



УДК 577.151.35:577.113.4:577.2.08

СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕННЫХ НУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ МАРКИРОВАНИЯ ПРОДУКТОВ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

© 2023 г. В. Е. Шершов^{*,#}, С. А. Лапа^{*}, А. И. Левашова^{*}, И. Ю. Шишкин^{*}, Г. Ф. Штылев^{*},
Е. Ю. Шекалова^{*}, В. А. Василисков^{*}, А. С. Заседателев^{*}, В. Е. Кузнецова^{*}, А. В. Чудинов^{*}

*ФГБУН “Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта” РАН,
Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 09.12.2022 г.

После доработки 13.12.2022 г.

Принята к публикации 15.12.2022 г.

Осуществлен синтез флуоресцентно-меченых нуклеотидов, содержащих цвиттерионный индодикарбоцианиновый краситель, присоединенный через *транс*-алкеновый спейсер в положении С5 пиримидинового основания, и проверена их субстратная эффективность в условиях рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA). В результате RPA образовались полноразмерные целевые продукты фрагмента гена *ebpS* возбудителя бактериальной пневмонии (*Staphylococcus aureus*) с высокой плотностью встраивания флуоресцентной метки.

Ключевые слова: флуоресцентно-меченые нуклеотиды, индодикарбоцианиновые красители, изотермическая амплификация, рекомбиназная полимеразная амплификация

DOI: 10.31857/S0132342323050056, EDN: BAKVTC

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в практике клинических лабораторных исследований инфекционных заболеваний все больше внимания уделяется молекулярно-генетическим методам анализа [1–3]. Важным этапом развития микроанализа нуклеиновых кислот стала разработка систем, включающих все этапы проведения анализа в одном устройстве (“лаборатория на чипе”): выделение анализируемого генетического материала из образца и его амплификация методом ПЦР с одновременным флуоресцентным маркированием, гибридационный анализ и цифровая регистрация полученных результатов, автоматически, без контакта с окружающей средой [4–6]. Развитие технологии “лаборатория на чипе” привело к появлению новых методов анализа, основанных на изотермической амплификации нуклеиновых кислот [7, 8]. Амплификация нуклеиновых кислот при одной оптимальной температуре значительно упрощает реализацию методов амплификации в медицин-

ских диагностических приборах и аналитическом оборудовании. При оптимально подобранных условиях изотермическая амплификация обеспечивает сопоставимую или даже более высокую чувствительность и специфичность по сравнению с традиционной ПЦР [9].

В настоящее время разработан ряд методов изотермической амплификации: метод катящегося кольца (RCA), петлевая изотермическая амплификация (LAMP), рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA) и некоторые другие [10]. Во всех случаях такие системы используют комплекс ферментов либо определенные модификации, позволяющие обходиться без стадии плавления ДНК. Так же, как и в традиционной ПЦР, для маркирования фрагментов ДНК применяются флуоресцентно-меченые нуклеотиды.

Цель данной работы – синтез субстратов для ферментов изотермической амплификации в виде флуоресцентно-меченых пиримидиновых нуклеотидов, содержащих *транс*-алкеновый спейсер в положении С5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность встраивания модифицированных нуклеотидов в условиях изотермической амплификации исследована на примере идентификации возбудителя бактериальной пневмонии

Сокращения: dATP – 2'-дезоксиаденозинтрифосфат; dCTP – 2'-дезокситидинтрифосфат; dGTP – 2'-дезоксигуанозинтрифосфат; dTTP – 2'-дезокситимидинтрифосфат; dUTP – 2'-дезоксуридинтрифосфат; fluor-dUTP – флуоресцентно-меченый 2'-дезоксуридин-5'-трифосфат; RPA – рекомбиназная полимеразная амплификация.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (495) 135-98-00; эл. почта: shershov@list.ru).

(*Staphylococcus aureus*). В качестве субстратов синтезированы флуоресцентно-меченые dCTP и dUTP, маркированные электронейтральным цвиттерным индодикарбоцианиновым красителем [11], характеризующимся флуоресценцией в длинноволновой области спектра, повышенной растворимостью в воде, высокими значениями квантового выхода флуоресценции и молярного коэффициента экстинкции, повышенной фотостабильностью и хемостойкостью. С5-положение пиримидинового цикла наиболее оптимально подходит для модификации нуклеотидов, поскольку не ингибирует взаимодействие оснований А–Т [12]. Структура пиримидинового основания и строение присоединенного к нему маркера влияют на эффективность встраивания fluo-dNTP в зависимости от вида ДНК-полимеразы.

Флуоресцентно-меченый dCTP (**VI**) получали многостадийным синтезом из 5-иод-2'-дезоксцитидина (**I**), включающим в себя пять принципиальных стадий (схема 1). По литературным данным [13] известно, что N4-аминогруппа цитидина ингибирует реакцию Хека. В качестве защиты использовали диметилформаминовую группу, которую вводили при помощи диметилацетата диметилформамида. Далее проводили реакцию конденсации цитидина (**I**) с *N*-аллил-2,2,2-трифторацетамидом (**II**), предварительно полученного реакцией трифторуксусного ангидрида с аллиламином, в присутствии трис(добензилиденацетон)дипалладия(0) и тетрабутиламонийхлорида в DMF. Важный этап, повышающий выход продукта (**III**), – удаление кислорода из реакционной массы. Диметилформаминовую защитную группу селективно удаляли в кислых условиях, не затрагивая трифторацетильную группу.

