

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МАРКИРОВАНИЯ ДНК ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ БЛИЖНЕГО ИНФРАКРАСНОГО ДИАПАЗОНА

© 2020 г. В.Е.Шершов, А.Ю.Иконникова, В.А.Василисков, С.А.Лапа, Р.А. Мифтахов,
В.Е. Кузнецова, А.В. Чудинов, Т.В. Наседкина

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

E-mail: nased@biochip.ru

Поступила в редакцию 08.07.2020 г.

После доработки 16.07.2020 г.

Принята к публикации 17.07.2020 г.

Исследована эффективность маркирования ДНК производными 5'-трифосфатов 2'-дезоксисуридина, содержащих цианиновый краситель Су7 в качестве флуорофора. Два флуоресцентно-меченых аналога Су7-dUTP различались химическим строением линкера, соединяющего нуклеотид с флуорофором. Эффективность полимеразной цепной реакции и ингибирование модифицированными нуклеотидами исследовали методом ПЦР в реальном времени. Эффективность включения маркированных нуклеотидов в продукты ПЦР оценивали методом количественного электрофореза. Эффективность маркирования ДНК-мишени оценивали по связыванию флуоресцентно-меченых продуктов ПЦР с матрицей олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных в гидрогелевых ячейках биологического микрочипа (биочипа) с регистрацией результатов в ближнем инфракрасном диапазоне методом цифровой люминесцентной микроскопии. Показано, что увеличение длины линкера приводит к более эффективному встраиванию маркированного нуклеотида. Тем не менее оба соединения обеспечивали высокую чувствительность и специфичность анализа ДНК с использованием аллель-специфичной гибридизации на биочипе.

Ключевые слова: флуоресценция, модифицированные нуклеотиды, цианиновые красители ближнего ИК-диапазона, ПЦР в реальном времени, эффективность ПЦР, биологические микрочипы, аллель-специфичная гибридизация.

DOI: 10.31857/S0006302920050038

При исследовании биологически активных макромолекул используют разные форматы проведения анализа. Один из таких форматов основан на регистрации результатов анализов, проведенных на поверхности твердой подложки с использованием микроколичеств исследуемого вещества [1–3]. Для визуализации результатов широко используют флуоресцентные красители, которыми маркируют макромолекулы, участвующие в процедуре анализа. Наиболее часто используемые красители флуоресцируют в видимой области спектра, где существенная фоновая флуоресценция компонентов анализа может вызвать значительные помехи. Использование красителей Су5 с флуоресценцией в области 650–670 нм способствует снижению фоновой флуоресценции [4, 5]. В ближней инфракрасной области 750–1000 нм, также известной как «биологическое ок-

но», фоновая флуоресценция потенциально может быть еще ниже [6, 7]. Среди органических красителей большой интерес представляют индотрикарбоцианиновые красители, аналоги Су7 с максимумами поглощения и флуоресценции в ближней инфракрасной области. Эти красители достаточно стабильны в условиях проведения молекулярно-биологического анализа и обладают высокими коэффициентами молярной экстинкции и высокими квантовыми выходами флуоресценции [8–10].

ДНК-полимеразы могут воспринимать дезоксиуридинтрифосфаты, маркированные цианиновыми красителями, в качестве субстратов и встраивать флуоресцентно-меченые нуклеотиды в синтезируемую *de novo* цепь ДНК в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) [1–3]. Ранее было показано, что флуоресцентно-меченые аналоги Су5-dUTP, различающиеся структурой цианинового флуорофора, а также химическим строением линкера, соединяющего нуклеотид с флуорофо-

Сокращения: ПЦР – полимеразная цепная реакция, Су7-dUTP и Су5-dUTP – флуоресцентно-меченые аналоги 5'-трифосфат-2'-дезоксисуридина.

ром, влияют на взаимодействие с ДНК-полимеразой и соответственно на встраивание модифицированных нуклеотидов в ДНК [4, 5, 9].

