ კომპლექსს. იზოთერმული ამპლიფიკაცია შეიძლება შესრულდეს მარტივი გამაცხელებლით ან ეგზოთერმული რეაქციის ენერგიით.

Assay	Reaction temperature (°C) ^a	Reaction duration (min) ^a	Multiplex ^b	Rapid detection formats ^c	Target
<i>Methods based on RNA transcription</i>					
NASBA	41 ^d	105	Y	RTF, NALF	RNA (DNA)
TMA	60 ^d	140	Y	RTF	RNA (DNA)
SMART	41 ^d	180	N/A	RTF	RNA, DNA
<i>Methods based on DNA replication with enzymatic duplex melting/primer annealing</i>					
HDA	65	75–90	Y	RTF, NALF	DNA ^e
RPA	30–42	20	Y	RTF, NALF	DNA ^e
<i>Methods based on DNA-polymerase-mediated strand displacement from linear or circular targets</i>					
LAMP	60–65 ^d	60–90	N/A	RTF, NALF, RTT, TE	DNA ^e
CPA	65	60	N/A	RTF, NALF	DNA
SMART-AMP	60	45	N/A	RTF	DNA ^e
RCA	65	60	N/A	RTF	DNA ^e
RAM	63 ^d	120–180	N/A	RTF	DNA ^e
<i>Methods based on polymerase extension/strand displacement, plus a single strand cutting event</i>					
SDA	37	120	Y	RTF, NALF	DNA ^e
NEAR	55	10	Y	RTF, NALF	DNA ^e
NEMA	65	30	N/A	NALF	DNA
ICA	60	60	N/A	RTF	DNA
EXPAR	55	10–20	Y	RTF, NALF	DNA
BAD AMP	40	40	N/A	RTF	DNA
PG-RCA	60	60–120	N/A	RTF	DNA

ცხრილი 2. იზოთერმული ამპლიფიკაციის მეთოდები, რომლებიც დაფუძნებულია: რნმ-ის ტრანსკრიფციაზე (პირველი სამი); დნმ-ის რეპლიკაციაზე ენზიმურად დუპლექსის გაღლობით და პრაიმერის დაკავშირებით (შემდეგი ორი); დნმ-პოლიმერაზას ჯაჭვის ჩანაცვლების უნარზე წრფივი ან წრიული სამიზნე მოლეკულებიდან (შემდეგი ხუთი). პოლიმერაზულ ექსტენცია/ ჯაჭვის ჩანაცვლების უნარს პლუს ერთმაგი ჯაჭვის გაჭრა (შემდეგი შვიდი).

დეტექცია. ნუკლეინის მჟავების დეტექცია შეიძლება მოხდეს როგორც რეაქციის შემდეგ (endpoint detection), ასევე რეაქციის პროგრესის დროს (real-time detection). რეაქციის შემდეგი დეტექცია მოითხოვს უფრო მარტივ კომპლექს ვიდრე რეალური დროის

დეტექცია. რეალური დროის დეტექცია ნიშნავს რომ ამპლიფიკაცია ინტეგრირებულია დეტექციასთან. უმრავლესი დღეს არსებული POC მეთოდები დაფუძნებულია რეალური დროის ფლურესცენციულ დეტექციაზე RTF (ცხრილი 1), რომელიც შესაბამისად მოითხოვს ხელსაწყოების რთულ და ძვირ კომპლექსს. მარტივი და იაფი რეალური დროის დეტექცია შესაძლებელია იზოთერმული პროცესებისთვის.

დღევანდელი კლინიკური დიაგნოსტიკის მეთოდები, რომელთა უმრავლესობაც PCR-ის ბაზაზეა დაფუძნებული კვლავ რთული სისტემებია, გამოიყენება მხოლოდ ცენტრალურ კლინიკებში და ძვირადღირებულია. ნუკლეინის მჟავების ამპლიფიკაციის მოსახერხებელი სისტემები, რომლებშიც ინტეგრირებული იქნება ნიმუშის მომზადება და დეტექცია, ამასთან არ იქნება ძვირი, კვლავ გამოწვევად რჩება (39).

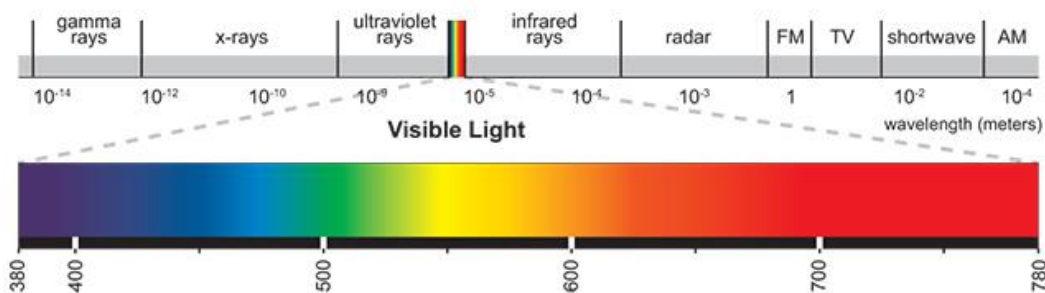
კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაცია (QPA). ახლახანს შემუშავებულ იქნა, დნმ-ის იზოთერმული ამპლიფიკაციის მეთოდი: კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაცია, Quadruplex Priming Amplification (QPA), რომელიც დაფუძნებულია კვადრუპლექს d(GGGTGGGTGGGTGGG)-ზე (ავტორი ბესიკ კანკია). G3T თანმიმდევრობა არის ბაზისური დნმ-ის აპტამერისათვის, რომელიც შეიქმნა HIV-1 ინტეგრაციის წინააღმდეგ (20). QPA-ის ძირითადი ფაქტორი არის ის, რომ K^+ -ის თანაობისას G3T თანმიმდევრობას შეუძლია წარმოქმნას კვადრუპლექსი, მნიშვნელოვნად უფრო ხელსაყრელი თერმოდინამიკით ვიდრე შესაბამისი დნმ-დუპლექსი. პრაიმერს, რომელიც G3T-ის წაკვეთილი ვერსიაა (5'-GGGTGGGTGGGTGGG-3' გამოკლებული 1,2 ან 3 გუანინი 3'-ბოლოდან), შეუძლია თავისთავად დაიკეცოს მონომოლეკულურ კვადრუპლექსად, პოლიმერაზას მიერ ელონგაციის შემდეგ ტემპერატურული ცვლილების გარეშე. კვადრუპლექსის ფორმირება გამორიცხავს, პრაიმერის სამიზინე მოლეკულასთან ხელახალ დაკავშირებას და რეაქცია გაგრძელდება, ყველა კვადრუპლექსის ფორმირებამდე. დამატებით, კვადრუპლექსის დეტექციისათვის გამოყენებულ იქნა G3T კომბინირებული ფლურესცენციული მოლეკულით მეოთხე პოზიციაში, რომელიც აჩვენებს თითქმის 100-ჯერ გაზრდილ ფლურესცენციას კვადრუპლექსის ფორმირებისას, რაც საშუალებას იძლევა მარტივი და ეფექტური რაოდენობრივი განსაზღვრის, დამატებითი მოლეკულების გარეშე (24).

მეთოდოლოგია

თავი 1. გაზომვის მეთოდები

1.1 ულტრაიისფერ-ხილული სპექტროსკოპია

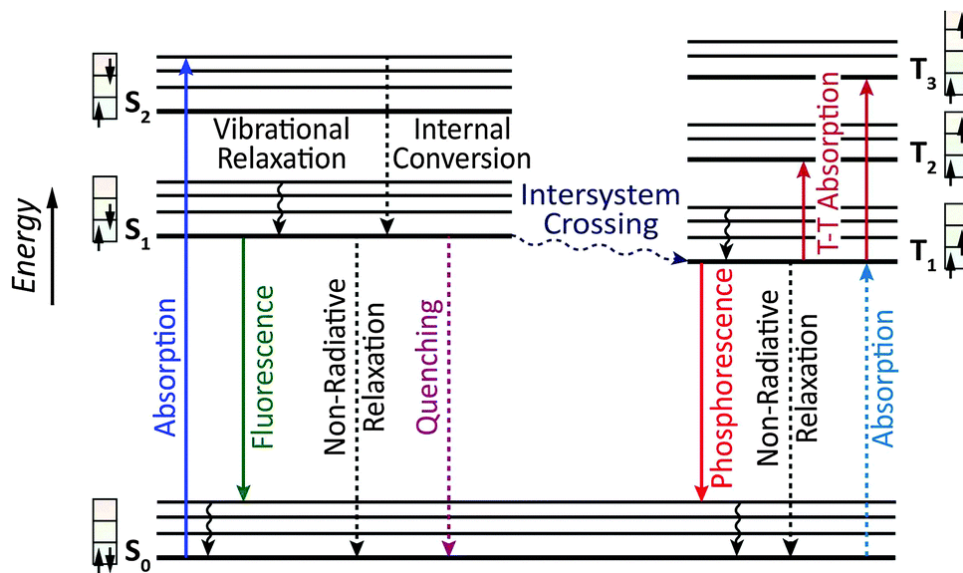
სინათლე ჩვენს ცხოვრებაში განუზომლად დიდ როლს ასრულებს. გარემომცველი გარემოს შესახებ ინფორმაციის ყველაზე მეტ ნაწილს ადამიანი სინათლის საშუალებით იღებს. მაგრამ, ფიზიკის ნაწილში, რომელსაც ოპტიკას ვუწოდებთ, სინათლეში არა მხოლოდ ხილული სინათლე იგულისხმება, არამედ მისი მიმდებარე ელექტრომაგნიტური გამოსხივების სპექტრის ფართო დიაპაზონიც - ინფრაწითელიდან ულტრაიისფერამდე. თვისებების მიხედვით სინათლე პრინციპულად არ განირჩევა ელექტრომაგნიტური გამოსხივების სხვა დიაპაზონებისაგან. სპექტრის სხვადასხვა უბნები ერთმანეთისაგან მხოლოდ ტალღის სიგრძითა λ და სიხშირით ν განსხვავდებიან, ხილული სინათლე დაახლოებით 380-780 ნმ დიაპაზონს იკავებს. ულტრაიისფერი გამოსხივება დაახლოებით მდებარეობს 10 – 380 ნმ, თუმცა ძირითადად განასხვავებენ შორ და ახლო ულტრაიისფერს. შორი ულტრაიისფერი 10-200 ნმ-ის დიაპაზონშია ძლიერად შთანთქავს ჰაერი, 200-380 ნმ-ის დიაპაზონში ახლო ულტრაიისფერია, აქტიურად გამოიყენება სპექტროსკოპიაში. 780 ნმ - 1 მმ დიაპაზონში მდებარეობს ინფრაწითელი გამოსხივება.



ილუსტრაცია 6. ელექტრომაგნიტური გამოსხივება (მ), ხილული სინათლე (ნმ) (9).

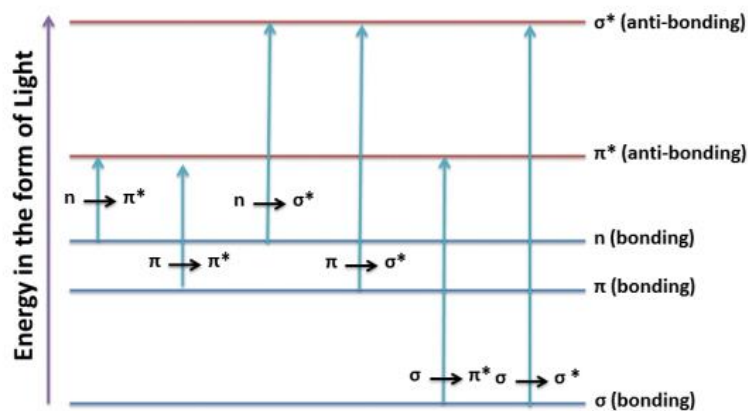
სინათლე წარმოადგენს ელექტრომაგნიტურ ტალღას, რომელიც წარმოდგენილია ურთიერთპერპენდიკულარულ სიბრტყეებში მერხევ ელექტრული და მაგნიტურ ველებით რომლებიც თავის გავრცელების გზაზე იცვლიან თავიანთ მნიშვნელობას სინუსის ან კოსინუსის კანონით. როგორც ითქვა სინათლე ელექტრომაგნიტურ ტალღას წარმოადგენს, თუმცა კვანტური ფიზიკის თვალთახედვით ის ასევე განიხილება როგორც კორპუსკულური, ანუ ფოტონური ბუნების ნაწილაკების ნაკადი, რომელსაც გააჩნია როგორც ენერგია, ასევე მოძრაობის მასაც. ფოტონის ენერგიის დასათვლელად გამოიყენება ფორმულა: $E=hc/\lambda=h\nu$, სადაც h - პლანკის მუდმივაა ($h \approx 6.63 \cdot 10^{-34}$ ჯ * წმ), c - ვაკუუმში სინათლის სიჩქარე (300 000 კმ/წმ), λ - სინათლის ტალღის სიგრძე, ν – ტალღის სიხშირე.

მოლეკულას ან ქიმიურ ჯგუფს რომელსაც გააჩნია უნარი ხილული ან ახლო ულტრაიისფერი სინათლე შთანთქოს და გადავიდეს ენერგეტიკულად მაღალ, აგზნებულ მდგომარეობაში, ქრომოფორს უწოდებენ.



ილუსტრაცია 7. იაბლონსკის დიაგრამა შთანთქმისთვის, ფლუორესცენციისთვის და ფოსფორესცენციისათვის (18).

ელექტრონის ენერგეტიკული გადასვლები შთანთქმული სინათლის ტოლია: $\Delta E = h\nu$. ხილული სინათლის ენერგია 36-72 კკალ/მოლია, მაშინ როცა ულტრაიისფერი სინათლის ენერგია 200 ნმ ტალღის სიგრძეზე ≈ 143 კკალ/მოლია. ქრომოფორში ამ ენერგიების შესაბამისი ელექტრონები ბმის მიხედვით არის სამი სახის σ , π , n . σ ბმა წარმოიქმნება ელექტრონული ღრუბლების გადაფარვით ატომების ცენტრების შემაერთებელი წარმოსახვითი წრფის გასწვრივ. s ორბიტალები ნებისმიერ ორბიტალთან მხოლოდ σ ბმას წარმოქმნის, დანარჩენ ორბიტალებს σ ბმის წარმოქმნაც შეუძლიათ და π ბმებისაც. თუ ატომებს შორის ერთი ბმაა, ის აუცილებლად არის სიგმა ბმა. π ბმა რამდენიმე შეიძლება იყოს, წარმოიქმნება სავალენტო ორბიტალების გადაფარვით ბირთვების შემაერთებელი წრფიდან ორ მხარეს. ამ დროს გადაფარვის ხარისხი უფრო ნაკლებია და გადაფარვის არეებიც უფრო დაშორებულია ბირთვებიდან. ამიტომ π ბმა გაცილებით სუსტია ვიდრე



ილუსტრაცია 8. ელექტრონის სხვადასხვა გადასვლა დაკავშირებულიდან ანტი-დაკავშირებულ დონეებს შორის სინათლის შთანთქმის შემდეგ (37).