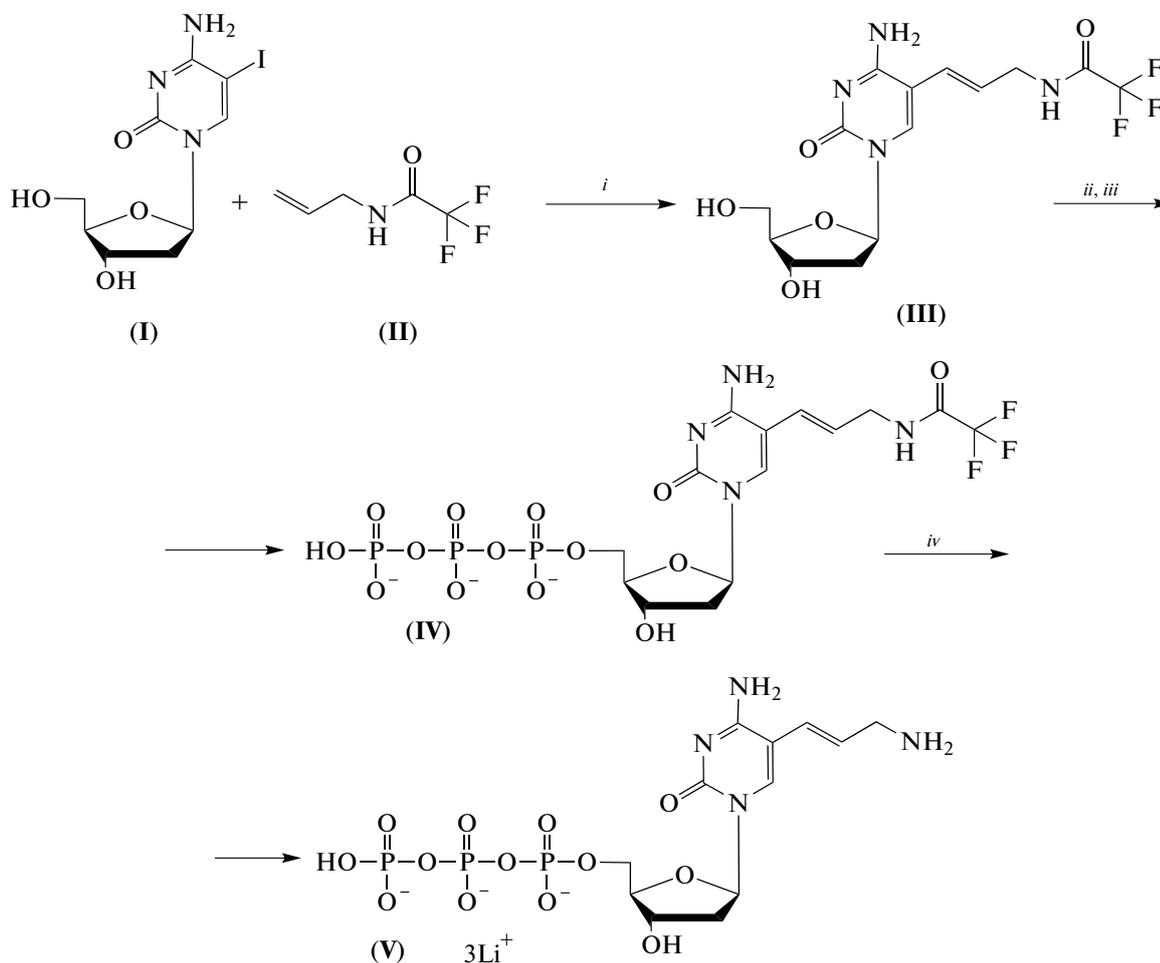


Схема 1. Синтез 5-аминоаллил-2'-дезоксцитидин-5'-трифосфата (**V**). Условия: *i* – DMF-DMA, Bu₄NCl, LiCl, LiOAc(H₂O)₂, AATFA, Pd₂(dba)₃, DMF, 55°C, 3 ч; *ii* – POCl₃, TMP, 4°C, 1 ч 40 мин; *iii* – пирофосфат трибутиламония, DMF, Bu₃N, 20°C, 40 мин; *iv* – NH₃·H₂O (30%), 20°C, 1 ч.