В настоящей работе исследована эффективность флуоресцентного маркирования синтезируемой *de novo* ДНК в ходе ПЦР с помощью флуоресцентно-меченых 5'-трифосфатов 2'-дезоксиуридина, содержащих индотрикарбо-цианиновый аналог Cy7, в зависимости от химического строения линкера, соединяющего флуорофор и маркированный нуклеотид. Для проведения ПЦР использовали две коммерческие Taq-полимеразы с горячим стартом. Для оценки факторов, влияющих на эффективность флуоресцентного маркирования ДНК, использовали комплексный подход, который ранее был разработан на примере аналогов Cy5-dUTP [5]. Ингибирование ПЦР нуклеотидами, маркированными флуоресцентной меткой, исследовали методом ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green. Эффективность включения маркированных нуклеотидов в продукты ПЦР оценивали на основании количественного анализа электрофореграмм по каналам SYBR Green I и Cy7. Общую эффективность маркирования ДНК оценивали по связыванию флуоресцентно-меченых продуктов ПЦР с набором олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных в гидрогелевых ячейках биочипа с регистрацией результатов в ближнем инфракрасном диапазоне методом цифровой люминесцентной микроскопии. Комбинация этих методов позволила провести сравнительную оценку маркированных нуклеотидов и выбрать оптимальные варианты, обеспечивающие высокую чувствительность и специфичность анализа ДНК методом гибридизации с иммобилизованными олигонуклеотидами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови человека с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. В качестве мишени для амплификации использовали участок гена *CDYL2*, содержащий полиморфизм rs13329835 A>G. Были использованы следующие праймеры: *CDYL2_F* – 5'-CCAGTGAGGCCAGTACCATCATTT-3' (Forward primer) и *CDYL2_R* – 5'-TCATTGGATCTCAT-TACTGGTGGTGGAGCTTTGGGTAT-3' (Reverse primer). Размер продукта составлял 113 п.о. Последовательность обратного праймера включала локус-специфичную часть и адаптер (малые прописные), что позволяло асимметрично нарабатывать ПЦР-продукт в ходе одноэтапной ПЦР для последующей гибридизации на биочипе.

Влияние различных Cy7-dUTP на прохождение ПЦР исследовали с помощью ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего

красителя EvaGreen. Использовали две коммерчески доступные полимеразы с горячим стартом: SynTaq ДНК-полимераза («Синтол», Россия) и Hot Start Taq ДНК-полимераза («СибЭнзим», Россия). Состав реакционной смеси: 5 мкг ДНК, дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) в концентрации 200 мкМ каждый, 1×ПЦР буфер (SynTaq и Hot Start Taq, соответственно), 1,5 мМ MgCl₂, праймеры в концентрации 300 нМ, 1×EvaGreen (Biotium, США) и 0.75 ед. активности полимеразы на реакцию. Также в реакцию добавляли один из двух Cy7-dUTP (dU83, dU84) в концентрации 20, 8 и 4 мкМ. Реакцию проводили на приборе Light-Cycler 96 (Roche, Швейцария) по следующей программе: 94°C – 4 мин, 45 циклов (94°C – 15 с, 62°C – 30 с, 72°C – 30 с) с детекцией флуоресценции по каналу ResoLight.

Для оценки показателя динамики ПЦР в реальном времени использовали скорость амплификации, рассчитанную по тангенсу угла наклона линейного участка кривой накопления флуоресцентного сигнала ($\text{tg}\alpha$) [5], которую нормировали на скорость ПЦР без добавления модифицированных нуклеотидов.

Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2%-м агарозном геле и проводили детекцию по каналу SYBR Green I с помощью системы геледокументирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США) и по каналу Cy7 с использованием исследовательского анализатора гелей. Анализатор гелей имел поле регистрации 15 × 15 см, был снабжен ртутной лампой и встроенным прибором с зарядовой связью RTE/CCD-1536-K/1 (Roper Scientific, Sarasota, США). Возбуждение флуоресценции проводили на длинах волны 615–645 нм, флуоресценцентные сигналы регистрировали в диапазоне пропускания 810–830 нм.

Электрофореграммы анализировали с помощью программы Image1. Эффективность встраивания (*Eff*) исследуемых Cy7-dUTP определяли как долю флуоресцентно-меченого продукта в общем количестве наработанного продукта: $Eff = I_{Cy7} / (I_{SG} \cdot Q_{Cy7} \cdot \epsilon_{Cy7})$, т.е. как отношение суммарной интенсивности сигналов по каналу Cy7 ($I_{Cy7} = S \cdot I_{\text{средн}}$, где S – площадь, занимаемая флуоресцентно-меченым продуктом, $I_{\text{средн}}$ – среднее локальное значение флуоресценции ПЦР-продукта) к интенсивности сигналов по каналу SYBR Green I ($I_{SG} = S \cdot I_{\text{средн}}$), с учетом квантового выхода (Q_{Cy7}) и коэффициента молярной экстинкции (ϵ_{Cy7}).