σ ბმა. σ ელექტრონებს აქვთ ყველაზე დაბალი ენერგეტიკული დონე, მათი გადასვლები შორ ულტრაიისფერ უბანშია და იშვიათია. π ელექტრონებს აქვთ უფრო მეტი ენერგია და მათი აგზნება ხილული სინათლითაც შესაძლებელია. n ელექტრონები მხოლოდ ერთ ატომთან არიან დაკავშირებულები და ენერგეტიკულად მაღლა მდებარეობენ. სინათლეს

ძირითადად ის ქრომოფორები შთანთქვენ, რომლებიც შეიცავენ π და n ელექტრონებს და გადადიან უფრო მაღალ ანტიდაკავშირებულ ორბიტალებზე.

Chromophore	Example	Excitation	$\lambda_{\max}$ (nm)	Solvent
C = C	Ethene	$\pi \rightarrow \pi^*$	171	Hexanes
C = O	Ethanal	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	Hexane
		$n \rightarrow \pi^*$	290	
N = O	Nitromethane	$\pi \rightarrow \pi^*$	200	Hexane
		$n \rightarrow \pi^*$	275	

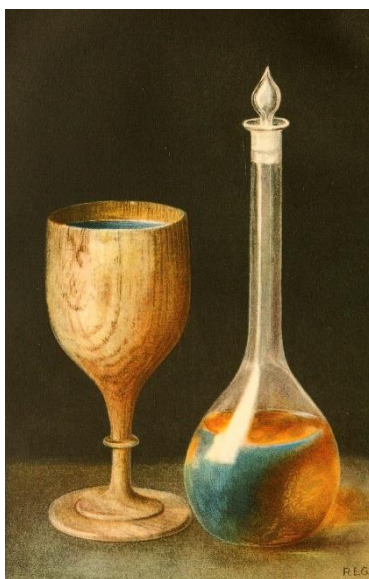
ცხრილი 3. გავრცელებული ქრომოფორები და მათი შთანთქმის ტალღის სიგრძეები(37) .

ლამბერტ-ბერის კანონის თანახმად $A = \log_{10}(I_0/I) = \epsilon \cdot c \cdot L$ სადაც A შთანთქმაა, I_0 დაცემული სინათლის ინტენსივობაა, I გასული სინათლის ინტენსივობა, c ნივთიერების კონცენტრაცია, L სინათლის მიერ ნივთიერებაში გავლილი მანძილი, ϵ ექსტინქციის კოეფიციენტი (ან მოლარული შთანთქმა) და ახასიათებს ქრომოფორის შთანთქმის უნარს, განსაზღვრულ ტალღის სიგრძეზე. ექსტინქციის კოეფიციენტის ერთეულია ლ *მოლ⁻¹ *სმ⁻¹ და წარმოადგენს ორგანული მოლეკულის ერთ-ერთ ფუნდამენტურ მახასიათებელს. როგორც ლამბერტ-ბერის კანონის მარჯვენა ნაწილიდან ჩანს შთანთქმა წრფივადაა დამოკიდებული კონცენტრაციაზე, მაგრამ როდესაც I გასული სინათლის ინტენსივობა I_0 -ზე 100-ჯერ და მეტჯერ ნაკლებია მარჯვენა ტოლობა სამართლიანი არაა. როგორც ავლნიშნეთ, ϵ ექსტინქციის კოეფიციენტი ახასიათებს ქრომოფორის შთანთქმის უნარს ანუ დამოკიდებულია ელექტრონის ენერგეტიკულ გადასვლებზე, მაგალითად $n \rightarrow \pi^*$ გადასვლის ექსტინქციის კოეფიციენტი დაბალია 10 დან 100 ლ *მოლ⁻¹ *სმ⁻¹ -მდე, ხოლო $\pi \rightarrow \pi^*$ გადასვლების 1000 დან 10000-ზე მეტია.

Nucleotide	Lambda Maximum (pH 7.0)	A _m (pH 7.0) molar extinction coefficient
2'-dATP	259 nm	15.2×10^3 ^d
2'-dCTP	280 nm ^a	13.1×10^3 ^{a,e}
2'-dGTP	253 nm	13.7×10^3 ^f
2'-dITP	249 nm	12.2×10^3 ^{b,h}
2'-dTTP	267 nm ^b	9.6×10^3 ^g
2'-dUTP	262 nm	10.2×10^3 ⁱ
c7-2'-ATP	270 nm	12.3×10^3 ^j
c7-2'-dGTP	257 nm	10.5×10^3 ^c
2',3'-ddATP	259 nm	15.2×10^3 ^d
2',3'-ddCTP	280 nm ^a	13.1×10^3 ^{a,e}
2',3'-ddGTP	253 nm	13.7×10^3 ^f
2',3'-ddTTP	267 nm	9.6×10^3 ^g
ATP	259 nm	15.4×10^3
CTP	280 nm ^a	13.0×10^3 ^a
GTP	252 nm	13.7×10^3
UTP	262 nm	10.2×10^3

ცხრილი 4. ნუკლეოტიდების შთანთქმის ტალღის სიგრძეები და ექსტინქციის კოეფიციენტები (ლ *მოლი⁻¹*სმ⁻¹) (ანალიზი ჩატარებულია: *a*- pH 2-ზე, *b*-pH 6-ზე) (11).

ულტრაიისფერ-ხილული სპექტრომეტრი: ტემპერატურადამოკიდებული ულტრაიისფერ - ხილული სპექტრომეტრი არის მოსახერხებელი ხელსაწყო დნმ-ის ან რნმ-ის მეორეული სტრუქტურის, თერმული სტაბილურობის შესასწავლად და ვანტ ჰოფის თერმოდინამიკის შესაფასებლად. აღნიშნულ ნაშრომში სპექტრომეტრი გამოყენებულ იქნა ოლიგონუკლეოტიდების ლღობის ექსპერიმენტების დაკვირვებისთვის. დნმ-ის დუბლექსის გაშლას თან ახლავს შთანთქმის გაზრდა 260 ნმ -ზე, მაშინ როდესაც ნუკლეინის მჟავების ტრიპლექსის გაშლა უკეთესად ხასიათდება 280 ნმ-ზე(22), და კვადრუპლექსებისათვის თერმოდინამიკული პარამეტრების ზუსტი განსაზღვრა შესაძლებელია ულტრაიისფერი სპექტრის ახლო ტალღოვან რეგიონში ~295 ნმ (26,36). იმისათვის რომ გვეჩვენებინა კვადრუპლექსის გაშლისთვის დამახასიათებელი სპექტრი, დნმ-ის თითოეული თანმიმდევრობისთვის ჩვენ ჩავწერეთ სპექტრი K⁺ თანაობისას და მათ გარეშე, სხვადასხვა კათიონებით. გაზომვები ჩატარდა Varian Cary 100 Bio ულტრაიისფერ-ხილული სპექტრომეტრით.



ილუსტრაცია 9. ფლურესცენცია (45).

1.2. ფლურესცენციული სპექტროსკოპია

ფლურესცენცია არის სინათლის გამოსხივება ნივთიერების მიერ, რომელმაც შთანთქა სინათლე ან სხვა ელექტრომაგნიტური გამოსხივება. ასეთ ნივთიერებას ფლუროფორი ეწოდება. გამოსხივებული სინათლე უფრო გრძელტალღოვან უბანშია და ნაკლები ენერგია აქვს ვიდრე შთანთქმული. ამიტომ ფლუროფორი ხასიათდება შთანთქმის და გამოსხივების ტალღის სიგრძეებით, ასევე კვანტური სარგებელით (QY)-გამოსხივებული ფოტონების რაოდენობის შეფარდება შთანთქმულთან (28). როგორც მე-7 ილუსტრაციიდან ჩანს ფლურესცენცია არის, ელექტრონის მკვეთრი ჩამოსვლა ზედა ენერგეტიკული დონიდან დაბალ დონეზე, რომელსაც თან ახლავს სინათლის გამოსხივება. განსხვავება შთანთქმულ და გამოსხივებულ ენერგიებს შორის ძირითადად გამოწვეულია მოლეკულათა ვიბრაციით სინათლის შთანთქმის შემდეგ, ან ზედა აგზნებული დონიდან (S_2) ქვედა აგზნებულ დონეზე (S_1) გადასვლაზე, რომელსაც არ ახლავს გამოსხივება (Internal Conversion). ამასთან შესაძლებელია ფლურესცენციული სიგნალის ჩახშობა, მაგ. როდესაც ფლუროფორი დიპოლ-დიპოლური ურთიერთქმედების გზით(17) ენერგიას გადასცემს ახლო მყოფ სხვა მოლეკულას. როდესაც ორივე მოლეკულა ფლუროფორია განსხვავებული შთანთქმის და

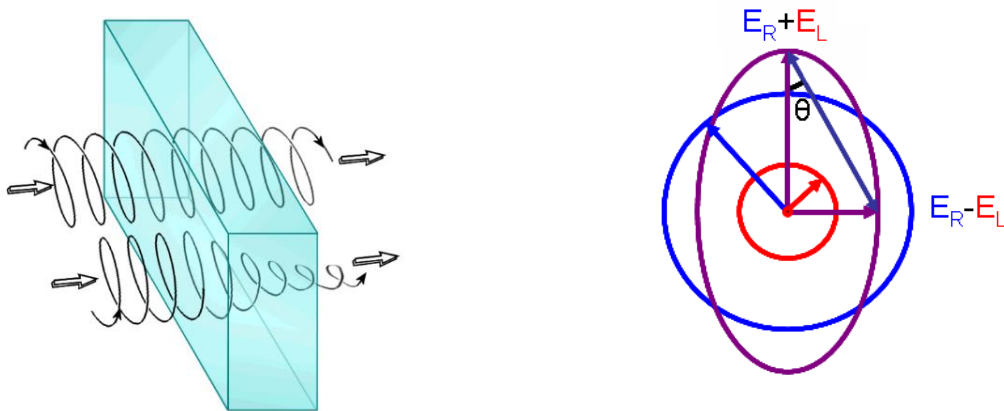
გამოსხივების ტალღის სიგრძეებით ამ მეთოდს იყენებენ FRET (Förster resonance energy transfer) ტექნოლოგიაში. FRET ძლიერ სენსიტიური მეთოდია ხშირ შემთხვევაში პროპორციულია მანძილის მეექვსე ხარისხის (10).

ფლუორიმეტრი. თუ კვადრუპლექსის წარმომქმნელ ოლიგონუკლეოტიდურ თანმიმდევრობაში, (მაგ. 5'-GGGTGGGTGGGTGGG-3') მარყუჟის პოზიციაში ჩასმულია ფლურესცირებადი ნუკლეოტიდი (3-methyl isoxanthopterin (3MI) ან სხვა ნუკლეოტიდის ფლურესცირებადი ანალოგი), მაშინ ფორმირებული კვადრუპლექსის დაფიქსირება შესაძლებელია ფლუორიმეტრით. აღნიშნული მეთოდი საშუალებას იძლევა დავაფიქსიროთ კვადრუპლექსის წარმოქმნა რეალურ დროში. ამ მეთოდით მოხდა კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაციის შემუშავება სხვადასხვა ტემპერატურაზე. გაზომვები ჩატარდა Varian Cary Eclipse ფლურესცენციული სპექტრომეტრით.

1.3. წრიული დიქროიზმის სპექტროსკოპია

ელექტრომაგნიტურ ტალღაში E ელექტრული და B მაგნიტური ვექტორები ურთიერთმართობულია და ტალღის გავრცელების მართობულ სიბრტყეში მდებარეობენ. სინათლის ნივთიერებასთან ურთიერთქმედების პროცესებში ძირითად როლს ელექტრული E ვექტორი ასრულებს, ამიტომაც მას სინათლის ვექტორს უწოდებენ. ჩვეულებრივი წყაროების (მაგალითად, მზის სინათლე, ვარვარების ნათურის სხივი და ა.შ.) გამოსხივებული ტალღების სინათლის ვექტორები სხვადასხვანაირადაა მიმართული, საშუალოდ რხევის ყველა მიმართულება თანაბარუფლებიანია. პოლარიზაციის არ მქონე სინათლეს ბუნებრივ სინათლეს უწოდებენ. თუ ელექტრომაგნიტური ტალღების გავრცელებისას სინათლის ვექტორი მიმართულებას ინარჩუნებს, ასეთ ტალღას წრფივად პოლარიზებულს უწოდებენ (ტერმინი პოლარიზაცია მაღიუსის მიერ იყო შემოტანილი განივი ტალღების შესწავლისას). თუ ერთიდაიგივე მიმართულების ორი მონოქრომატული, ერთმანეთის მართობულ სიბრტყეებში პოლარიზებული ტალღა ვრცელდება, რომელთა ფაზათა შორის სხვაობა $\pi/2$ -ია, მათი შეკრების შემთხვევაში

წარმოიქმნება წრიულად პოლარიზებული ტალღა. ასეთ ტალღაში ელექტრული ვექტორის სიდიდე დროში არ იცვლება, მიმართულებებით კი წრეს შემოწერს, თუ ტალღა დამკვირვებლის მიმართ ვრცელდება და ამ დროს ელექტრული ვექტორი მიმართულებას საათის ისრის მიმართულებით იცვლის მაშინ ამბობენ, რომ სინათლე არის მარჯვენა წრიულად პოლარიზებული. მრავალი ნივთიერებისათვის სინათლის შთანთქმა ძლიერადაა დამოკიდებული სინათლის ტალღის ელექტრული ვექტორის მიმართულებაზე. ამ მოვლენას დიქროიზმს უწოდებენ (42). წრიული დიქროიზმი არის მოლეკულის მიერ მარცხენა და მარჯვენა წრიულად პოლარიზებულ სინათლის განსხვავებული შთანთქმა. წრიულ დიქროიზმზე დაფუძნებული სპექტროსკოპია გამოიყენება მოლეკულების სტრუქტურების და ოპტიკური იზომერიზმის შესასწავლად. როგორც ავღნიშნეთ $\Delta A = A_L - A_R$, ლამბერტ-ბერის კანონის გამოყენებით იქნება $\Delta A = (\epsilon_L - \epsilon_R) \cdot c \cdot L$. სადაც ϵ_L , ϵ_R შესაბამისად მარცხენა და მარჯვენა წრიულად პოლარიზებულ სინათლის ექსტინქციის კოეფიციენტებია. როდესაც ხდება განსხვავებული ინტენსივობის მარცხენა და მარჯვენა წრიულად პოლარიზებული სინათლის შეკრება მიიღება ელიფსურად პოლარიზებული სინათლე. განსხვავება ხასიათდება θ ელიფსურობის (ellipticity) კუთხით.