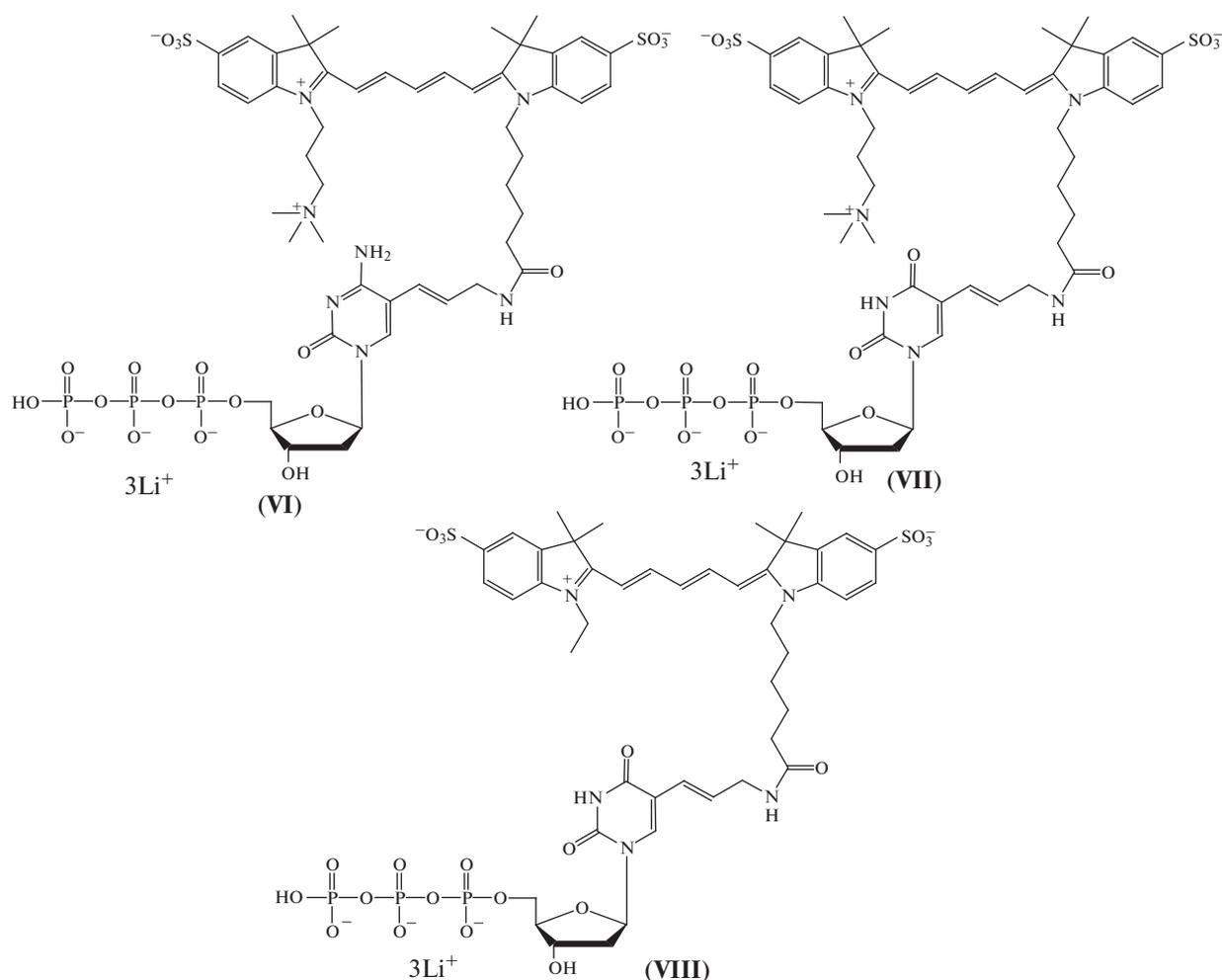


Рис. 1. Строение флуоресцентно-меченых пиримидиновых нуклеотидов (VI–VIII).

Трифосфат (IV) получали в две стадии. На первом этапе действием хлорокиси фосфора на нуклеозид (III) получали промежуточный хлорангидрид при использовании триметилфосфата в качестве растворителя. Согласно литературным данным [14], 5'-селективное фосфорилирование нуклеозидов при действии хлорокиси фосфора в триалкилфосфате проходит через образование комплекса нуклеозид–триалкилфосфат (триалкилфосфат взаимодействует с 5'-гидроксильной группой и с самым нуклеофильным атомом азота гетероциклического основания), что повышает региоселективность реакции. Далее образовавшийся хлорангидрид без выделения вводили в реакцию с тетрабутиламмонийпирофосфатом в DMF в присутствии трибутиламина с последующим снятием трифторацетильной защитной группы раствором аммиака.

Флуоресцентное маркирование AAdCTP (V) проводили при помощи предварительно полу-

ченного активированного производного индоди-карбоцианинового красителя [15]. Реакцией аминогруппы нуклеотида с *p*-нитрофениловым эфиром красителя в смеси в 0.1 M NaHCO₃ : Na₂CO₃ (pH 8.5) : DMF получали флуоресцентно-меченый цитидинтрифосфат (VI) с выходом ~65% (рис. 1).

Для проверки субстратной эффективности нуклеотидов (VI) и (VII), отличающихся строением пиримидинового основания, проводили изотермическую амплификацию в режиме реального времени, а также электрофоретический контроль продуктов реакции. Для оценки степени встраивания модифицированных нуклеотидов был выбран fluor-dUTP (VIII), показавший хорошие результаты для ферментативного маркирования ДНК в ходе ПЦР по сравнению с коммерчески доступным продуктом (Cy5-dUTP, PA55022; Amersham, США).