Для проведения аллель-специфичной гибридизации с флуоресцентно-меченым ПЦР-продуктом использовали иммобилизованные олигонуклеотиды, позволяющие определять два аллеля гена *CDYL* (аллель А и аллель G). В ячейках биочипа были им-

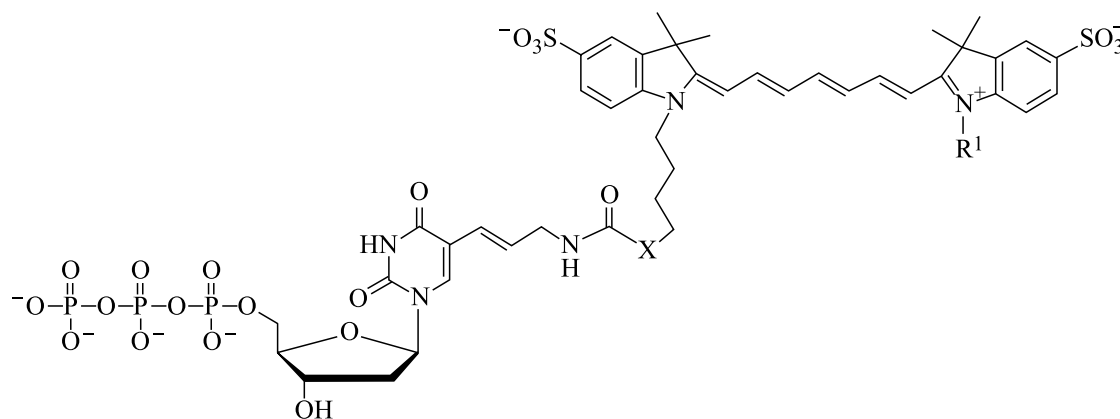


Рис. 1. Химическое строение изученных аналогов Су7.

мобилизованы ДНК-зонды 5'-СТААТАGGCACA-GAGAGATC-NH2-3' (CDYL2_A) и 5'-СТААТАGG-CGAGAGAGAT-NH2-3' (CDYL2_G), ячейки на чипе продублированы.

В состав реакции входили 1×ПЦР буфер, 4 мМ MgCl₂, 0.2 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 2.5 ед. полимеразы SnpTaq («Синтол», Россия), по 1 пМ locus-специфичных праймеров, 100 пМ универсального праймера 5'-ТСАТТGGATСТСАТТА-3', 10 нг ДНК и исследуемые Су7-dUTP в концентрациях 20, 8, 4 и 2 мкМ. Гибридизацию на биочипе осуществляли в смеси, содержащей 25% формамида, 5×SSPE, 50 об. % ПЦР-продукта, в течение 6–8 ч при 37°C, после инкубации биочип промывали и высушивали. Флуоресцентные сигналы регистрировали на портативном цифровом люминесцентном микроскопе, с возбуждением в области 615–645 нм и регистрацией флуоресцентных сигналов в диапазоне пропускания 810–830 нм. Изображения анализировали с помощью программы ImaGeWare (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия).

Использовали образцы ДНК с известными генотипами по локусу CDYL2 rs13329835: гомозигота А/А, гетерозигота А/Г и гомозигота Г/Г. Для определения эффективности маркирования ПЦР-продукта оценивали среднее значение интенсивности флуоресцентного сигнала от совершенных дуплексов. Дискриминационные отно-

шения (ДО) рассчитывали по формуле $ДО = \Sigma IA / \Sigma IG$, где ΣIA – сумма значений сигналов ячеек с иммобилизованными олигонуклеотидами CDYL2_A, ΣIG – сумма значений сигналов ячеек с иммобилизованными олигонуклеотидами CDYL2_G.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали два производных 5'-трифосфат-2'-дезоксиуридина, связанных по 5'-положению с цвитерионными индотрикарбоцианиновыми красителями (аналогами Су7) и имеющих линкеры различного химического строения. Цвитерионное строение красителя обеспечивает его высокую гидрофильность и уменьшает неспецифическое связывание с ДНК и ДНК-полимеразой, а также влияет на суммарный электрический заряд красителя. В данном исследовании оба соединения имели суммарный нейтральный заряд [6, 11, 12]. Модификация урацила по 5'-положению через транс-алкеновую связь направляет модифицирующую группу в широкую бороздку двунитевой ДНК, а протяженный линкер отдаляет флуорофор от нуклеотида. Структурная формула исследованных флуоресцентно-меченых производных дезоксиуридинтрифосфата приведена на рис. 1, их оптические характеристики представлены в таблице.