ილუსტრაცია 10. წრიული დიქროიზმი (56).

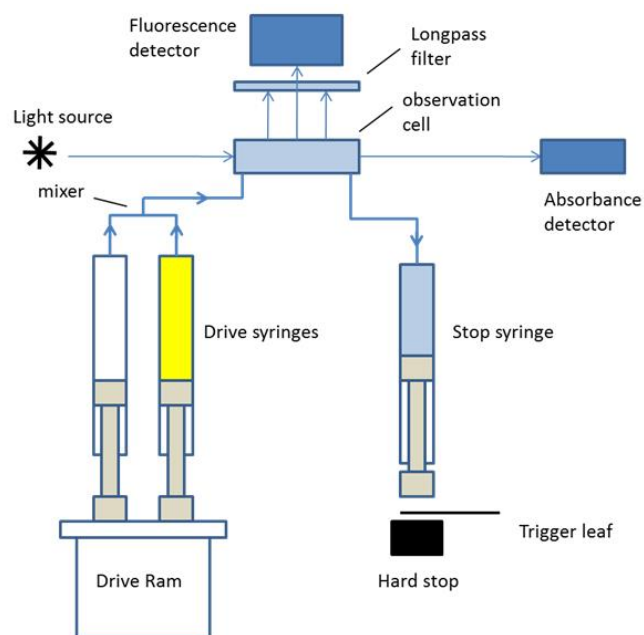
$\tan\theta=(E_R-E_L)/(E_R+E_L)$ აქედან, იმის გათვალისწინებით რომ ინტენსივობა ელექტრული ვექტორის კვადრატის პროპორციულია, ლამბერტ-ბერის კანონის გამოყენებით მიიღება დამოკიდებულება მოლარულ ელიფსურობასა $[\theta]=100*\theta/c*L$ და მოლარულ წრიულ დიქროიზმს შორის: $[\theta]=3298.2 * \Delta\varepsilon$ (57). ჩვეულებრივ ხდება $\Delta A(\Delta\varepsilon)$ -ს გაზომვა, მაგრამ მონაცემთა ჩაწერა ისტორიული მიზეზების გამო ხდება $[\theta]$ მოლარული ელიფსურობით.

აღნიშნულ ნაშრომში, წრიული დიქროიზმის მეთოდით მოხდა G3T-ის ვარიაციების სტრუქტურული შესწავლა. გაზომვები ჩატარდა Jasco-815 სპექტროპოლარიმეტრით.

1.4. Stopped-flow ტექნიკა

Stopped-flow ტექნიკა წარმოადგენს, ხელსაწყოს სადაც ხდება რეაგენტების ხსნარების სწრაფი შერევა, რეაქციის კინეტიკის შესასწავლად. ხსნარების საწრაფი შერევა ხდება ტუმბოებიდან, შემრევ ნაწილში, შემდეგ კიუეტაში სადაც ხდება რეაქციაზე დაკვირვება ფლუორიმეტრით ან სხვა მეთოდით. ამასთან ხსნარების შერევა ხდება ყოველ ჯერზე განსაზღვრული მოცულობით. რამდენიმე მილიწამი დინების შემდეგ ხდება ნაკადის შეჩერება, შემრევი ტუმბოების მყისიერი გაჩერებით მას შემდეგ რაც, მოხდება კიუეტის ახლად შერეული ხსნარით შევსება (ყოველ ჯერზე ახლად შერეული ხსნარი კიუეტიდან გამოდევნის, არსებულ ხსნარს და ავსებს მოპირდაპირე ტუმბოს, რომელიც სენსორულადაა დაკავშირებული ხელსაწყოსთან და იწვევს შემრევი ტუმბოების გაჩერებას (ილუსტრაცია 11)). Stopped-flow ტექნიკა წარმოადგენს მოსახერხებელ ხელსაწყოს ისეთი სწრაფი რეაქციების დაკვირვებისთვის რომელთა დრო რამდენიმე მილიწამია.

Stopped-flow ტექნიკით მოხდა G3T-MTT კვადრუპლექსის კინეტიკის კვლევა კალიუმის და სტრონციუმის იონებით.



ილუსტრაცია 11. Stopped-flow ტექნიკა ფლუორიმეტრით ან uv-vis სპექტრომეტრით (41).

თავი 2. გამოყენებული მასალები

აღნიშნულ ნაშრომში გამოყენებული მეთოდების (ულტრაიისფერ-ხილული სპექტროსკოპია, ფლურესცირებადი სპექტროსკოპია, წრიული დიქროიზმი, Stopped-flow ტექნიკა) კომბინაციამ საშუალება მოგვცა კვლევა გვეწარმოებია სხვადასხვა დნმ-თანმიმდევრობებზე.

N	5'-ოლიგონუკლეოტიდი-3'	სახელი	N	5'-ოლიგონუკლეოტიდი-3'	სახელი
1	GGGTGGGTGGGTGGG	G3T	15	GCGGGTGGGTGGGTGGG	GC-G3T
2	GGGCGGGTGGGTGGG	G3T-CTT	16	GCGGGCGGGTGGGTGGG	GC-G3T-CTT
3	GGGCGGGCGGGTGGG	G3T-CCT	17	GCGGGCGGGCGGGTGGG	GC-G3T-CCT
4	GGGCGGGCGGGCGGG	G3T-CCC	18	GCGGGCGGGCGGGCGGG	GC-G3T-CCC
5	GGGAGGGTGGGTGGG	G3T-ATT	19	GGGGGGGTGGGTGGG	G3T-GTT
6	GGGAGGGCGGGTGGG	G3T-ACT	20	GGGGGGGCGGGTGGG	G3T-GCT
7	GGGAGGGTGGGCGGG	G3T-ATC	21	GGGGGGGTGGGCGGG	G3T-GTC
8	GGGAGGGCGGGCGGG	G3T-ACC	22	GGGGGGGCGGGCGGG	G3T-GCC
9	CCCACCCACCC		23	CCCACCCACCA	
10	CCCGCCCGCCCTCCC		24	CCCACCCACAA	
	5'-(პრაიმერი 3MI-ით)-3'			5'-(პრაიმერი 2AP-ით)-3'	
11	GGG(3Mi)GGGTGGGTGGG	G3T-MTT	25	GGG(2AP)GGGCGGGCGGG	G3T-ACC
12	GGG(3Mi)GGGTGGGTGG		26	GGG(2AP)GGGCGGGCGG	
13	GGG(3Mi)GGGTGGGTG		27	GGG(2AP)GGGCGGGCG	
14	GGG(3Mi)GGGTGGGT		28	GGG(2AP)GGGCGGGC	

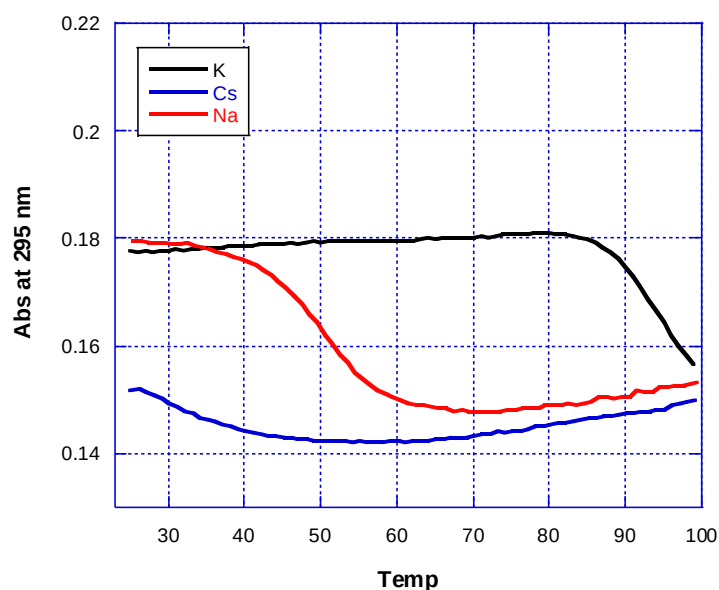
ცხრილი 5. კვლევაში გამოყენებული ოლიგონუკლეოტიდები.

ოლიგონუკლეოტიდები, გარდა პრაიმერებისა შეძენილ იქნა Integrated DNA Technologies-დან, პრაიმერები კი - Fidelity Systems-დან. დამატებით QPA ექსპერიმენტებისთვის გამოყენებული იქნა დნმ პოლიმერაზები: *Bst* 2 (8000 U/mL), *Taq* (5000 U/mL) და დეზოქსიგუანოზინტრიფოსფატი (dGTP). სამივე შეძენილ იქნა New England BioLabs-დან. ყველა ექსპერიმენტში გამოყენებულ იქნა 10 mM Tris-HCl ბუფერი pH 8.7, სხვადასხვა ქლორიდით: KCl, CsCl, NaCl, MgCl₂, BaCl₂ ან SrCl₂.

შედეგები

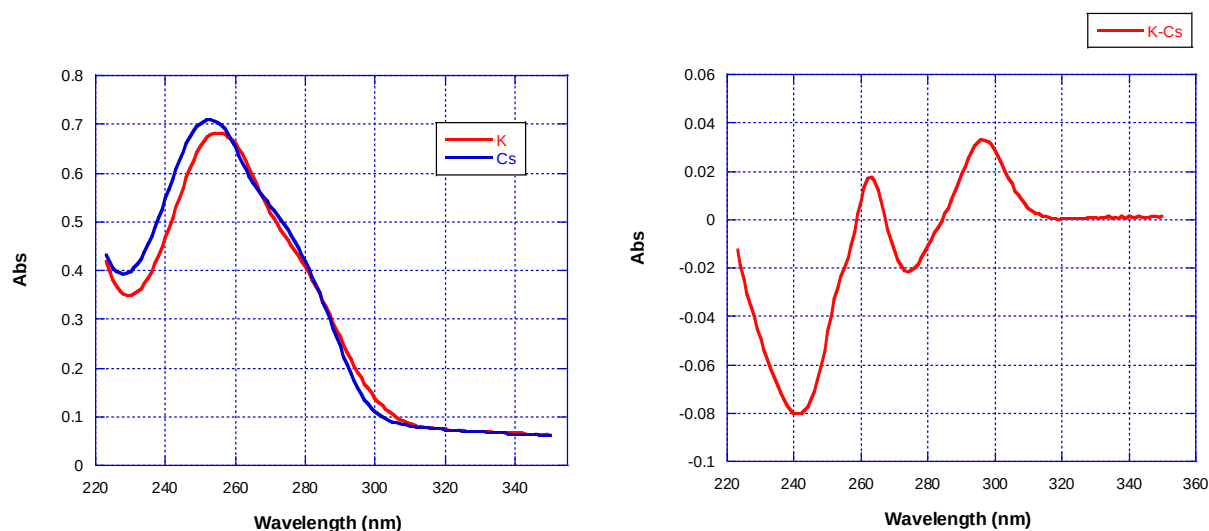
თავი 1. კვადრუპლექსის ღლობა.

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, კვადრუპლექსი წარმოადგენს ძლიერ სტაბილურ სტუქტურას. კვადრუპლექსის სტაბილურობის შესასწავლად მეტად მოსახერხებელ ხელსაწყოს წარმოადგენს ტემპერატურა დამოკიდებული UV-VIS სპექტროსკოპი. კვადრუპლექსს გარდა დნმ-ის შთანთქმისა 260 ნმ-ზე, დამატებით ახასიათებს გაზრდილი შთანთქმა 295 ნმ ტალღის სიგრძეზე. აღნიშნული მონაცემის გამოყენებით შესაძლებელია კვადრუპლექსის სტაბილურობის შესწავლა UV-VIS სპექტროსკოპიით 295 ნმ ტალღის სიგრძის დაფიქსირებით (ტემპერატურის ცვლილების სიჩქარე $1^{\circ}\text{C}/\text{წთ}$). აღნიშნულმა ექსპერიმენტებმა საშუალება მოგვცა გაგვეგოთ თუ როგორია კვადრუპლექსის ღლობის ტემპერატურა (T_m) და როგორ არის ის დამოკიდებული კათიონებზე და მათ კონცენტრაციაზე, მარყუჟის პოზიციაში ნუკლეოტიდის ცვლილებაზე.



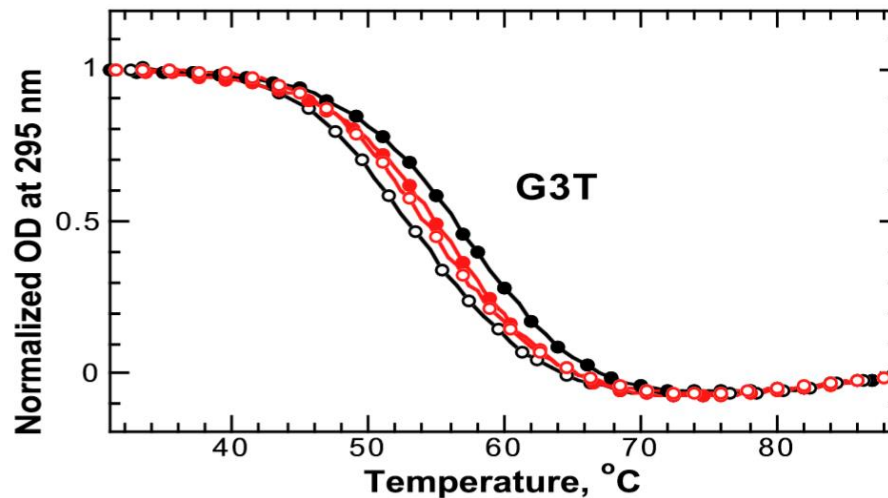
გრაფიკი 2: G3T-CCT ($5\ \mu\text{M}$) კვადრუპლექსის ღლობა სხვადასხვა კათიონით. 1) KCl 15mM, 2) CsCl 15 mM, 3) NaCl 15 mM; 10 mM Tris-HCl ბუფერი pH 8.7-ზე.

UV-VIS სპექტროსკოპიით ჩატარებულმა ცდებმა აჩვენა, რომ ცეზიუმი კვადრუპლექსს არ წარმოქმნის, ნატრიუმი წარმოქმნის ნაკლებად სტაბილურ კვადრუპლექსს $T_m=50^{\circ}\text{C}$, კალიუმი კი წარმოქმნის ძლიერ სტაბილურ კვადრუპლექსს $T_m >94^{\circ}\text{C}$ 15 mM კონცენტრაციაზე. არსებობს კორელაცია იონურ რადიუსსა და კვადრუპლექსის სტაბილურობას შორის. კალიუმი ეფექტური იონური რადიუსით 138 პიკომეტრი ოპტიმალურია G კვარტეტისათვის (ილუსტრაცია 1. მარჯვნივ), მაშინ როცა ცეზიუმი იონური რადიუსით 167 პიკომეტრი (20) დიდია. სტრონციუმის (Sr^{2+}) და ბარიუმის (Ba^{2+}) იონები ეფექტური რადიუსით 118 პმ და 135 პმ წარმოქმნის ძლიერ სტაბილურ კვადრუპლექსს. ნატრიუმი იონური რადიუსით 102 პმ, (59) წარმოქმნის ნაკლებად სტაბილურ კვადრუპლექსს.