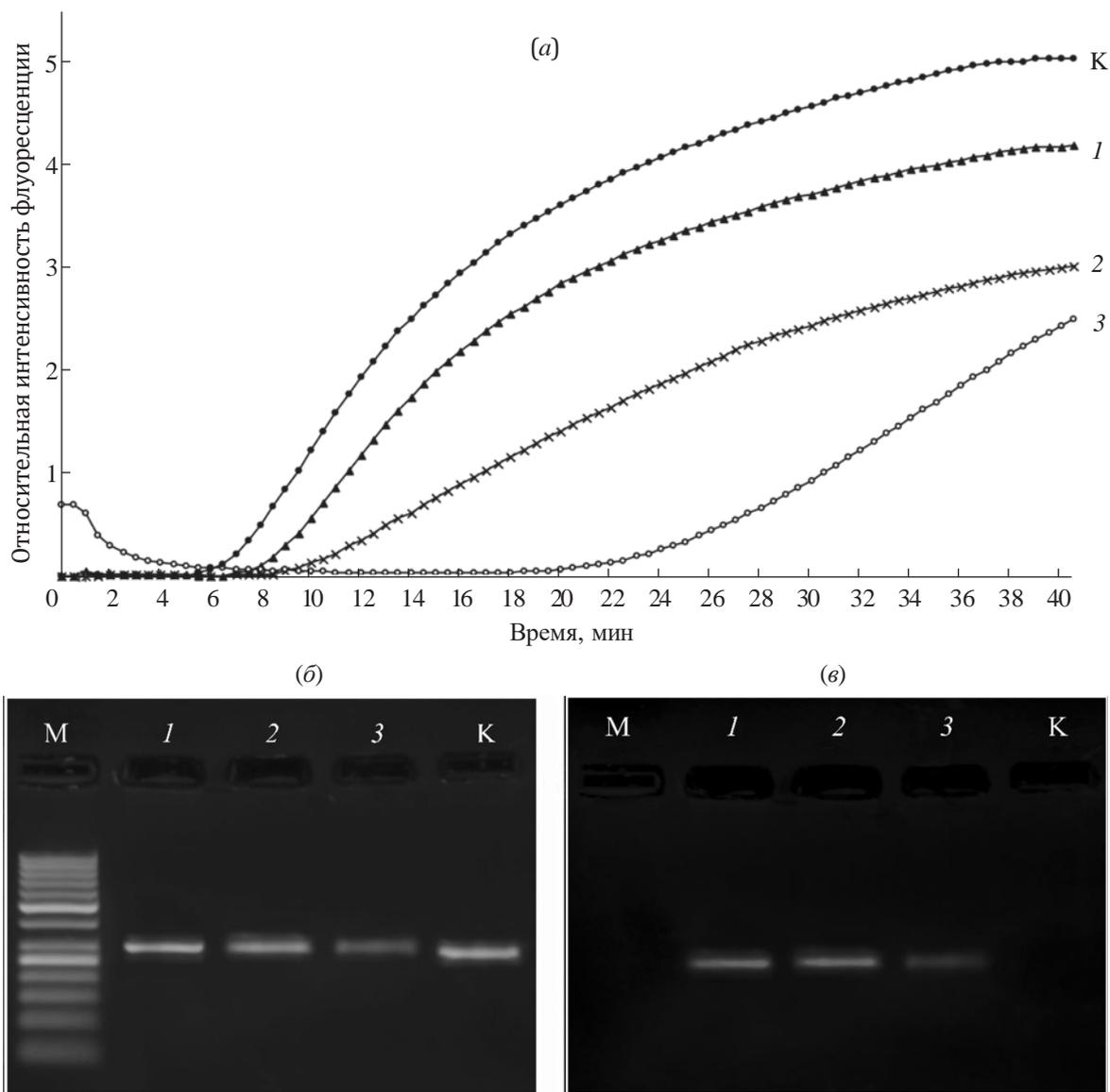


Рис. 2. Проверка субстратной эффективности флуоресцентно-меченых нуклеотидов (VI–VIII). (a) – RPA в режиме реального времени при концентрации fluor-dNTP, равной 8 мкМ; (б, в) – электрофореграммы, полученные в цифровом формате RAW с сохранением данных попиксельной интенсивности сигнала для измерения выхода полноразмерного продукта, 4%-ный агарозный гель, окрашивание с детекцией на длине волны SYBR Green (б) и Cy5 (в). Обозначения: М – маркер длин двухцепочечных ДНК GeneRuler 50 bp (Thermo Scientific, США), 1 – нуклеотид (VII), 2 – нуклеотид (VI), 3 – нуклеотид (VIII), К – природные dNTP.

Результаты RPA показали, что модифицированные нуклеотиды (VI) и (VII), содержащие цвиттерийный краситель, характеризуются быстрой кинетикой ($\Delta t = 8$) по сравнению с fluor-dUTP (VIII) ($\Delta t = 22$), но обладают небольшим ингибирующим эффектом (сравнение с контрольным образцом, содержащим только природные dNTP) (рис. 2). Анализ электрофореграмм показал образование полноразмерных целевых продуктов (*Stafilococcus aureus*, фрагмент гена *ebpS*) и высокую плотность встраивания флуоресцентной метки (VI) и (VII) по сравнению с fluor-dUTP (VIII).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реагенты и растворители марок о.с.ч., х.ч. или ч.д.а. фирм Sigma-Aldrich (США), Thermo Fisher (США) и Химмед (Россия). Все реагенты, в том числе растворители, были свежеперегнанными и свежеприготовленными либо только что приобретенным новым товаром.

1 М триэтиламмоний-гидрокарбонатный буферный раствор (TEAB) готовили следующим образом: через смесь деионизированной воды (600 мл) и триэтиламина (139 мл, 1 моль) при охлаждении

на льду и интенсивном перемешивании пропускали углекислый газ до получения нужного значения pH 7.5–8.0.