В качестве мишени использовали последовательность гена CDYL2, содержащую полимор-

Оптические характеристики исследованных флуоресцентно-меченых производных дезоксиуридинтрифосфата

Сокращенное наименование	Заместитель флуорофора R ¹	Фрагмент линкера X	$\epsilon \cdot 10^{-5}, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}, \text{nm}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}, \text{nm}$	Квантовый выход Q, %
dU83	$-(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	$-\text{CH}_2-$	1,95	744	767	27
dU84	$-(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	$(\text{CH}_2)_5\text{NHCOCH}_2-$	1,99	744	767	29

Примечание. Измерения проведены в фосфатно-солевом буфере (0.15 М NaCl, 10 мМ калий-фосфат, pH 7.4).

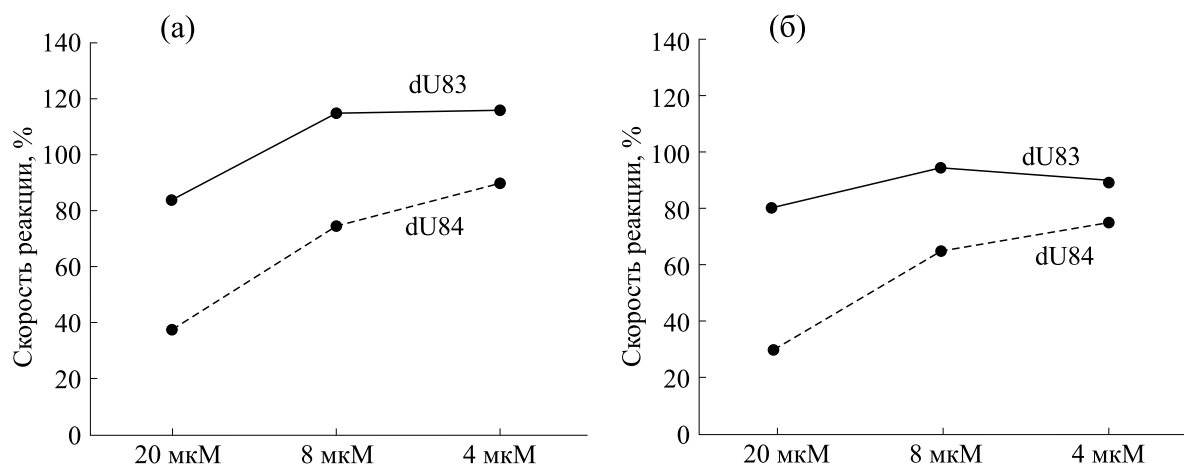


Рис. 2. Ингибирование полимеразной цепной реакции в зависимости от концентрации Cy7-dUTP. По оси y – скорость реакции в присутствии Cy7-dUTP, нормированная на скорость реакции без добавления модифицированного нуклеотида: (а) – ПЦР с полимеразой SynTaq, (б) – ПЦР с полимеразой Hot Start Taq. По оси абсцисс – концентрация Cy7-dUTP.

физм rs13329835 A>G. Белок CDYL2 играет важную роль в развитии опухолевых клеток (рост, метастазирование, пластичность), в т.ч. при раке молочной железы. Также показана роль полиморфизма rs13329835 в повышении риска развития рака молочной железы [13].

Влияние Cy-7-dUTP на скорость амплификации изучали методом ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя EvaGreen, который встраивается в образующуюся в процессе реакции двухцепочечную ДНК и начинает флуоресцировать. Каждый из исследуемых Cy7-dUTP добавляли в трех концентрациях: 20, 8 и 4 мкМ. В реакции использовали две коммерческие Taq-полимеразы – SynTaq и Hot Start Taq. Результаты представлены на рис. 2. Видно, что в случае обеих полимераз добавление любого из Cy7-dUTP в концентрации 4 или 8 мкМ практически не приводит к снижению скорости реакции. Эффект ингибирования проявляется в присутствии 20 мкМ Cy7-dUTP, однако он выражен в разной степени для двух различных производных. Наименьшее влияние оказывал dUCy83, а в случае dU84 наблюдали заметное снижение скорости реакции (более чем в два раза).

Способность изучаемых модифицированных нуклеотидов встраиваться в ДНК в ходе ПЦР оценивали на основании количественного анализа электрофореграмм, полученных для продуктов ПЦР в реальном времени, по каналам SYBR Green I и Cy7 (рис. 3).