გრაფიკი 3. მარცხნივ: განსხვავება G3T კვადრუპლექსის შთანთქმასა და იგივე თანმიმდევრობის ერთჯაჭვიან დნმ-ის შთანთქმას შორის. კალიუმის იონის თანაობისას კვადრუპლექსი წარმოიქმნება, ხოლო ცეზიუმის იონი კვადრუპლექსს არ წარმოქმნის. **მარჯვნივ:** მიღებული მარცხენა გრაფიკიდან. G3T-ის შთანთქმას კალიუმის იონის თანაობისას გამოკლებული G3T-ის შთანთქმა ცეზიუმის იონის თანაობისას. მიღებულ გრაფიკზე კარგად ჩანს კვადრუპლექსის შთანთქმა 295 ნმ ტალღის სიგრძეზე.

G3T-ის სტაბილურობის შესასწავლად ჩავატარეთ ლღობის (გაცხელებით) და შემდეგ ფორმირების (გაცივებით) ექსპერიმენტი, ტემპერატურის ცვლილების სხვადასხვა სიჩქარით:



გრაფიკი 4. G3T (5 μ M) კვადრუპლექსის ლღობა (წერტილები) - ფორმირება (წრეები) ტემპერატურის ცვლილების სხვადასხვა სიჩქარით: 1°C/წთ (შავი) და 0.5 °C/წთ (წითელი). 0.1 mM KCl; 10 mM Tris-HCl ბუფერი pH 8.7-ზე (25).

Oligonucleotide	Name	T_m (°C)		
		5 mM K^+	10 mM K^+	15 mM K^+
GGGTGGGTGGGTGGG	G3T-TTT	84.0	89.0	>94
GGGCGGGTGGGTGGG	G3T-CTT	84.0	88.5	>94
GGGCGGGCGGGTGGG	G3T-CCT	83.5	88.0	>94
GGGCGGGCGGGCGGG	G3T-CCC	82.0	87.0	>94
GCGGGTGGGTGGGTGGG	GC-G3T-TTT	76.0	82.0	86.0
GCGGGCGGGTGGGTGGG	GC-G3T-CTT	76.0	81.5	85.0
GCGGGCGGGCGGGTGGG	GC-G3T-CCT	74.0	81.0	85.0
GCGGGCGGGCGGGCGGG	GC-G3T-CCC	73.0	79.0	84.0

ცხრილი 6. G3T ლღობის ტემპერატურა და მისი დამოკიდებულება კალიუმის კონცენტრაციაზე, მარყუჟის პოზიციაში თიმინის ციტოზინით ცვლილებაზე და GC მიერთებებზე. (ყველა ოლიგონუკლეოტიდი 4 μ M კონცენტრაციის) (31).

როგორც ცხრილიდან ჩანს კვადრუპლექსის ლლობის ტემპერატურა 94 °C-ზე მეტია კალიუმის იონის 15 mM კონცენტრაციის დროს. როგორც ცდებმა აჩვენა მარყუჟის პოზიციაში თიმილის ციტოზინით ცვლილება იწვევს მცირე დესტაბილიზაციას, მაშინ როცა GC მიერთებებს აქვთ ძლიერი დესტაბილიზაციის უნარი(-8°C). ასევე ცხრილიდან ჩანს რომ კვადრუპლექსის T_m დამოკიდებულია კათიონების კონცენტრაციაზე და იზრდება კათიონების კონცენტრაციის ზრდისას.

ლლობის ექსპერიმენტებით შექცევადი პროცესებისთვის შესაძლებელია ვანტ ჰოფის ენტალპიის ცვლილების ΔH_{vH} განსაზღვრა. ($\Delta H = \Delta Q + V\Delta P$, მუდმივი წნევის პირობებში სისტემის ენტალპიის ცვლილება რეაქციის დროს მიღებული ან გაცემული სითბოს რაოდენობის ტოლია). როგორც მე-4 გრაფიკიდან ჩანს კვადრუპლექსის ლლობა შექცევადი პროცესია და ΔH_{vH} განსაზღვრისათვის ლლობის მრუდიდან გამოყენებულ იქნა ფორმულა: $\Delta H_{vH} = 4RT_m^2(\delta\alpha/\delta T)$, სადაც R უნივერსალური გაზური მუდმივაა ($\approx 1.987 \cdot 10^{-3}$ კკალ* K^{-1} *მოლი $^{-1}$), $\delta\alpha/\delta T$ კი ერთზე ნორმალიზებული შთანთქმის წარმოებულის მნიშვნელობაა T_m აბსოლუტურ ტემპერატურაზე. მე-7 ცხრილში მოცემულია კვადრუპლექსების ლლობის მრუდიდან დათვლილი ΔH_{vH} მნიშვნელობები:

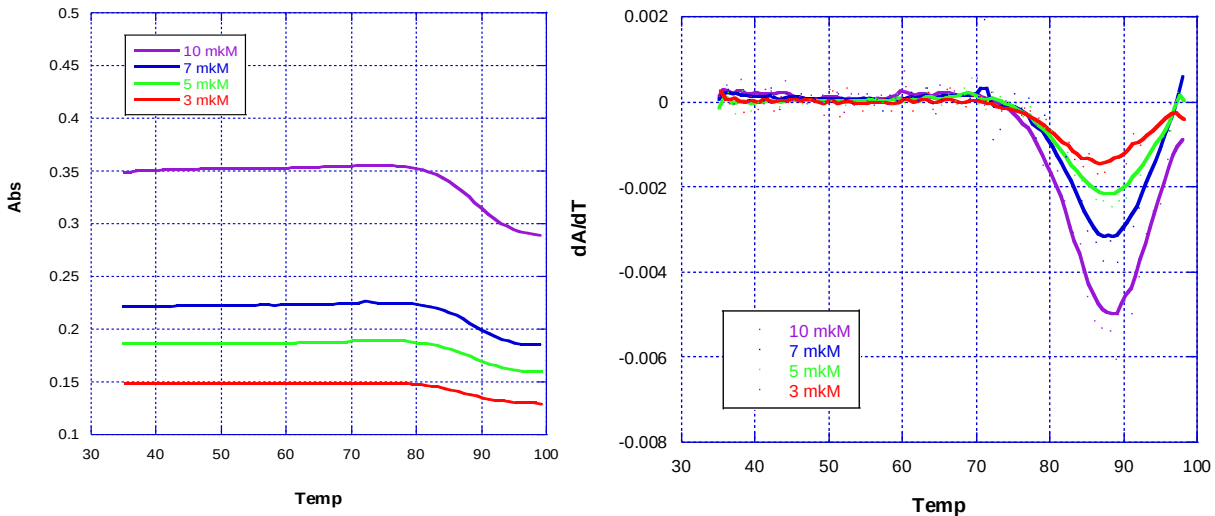
Oligonucleotide	Name	T_m (°C)	ΔH_{vH} (kcal/mol)
GGGAGGGTGGGTGGG	G3T-ATT	91.0	55
GGGAGGGCGGGTGGG	G3T-ACT	91.0	58
GGGAGGGTGGGCGGG	G3T-ATC	91.5	55
GGGAGGGCGGGCGGG	G3T-ACC	90.0	54
GGGGGGGTGGGTGGG	G3T-GTT	92.0	56
GGGGGGCGGGTGGG	G3T-GCT	91.5	55
GGGGGGGTGGGCGGG	G3T-GTC	91.5	56
GGGGGGCGGGCGGG	G3T-GCC	91.0	53 ^a

ცხრილი 7. G3T-ის ვარიაციების ვანტ ჰოფის ენტალპიის ცვლილება ლლობისას. (15 mM KCl, 35 mM CsCl, and 2 mM MgCl₂, ყველა ოლიგონუკლეოტიდი 4 μ M კონცენტრაციის)(31).

მე-7 ცხრილში მოცემული კვადრუპლექსებს მარყუჟის პოზიციაში (მეოთხე პოზიცია) აქვთ პურინები და მათი ლლობის ტემპერატურა შესამჩნევად ნაკლებია. აქედან შეიძლება

ითქვას, კვადრუპლექსი პირიმიდინებით მარყუჟის პოზიციაში უფრო სტაბილური სტრუქტურაა (ცხრილი 6).

აგრეთვე ჩავატარეთ ლლობის ექსპერიმენტები, იმის დასადგენად არის თუ არა კვადრუპლექსის T_m დამოკიდებული მის კონცენტრაციაზე:



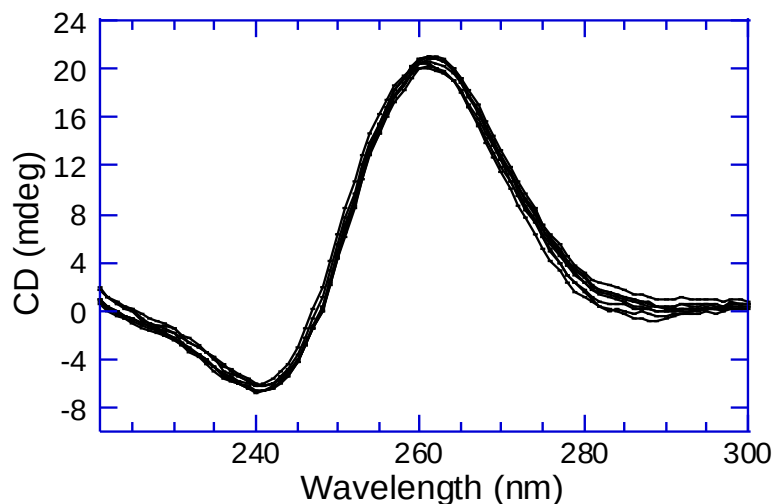
გრაფიკი 5. G3T-CCT კვადრუპლექსის ლლობა (მარჯვნივ წარმოდგენილი) სხვადასხვა კონცენტრაციაზე: 3, 5, 7, 10 μ M. (15 mM KCl; 10 mM Tris-HCl ბუფერი pH 8.7).

როგორც გრაფიკიდან ჩანს კვადრუპლექსის ლლობის ტემპერატურა არ არის დამოკიდებული მის კონცენტრაციაზე, როცა კათიონების კონცენტრაცია ბევრად მეტია G3T-ის კონცენტრაციაზე (აქ 1500-ჯერ და მეტად). ეს აიხსნება იმით, რომ G3T-კვადრუპლექსი წარმოადგენს მონომოლეკულურ სტრუქტურას.

თავი 2. გაზომვები წრიული დიქროიზმის სპექტრომეტრით

ცნობილია რომ პარალელურად დაკეცილ კვადრუპლექსს აქვს მკვეთრად გამოხატული დადებითი პიკი ~ 265 ნმ და უფრო ნაკლები ინტენსივობის უარყოფითი პიკი ~ 240 ნმ წრიული დიქროიზმის სპექტროსკოპიის მეთოდით გაზომვისას. მაშინ როცა ანტიპარალელურ კვადრუპლექსს ახასიათებს დადებითი პიკი ~ 245 ნმ და ~ 295 ნმ და უარყოფითი პიკი ~ 265 ნმ ტალღის სიგრძეზე (32,40,53) .

იმის გასარკვევად იწვევს თუ არა მარყუჟის პოზიციაში ნუკლეოტიდის ცვლილება კვადრუპლექსის სტრუქტურულ ცვლილებას, შესწავლილი იქნა G3T-ის რვა მოდიფიკაცია (ცხრილი 7), რომლებთაც მარყუჟის პოზიციაში შეცვლილი ქონდათ ნუკლეოტიდები. წრიული დიქროიზმით გაზომვებმა რვავე კვადრუპლექსზე აჩვენა ერთნაირი პარალელური დაკეცვისთვის დამახასიათებელი პიკი (31):

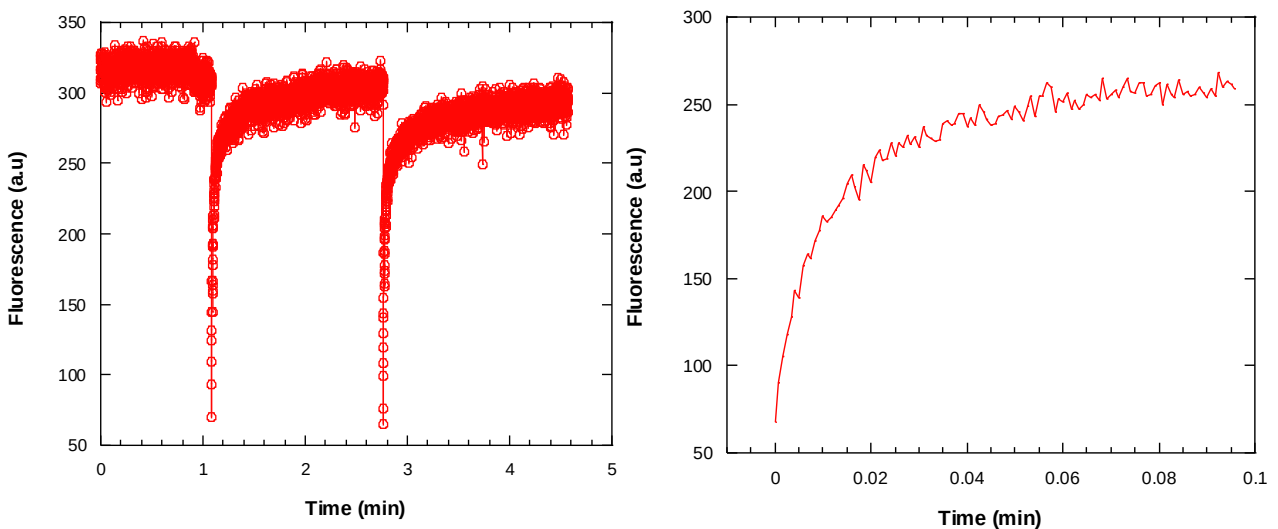


გრაფიკი 6. წრიული დიქროიზმის გაზომვები.

მოცემული შედეგებით შეგვიძლია ვთქვათ, რომ მარყუჟის პოზიციაში ნუკლეოტიდის ცვლილება არ ცვლის G3T კვადრუპლექსის დაკეცვის პარალელურ სტრუქტურას.

თავი 3. გაზომვები Stopped-flow ტექნიკით.