Индивидуальность полученных соединений и ход реакции контролировали методом ТСХ на пластинках RP-18 (Merck, Германия). Колоночную хроматографию проводили на колонках с сорбентом LiChroprep RP-18 с размером частиц 0.025–0.040 мкм (Merck, Германия) и DE52 (Whatman, Великобритания). Подачу элюента на колонку при хроматографической очистке образцов осуществляли при помощи программируемого перистальтического насоса Econo Gradient Pump (Bio-Rad, США). Сигналы образцов регистрировали с использованием УФ-детектора Econo UV Monitor (Bio-Rad, США).

Микроколичества веществ взвешивали на аналитических весах CP225D (Sartorius, Германия). Интенсивное перемешивание реакционных масс при термостатировании в микропробирках проводили на термошейкере TS-100C (BioSan, Латвия). Обнаружение веществ на хроматограммах осуществляли в УФ-свете при длинах волн 254, 302 и 365 нм (модель UVLMS-38, Upland, США). Упаривание растворов проводили при пониженном давлении при температуре 35°C при помощи роторного испарителя Laborota 4000-Efficient (Heidolph, Германия). Для создания глубокого вакуума использовали вакуумный насос Welch-ILMVAC 8917 (Applied Vacuum Technology, США).

Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре 4800 Plus MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems/MDS Sciex, США), реализующем технологию MALDI-TOF (времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией).

^1H -, ^{19}F - и ^{31}P -ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре AMX-400 (400 МГц; Bruker, Германия) в растворах D_2O и $\text{DMSO}-d_6$. Химические сдвиги δ выражали в ppm (м.д.), константы спин-спинового взаимодействия (J) – в Гц. Мультиплетность сигналов: с – синглет, д – дублет, т – триплет, кв – квадруплет, м – мультиплет.

В работе использовали природные dNTP (Сиб-Энзим, Россия), набор TwistAmp (Cambridge TwistDx, Великобритания). Синтез олигонуклеотидов осуществлен компанией ООО “Люмипроб РУС”, Россия.

В работе использовали бокс антибактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами для проведения ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-“Ламинар-С” (ЗАО “Ламинарные системы”, Россия), полуавтоматические пипетки (Sartorius, Франция), амплификатор LabNet TC9610 (Labnet International Inc., США), центрифугу-вортекс Микроспин FV-2400 (Biosan, Латвия), высокоскоростную центрифугу для микропробирок Eppendorf 5420 (Eppendorf, Германия), ДНК-ампли-

фикатор IQ5 (Bio-Rad, США), циркуляционный жидкостный термостат с насосом MLW U8 (Венгрия), камеру для горизонтального электрофореза (Helicon, Россия), источник питания Эльф-8 (ДНК-Технология, Россия), трансиллюминатор TSP-26.LMX V1 365/312 нм (Vilber Lourmat, Франция), цифровой фотоаппарат D5100 (Nikon, Япония) с оптическим фильтром SYBR Photographic Filter S7569 (Molecular Probes, США). Определение концентрации олигонуклеотидов проводили с помощью спектрофотометра для микрообъемов Nano Drop 1000 (Thermo Scientific, США).

Индодикарбоцианиновый краситель и его активированное производное, флуоресцентно-меченый dUTP (VIII), (IX), синтезированы согласно опубликованным нами методикам [11, 16].

Пирофосфат трибутиламмония. Декагидрат пирофосфата натрия 2.2 г (5 ммоль) растворяли в минимальном количестве воды и наносили на колонку, заполненную ионообменной смолой DOWEX-50 в H^+ -форме, элюировали водой, собирали ~30 мл раствора пирофосфорной кислоты. В раствор кислоты добавляли *n*- Bu_3N (10 ммоль, 1.5 мл) и перемешивали до однородного состояния. Раствор пирофосфата три-*n*-бутиламмония концентрировали упариванием в вакууме досуха. Добавляли расчетное количество DMF. Получали раствор с концентрацией 1.146 ммоль/г.

***N*-Аллил-2,2,2-трифторацетамид (II).** К аллиламину (60 мл, 800 ммоль), охлажденному до -5°C , при перемешивании добавляли по каплям трифторуксусный ангидрид (56 мл, 397 ммоль). Смесь дополнительно перемешивали в течение 1.5 ч при -5°C , а затем выдерживали при комнатной температуре 12 ч. Затем к смеси добавляли этилацетат (500 мл) и 0.1 М раствор бикарбоната натрия (500 мл). Органический слой промывали раствором 0.1 М бикарбоната натрия (2×500 мл) и водой (2×500 мл). Раствор фильтровали, концентрировали упариванием, а затем перегоняли в вакууме. Выход *N*-аллил-2,2,2-трифторацетамида составил 34 г (29%). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 6.58 (с, 1H, NH), 5.86 (м, 1H, CH), 5.3 (м, 2H, CH_2), 4.0 (т, 2H, CH_2N). Найдено: m/z 153.04 [M] $^+$. $\text{C}_5\text{H}_6\text{F}_2\text{NO}$. Вычислено: $M = 153.23$. ^{19}F -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): -74.58 (с, F).