Эффективность встраивания маркированных нуклеотидов Taq-полимеразами определяли по отношению количества флуоресцентно-меченого продукта (определен на канале Cy7) к общему количеству наработанного в реакции полноразмерного продукта (определен на канале SYBR

Green I) с учетом спектральных характеристик красителей: квантового выхода Q и коэффициента молярной экстинкции ϵ . Следует отметить, что оба производных близки по своим спектральным характеристикам (см. таблицу).

Результаты анализа электрофореграмм для полимераз SynTaq и Hot Start Taq представлены на рис. 4. Эффективность встраивания маркированных нуклеотидов в растущую цепь ДНК возрастает с ростом концентрации маркированных трифосфатов: 4 мкМ < 8 мкМ < 20 мкМ.

Для соединения dU84 наблюдается заметное увеличение встраивания маркированных нуклеотидов по сравнению с dU83, что связано с удлинением линкера, соединяющего флуорофор с нуклеиновым основанием. Аналогичная картина была получена ранее для красителей Cy5 и Cy3 [9].

Ранее было показано, что в ряду трифосфатов с электронейтральными красителями эффективность встраивания маркированных нуклеотидов несколько выше для цвитерионных красителей на протяженном линкере, эта же закономерность выявлена нами для соединений Cy7-dUTP [8, 9, 14]. Таким образом, в ряду исследованных маркированных трифосфатов наиболее эффективно встраиваются в растущую цепь ДНК соединения с цвитерионным красителем на более протяженном линкере и с суммарным электронейтральным зарядом (dU84). Такая картина воспроизводима в случае обеих полимераз – SynTaq и Hot Start Taq.

Общую эффективность маркирования ДНК оценивали при связывании флуоресцентно-меченых продуктов ПЦР с матрицей олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных в гидрогелевых ячейках биочипа с измерением интенсивности флуоресценции красителей в составе ДНК-дуплексов. На интенсивность флуоресцентных

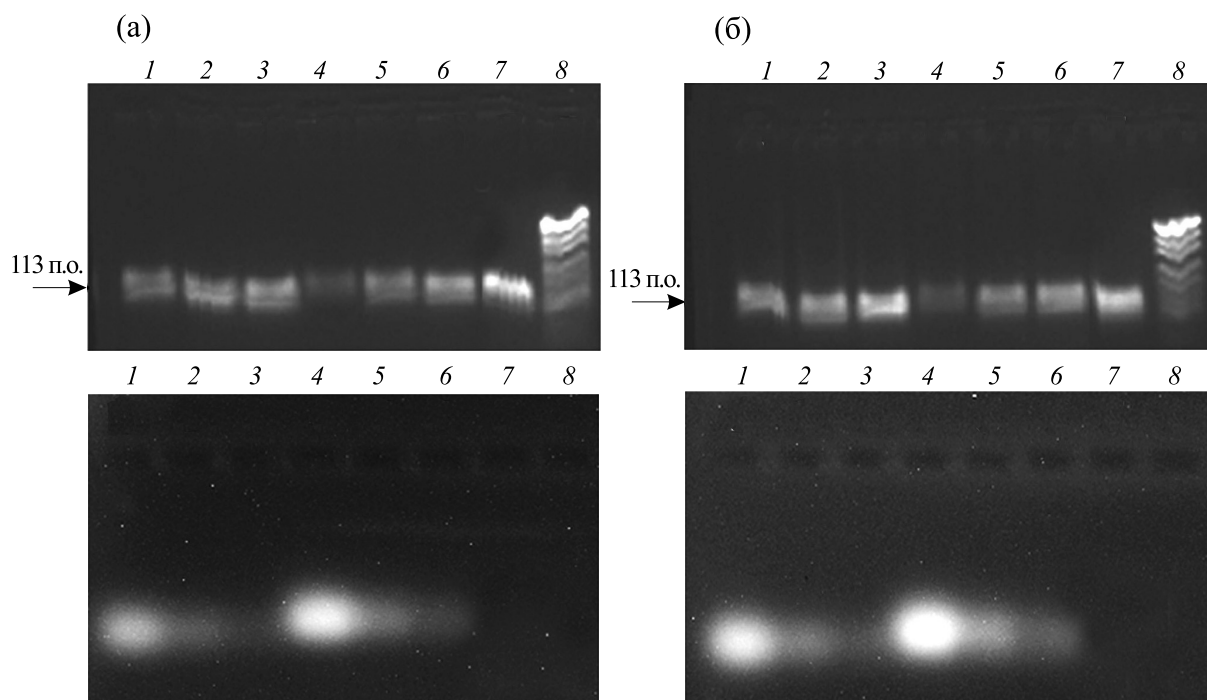


Рис. 3. – Электрофореграммы ПЦР-продуктов, полученных в реакции с полимеразы SynTaq (а) и Hot Start Taq (б). Вверху – детекция по каналу SYBR Green, внизу – по каналу Cy7. 1, 2, 3 – dU83; 4, 5, 6 – dU84; в концентрациях 20, 8 и 4 мкМ каждый соответственно; 7 – продукт ПЦР без модифицированного нуклеотида; 8 – маркер длины фрагментов PUC19.