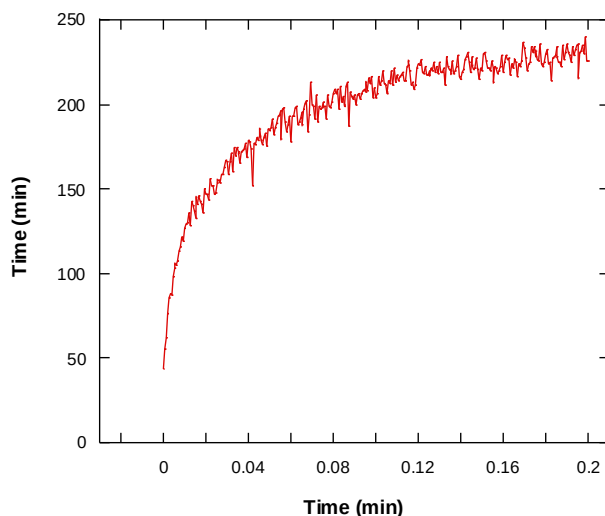
კვადრუპლექსის კინეტიკის კვლევაში, მნიშვნელოვანია იმის ცოდნა თუ რამდენად სწრაფად წარმოიქმნება კვადრუპლექსი. აღნიშნულის გასარკვევად ჩავატარეთ გაზომვები Stopped-flow ტექნიკის გამოყენებით. Stopped-flow-ზე ხდებოდა შერევა ერთი მხვრივ კვადრუპლექსის წარმომქნელი თანმიმდევრობის (G3T) და მეორე მხვრივ კათიონის. იმისათვის რომ დავკვირვებოდით კვადრუპლექსების წარმოქმნას, გამოვიყენეთ პრაიმერი G3T-MTT, მარყუჟის პოზიციაში ჩასმული ფლურესცირებადი ნუკლეოტიდით (3-methyl isoxanthopterin (3MI)) (ილუსტრაცია 13). 3MI არის გუანინის ფლურესცირებადი ანალოგი, ვოტსონ-კრიკის ფუძეთა წყვილს არ წარმოქმნის. აქვს მაღალი კვანტური სარგებელი 0.88, როგორც თავისუფალ ფუძეს წყალხსნარებში ფიზიოლოგიურ pH-ზე. მას შემდეგ რაც ჩაებმება დნმ-ის თუნდაც ერთმაგ ჯაჭვში, მისი ფლურესცენცია მნიშვნელოვნად კლებულობს (16). მარყუჟის პოზიციაში აქვს ძლიერი სიგნალი კვადრუპლექსის ფორმირებისას. ამ შემთხვევაში ფორმირებული კვადრუპლექსის დაფიქსირება შესაძლებელია ფლურიმეტრით. ექსპერიმენტები ჩატარდა სტრონციუმის და კალიუმის იონების გამოყენებით.



გრაფიკი 7. მარცხნივ: Stopped-flow ექსპერიმენტი გაზომილი ფლუორიმეტრით. აღნიშნულ ექსპერიმენტში მოხდა 500 nM 5'-GGG(3Mi)GGGTGGGTGGG და 20 mM SrCl₂ შერევა 10 mM ტრის ბუფერის თანაობისას 54°C-ზე. **მარჯვნივ:** ერთ-ერთი მრუდი იგივე ექსპერიმენტიდან.

20 mM სტრონციუმის იონებით ექსპერიმენტი ჩავატარეთ 52 °C - 58 °C ტემპერატურულ შუალედში, 2 გრადუსიანი ინტერვალით. ყოველი მათგანისათვის მრუდიდან დავითვალეთ კვადრუპლექსების ნახევარწარმოქმნის დრო $t_{1/2}$. შედეგებმა აჩვენა, რომ ოთხივე ცდაში ნახევარწარმოქმნის დრო თითქმის ერთნაირია და საშუალოდ 0.64 წამია. მიღებული შედეგი მიუთითებს, რომ კვადრუპლექსის წარმოქმნის სიჩქარე არ არის დამოკიდებული ტემპერატურაზე (ცხრილი 8).

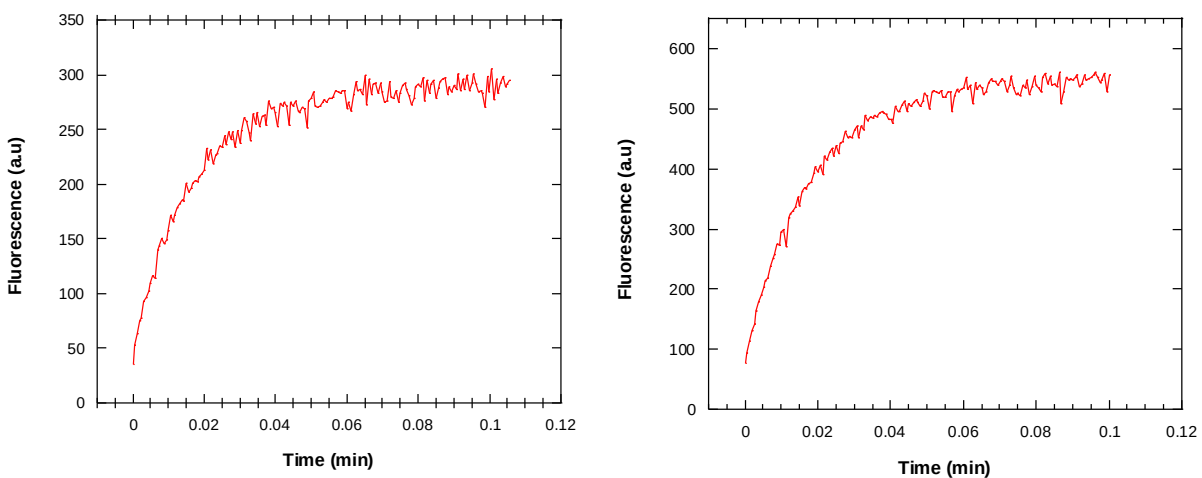
იმის დასადგენად მოქმედებს თუ არა მეტალის იონების ცვლილება კვადრუპლექსის წარმოქმნის სიჩქარეზე, აღნიშნული ექსპერიმენტი ჩატარებულ იქნა სტრონციუმის იონების განსხვავებული მნიშვნელობისთვის. ცდები ჩავატარეთ სტრონციუმის იონების 1 mM მნიშვნელობისათვის 52 °C - 58 °C ტემპერატურულ შუალედში, 2 გრადუსიანი ინტერვალით. ყოველი მათგანისათვის მრუდიდან დავითვალეთ კვადრუპლექსების ნახევარწარმოქმნის დრო $t_{1/2}$.



გრაფიკი 8. ექსპერიმენტში მოხდა 500 nM G3T-MTT და 1 mM SrCl₂ შერევა 10 mM ტრის ბუფერის თანაობისას 54°C-ზე.

როგორც შედეგებმა აჩვენა სტრონციუმის იონების 1 mM მნიშვნელობისათვის კვადრუპლექსის ნახევარწარმოქმნის დრო გაიზარდა, ვიდრე 20 mM სტრონციუმის იონების შემთხვევაში (გრაფიკი 7) და საშუალოდ უდრის 1.35 წამს. აღნიშნულის გათვალისწინებით შეგვიძლია ვთქვათ, რომ კვადრუპლექსის წარმოქმნის სიჩქარე დამოკიდებულია კათიონების კონცენტრაციაზე.

დამატებით Stopped-flow გაზომვები ჩავატარეთ კალიუმის იონებით, 52 °C- 58 °C ტემპერატურულ შუალედში, 2 გრადუსიანი ინტერვალით. ამ ექსპერიმენტებში მოხდა ერთი მხვრივ 500 nM G3T-MTT და მეორე მხვრივ 5 mM KCl შერევა 10 mM ტრის ბუფერის თანაობისას. იგივე გაზომვები ჩავატარეთ 1 μ M G3T-MTT კონცენტრაციისას, 52 და 56 °C ტემპერატურაზე.



გრაფიკი 9. Stopped-flow გაზომვები. **მარცხნივ:** აღნიშნულ ექსპერიმენტში მოხდა **500 nM G3T-MTT** და 5 mM KCl შერევა 10 mM ტრის ბუფერის თანაობისას 56°C-ზე. **მარჯვნივ:** აღნიშნულ ექსპერიმენტში მოხდა **1 μ M G3T-MTT** და 5 mM KCl შერევა 10 mM ტრის ბუფერის თანაობისას 56°C-ზე. შედეგებიდან ფიქსირდება ერთნაირი ნახევარწარმოქმნის დრო G3T-MTT-ის სხვადასხვა კონცენტრაციისას (მარცხნივ: 0.67 წამი, მარჯვნივ: 0.7 წამი).

გრაფიკებიდან დათვლილ იქნა, G3T-MTT კვადრუპლექსის ნახევარწარმოქმნის დრო:

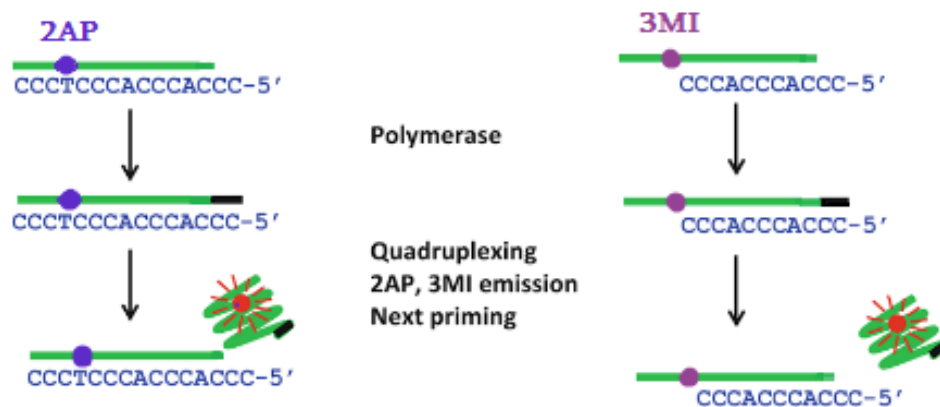
T°C	Sr 20 mM+G3T-<i>MTT</i> (500 nM); <i>t_{1/2}</i> (წამი)	Sr 1 mM+G3T-<i>MTT</i> (500 nM); <i>t_{1/2}</i> (წამი)	K 5 mM+G3T-<i>MTT</i> (500 nM); <i>t_{1/2}</i> (წამი)	K 5 mM+G3T-<i>MTT</i> (1 μM); <i>t_{1/2}</i> (წამი)
52 °C	0.6	1.33	0.67	0.6
54 °C	0.6	1.32	0.675	-
56 °C	0.7	1.38	0.67	0.7
58 °C	0.65	1.38	0.67	-
საშუალო დრო	0.64	1.35	0.67	0.65

ცხრილი 8: G3T-MTT კვადრუპლექსის ნახევარწარმოქმნის დრო.

Stopped-flow ტექნიკით ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ G3T კვადრუპლექსის ფორმირება სწრაფი პროცესია და ტემპერატურაზე დამოკიდებული არ არის. G3T კვადრუპლექსის ნახევარწარმოქმნის დრო დამოკიდებულია კათიონებზე და მის კონცენტრაციაზე, თუმცა არ არის დამოკიდებული კვადრუპლექსის კონცენტრაციაზე (როცა G3T-ის კონცენტრაცია ბევრად ნაკლებია კათიონების კონცენტრაციაზე).

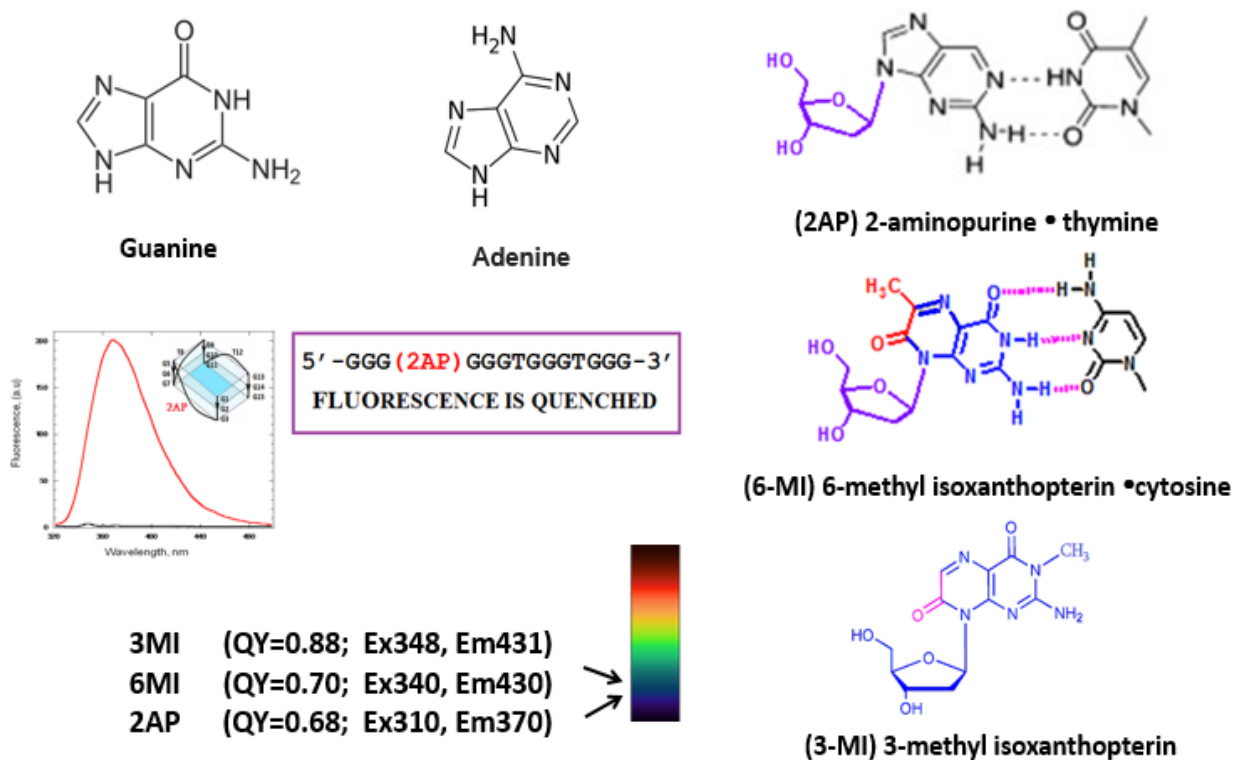
თავი 4. კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაცია (Quadruplex Priming Amplification (QPA))

ახლაზანს აღმოჩენილ იქნა, რომ d(GGGTGGGTGGGTGGG)-ის (G3T) თავისუფალი ენერგია შეიძლება გამოვიყენოთ დნმ-ის იზოთერმული ამპლიფიკაციისთვის, ანუ კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაცია (Quadruplex Priming Amplification (QPA)) (24). ძირითადი პუნქტი QPA - ის (ილუსტრაცია 12) არის ის, რომ K^+ -ის თანაობისას G3T თანმიმდევრობას შეუძლია წარმოქმნას კვადრუპლექსი, მნიშვნელოვნად უფრო ხელსაყრელი თერმოდინამიკით ვიდრე შესაბამისი დნმ-დუპლექსი. პრაიმერი, რომელიც G3T-ის წაკვეთილი ვერსიას, შემუშავებულ იქნა იმისთვის რომ თავისთავად დაიკეცოს მონომოლეკულურ კვადრუპლექსად, პოლიმერაზას მიერ ელონგაციის შემდეგ ტემპერატურული ცვლილების გარეშე. დამატებით, კვადრუპლექსის დეტექციისათვის გამოყენებულ იქნა G3T კომბინირებული ფლურესცენციული მოლეკულით (2AP ან 3MI) მეოთხე პოზიციაში, რომელიც აჩვენებს თითქმის 100-ჯერ გაზრდილ ფლურესცენციას კვადრუპლექსის ფორმირებისას, რაც საშუალებას იძლევა მარტივი და ეფექტური რაოდენობრივი განსაზღვრის, დამატებითი მოლეკულების გარეშე (24).