5-(3)-Трифторацетилаллиламин-2'-дезокситидин (III) [17]. 5-Иод-2'-дезокситидин (I) (400 мг, 1.13 ммоль), диметилфосфатдиметил-ацеталь (225 мкл, 1.7 ммоль), тетрабутиламоний-хлорид (315 мг, 1.13 ммоль), литий хлорид (48 мг, 1.13 ммоль), литий ацетат (217 мг, 2.83 ммоль) и *N*-аллил-2,2,2-трифторацетамид (II) (520 мг, 3.4 ммоль) растворяли в DMF (16 мл), дегазировали в вакууме, нагревали 1 ч при 55°C в атмосфере азота и добавляли растворенный в DMF (200 мкл) трис(дибензилденацетон)дипалладий(0) (52 мг,

0.057 ммоль). Реакционную массу дополнительно перемешивали 1 ч при 55°C, затем приливали 1 М раствор соляной кислоты (6 мл) и далее нагревали еще 1 ч. По окончании нагревания к охлажденной до комнатной температуры реакционной смеси при перемешивании добавляли гидрокарбонат натрия (0.5 г, 6 ммоль) в воде (7 мл) и перемешивали 10 мин при комнатной температуре. Полученную суспензию фильтровали на фильтре Бюхнера со стекловолоконной мембраной (Whatman, GF/V, Великобритания). Осветленный раствор дополнительно фильтровали через активированный целит. Продукт реакции выделяли обращенно-фазовой хроматографией на колонке RP-18, используя для детекции вещества UV-детектор (280 нм), подключенный к самописцу. Элюировали в 0.05 М ТЕАВ с линейным градиентом концентрации CH_3CN от 0 до 50%. Растворитель удаляли в вакууме, остаток высушивали в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 . Получили 270 мг (62%) продукта (III). ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 9.53 (с, 1Н, NH), 8.09 (с, 1Н, C(6)H), 7.16 (уш.с., 2Н, NH_2), 6.41 (д, 1Н, C(3')OH), 6.15 (т, 1Н, C(1')H), 5.90 (м, 1Н, C(2)H), 5.18 (д, 1Н, C(1)H), 5.04 (т, 1Н, C(5')OH), 4.22 (м, 1Н, C(3')H), 3.91 (д, 2Н, C(3)H₂), 3.81 (м, 1Н, C(4')H), 3.60 (м, 2Н, C(5')H₂), 2.04 (м, 2Н, C(2')H₂). ^{19}F -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): -74.22 (с, P). Найдено: m/z 378.31 $[M]^+$. $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_5$. Вычислено: $M = 377.23$.

5-Аллиламин-2'-дезокситидин-5'-трифосфат (V). К охлажденному до 0°C раствору 5-(3)-трифторацетилаллиламин-2'-дезокситидина (III) (41 мг, 0.1 ммоль) в триметилфосфате (1.1 мл) при перемешивании добавляли предварительно охлажденный до 5°C раствор POCl_3 (100 мкл, 1 ммоль) в триметилфосфате (170 мкл). Реакционную массу перемешивали 1 ч 40 мин при 4°C, затем охлаждали до -10°C, добавляли раствор пиррофосфата трибутиламмония в DMF (1.2 мл, 0.7 ммоль, 0.65 М), Vb_3N (200 мкл) и дополнительно перемешивали при комнатной температуре 40 мин. Продукт реакции осаждали 2%-ным раствором LiClO_4 в ацетоне. Полученный осадок промывали ацетоном и высушивали в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 . Полученный осадок разбавляли в 50 мл воды и очищали методом колоночной адсорбционной обращенно-фазовой хроматографии на колонке с сорбентом RP-18 в 0.05 М ТЕАВ с линейным градиентом концентрации CH_3CN от 0 до 30%, с УФ-контролем на длине волны 254 нм. После очистки растворитель удаляли в вакууме.

К высушенному 5-аминоаллилтрифторацетил-2'-дезокситидин-5'-трифосфату (IV) добавляли $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (30%, 1 мл) и перемешивали 1 ч при комнатной температуре, затем растворитель удаляли в вакууме. Полученный осадок растворяли в воде и очищали ионообменной хрома-

тографией на колонке с DEAE-целлюлозой в 30%-ном CH_3CN с линейным градиентом концентрации ТЕАВ от 0 до 0.5 М с УФ-контролем при длине волны 254 нм. Фракцию целевого соединения концентрировали в вакууме до твердого состояния, твердый остаток высушивали в вакууме до постоянного веса, затем растворяли в минимальном количестве деионизированной воды и осаждали 2%-ным раствором перхлората лития в ацетоне. Выход 5-аминоаллил-2'-дезокситидин-5'-трифосфата (V) составил 11 мг (20%). $\lambda_{\text{abs}}(\text{H}_2\text{O}) = 290$ нм. ^1H -ЯМР (D_2O): 8.26 (с, 1Н, C(6)H), 6.60 (д, J 16.0, 1Н, C(1)H), 6.47 (м, 1Н, C(2)H), 6.30 (т, J 6.4, 1Н, C(1')H), 4.61 (м, 1Н, C(4')H), 4.2 (м, 3Н, C(3')H, C(5')H₂), 3.73 (д, J 6.4, 2Н, C(3)H₂), 2.39 (м, 2Н, C(2')H₂). ^{31}P -ЯМР (D_2O): -21.97 ($^{\beta}\text{P}$, т), -10.57 ($^{\alpha}\text{P}$, д), -8.63 ($^{\gamma}\text{P}$, д). Найдено: m/z 490.04 $[M]^+$ $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{P}_3$. Вычислено: $M = 488.99$.