сигналов помимо эффективности встраивания маркированных нуклеотидов в анализируемую ДНК-мишень влияет яркость флуоресценции красителей. Кроме того, красители, связанные с ДНК-мишенью, могут влиять на константу связывания с комплементарным зондом, неспецифически связываясь с некомплементарными

зондами и элементами биочипа. Также имеет значение количество наработанного продукта при проведении ПЦР. Поэтому общая эффективность маркирования ДНК, определяемая по результатам гибридационного анализа продуктов ПЦР, является интегральной величиной, которая, собственно, и представляет интерес.

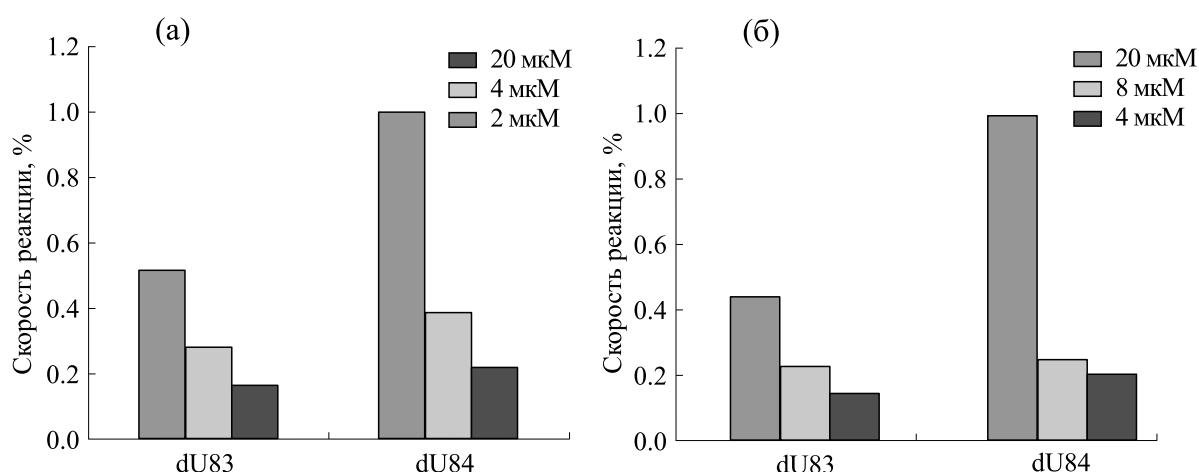


Рис. 4. Результаты количественного определения эффективности встраивания модифицированных нуклеотидов для двух полимераз: SynTaq (а) и Hot Start Taq (б). По оси ординат – нормированное значение эффективности встраивания (эффективность встраивания в процентном отношении к максимальному значению для dU84), по оси абсцисс – различные соединения Cy7-dUTP в концентрациях 20, 8 и 4 мкМ соответственно.

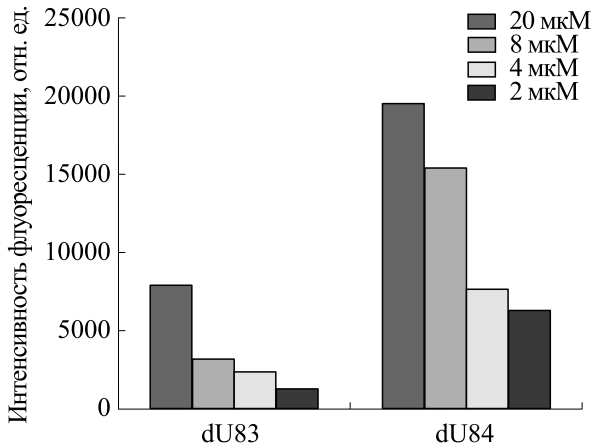


Рис. 5. Результаты гибридационного анализа. По оси ординат – интенсивность флуоресцентного сигнала от совершенных дуплексов. По оси абсцисс – различные соединения Cy7-dUTP в концентрациях 20, 8, 4 и 2 мкМ соответственно.