ილუსტრაცია 12. კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაცია (QPA), ფლურესცენციული მოლეკულებით: 2AP-ით და 3MI-ით.

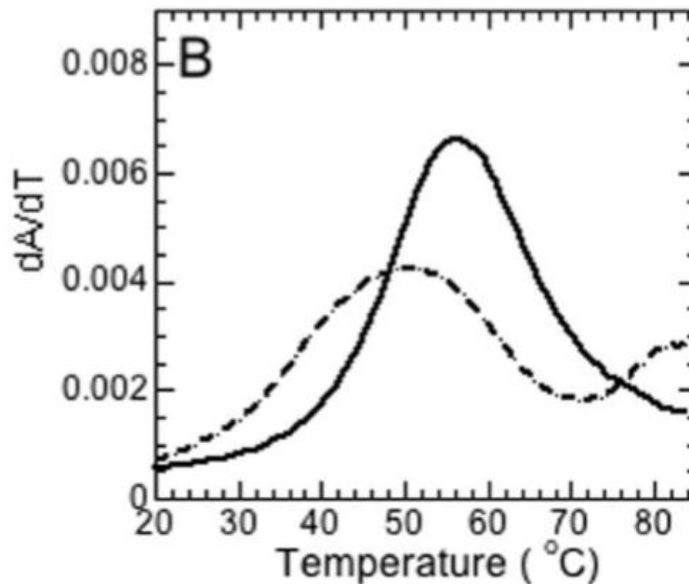
2-ამინოპურინი (2-Aminopurine(2AP)) აგზნების და გამოსხივების ტალღის სიგრძეებით 310 ნმ და 370 ნმ, არის ადენინის ფლურესცირებადი ანალოგი, რომელიც წარმოქმნის ვოტსონ-კრიკის ფუძეთა წყვილს თიმიტან (29,34) და აქვს მაღალი კვანტური სარგებელი (0.68) როგორც თავისუფალ ფუძეს წყალხსნარებში ფიზიოლოგიურ pH-ზე (55). მას შემდეგ რაც ჩაებმება თუნდაც დნმ-ის ერთმაგ ჯაჭვში, მისი ფლურესცენცია მნიშვნელოვნად კლებულობს. ეს ზღუდავს 2AP-ის ფართო გამოყენებას ნუკლეინის მჟავებში; როგორც ასეთი, ის ძირითადად გამოიყენება ნუკლეინის მჟავების მარყუჟის სტრუქტურის კვლევებში (3,13,27,35). კიდევ ერთი კლასი მაღალ ფლუროსცენცირებადი ნუკლეოტიდებისა, რომლებიც არიან პურინის მსგავსი სტრუქტურულად და არის მნიშვნელოვნად ჩახშობილი ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობაში არის პტერიდინი. ძლიერად ფლურესცირებადი პტერიდინებია: 3-methyl isoxanthopterin (3MI) (Ex348, Em431) და 6-methyl isoxanthopterin (6MI) (Ex340, Em430) კვანტური სარგებლით 0.88 და 0.70 (16).



ილუსტრაცია 13. ფლურესცენციული მოლეკულები: 2AP, 6MI და 3MI. 2AP წარმოადგენს ადენინის ფლურესცენციულ ანალოგს და წარმოქმნის ვოტსონ-კრიკის ფუძეთა წყვილს თიმინთან. 6MI გუანინის ანალოგი და ფუძეთა წყვილს წარმოქმნის ციტოზინთან. 3MI გუანინის ანალოგი, ფუძეთა წყვილს არ წარმოქმნის.

QPA რეაქციისათვის საჭიროა: 1) პრაიმერი, რომელიც G3T-ის წაკვეთილი ვერსიაა (5'-(GGGTGGGTGGGTGGG-3' გამოკლებული 1,2 ან 3 გუანინი 3'-ბოლოდან) და მეოთხე პოზიციაში ჩასმული აქვს ფლურესცენციული მოლეკულა (მაგ. 5'-GGG(3Mi)GGGTGGGTGGG-3'). პრაიმერი კვადრუპლექსს არ წარმოქმნის, იმიტომ რომ G-კვარტეტის ფორმირებისთვის (ილუსტრაცია 1, მარჯვნივ) აკლია გუანინი. ამ მდგომარეობაში არ გვაქვს 3MI-ის სიგნალიც, რომელიც ჩახშობილია მეზობელი გუანინებით. 2) სამიზნე მოლეკულა, CCCACCCACCC რომელიც არის პრაიმერის კომპლიმენტარული და უკავშირდება პრაიმერს. იმისთვის რომ დუპლექსი წარმოიქმნას საჭიროა შეირჩეს შესაბამისი ტემპერატურა 3) დნმ-პოლიმერაზა. იმის გამო რომ, QPA არის იზოთერმული და არ გვაქვს ტემპერატურული ცვლილება, პოლიმერაზას შერჩევა სირთულეს არ წარმოადგენს. 4) დეზოქსიგუანოზინტრიფოსფატი (dGTP) იმისთვის, რომ მოხდეს პრაიმერის ელონგაცია დნმ-პოლიმერაზას მიერ კვადრუპლექსის წარმოქმნელ თანმიმდევრობამდე. 5) ბუფერი, რომელიც შეიცავს K^+ კვადრუპლექსის ფორმირებისათვის და დნმ-პოლიმერაზასთვის ოპტიმალური იქნება (2 mM Mg^{2+} და კათიონების კონცენტრაცია 50 mM). მას შემდეგ, რაც დნმ-პოლიმერაზა მოახდენს პრაიმერის ელონგაციას 5'-GGG(3Mi)GGGTGGGTGGG-3'-მდე, K^+ -ის თანაობისას GGG(3Mi)GGGTGGGTGGG/CCCACCCACCC დუპლექსი თავისით იშლება და კვადრუპლექსი წარმოიქმნება, 3MI უკვე აღმოჩნდება მარყუჟის პოზიციაში და შესაძლებელი იქნება სიგნალის დაფიქსირება ფლურიმეტრით. გარდა ამისა კვადრუპლექსის ფორმირება გამორიცხავს, პრაიმერის სამიზნე მოლეკულასთან ხელახალ დაკავშირებას და რეაქცია გაგრძელდება, ყველა კვადრუპლექსის ფორმირებამდე (რაც გამორიცხავს „პლატოს ეფექტს“). თუ როგორ არის შესაძლებელი GGG(3Mi)GGGTGGGTGGG/CCCACCCACCC დუპლექსის თავისით დაშლა, ჩანს ლღობის ექსპერიმენტში 260 ნმ-ზე, კალიუმის იონით და მის გარეშე (გრაფიკი 10). ამ

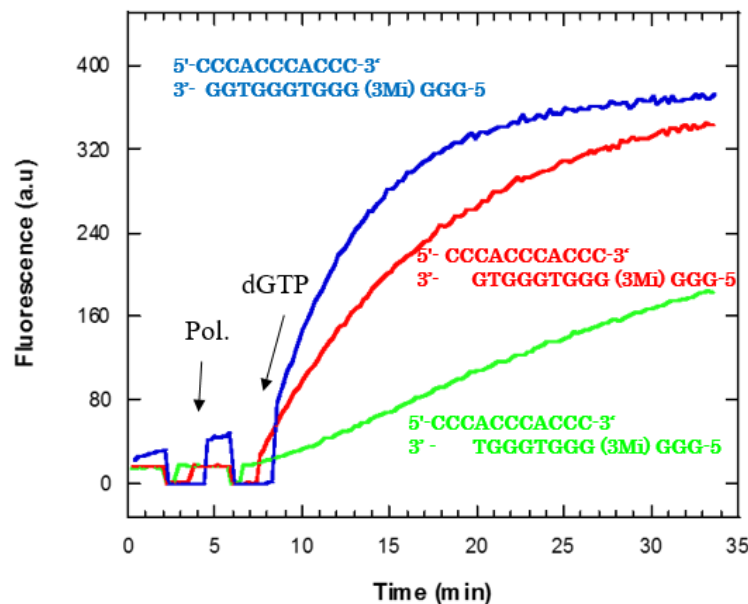
ექსპერიმენტმა აჩვენა, რომ აღნიშნული დუბლექსი კალიუმის იონის თანაობისას 7 °C - ით არასტაბილურია, ვიდრე მის გარეშე. ეს აიხსნება იმით, რომ G3T-MTT K⁺-ით კვადრუპლექსს წარმოქმნის და ამიტომ G3T-MTT/CCCACCCACCC დუბლექსი ნაკლებად სტაბილურია კალიუმის იონის თანაობისას. სწორედ აღნიშნული ხელსაყრელი თერმოდინამიკის საშუალებით არის შესაძლებელი QPA-ის განხორციელება იზოთერმულად, დამატებითი ტემპერატურული ცვლილების გარეშე.



გრაფიკი 10. UV-Vis სპექტრომეტრით ლღობის წარმოებული (dA/dT). წყვეტილი ხაზი: G3T-MTT/CCCACCCACCC K⁺-ით (25 mM KCl, 25 mM CsCl, 2 mM MgCl₂); მთლიანი ხაზი G3T-MTT/CCCACCCACCC K⁺-ის გარეშე (50 mM CsCl, 2 mM MgCl₂). (M=3MI)(12).

ჩვენ ჩავატარეთ ექსპერიმენტები QPA-ის შემუშავებისთვის სხვადასხვა ტემპერატურაზე. ამისთვის გამოვიყენეთ სხვადასხვა პრაიმერი და სამიზნე მოლეკულა განსხვავებული ლღობის ტემპერატურით. ყველა ექსპერიმენტში დავაფიქსირეთ: ა) სამიზნე მოლეკულის 1 nM და პრაიმერის 100 nM კონცენტრაცია. ბ) dGTP-ის 800 μM კონცენტრაცია. გ) გამოყენებულ იქნა *Bst* 2 პოლიმერაზა და *Taq* პოლიმერაზა (მაღალ ტემპერატურებზე). დ) ბუფერი Tris-HCl ბუფერი შემადგენლობით 25 mM KCl, 25 mM CsCl, 2 mM MgCl₂ (pH 8.7).

QPA-ის ექსპერიმენტი პრაიმერებით (100 nM): 5'-GGGMGGGTGGGT-3', 5'-GGGMGGGTGGGTG-3', 5'-GGGMGGGTGGGTGG-3' და სამიზნე მოლეკულით (1 nM) - 5'-CCCACCCACCC-3'. აღიშნული პირობებით ექსპერიმენტები ჩატარებული იქნა *Bst* 2 დნმ-პოლიმერაზას გამოყენებით, 40 °C -დან 68 °C -მდე ტემპერატურულ შუალედში 2°C ინტერვალით, ხდებოდა ცდების გამეორება და საშუალო შედეგების დაფიქსირება ცდომილების გამოსარიცხად. ცდის მონაცემებიდან დავითვალეთ რეაქციის სიჩქარე და მიღებული შედეგებით ავაგეთ სიჩქარის ტემპერატურაზე დამოკიდებულების გრაფიკი.

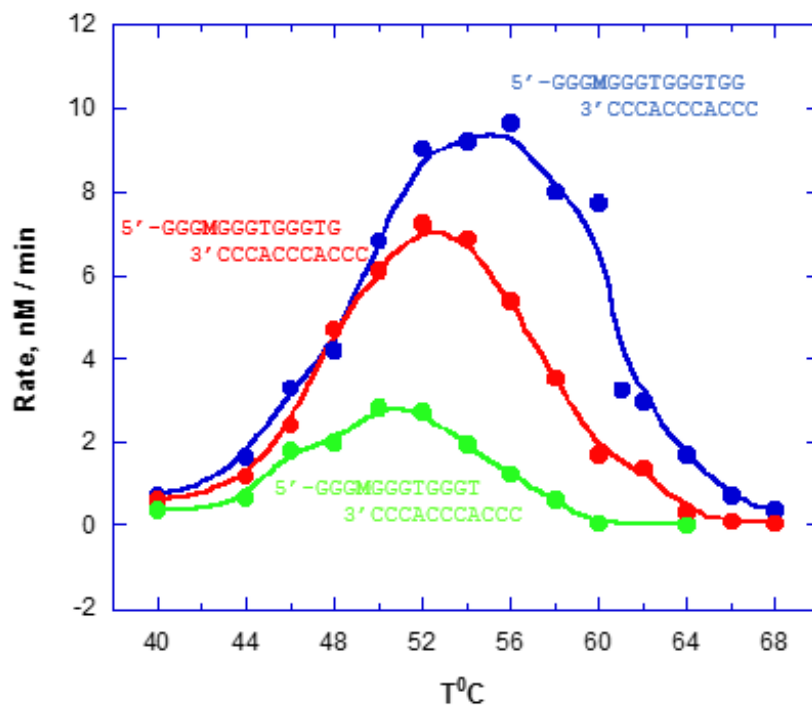


გრაფიკი 11. QPA -ის ნიმუში 3MI-ის გამოყენებით 54 °C-ზე , რეაგენტები: 1 nM სამიზნე მოლეკულა 5'-CCCACCCACCC-3', 100 nM პრაიმერები: 5'-GGG(3Mi)GGGTGGGTGG-3'-(ლურჯი), 5'-GGG(3Mi)GGGTGGGTG-3' (წითელი), 5'-GGG(3Mi)GGGTGGGT-3' (მწვანე); 800 μM [dGTP], 8U *Bst* 2 პოლიმერაზა, ბუფერი: 10 Tris-HCl, 25 mM KCl, 25 mM CsCl, 2 mM MgCl₂, (pH 8.7).