Трилитиевая соль 5-[4-аза-5-оксо-10-(1'-(3-триметиламмоний)пропил)-3,3,3',3'-тетраметил-5,5'-дисульфоиндодикарбоцианин-1-ил]-дек-1-ен-1-ил]-2'-дезокситидин-5'-трифосфата (VI). К замороженному раствору AAdCTP (V) (8 мг, 0.014 ммоль), DMAP (1.8 мг, 0.014 ммоль) и DIPEA (2.5 мкл, 0.014 ммоль) в 0.1 М $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (800 мкл) добавляли охлажденный до -18°C раствор *n*-нитрофенилового эфира *N*-(5-карбокспен-тил)-3,3,3',3'-тетраметил-*N'*-(3-триметиламмоний)пропил)-5,5'-дисульфоиндодикарбоцианинового красителя (42 мг, 0.06 ммоль) в DMSO (1.2 мл) и перемешивали 8 ч при 10°C. По окончании перемешивания в реакционную массу добавляли 2%-ный раствор LiClO_4 в ацетоне (3 мл). Смесь центрифугировали, осадок промывали ацетоном, растворяли в 0.1 М ТЕАВ (3 мл) и очищали в три этапа.

На первом этапе проводили очистку методом колоночной адсорбционной обращенно-фазовой хроматографии на колонке с сорбентом RP-18 в 0.02 М ТЕАВ с линейным градиентом концентрации CH_3CN от 5 до 30%, затем ионообменной хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой в 30%-ном CH_3CN с линейным градиентом концентрации ТЕАВ от 0.05 до 0.5 М. На третьем этапе на колонке с сорбентом RP-18 последовательно элюировали 0.1 М EDTA, затем 0.1 М LiClO_4 , H_2O и $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (1 : 9).

Фракцию целевого вещества концентрировали в вакууме до твердого состояния, твердый остаток высушивали в вакууме до постоянного веса, затем растворяли в минимальном количестве деионизированной воды и осаждали 2%-ным раствором перхлората лития в ацетоне. Выход 9.4 мг (51%). ^1H -ЯМР (D_2O): 7.65 (м, 2Н, краситель β,β' -CH), 7.42, 7.03, 6.86 (м, д, д, 7Н, C(6)H, краситель ArH), 6.24 (т, 1Н, краситель γ -CH, J 12.0), 6.05 (д, J 16.0, 1Н, краситель

C(1)H), 5.80 (м, 3H, краситель C(2)H, C(1')H, краситель α -CH), 5.63 (м, 1H, краситель α' -CH), 4.25 (м, 1H, C(4')H), 3.80 (уш.м., 7H, C(3')H, C(5')H₂, CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃, краситель C(6)H₂), 3.42 (м, 2H, краситель C(3)H₂), 3.11 (м, 2H, CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃), 2.73 (с, 9H, CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃), 1.88 (м, 8H, C(2')H₂, CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃, краситель C(7)H₂, C(10)H₂), 1.65 (с, 12H, краситель CH₃(3,3), CH₃(3,3')), 1.47, 0.98 (2м, 4H, краситель C(8)H₂, C(9)H₂). ³¹P-ЯМР (D₂O): -21.08 (т, ^βP), -11.70 (д, ^αP), -5.53 (д, ^γP). Найдено: *m/z* 1231.5 [M]⁻. C₄₉H₆₄N₇O₂₀P₃S₂⁴⁻. Вычислено: *M* = 1228.12.

Определение эффективности амплификации с помощью RPA в режиме реального времени. Для определения кинетики амплификации по накоплению флуоресцентного сигнала EvaGreen для каждого флуоресцентно-меченого нуклеозидтрифосфата проводили RPA в режиме реального времени на приборе iQ5 (Bio-Rad, США). В качестве матрицы использовали очищенную геномную ДНК штамма *Staphylococcus aureus* MW2 (ATCC VAA-1707, MRSA). Праймеры к фрагменту гена *ebpS* *S. aureus*: прямой *ebpS*-f1-35 5'-CCAAATATCGCTAATGCACCGATAATTAGTACAGC-3' и обратный *ebpS*-r1-35 5'-ACTCGACTGAGGATAAAGCGTCTCAAGATAAGTCT-3'. Для проведения RPA использовали набор TwistAmp (Cambridge TwistDx, Великобритания) согласно рекомендациям производителя. Реакционная смесь содержала 200 мкМ каждого из природных dNTP, а также один из флуоресцентно-меченых нуклеозидтрифосфатов (VI–VIII) в концентрации 8 мкМ для определения кинетики и выхода продукта амплификации. Суммарную концентрацию каждого нуклеозидтрифосфата (VI–VIII) и природного dNTP доводили до 200 мкМ с помощью 2 мМ раствора соответствующего природного dNTP. RPA проводили в течение 40 мин при 40°C.