Эффективность флуоресцентного маркирования ДНК трифосфатами Cy7-dUTP в ходе ПЦР с полимеразой SynTaq, определенная по результа-

там гибридационного анализа, представлена на рис. 5. Для полимеразы Hot Start Taq были получены аналогичные результаты.

Интенсивность флуоресцентных сигналов для обоих Cy7-dUTP возрастает с ростом концентрации маркированных трифосфатов в ПЦР смеси: $2 \text{ мкМ} < 4 \text{ мкМ} < 20 \text{ мкМ}$ (рис. 5) и коррелирует с эффективностью встраивания модифицированных нуклеотидов в ДНК (см. рис. 4). Это означает, что цвтерсионные красители Cy7 как таковые не влияют на эффективность гибридационного анализа ДНК.

При сравнении картин гибридации для dU83 и dU84 наблюдается увеличение интенсивности флуоресцентных сигналов в ряду $dU83 < dU84$ (рис. 5), что также коррелирует с эффективностью встраивания модифицированных нуклеотидов в ДНК (см. рис. 4). Таким образом, для исследованных маркированных трифосфатов интенсивность флуоресцентных сигналов при проведении гибридационного анализа выше для цвтерсионного соединения с более протяженным линкером при суммарном электронейтральном заряде (рис. 5).

Примеры гибридационных картин представлены на рис. 6а. Как видно, для гомозигот A/A и G/G сигналы от совершенных дуплексов заметно превышают сигналы от несовершенных дуплексов. При гетерозиготном генотипе A/G происходит эффективное связывание с ячейками биочипа, содержащими олигонуклеотиды, комплементарные обоим аллелям. Также было рассчитано дискриминационное отношение для всех трех вариантов генотипа: гомозигот «дикого типа», гетерозигот и гомозигот по «мутации». В случае обоих маркированных трифосфатов полученные значения дискриминационных отношений позволяют достоверно разделить все три генотипа – A/A, A/G и G/G – как в случае dU84, так и в случае dU83 (рис. 6б).

Следует отметить, что даже при минимальных концентрациях Cy7-dUTP (2 мкМ) наблюдается достаточно высокий уровень флуоресцентных сигналов. Одной из проблем при использовании цвтерсионных красителей является их невысокая химическая стабильность и низкий квантовый выход [15, 16]. Исследованные нами производные 5'-трифосфат-2'-дезоксисуридина (аналоги Cy7-dUTP) демонстрируют высокую стабильность и высокий выход флуоресценции, эффективное включение флуоресцентно-меченых нуклеотидов в растущую цепь ДНК с SynTaq и Hot Start Taq ДНК-полимеразами и, таким образом, обеспечивают высокую чувствительность и специфичность анализа ДНК при гибридации с иммобилизованными олигонуклеотидами. Тот факт, что выявленные закономерности воспроизводятся при использовании двух различных

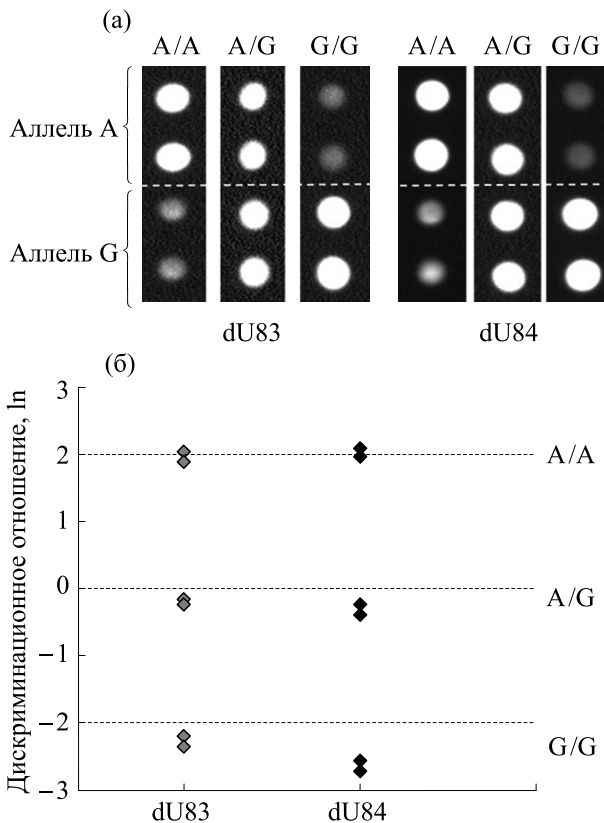


Рис. 6. Результаты гибридационного анализа на биологическом микрочипе при концентрации 2 мкМ Cy7-dUTP (dU83 или dU84) в одноаундовой ПЦР: (а) – картины распределения флуоресцентных сигналов; (б) – дискриминационные отношения для трех генотипов (A/A, A/G, G/G соответственно).