Primer/Template Sequen	Name	T_m (°C)	$\Delta T_{m, \text{Subprod}}$ (°C)	$T_{QPA, \text{max}}$ (°C)
5'-GGGMGGGTGGGTGGG CCCACCCACCC	(Product)	53.0	—	—
5'-GGGMGGGTGGGT CCCACCCACCC	(Sub 1)	45.0	-8	51
5'-GGGMGGGTGGGTG CCCACCCACCC	(Sub 2)	50.0	-3	52
5'-GGGMGGGTGGGTGG CCCACCCACCC	(Sub 3)	56.0	3	55

ცხრილი 9. ლღობის ტემპერატურა (T_m) და QPA-ის ოპტიმალური ტემპერატურა (T_{QPA}) პრაიმერ-სამიზნე კომპლექსებისთვის მოცემული მე-12 გრაფიკზე (12).

ცხრილიდან ჩანს, რომ პროდუქტი დუპლექსის ლღობის ტემპერატურა 53°C , (რომელშიც 11 ფუძეთა წყვილია), უფრო ნაკლებია, ვიდრე მესამე სუბსტრატის 56°C , (რომელშიც 10 ფუძეთა წყვილია). ეს როგორც ავლნიშნეთ გამოწვეულია იმით რომ G3T-MTT კვადრუპლექსს წარმოქმნის, ხოლო თუ გუანინის მოვაცლით ვერ წარმოქმნის, ამიტომ პროდუქტი დუპლექსის დაშლას უფრო ნაკლები ტემპერატურა სჭირდება.



გრაფიკი 12. QPA-ის სიჩქარის დამოკიდებულება ტემპერატურაზე, პრაიმერები: 5'-GGG(3Mi)GGGTGGGT-3' (მწვანე), 5'-GGG(3Mi)GGGTGGGTG-3' (წითელი), 5'-GGG(3Mi)GGGTGGGTGG-3' (ლურჯი); სამიზნე მოლეკულა 5'-CCCACCCACCC-3'.

შედეგებიდან ჩანს, რომ 12 ნუკლეოტიდიანი პრაიმერისთვის (მწვანე), QPA-ის მაქსიმალური სიჩქარე არის 51°C ტემპერატურის მახლობლად, 13 ნუკლეოტიდიანი პრაიმერისთვის (წითელი) – 52°C ტემპერატურის მახლობლად, ხოლო 14 ნუკლეოტიდიანი პრაიმერისთვის (ლურჯი) – 55°C ტემპერატურის მახლობლად. გრაფიკიდან ჩანს რომ QPA-ის სიჩქარე მესამე პრაიმერით თითქმის 10 nM/წუთია.

როგორც ზემოთ ავღნიშნეთ 3MI ფუძეთა წყვილს არ წარმოქმნის, ამიტომ QPA-ის შემუშავება მაღალ ტემპერატურაზე მოსახერხებელია 2-ამინოპურინით (2AP), რომელიც წარმოქმნის ფუძეთა წყვილს თიმინთან და ზრდის დუპლექსის ლღობის ტემპერატურას. ცდებში გამოყენებული იქნა შემდეგი პრაიმერები: 5'-GGG(2AP)GGGCGGGCGG-3', 5'-GGG(2AP)GGGCGGGCG-3', 5'-GGG(2AP)GGGCGGGC-3' და სამიზნე მოლეკულა - 5'-CCCGCCCCGCCCTCCC-3'.

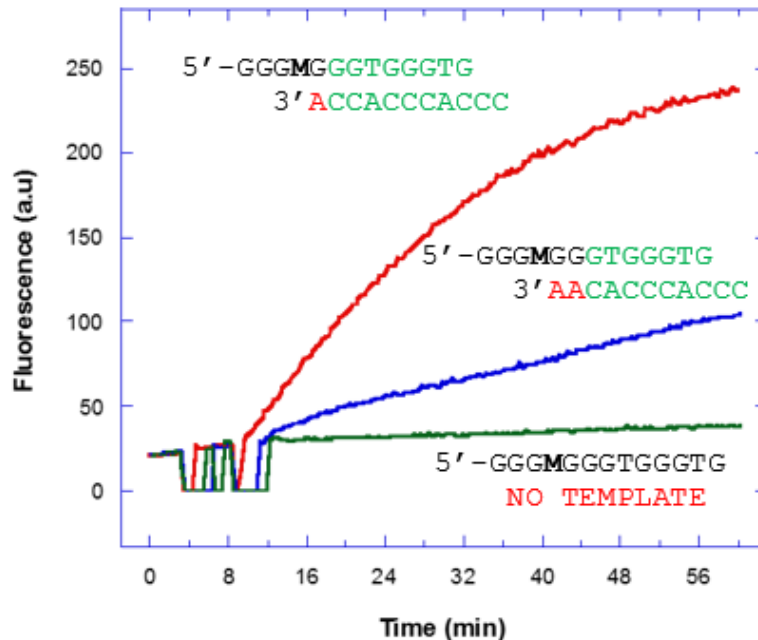
Primer/template sequence	T_m (°C)		$\Delta T_{m, \text{Sub-Prod}}$ (°C)	T_{QPA} (°C)
	Cs ⁺	K ⁺		
5'GGG A GGGCGGGCGGG (Product) 3'CCCTCCCCGCCCGCCC	75.0	69.0	-	-
5'GGG A GGGCGGGC (Sub1) 3'CCCTCCCCGCCCGCCC	67.0	68.0	- 1.0	nd
5'GGG A GGGCGGGCG (Sub2) 3'CCCTCCCCGCCCGCCC	70.5	71.0	2.0	65.0
5'GGG A GGGCGGGCGG (Sub3) 3'CCCTCCCCGCCCGCCC	73.0	73.5	4.5	67.0

ცხრილი 10. ლღობის ტემპერატურა (T_m) და QPA-ის ოპტიმალური ტემპერატურა (T_{QPA}) პრაიმერ-სამიზნე კომპლექსებისთვის. (A=2AP) (54).

ექსპერიმენტები ჩატარდა თერმოფილური *Taq* პოლიმერაზით 55 °C -დან 75 °C -მდე ტემპერატურულ შუალედში 2°C ინტერვალით და დადგინდა QPA-ის ოპტიმალური ტემპერატურა. შედეგებმა აჩვენა, რომ სუბსტრატი 1 (ცხრილი 10) ხასიათდება დაბალი სიჩქარით, სუბსტრატი 2-ის მაქსიმალური სიჩქარე ≈ 5.5 nM/წუთია 65 °C-ზე, ხოლო სუბსტრატი 3-ის მაქსიმალური სიჩქარე ≈ 8 nM/წუთია 67 °C-ზე; 72 °C-ზე სიჩქარე საკმაოდ ≈ 2.65 nM/წუთი, 75 °C-ზე კი 0.45 nM/წუთია.

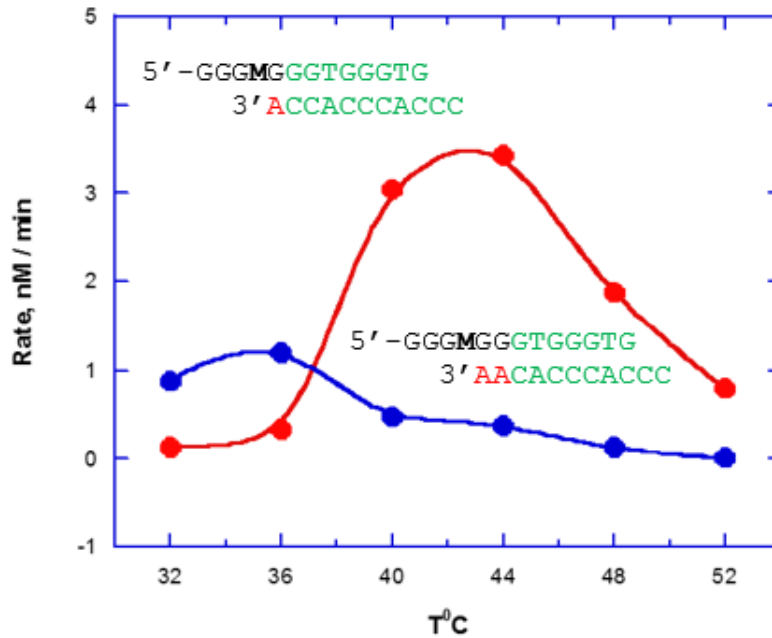
QPA-ის შემუშავებისთვის 40 °C-ის ფარგლებში გამოვიყენეთ 13 ნუკლეოტიდიანი პრაიმერი, მეოთხე პოზიციაში კომბინირებული 3MI-ით 5'-GGGMGGGTGGGTG (G3T-ის თანმიმდევრობას გამოკლებული ორი გუანინი 3' პრაიმ ბოლოდან) და 5'-CCCACCCACCA, 5'-CCCACCCACAA სამიზნე მოლეკულები, შესაბამისად ერთი და ორი ცდომილებით დაკავშირებაში (mismatch). Mismatch დამატებით ამცირებს პრაიმერ-სამიზნე

მოლეკულის ლობის ტემპერატურას, რამაც საშუალება მოგვცა ჩავვეტარებოთ ექსპერიმენტები 40 °C-ზე დაბალ ტემპერატურაზეც.



გრაფიკი 13. QPA -ის ნიმუში 3MI-ის გამოყენებით 40 °C-ზე ($M=3MI$), რეაგენტები: 1 nM სამიზნე მოლეკულა, 100 nM პრაიმერი, 800 μM [dGTP], 8U *Bst* 2 პოლიმერაზა, ბუფერი: 10 mM Tris-HCl, 25 mM KCl, 25 mM CsCl, 2 mM $MgCl_2$ (pH 8.7).

აღიზნული რეაგენტებით ექსპერიმენტები განხორციელდა 32 °C -დან 52-°C ტემპერატურულ შუალედში 4 °C ინტერვალით. მე-14 გრაფიკზე მწვანე ხაზით მოცემულია ნეგატიური კონტროლი- როდესაც ხსნარში არ გვაქვს სამიზნე მოლეკულა, შედეგიდან ჩანს, რომ ამ დროს ფლურესცენციული სიგნალი თითქმის ნულია (მცირე სიგნალი ფონს ახასიათებს), კვადრუპლექსი არ წარმოიქმნება. მიღებულ შედეგებზე დაყრდნობით დათვლილ იქნა რეაქციის სიჩქარე და აგებულ იქნა სიჩქარის ტემპერატურაზე დამოკიდებულების გრაფიკი:



გრაფიკი 14. QPA-ის სიჩქარის დამოკიდებულება ტემპერატურაზე, სამიზნე მოლეკულები: 5'-CCCACCCACCA (წითელი წრეები) და 5'-CCCACCCACAA (ლურჯი წრეები); პრაიმერი 5'-GGGMGGGTGGGTG (M=3MI). რეაგენტები: 1 nM სამიზნე მოლეკულა, 100 nM პრაიმერი, 800 μ M [dGTP], 8U Bst 2 პოლიმერაზა, ბუფერი: 10 mM Tris-HCl, 25 mM KCl, 25 mM CsCl, 2 mM MgCl₂, (pH 8.7).

აღნიშნული შედეგებიდან ჩანს, რომ 5'-CCCACCCACCA სამიზნე მოლეკულისთვის მაქსიმალური სიჩქარე არის 42°C ტემპერატურის მახლობლად, ხოლო 5'-CCCACCCACAA სამიზნე მოლეკულისთვის 35°C ტემპერატურის მახლობლად.

შედეგებზე დაყრდნობით შეგვიძლია ვთქვათ, რომ იზოთერმული კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაცია მუშაობს ფართო ტემპერატურულ შუალედში: 35-75 °C.

შედეგების ინტერპრეტაცია / დისკუსია

იმისთვის რომ განხორციელდეს QPA საჭიროა ფიქსირებულ ტემპერატურაზე მოხდეს შემდეგი საფეხურები 1) პრაიმერ/სამიზნე მოლეკულის დუპლექსის წარმოქმნა, 2) პოლიმერაზული ელონგაცია, 3) დუპლექსის თავისთავადი დაშლა და კვადრუპლექსის ფორმირება. ამიტომ ჩვენი კვლევის ძირითადი მიზანი ისეთი პრაიმერ/სამიზნე მოლეკულის შერჩევა იყო, რომლებითაც შესაძლებელი იქნებოდა ამ საფეხურების განხორციელება. 35°C-დან 48 °C ტემპერატურულ შუალედში ეს მიღწეულ იქნა 13 ნუკლეოტიდიანი პრაიმერით 5'-GGG(3Mi)GGGTGGGTG-3', ოპტიმალური ტემპერატურაა 42 °C (სადაც QPA-ის აქვს მაქსიმალური სიჩქარე). 46°C-დან 62°C-მდე ტემპერატურულ შუალედში მაქსიმალური სიჩქარე აქვს 14 ნუკლეოტიდიან პრაიმერს 5'-GGG(3Mi)GGGTGGGTGG-3', ოპტიმალური ტემპერატურაა 55°C. 62°C-დან 75°C-მდე მაქსიმალური სიჩქარე აქვს 14 ნუკლეოტიდიან პრაიმერს 5'-GGG(2AP)GGGCGGGCGG-3' 2AP-ით, ოპტიმალური ტემპერატურაა 67°C. აღიშნულის გათვალისწინებით შეგვიძლია ვთქვათ, რომ იზოთერმული კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაცია მუშაობს ფართო ტემპერატურულ შუალედში: 35-75 °C.

QPA-ის სიჩქარე, დამოკიდებულია შემდეგ კომპონენტზე: 1) სამიზნე მოლეკულის და პრაიმერის კონცენტრაცია; იმის გამო რომ კვადრუპლექსის წარმოქმნელი თანმიმდევრობის ფორმირება ხდება სამიზნე მოლეკულაზე და პრაიმერ/სამიზნე მოლეკულის დუპლექსის წარმოქმნის სიჩქარე მათ კონცენტრაციაზეა დამოკიდებული. 2) სუბსტრატი დუპლექსის ლღობის ტემპერატურის განსხვავება პროდუქტ დუპლექსზე (ცხრილი 9), როცა ეს განსხვავება დადებითია მიიღწევა მაქსიმალური სიჩქარე, რაც გამოწვეულია პრაიმერ/სამიზნე მოლეკულის დუპლექსის წარმოქმნის შემდეგ მისი დაშლის სიმარტივეზე. 3) კალიუმის იონის კონცენტრაციაზე ბუფერში. 4) დნმ-პოლიმერაზას კონცენტრაციაზე და სიჩქარეზე. 5) ასევე დამოკიდებულია დეზოქსიგუანოზინტრიფოსფატის (dGTP) კონცენტრაციაზე. იმის გათვალისწინებით რომ განხილულ კვლევებში არ იცვლებოდა 1, 3, 4 და 5 პუნქტი, QPA-ის სიჩქარე

დამოკიდებული იყო პრაიმერ/სამიზნე მოლეკულის დუპლექსზე, რაც სხვადასხვა კომპლექსის შედარების საშუალებას გვაძლევს. შედეგება აჩვენა, რომ QPA-ის მაქსიმალური სიჩქარე მიიღწევა 14 ნუკლეოტიდიანი პრაიმერით, 3MI-ის გამოყენებით 5'-GGG(3Mi)GGGTGGGTGG-3' 55 °C-ზე (გრაფიკი 12), მაქსიმალური სიჩქარე დაახლოებით 10 nM/წუთშია.