Полученные ПЦР-продукты разделяли в 4%-ном агарозном геле, выход реакции оценивали по оптической плотности полос в дорожках геля, соответствующих полноразмерному продукту. Визуализацию проводили с помощью системы геледокументации ChemiScope 6200 Touch (Clinx Science Instruments Co., КНР).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы флуоресцентно-меченые нуклеотиды, содержащие цвиттерионный индодикарбоцианиновый краситель, присоединенный через *транс*-алкеновый линкер в положении C5 пиримидинового основания. Изучена их субстратная эффективность в условиях рекомбинантной полимеразной амплификации, в результате проведения которой образовались полноразмерные целевые продукты фрагмента гена *ebpS*

возбудителя бактериальной пневмонии (*Staphylococcus aureus*) с высокой плотностью встраивания флуоресцентной метки. Использование флуоресцентно-меченого цитидинтрифосфата может позволить эффективно проводить ферментативное ДНК-маркирование последовательностей, содержащих GC-богатые участки.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00257).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Donatin E., Drancourt M. // Med. Mal. Infect. 2012. V. 42. P. 453–459. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.07.017>
2. Erdmann V.A., Jurga S., Barciszewski J. // RNA DNA Diagnostics. 2015. P. 259–280. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17305-4_13
3. Huang H.-J., Campana R., Akinfenwa O., Curin M., Sarzsinszky E., Karsonova A., Riabova K., Karaulov A., Niespodziana K., Elisyutina O., Fedenko E., Litovkina A., Smolnikov E., Khaitov M., Vrtala S., Schlederer T., Valenta R. // Front. Immunol. V. 11. P. 594978. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.594978>
4. Erickson D., O'Dell D., Jiang L., Oncescu V., Gumus A., Lee S., Mancuso M., Mehta S. // Lab. Chip. 2014. V. 14. P. 3159–3164. <https://doi.org/10.1039/C4LC00142G>
5. Temiz Y., Lovchik R.D., Kaigala G.V., Delamarche E. // Microelectronic Engineering. 2015. V. 132. P. 156–175. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2014.10.013>
6. Allert R.D., Bruckmaier F., Neuling N.R., Freire-Moschovitis F.A., Liu K.S., Schrepel C., Schätzle P., Knittel P., Hermans M., Bucher D.B. // Lab. Chip. 2022. V. 22. P. 4831–4840. <https://doi.org/10.1039/D2LC00874B>
7. Zhao Y., Chen F., Li Q., Wang L., Fan C. // Chem. Rev. 2015. V. 115. P. 12491–12545. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428>
8. Oliveira B.B., Veigas B., Baptista P.V. // Front. Sens. 2021. V. 2. P. 752600. <https://doi.org/10.3389/fsens.2021.752600>
9. Li J., Macdonald J. // Biosens. Bioelectron. 2015. V. 64. P. 196–211. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.069>
10. Deng H., Gao Z. // Anal. Chim. Acta. 2015. V. 853. P. 30–45. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.09.037>

11. Spitsyn M.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Emelyanova M.A., Guseinov T.O., Lapa S.A., Nasedkina T.V., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Dyes Pigments*. 2017. V. 147. P. 199–210.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.07.052>
12. Tesler J.K., Cruickshank A.L., Morrison E., Netzel T.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1989. V. 111. P. 6966–6976.
<https://doi.org/10.1021/ja00200a011>
13. Gandhi V.V., Samuels D.C. // *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*. 2011. V. 30. P. 317–339.
<https://doi.org/10.1080/15257770.2011.586955>
14. Ikemoto T., Haze A., Hatano H., Kitamoto Y., Ishida M., Nara K. // *Chem. Pharm. Bull.* 1995. V. 43 P. 210–215.
<https://doi.org/10.1248/cpb.43.210>
15. Спицын М.А., Кузнецова В.Е., Шершов В.Е., Лапа С.А., Гусейнов Т.О., Заседателев А.С., Чудинов А.В. // *Биоорг. химия*. 2017. Т. 43. С. 444–448. [Spitsyn M.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Lapa S.A., Guseinov T.O., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 471–475.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162017040136>
16. Zasedateleva O.A., Vasiliskov V.A., Surzhikov S.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Guseinov T.O., Smirnov I.P., Yurasov R.A., Spitsyn M.A., Chudinov A.V. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. e73.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky247>
17. Reddington M.V., Cunningham-Bryant D. // *Tetrahedron Lett.* 2011. V. 52. P. 181–183.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.10.137>

Synthesis of Fluorescent-Labeled Nucleotides for Labeling of Isothermal Amplification Products

V. E. Shershov^{*,#}, S. A. Lapa^{*}, A. I. Levashova^{*}, I. Yu. Shishkin^{*}, G. F. Shtylev^{*}, E. Yu. Shekalova^{*}, V. A. Vasiliskov^{*}, A. S. Zasedatelev^{*}, V. E. Kuznetsova^{*}, and A. V. Chudinov^{*}

[#]Phone: +7 (495) 135-98-00; e-mail: shershov@list.ru

^{*}Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

The synthesis of fluorescently labeled nucleotides containing a zwitterionic indodicarbocyanine dye attached via a *trans*-alkene spacer at the C5 position of the pyrimidine base was carried out, and their substrate efficiency was tested under conditions of recombinase polymerase amplification (RPA). As a result of RPA, the formation of full-sized target products of the *ebpS* gene fragment of the causative agent of bacterial pneumonia (*Staphylococcus aureus*) and a high density of fluorescent label embedding occurred.

Keywords: fluorescently labeled nucleotides, indodicarbocyanine dyes, isothermal amplification, recombinase polymerase reaction