Тақ ДНК-полимераз, тажже подтврждает досто-
верность полученных данных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке
Федеральной целевой программы «Исследования
и разработки по приоритетным направлениям
развития научно-технологического комплекса
России на 2014–2020 годы» (соглашение
№ 05.604.21.0234, уникальный идентификатор
проекта RFMEFI60419X0234).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания ка-
ких-либо исследований с использованием людей
и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Т. В. Наседкина, О. Е. Громыко, М. А. Емельянова
и др., Молекуляр. биология **48** (2), 2014.
2. Д. О. Фесенко, И. С.Абрамов, В. Е. Шершов и др.,
Молекуляр. биология **52** (6), 997 (2018).
3. М. Emelyanova, L. Ghukasyan, I. Abramov, et al., On-
cotarget **8** (32), 52304 (2017).
4. В. Е. Шершов, В. Е. Кузнецова, Ю. П. Лысов и др.,
Биофизика **60** (6), 1216 (2015).
5. Т. С. Лисица, В. Е. Шершов, М. А. Спицын и др.,
Биофизика **62** (3), 464 (2017).
6. V. E. Kuznetsova, M. A. Spitsyn, V. E. Shershov, et al.,
Mendeleev Commun. **26**, 95 (2016).
7. М. А. Спицын, В. Е. Кузнецова, В. Е. Шершов
и др., Биооргани. химия **43** (4), 444 (2017).
8. М. А. Spitsyn, V. E. Kuznetsova, V. E. Shershov, et al.,
Dyes and Pigments **147**, 199 (2017).
9. О. А. Zasedateleva, V. A. Vasiliskov, S. A. Surzhikov,
et al., Nucl. Acids Res. **46**, e732018 (2018).
10. Д. О. Фесенко, Т. О. Гусейнов, С. А. Лапа и др. Мо-
лекуляр. биология **52** (3), 533 (2018).
11. P. J. Finn, L. Sun, S. Nampalli, et al., Nucl. Acids Res.
30 (13), 2877e85 (2002).
12. K. Sato, A. P. Gorka, T. Nagaya, et al., Bioconjug.
Chem. **27** (2), 404e13 (2016).
13. Y. Hamdi, M. B. Rekaya, S. Jingxuan, et al., BMC
Cancer **18** (1), 1295 (2018).
14. V. E. Shershov, V. E. Kuznetsova, S. A. Lapa, et al.,
Mendeleev Commun. **27**, 360 (2017).
15. P. L. Southwick, L. A. Ernst, E. W. Tauriello, et al., Cy-
tometry **11**, 418e30 (1990).
16. O. Mader, K. Reiner, H. I. Egelhaaf, et al., Bioconjug.
Chem. **15**, 70e8 (2004).

Study of the Efficiency of DNA Labelling Using Near Infrared Fluorescent Dyes

V.E. Shershov, A.Yu. Ikonnikova, V.A. Vasiliskov, S.A. Lapa, R.A. Miftakhov, V.E. Kuznetsova,
A.V. Chudinov, and T.V. Nasedkina

Engelhard Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

The efficiency of DNA labelling with derivatives of 2'-deoxyuridine-5'-triphosphates, containing Cy7 cy-
anine dye as a fluorophore, was assessed. The two fluorescent Cy7l abeled dUTP analogues were distin-
guished from one another by the chemical structure of the linker used to connect the fluorophore to the nu-
cleotide. The efficiency of polymerase chain reaction and inhibition by modified nucleotides were investigat-
ed by real-time PCR. The efficiency of incorporation of labeled nucleotides into PCR products was evaluated
by quantitative electrophoresis. The efficiency of target DNA labelling was evaluated by binding of fluores-
cence-labeled PCR products to a matrix of oligonucleotide probes immobilized in hydrogel drops of biolog-
ical microarray (biochip) with near infrared hybridization results recorded by digital luminescent microscopy.
The increase of the linker length has been shown to result in more efficient incorporation of the labeled nu-
cleotide. However, both compounds provided high sensitivity and specificity of DNA analysis using allele-
specific hybridization on a biochip.

*Keywords: fluorescence, modified nucleotides, near infrared cyanine dyes, real-time PCR, PCR efficiency, biolog-
ical microarray, allele-specific hybridization*