აღნიშულ ნაშრომში განხორციელებული კვლევები ქმნის საფუძველს იმისა, რომ კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაცია (QPA) გამოყენებულ იქნას მარტივი დიაგნოსტიკური (Point of care (POC)) მეთოდის შემუშავებაში.

დასკვნები და რეკომენდაციები

1. კვადრუპლექსის ლღობის ტემპერატურა დამოკიდებულია კათიონებზე და მათ კონცენტრაციაზე (იზრდება კონცენტრაციის ზრდისას).
2. G3T-ის მარყუჟის პოზიციაში თიმილის ციტოზინით ჩანაცვლება იწვევს უმნიშვნელო დესტაბილიზაციას, მაშინ როცა პურინით და მათი ფლურესცენციული ანალოგებით ჩანაცვლება იწვევს ლღობის ტემპერატურის შემცირებას 3°C დან - 5°C - მდე.
3. GC-მიერთებები 5' ბოლოდან G3T კვადრუპლექსზე იწვევენ ლღობის ტემპერატურის შემცირებას 8°C -ით.
4. მონომოლეკულური კვადრუპლექსის ლღობის ტემპერატურა არ არის დამოკიდებული მის კონცენტრაციაზე, როცა G3T-ის კონცენტრაცია ბევრად ნაკლებია კათიონების კონცენტრაციაზე.
5. მარყუჟის პოზიციაში თიმილის ცვლილება სხვა ნუკლეოტიდით ან მათი ფლურესცენციული ანალოგით არ ცვლის G3T კვადრუპლექსის პარალელურ სტრუქტურას.
6. G3T კვადრუპლექსის ფორმირება სწრაფი პროცესია ტემპერატურაზე დამოკიდებული არ არის.
7. G3T კვადრუპლექსის ნახევარწარმოქმნის დრო დამოკიდებულია კათიონებზე და მის კონცენტრაციაზე და არ არის დამოკიდებული კვადრუპლექსის კონცენტრაციაზე (როცა G3T-ის კონცენტრაცია ბევრად ნაკლებია კათიონების კონცენტრაციაზე).
8. QPA-ის მაქსიმალური სიჩქარე მიიღწევა პრაიმერით 3MI-ის გამოყენებით დაახლოებით 55°C -ზე. მაქსიმალური სიჩქარე ~ 10 nM/წთ, როცა პრაიმერი/სამიზნე მოლეკულა 100/1 nM-ია.

9. G3T-ზე დაფუძნებული იზოთერმული კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაცია მუშაობს ფართო ტემპერატურულ შუალედში: 35-75 °C.
10. აღნიშულ ნაშრომში განხორციელებული კვლევები ქმნის საფუძველს იმისა, რომ კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაცია (QPA) გამოყენებულ იქნას მარტივი დიაგნოსტიკური (Point of care) მეთოდის შემუშავებაში.

ბიბლიოგრაფია

1. Bartlett, J. M. S.; Stirling, D. (2003). "A Short History of the Polymerase Chain Reaction". PCR Protocols. *Methods in Molecular Biology*. 226 (2nd ed.). pp. 3–6.
2. Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J.A., Vermaas, E.H. and Toole, J.J. (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, 355.
3. Bradrick, T.D. and Marino, J.P. (2004) Ligand-induced changes in 2-aminopurine fluorescence as a probe for small molecule binding to HIV-1 TAR RNA. *RNA*, 10, 1459-1468.
4. Bugaut A, Balasubramanian S (2012). "5'-UTR RNA G-quadruplexes: translation regulation and targeting.". *Nucleic Acids Res*. 40 (11): 4727–41.
5. Burge S, Parkinson G, Hazel P, Todd A, Neidle S (2006). „Quadruplex DNA: sequence, topology and structure“. *Nucleic Acids Res* 34 (19): 5402–15.
6. Cheng, S.; Fockler, C.; Barnes, W. M.; Higuchi, R. (1994). "Effective Amplification of Long Targets from Cloned Inserts and Human Genomic DNA". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91 (12): 5695–5699.
7. Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976). "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*". *J. Bacteriol*. 127 (3): 1550–1557.
8. De Cian, A., Cristofari, G., Reichenbach, P., De Lemos, E., Monchaud, D., Teulade-Fichou, M.P., Shin-Ya, K., Lacroix, L., Lingner, J. and Mergny, J.L. (2007) Reevaluation of telomerase inhibition by quadruplex ligands and their mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 17347-17352.
9. <http://www.eyehortilux.com>.

10. Förster, Th. (1965). "Delocalized Excitation and Excitation Transfer". In Sinanoglu, Oktay. Modern Quantum Chemistry. Istanbul Lectures. Part III: Action of Light and Organic Crystals. 3. New York and London: *Academic Press*. pp. 93–137. Retrieved 2011-06-22.
11. Gerstein S. Alan (Edited by) Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide. Copyright © 2001 by *Wiley-Liss*.
12. Gogichaishvili Sh., J. Johnson, D. Gvarjaladze, L. Lomidze, B. Kankia “ Isothermal amplification of DNA using quadruplex primers with fluorescent pteridine base analogue 3-methyl isoxanthopterin”. *Biopolymers, Volume: 101, Issue: 6*, Pages: 583-590 Published: JUN 2014.
13. Gray, R.D., Petraccone, L., Buscaglia, R. and Chaires, J.B. (2010) 2-aminopurine as a probe for quadruplex loop structures. *Methods Mol Biol*, 608, 121-136.
14. Gray, R.D., Petraccone, L., Trent, J.O. and Chaires, J.B. (2010) Characterization of a K⁺-induced conformational switch in a human telomeric DNA oligonucleotide using 2-aminopurine fluorescence. *Biochemistry*, 49, 179-194.
15. Greider C, Blackburn E (1985). „Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts“. *Cell* 43 (2 Pt 1): 405–13.
16. Hawkins, M.E. (2007) Synthesis, purification and sample experiment for fluorescent pteridine-containing DNA: tools for studying DNA interactive systems. *Nat Protoc*, 2, 1013-1021.
17. Helms, Volkhard (2008). "Fluorescence Resonance Energy Transfer". Principles of Computational Cell Biology. *Weinheim: Wiley-VCH*. p. 202.
18. Hui Xu , Runfeng Chen, Qiang Sun, Wenyong Lai, Qianqian Su, Wei Huang and Xiaogang Liu. Recent progress in metal–organic complexes for optoelectronic applications. *Chem Soc Rev*. 2014 May 21;43(10):3259-302.
19. Huppert Leon Julian, Four-stranded DNA: cancer, gene regulation and drug development. *Philosophical transactions of the royal society A*. Published 15 December 2007.

20. Jing, N., Rando, R.F., Pommier, Y. and Hogan, M.E. (1997) Ion selective folding of loop domains in a potent anti-HIV oligonucleotide. *Biochemistry*, **36**, 12498-12505.
21. Jing, N., Marchand, C., Liu, J., Mitra, R., Hogan, M.E. and Pommier, Y. (2000) Mechanism of inhibition of HIV-1 integrase by G-tetrad-forming oligonucleotides in Vitro. *J Biol Chem*, **275**, 21460-21467.
22. Kankia, B.I. (2003) Mg²⁺-induced triplex formation of an equimolar mixture of poly (rA) and poly(rU). *Nucleic Acids Res*, **31**, 5101-5107.
23. Kankia, B.I. (2004) Optical absorption assay for strand-exchange reactions in unlabeled nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, **32**, e154.
24. Kankia, B.I. (2011) Self-dissociative primers for nucleic acid amplification and detection based on DNA quadruplexes with intrinsic fluorescence. *Analytical Biochemistry*, **409**, 59-65.
25. Kankia, B; **Gvarjaladze, D**; Rabe, A; Lomidze, L; Metreveli, N; Musier-Forsyth, K. Stable Domain Assembly of a Monomolecular DNA Quadruplex: Implications for DNA-Based Nanoswitches. *Biophysical Journal*. Volume: 110 Issue: 10 Pages: 2169-2175. (2016).
26. Kankia, B.I. and Marky, L.A. (2001) Folding of the thrombin aptamer into a G-quadruplex with Sr(2⁺): stability, heat, and hydration. *J Am Chem Soc*, **123**, 10799-10804.
27. Kimura, T., Kawai, K., Fujitsuka, M. and Majima, T. (2006) Detection of the G-quadruplex-TMPyP4 complex by 2-aminopurine modified human telomeric DNA. *Chem Commun (Camb)*, 401-402.
28. Lakowicz, Joseph R. Principles of Fluorescence Spectroscopy (*Kluwer Academic / Plenum Publishers 1999*) p.10.
29. Law, S.M., Eritja, R., Goodman, M.F. and Breslauer, K.J. (1996) Spectroscopic and calorimetric characterizations of DNA duplexes containing 2-aminopurine. *Biochemistry*, **35**, 12329-12337.

30. Maizels, N. (2006) Dynamic roles for G4 DNA in the biology of eukaryotic cells. *Nat Struct Mol Biol*, *13*, 1055-1059.
31. Mathias J., R. Okyere, L. Lomidze, D. Gvarjaladze, K. Musier-Forsyth, B. Kankia "Thermodynamic properties of quadruplex primers for highly versatile isothermal DNA amplification". *Biophysical Chemistry*, Vol 185, Pages 14–18. 2014 Jan.
32. Matsugami A., K. Ouhashi, M. Kanagawa, H. Liu, S. Kanagawa, S. Uesugi, M. Katahira, An intramolecular quadruplex of (GGA)(4) triplet repeat DNA with a G:G:G:G tetrad and a G(:A):G(:A):G(:A):G heptad, and its dimeric interaction, *J. Mol. Biol.* *313*(2001) 255–269.
33. McEachern, M.J., Krauskopf, A. and Blackburn, E.H. (2000) Telomeres and their control. *Annu Rev Genet*, *34*, 331-358.
34. McLaughlin, L.W., Leong, T., Benseler, F. and Piel, N. (1988) A new approach to the synthesis of a protected 2-aminopurine derivative and its incorporation into oligodeoxynucleotides containing the Eco RI and Bam HI recognition sites. *Nucleic Acids Res*, *16*, 5631-5644.
35. Menger, M., Eckstein, F. and Porschke, D. (2000) Dynamics of the RNA hairpin GNRA tetraloop. *Biochemistry*, *39*, 4500-4507.
36. Mergny, J.L., Phan, A.T. and Lacroix, L. (1998) Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett*, *435*, 74-78.
37. Metha, Akul. "Principle". *PharmaXChange.info* (13 Dec 2011).
38. Nugent C, Lundblad V (1998). „The telomerase reverse transcriptase: components and regulation“. *Genes Dev* *12* (8): 1073–85.
39. Niemz Angelika, Ferguson M. Tanya, and Boyle S. David 'Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases'. *Trends Biotechnol* . 2011 May ; *29*(5): 240–250.
40. Paramasivan S., I. Rujan, P.H. Bolton, Circular dichroism of quadruplex DNAs: applications to structure, cation effects and ligand binding, *Methods* *43* (2007) 324–331.

41. <https://www.photophysics.com/lab/stopped-flow-spectroscopy-beginners-guide-ii>.
42. <http://physics.aidio.net/index.php/18-teoria/83-sinatlis-polarizacia>.
43. Rachwal, P.A. and Fox, K.R. (2007) Quadruplex melting. *Methods*, **43**, 291–301.
44. Rando, R.F., Ojwang, J., Elbaggari, A., Reyes, G.R., Tinder, R., McGrath, M.S. and Hogan, M.E. (1995) Suppression of human immunodeficiency virus type 1 activity in vitro by oligonucleotides which form intramolecular tetrads. *J Biol Chem*, **270**, 1754–1760.
45. Safford, William Edwin (1916). "Lignum nephriticum". *Annual report of the Board of Regents of the Smithsonian Institution. Washington: Government Printing Office*. p. 271–298.
46. Saiki, R.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.; Horn, G.; Erlich, H.; Arnheim, N. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia". *Science*. **230** (4732): 1350–1354.
47. Sambrook Joseph & Russel W. David (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.). *Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
48. Schaffitzel, C., Berger, I., Postberg, J., Hanes, J., Lipps, H.J. and Pluckthun, A. (2001) In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylonychia lemnae* macronuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8572–8577.
49. Sharkey, D. J.; Scalice, E. R.; Christy, K. G.; Atwood, S. M.; Daiss, J. L. (1994). "Antibodies as Thermolabile Switches: High Temperature Triggering for the Polymerase Chain Reaction". *Bio/Technology*. **12** (5): 506–509.
50. So, H.M., Won, K., Kim, Y.H., Kim, B.K., Ryu, B.H., Na, P.S., Kim, H. and Lee, J.O. (2005) Single-walled carbon nanotube biosensors using aptamers as molecular recognition elements. *J.Am Chem Soc*, **127**, 11906–11907.
51. Splettstoesser Thomas, <https://en.wikipedia.org/wiki/DNA>,

52. Stock S. Patricia; John, Vanderberg; Itamar, Glazer; Noel, Boemare (2009). "1.6.2. Primers development and virus identification strategies". *Insect Pathogens: Molecular Approaches and Techniques. CAB International*. p. 22. ISBN 978-1-84593-478-1.
53. Tang C.F., R.H. Shafer, Engineering the quadruplex fold: nucleoside conformation determines both folding topology and molecularity in guanine quadruplexes, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 5966–5973.
54. Taylor Adam; Anupama Joseph, Robert Okyere, Shota Gogichaishvili, Karin Musier-Forsyth, Besik Kankia. Isothermal quadruplex priming amplification for DNA-based diagnostics. *Biophysical Chemistry, Volume: 171, Pages: 1-8* Published: JAN 2013.
55. Ward, D.C., Reich, E. and Stryer, L. (1969) Fluorescence studies of nucleotides and polynucleotides. I. Formycin, 2-aminopurine riboside, 2,6-diaminopurine riboside, and their derivatives. *J Biol Chem*, **244**, 1228-1237.
56. https://en.wikibooks.org/wiki/Methods_and_Concepts_in_the_Life_Sciences/Spectroscopy
57. https://en.wikipedia.org/wiki/Circular_dichroism.
58. https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction.
59. https://en.wikipedia.org/wiki/Ionic_radius
60. Wright W, Tesmer V, Huffman K, Levene S, Shay J (1997). „Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end“. *Genes Dev* **11** (21): 2801–9.
61. <https://youngbiologists.wordpress.com/2014/01/29/pcr/>.
62. Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3406-3415.